

Aus
dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Gudermann

und dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, München
Leiter: Prof. Dr. Steinritz

***In vitro und ex vivo Modelle zur Aufklärung von Pathomechanismen toxischer
Verbindungen***

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Pharmakologie und Toxikologie
vorgelegt von
Dr. med. Niko Amend
2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Entwicklung und Charakterisierung von ex vivo Modellen	6
2.1. Die Nutzung von <i>precision-cut kidney slices</i> (PCKS) zur Charakterisierung der Pathophysiologie der Nierenschädigung durch Organophosphate (Hoeffner et al., 2024b; Hoeffner et al., 2024a)	6
2.2. Die Verwendung eines ex vivo Rattenmodells für die Untersuchung von Bispyridiniumverbindungen zur Wiederherstellung der neuromuskulären Transmission nach Nervenkampfstoffvergiftung (Amend et al., 2024c, 2024b)	9
2.3. Ein ex vivo Dünndarmmodell und <i>in vitro</i> rezeptorpharmakologische Untersuchungen zur Charakterisierung hochpotenter Opioidrezeptor Agonisten und Antagonisten (Amend et al., 2023b; Endt et al., 2025)	13
2.4. Die Verwendung eines ex vivo Hautmodells zur Untersuchung von Dekontaminationslösungen (Schwab et al., 2025)	16
3. Entwicklung und Charakterisierung von <i>in vitro</i> Modellen	20
3.1. Microelectrode array Systeme als <i>in vitro</i> Modelle zur Untersuchung der Kardiotoxizität hochtoxischer Verbindungen (Amend et al., 2019; Amend et al., 2021)	20
3.2. <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Hepatotoxizität von Organophosphaten (Horn et al., 2024a; Horn et al., 2024b)	24
3.3. Organ-on-a-Chip – Chancen und Limitationen für die Untersuchung von Organophosphaten (Amend et al., 2023a; Amend et al., 2024a)	26
4. Entwicklung und Charakterisierung translationaler Modelle (Marquart et al., 2019; Amend et al., 2020b; Amend et al., 2020a)	32
5. Zusammenfassung und Ausblick	36
Literaturverzeichnis	39
6. Danksagung	42

1. Einleitung

Vergiftungen mit toxischen Verbindungen sind insbesondere in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen eine Herausforderung für die dortigen Gesundheitssysteme. Die Gruppe der Organophosphate unterteilt sich grundsätzlich in Pestizide und Nervenkampfstoffe. Organophosphat-Pestizide sind im Rahmen von akzidentiellen Einnahmen oder auch Suiziden für weltweit über 100.000 Tote pro Jahr verantwortlich (Mew et al., 2017). Obwohl sehr toxische Organophosphate, wie Parathion mittlerweile weltweit kaum noch legal verwendet werden dürfen, nehmen die schweren Vergiftungen mit Organophosphaten insgesamt nur langsam ab (Mew et al., 2017). Organophosphat-Pestizide werden seit vielen Dekaden eingesetzt. Dennoch sind Teile der Pathophysiologie der Intoxikation weiterhin unverstanden. Exemplarisch seien hier die hepatotoxischen Auswirkungen nach Exposition gegenüber den Modellsubstanzen Parathion und Paraoxon genannt (Horn et al., 2024a).

Weiterhin stellen Nervenkampfstoffe aus der Gruppe der Organophosphate trotz Ächtung durch das Chemiewaffenübereinkommen (CWÜ) ein hohes Risiko für die Zivilbevölkerung dar. Nicht erst der Einsatz von Sarin im Jahr 2013 und 2017 in Syrien, sondern auch das Attentat auf Kim Jong-Nam im Jahr 2017 in Malaysia, die Vergiftungen von Sergei Skripal im Jahr 2018 in Großbritannien und Alexei Navalny im Jahr 2020 in Russland zeigen, dass Vergiftungen durch Nervenkampfstoffe von aktueller Relevanz sind (Berlinger J., 2017; John et al., 2018; Vale et al., 2018; Amend et al., 2020b; Steindl et al., 2021). Nach Exposition gegenüber Organophosphaten, seien es Pestizide oder Nervenkampfstoffe, wird das lebenswichtige Enzym Acetylcholinesterase (AChE) über eine kovalente Bindung an das Serin im aktiven Zentrum gehemmt (Holmstedt, 1959; Marrs, 2007). Dies führt zu einer Akkumulation des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) in cholinergen Synapsen (Abb. 1).

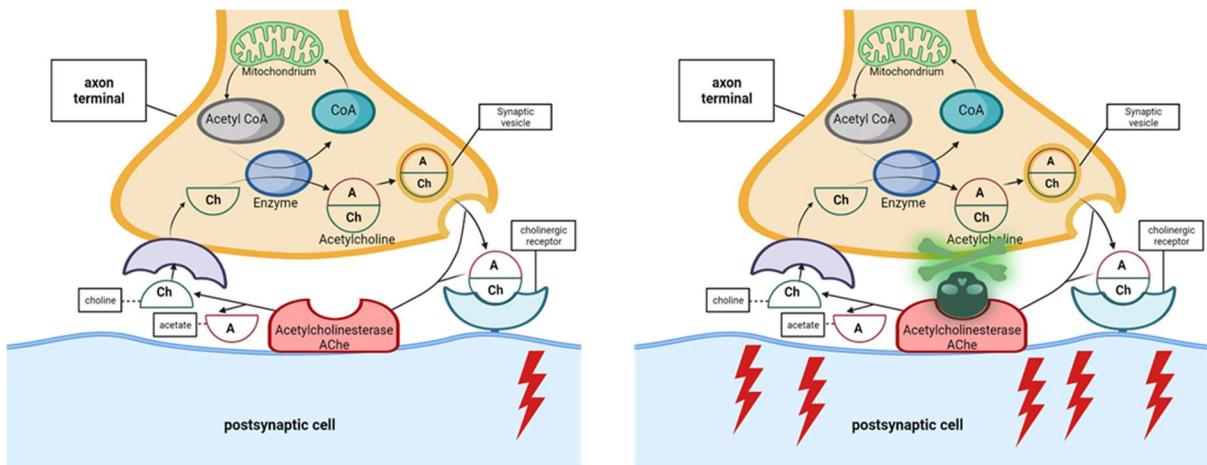


Abb. 1: Darstellung der Physiologie (links) und Pathophysiologie (rechts) im synaptischen Spalt in Hinblick auf die ungehemmte (links) bzw. gehemmte (rechts) Acetylcholinesterase. Created with BioRender.com.

Daraus kann sich wiederum eine cholinerge Krise entwickeln, die muskarinerge und nikotinerge Symptome aufweist. Zu den muskarinergen Symptomen gehören Salivation, Lakrimation, Urin- und Stuhlabgänge und Erbrechen. Die nikotinerge Überstimulation kann u.a. zu Muskelschwäche, oder Muskellähmung führen. Ist die Atemmuskulatur betroffen, kann dies mit einer sehr hohen Letalität einhergehen (Amend et al., 2020a). Die Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems (ZNS) z.B. in Form von epileptischen Anfällen, ist sowohl durch muskarinerge, als auch durch nikotinerge Überstimulation bedingt (Kwong, 2002). Im Verlauf der Vergiftung kann gehemmte AChE spontan oder gezielt über die Gabe eines Oxims reaktiviert werden, oder einem Alterungsprozess durch Abspaltung einer Alkylgruppe unterliegen, der das Enzym dann permanent inaktiviert (Kwong, 2002; Sirin et al., 2012). Gegenwärtig können die muskarinergen Symptome durch Verabreichung eines Antagonisten (z.B. Atropin) am muskarinergen Acetylcholinrezeptor (AChR) adressiert werden. Die nikotinergen Symptome können nur indirekt über ein Oxim behandelt werden: Das jeweilige Oxim reaktiviert gehemmte AChE und stellt somit deren Funktion wieder her. Hierbei existieren zahlreiche Herausforderungen, da nicht alle Nervenkampfstoffe (z.B. Tabun) durch die aktuell zugelassenen Oxime reaktiviert werden können (Worek et al., 2016). Weiterhin ist die Penetration in das ZNS bei den zugelassenen Oximen aufgrund der permanenten kationischen Ladung oftmals nicht gegeben. Hiermit wird deutlich, dass weitere Anstrengungen zur Entwicklung geeigneter Oxime und v.a. von Substanzen, die direkt am nikotinergen AChR wirken, notwendig sind.

Weitere hochtoxische Verbindungen, die im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen, sind Glykoside. Es handelt sich um pflanzliche Verbindungen, die aufgrund der hohen Toxizität bei gleichzeitig bestehender einfacher Verfügbarkeit, eine erhebliche Gefährdung vulnerabler Gruppen (z.B. von Kindern) darstellen. Exemplarisch sei hier auf die Glykoside aus *Nerium oleander* und *Thevetia peruviana* hingewiesen, die eine sehr hohe Toxizität aufweisen (Amend et al., 2021). Obwohl sich mit diesen toxischen Verbindungen jedes Jahr zahlreiche Personen vergiften, ist die Pathophysiologie der Vergiftung nicht zur Gänze geklärt. Die kardiotoxischen Auswirkungen insbesondere des Oleandrins, einem der Hauptvertreter der Glykoside aus *N. Oleander*, bedarf weiterer Forschung. Dies stellt die Entwicklung von Antidotien vor erhebliche Herausforderungen.

Schließlich stellen Opioide eine weitere Gruppe toxischer Stoffe dar, die im Rahmen der Arbeit untersucht werden. Mit der „Opioidkrise“ in den Vereinigten Staaten von Amerika ist nun auch ein Land mit hohem Einkommen durch Vergiftungen mit hochtoxischen Substanzen bedroht. Obwohl die physiologischen Wirkungen der Opioide seit Jahrzehnten erforscht werden, können Modelloptimierungen das Verständnis, insbesondere der Pathophysiologie der Vergiftung mit hochpotenten Opioiden, weiter ergänzen.

Grundlegend wird die aktuelle Arbeit zur Aufklärung von Pathomechanismen toxischer Verbindungen zunächst verschiedene *ex vivo* Modelle unter dem Gesichtspunkt der Modellentwicklung betrachten. Im zweiten Teil werden *in vitro* Modelle bis hin zu komplexen Organ-on-a-Chip Systemen verwendet, um weitere mechanistische Einblicke in Schädigungsmechanismen v.a. von Organophosphaten zu erlangen. Der dritte Teil der Arbeit stellt den translationalen Ansatz der untersuchten Modelle in den Fokus. Hier gilt es zu zeigen, inwiefern untersuchte *in vitro* Modelle zu einer Verbesserung der klinischen Versorgung vergifteter Patienten beitragen können. Das tiefgreifende Verständnis der Pathophysiologie der Vergiftung mit hochtoxischen Verbindungen stellt den Fokus der wissenschaftlichen Betrachtungen dar.

2. Entwicklung und Charakterisierung von *ex vivo* Modellen

2.1. Die Nutzung von *precision-cut kidney slices* (PCKS) zur Charakterisierung der Pathophysiologie der Nierenschädigung durch Organophosphate (Hoeffner et al., 2024b; Hoeffner et al., 2024a).

Precision-cut tissue slices (PCTS) werden seit vielen Jahrzehnten in der Forschung verwendet, um als Brücke zwischen *in vivo* und *in vitro* Modellsystemen zu dienen. Dabei können PCTS Aussagen zur Pharmakologie und Toxikologie verschiedener Modellsubstanzen erlauben. Im Sinne des 3R Prinzips von Russel und Burch (Russell and Burch, 1959) (Tierversuche zu ersetzen, die Zahl der Versuchstiere zu reduzieren und die Versuche für die Tiere so wenig belastend wie möglich zu gestalten), können Versuchstierzahlen deutlich reduziert werden und ggf. *in vivo* Versuche zumindest anteilig ersetzt werden.

PCKS werden seit vielen Jahren für ein tiefergreifendes Verständnis toxischer Nierenschädigungen verwendet. Bei der Vergiftung mit Organophosphaten hatte bislang die Nierenschädigung nur einen untergeordneten Stellenwert. Dies mag daran gelegen haben, dass bei der akuten Vergiftung insbesondere akut lebensbedrohliche Folgen, wie z.B. die respiratorische Insuffizienz, oder auch epileptische Anfälle im Fokus standen. Für ein tiefergreifendes Verständnis der Pathophysiologie der Vergiftung mit Organophosphaten scheint es aber angezeigt zu sein, auch die im klinischen Setting auftretende Nierenschädigung aufzuklären (Abend et al., 1994; Cavari et al., 2013). Dies könnte perspektivisch auch für chronische Nierenschädigungen relevant sein, z.B. nach einer überlebten akuten Intoxikation.

PCKS wurden über viele Jahrzehnte unter ganz unterschiedlichen Bedingungen inkubiert. Die durchgeführten Experimente zielten auf die Evaluierung des geeigneten Zellkulturmediums in Hinblick auf die Nephrotoxizität ab (Hoeffner et al., 2024b). Insbesondere das verwendete Antibiotikum selbst könnte erhebliche toxische Effekte auf die PCKS haben. Um die Inkubationsbedingungen der PCKS (im Rattenmodell) zu vereinheitlichen und um eine möglichst lange Kulturzeit von bis zu 10 Tagen zu garantieren, wurden verschiedene in der Vergangenheit publizierte Inkubationsmedien verglichen. Tabelle 1 zeigt die untersuchten Kombinationen aus Zellkulturmedien und Antibiotika.

Zusammensetzung der Zellkulturmedien	
WG	500 mL Williams medium E, w/o L-Glutamine, w/o Phenol red + 1.375 g D-glucose monohydrate (Merck) + 5 mL GlutaMAX (Life Tech Limited) + 500 µL gentamicin
RG	500 mL Renal Epithelial Cell Basal Medium 2 + 2.5 mL SupplementMix (PromoCell) + 525 µL gentamicin
DG	500 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham + 500 µL gentamicin
WPS	500 mL Williams medium E, w/o L-Glutamine, w/o Phenol red + 1.375 g D-glucose monohydrate + 5 mL GlutaMAX + 5.05 mL pen/strep
RPS	500 mL Renal Epithelial Cell Basal Medium 2 + 2.5 mL SupplementMix + 5.25 mL pen/strep
DPS	500 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham + 5 mL pen/strep
WC	500 mL Williams medium E, w/o L-Glutamine, w/o Phenol red + 1.375 g D-glucose monohydrate + 5 mL GlutaMAX + 5.05 mg ciprofloxacin
RC	500 mL Renal Epithelial Cell Basal Medium 2 + 2.5 mL SupplementMix + 5.25 mg ciprofloxacin
DC	500 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham + 5 mg ciprofloxacin

Tab. 1: Zusammenstellung der untersuchten Zellkulturmedien und der verwendeten Antibiotika. W = Williams medium E, w/o L-Glutamine, w/o Phenol red plus GlutaMAX, R = Renal Epithelial Cell Basal Medium 2 plus SupplementMix, D = Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham, G = gentamicin, PS = pen/strep, C = ciprofloxacin. Modifiziert nach (Hoeffner et al., 2024b).

Bei der Langzeitinkubation der PCKS von 10 Tagen zeigte sich, dass die Kombination von DMEM/F-12 und Gentamicin die höchste Viabilität im alamarBlue Cell Viability Assay bot. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass optimierte Zellkulturbedingungen Langzeitinkubationen von bis zu 10 Tagen ermöglichen. Damit wurde die Grundlage für weitergehende Untersuchungen der Nephrotoxizität der Organophosphate

geschaffen. Unter Nutzung der optimierten Zellkulturbedingungen wurden Ratten-PCKS gegenüber den Organophosphaten Malaoxon, Malathion, Paraoxon und Parathion exponiert und für bis zu 10 Tagen nachbeobachtet. Bei einer Konzentration von 500 μ M Organophosphat traten die Unterschiede zwischen den einzelnen Verbindungen am deutlichsten hervor (Abb. 2).

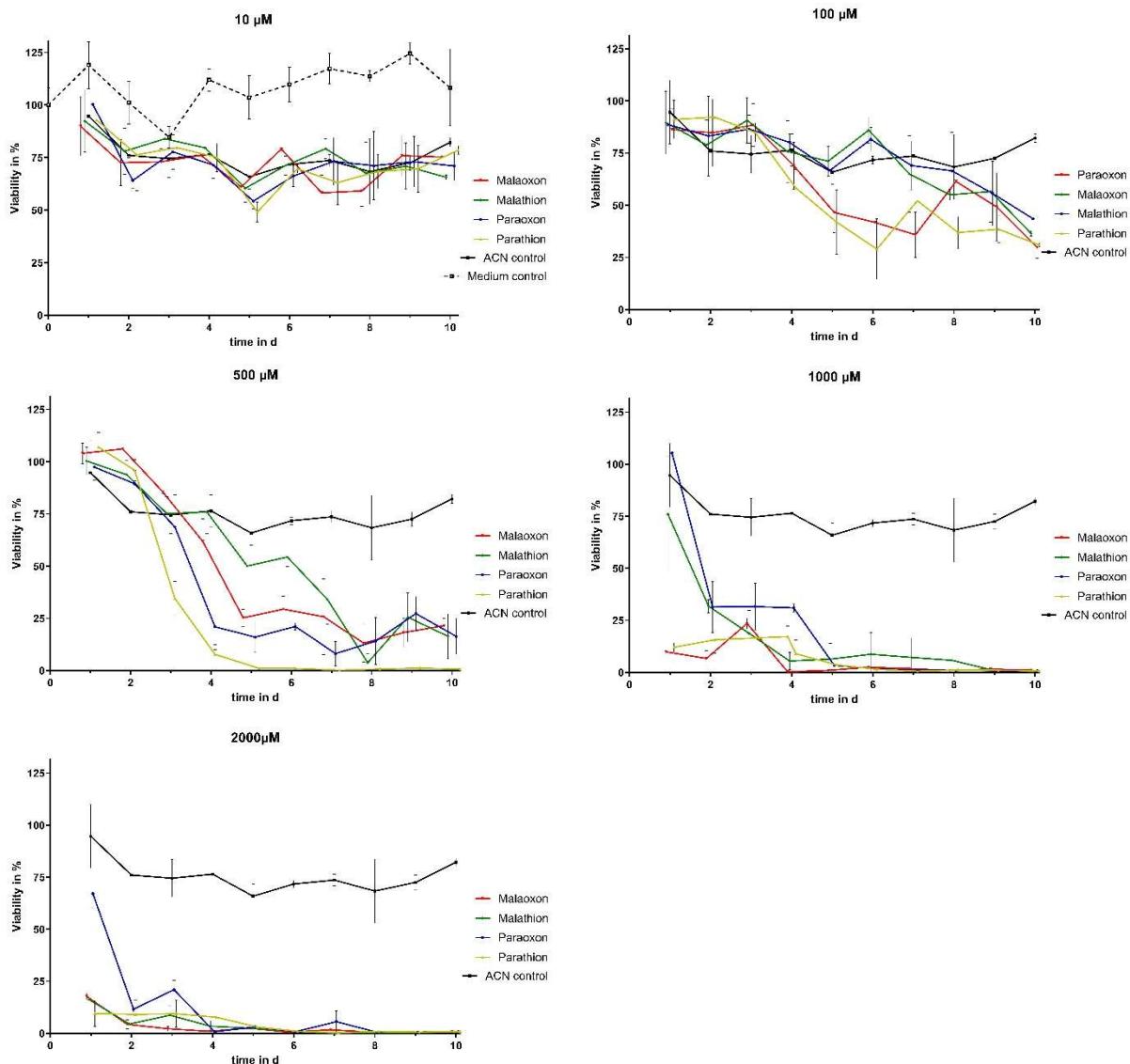


Abb. 2: Es wird die Viabilität der PCKS über einen Zeitraum von 10 Tagen dargestellt. Die Exposition fand mit 10 μ M – 2000 μ M OP und ACN als Kontrolle statt. Die Daten werden als Mittelwert und Standardabweichung angezeigt ($n = 3$) und wurden mittels alamarBlue Cell Viability Assay erhoben. Modifiziert nach (Hoeffner et al., 2024a).

Es zeigte sich, dass insbesondere Parathion und Paraoxon bei einer Konzentration von 500 μ M einen ausgeprägten Einfluss auf die Viabilität haben. Hinsichtlich mechanistischer Ursachen konnte gezeigt werden, dass es nach Exposition zu keinem

signifikanten LDH Austritt kam. Dies deutet darauf hin, dass die Zellmembran intakt bleibt und eine Nekrose damit unwahrscheinlich erscheint. In vorhergehenden Studien wurde in Nierengewebe (Ratte) das Vorhandensein einer AChE bewiesen (Muñoz-Delgado et al., 2010). Bislang gelang kein überzeugender Nachweis der Funktion dieses Enzyms in Nierengewebe. Es wurde aber z.B. eine erhöhte Aktivität der Cholinesterasen in Tumorgewebe gefunden, was auf eine Rolle im Zellwachstum hindeuten könnte (Muñoz-Delgado et al., 2010). Um festzustellen, ob die Hemmung der AChE in den PCKS mit der Reduktion der Viabilität und damit der Nephrotoxizität korreliert, wurden die AChE Aktivität bestimmt. Es zeigte sich eine AChE Aktivität von $14,4 \pm 0,7$ [mU/mg], die nach Exposition gegenüber 3 μ M Paraoxon um mehr als die Hälfte reduziert wurde. Der Umstand, dass es nach Exposition der PCKS gegenüber 10 μ M der vier getesteten Organophosphate zu keiner Reduktion der Viabilität kam, lässt den Schluss naheliegen, dass die Nephrotoxizität nicht durch eine Hemmung der AChE bedingt ist. Damit konnte die Nephrotoxizität der Organophosphate in PCKS nachgewiesen werden, die Klärung des genauen Mechanismus muss in zukünftigen Studien weiter ergründet werden.

2.2. Die Verwendung eines *ex vivo* Rattenmodells für die Untersuchung von Bispyridiniumverbindungen zur Wiederherstellung der neuromuskulären Transmission nach Nervenkampfstoffvergiftung (Amend et al., 2024c, 2024b)

Nach einer Vergiftung durch Organophosphate, seien es Pestizide oder Nervenkampfstoffe können, wie eingangs beschrieben, die Effekte der Überstimulation der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren nur indirekt adressiert werden. Die desensitisierten AChR können eine Ateminsuffizienz begünstigen und damit für einen letalen Ausgang der Vergiftung mit Organophosphaten verantwortlich sein. Die Bispyridinium Verbindung MB327 stellte einen ersten Schritt zur Nutzung neuartiger Verbindungen zur Resensitisierung des nikotinergen AChR dar. Obwohl dieser therapeutische Ansatz im Tiermodell erfolgreich war, verhinderte eine ausgeprägte Toxizität die Zulassung (Timperley et al., 2012). In einem Ratten-Hemidiaphragma-Modell wurden 4-tert-butyl bispyridinium Verbindungen und entsprechende Verbindungen ohne Substituenten hinsichtlich der Resensitisierung des nikotinergen AChR nach erfolgter Vergiftung mit Soman untersucht. Dieses *ex vivo* Modell nutzt

Ratten-Hemidiaphragmen, die in vertikalen Glaskammern an Kraftaufnehmern montiert werden und dann durch den Nervenkampfstoff Soman vergiftet werden. Der vergiftete Muskel erfährt eine komplexe elektrische Stimulation und die entsprechende Kraft wird aufgezeichnet. Verbindungen, die eine resensitisierende Wirkung auf den nikotinergen AChR aufweisen, führen zu einer (partiellen) Wiederherstellung der Muskelkraft. Das Screening einer Reihe von 4-tert-butyl bispyridinium Verbindungen und entsprechende Verbindungen ohne Substituenten zeigte eine Korrelation der Länge der entsprechenden Linker und der Fähigkeit zur Reaktivierung (Abb. 3).

4-tert-butyl bispyridinium Verbindungen			Bispyridinium Verbindungen ohne Substituenten		
n (Linker Länge)	Substanz	Diaphragma Wiederher- stellung	n (Linker Länge)	Substanz	Diaphragma Wiederher- stellung
1	MB780	Nein	1	MB775	Nein
2	MB583	Ja	2	MB520	Nein
3	MB327	Ja	3	MB408	Nein
4	MB781	Ja	4	MB444	Ja
5	MB782	Ja	5	MB442	Ja
6	MB783	Nein	6	MB776	Ja
7	MB784	Nein	7	MB777	Nein
8	MB785	Nein	8	MB505	Nein
9	MB582	Nein	9	MB778	Nein
10	MB786	Nein	10	MB779	Nein

Abb. 3: Wiederherstellung der Muskelkraft von Nervenkampfstoff gehemmten Ratten-Hemidiaphragmen durch 4-tert-butyl bispyridinium Verbindungen und entsprechende Verbindungen ohne Substituenten. Die entsprechende Länge der Linker korreliert mit der Fähigkeit zur Wiederherstellung der Muskelfunktion. „Ja“ bedeutet, dass die entsprechenden Verbindungen signifikant die Muskelfunktion wiederherstellen können ($p < 0.05$, $n \geq 4$). Modifiziert nach (Amend et al., 2024b).

Die 4-tert-butyl bispyridinium Verbindungen mit einer Linker Länge von $n=3$ und die entsprechenden bispyridinium Verbindungen ohne Substituenten mit $n=5$ zeigten die höchste Effizienz in der Wiederherstellung der Muskelkraft. $300 \mu\text{M}$ MB327 zeigte die höchste Wiederherstellungsrate für die Gruppe der 4-tert-butyl bispyridinium Verbindungen von $31,2 \pm 13,6\%$ bei 20 Hz gegenüber der Kontrolle und $10,2 \pm 10,9\%$ bei 50 Hz. Für die Gruppe der bispyridinium Verbindungen ohne Substituenten zeigten $300 \mu\text{M}$ MB442 die größte Wiederherstellung der Muskelfunktion von $24,8 \pm 10,7\%$ der

Kontrolle bei 20 Hz, and $13,1 \pm 7,3\%$ bei 50 Hz. Die Unterschiede der Stimulationsfrequenz spiegeln eine unterschiedliche ACh Konzentration im synaptischen Spalt wider. Allgemein wird davon ausgegangen, dass bereits eine Wiederherstellung der Kraft von $\geq 10\%$ für einen klinischen Benefit hinsichtlich der Atmung ausreichen. Da bispyridinium Verbindungen selbst in einer unterschiedlichen Ausprägung die AChE inhibieren und damit gegensätzliche Wirkungen auf die AChE ausüben können, wurde die Hemmwirkung selbiger Verbindungen aus Spender-AChE untersucht (Tab. 2).

Verbindung (4- <i>tert</i> -Butyl bispyridinium Verbindungen)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	Verbindung (bispyridinium Verbindungen ohne Substituenten)	IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)
MB780	$974 \pm 0,0$	MB775	$1218 \pm 0,0$
MB583	555 ± 240	MB520	$6981 \pm 0,0$
MB327	404 ± 176	MB408	$3700 \pm 0,0$
MB781	35 ± 26	MB444	1420 ± 40
MB782	$4 \pm 0,8$	MB442	711 ± 239
MB783	$0,6 \pm 0,2$	MB776	84 ± 4
MB784	$0,6 \pm 0,2$	MB777	16 ± 2
MB785	$0,3 \pm 0,0$	MB505	$1,4 \pm 0,7$
MB582	$0,2 \pm 0,05$	MB778	$0,3 \pm 0,04$
MB786	$0,1 \pm 0,03$	MB779	$0,2 \pm 0,02$

Tab. 2: Hemmung humaner AChE durch 4-*tert*-butyl bispyridinium Verbindungen und entsprechende Verbindungen ohne Substituenten. Es werden IC₅₀ Werte nach entsprechender Länge der Linker dargestellt. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung abgebildet. Modifiziert nach (Amend et al., 2024b).

Es zeigten sich insgesamt moderate inhibitorische Wirkungen der Substanzen auf humane AChE. Damit ist mit den im Hemidiaphragma-Modell untersuchten effektiven therapeutischen Dosen von 300 μM mit nur mäßigen Effekten auf die AChE und damit diesbezügliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu rechnen.

Eine weitere Gruppe von bispyridinium Verbindungen wurde im Rahmen von Strukturoptimierungen bzw. Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht. Es handelte sich um bispyridinium Analoga mit einem trimethylen oder 2,2'-diethoxy Linker. Methyl- und ethyl-substituierte bispyridinium Analoga sorgten für eine Wiederherstellung der neuromuskulären Funktion von bis zu $37 \pm 17\%$ (MB419, ein 3-methyl Analogon) bei einer Stimulationsfrequenz von 20 Hz (Abb. 4).

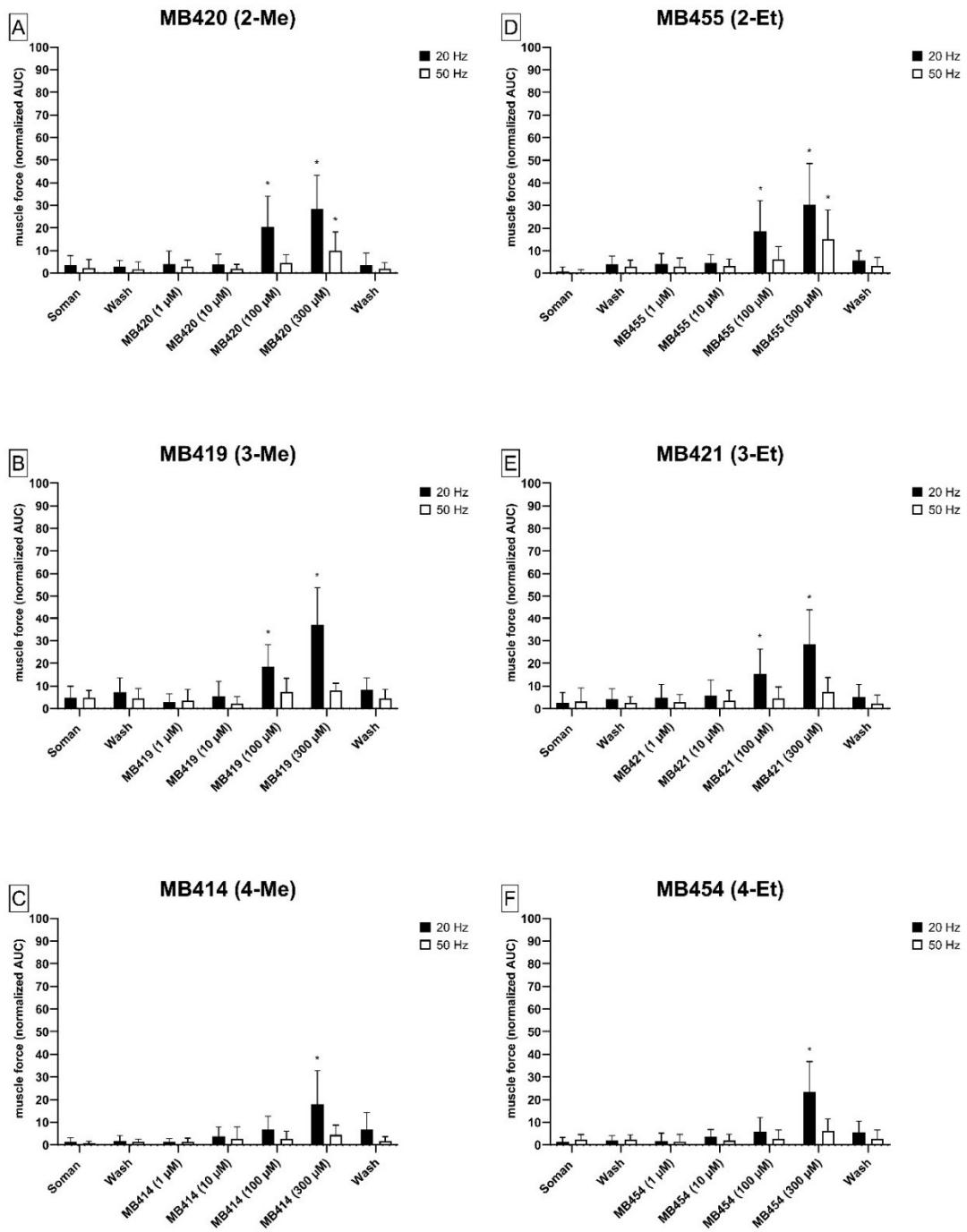


Abb 4: Wiederherstellung der Muskelkraft von Ratten-Hemidiaphragmen nach Somanexposition (3 μ M) durch bispyridinium Analoga mit einem trimethylen Linker (A-F; 1–300 μ M). A-C zeigen methylsubstituierte und D-F ethyl-substituierte bispyridinium Analoga. Alle Verbindungen sind nach der entsprechenden Position der methyl/ethyl Gruppe aufgelistet. Die Hemidiaphragmen wurden mit 20 Hz bzw. 50 Hz stimuliert. Die Daten werden als % der Kontrolle gezeigt. Modifiziert nach (Amend et al., 2024c).

Es zeigte sich, dass bispyridinium Analoga mit einer 2- oder 3-methyl Gruppe, oder einer 2- oder 3-ethyl Gruppe effektiver in der Wiederherstellung der neuromuskulären Funktion waren, als solche mit einer 4-methyl oder 4-ethyl Gruppe. In Zusammenschau mit den Daten zu den 4-tert-butyl bispyridinium Verbindungen und

den entsprechenden Verbindungen ohne Substituenten wurden also Struktur-Wirkungsbeziehungen der bispyridinium Verbindungen gewonnen. Diese Grundlagen können z.B. für molekulares Modelling zur Weiterentwicklung der am nikotinergen AChR aktiven Verbindungen, weitere Verwendung finden.

2.3. Ein *ex vivo* Dünndarmmodell und *in vitro* rezeptorpharmakologische Untersuchungen zur Charakterisierung hochpotenter Opioidrezeptor Agonisten und Antagonisten (Amend et al., 2023b; Endt et al., 2025)

Das hochpotente Opioid Carfentanil stellt, wie initial erläutert, ein relevantes Gesundheitsrisiko dar. Es wirkt über Gi/o-gekoppelte μ -Opioidrezeptoren und weist eine hohe Toxizität auf. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Pharmakodynamik von Carfentanil und dessen Letalität konnte bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Wirkmechanismen wurde eine HEK-293-Zelllinie etabliert, die stabil μ OR exprimiert. In dieser Zelllinie bestimmten wir die Liganden-Bindungsaffinität (K_i) und die Potenz (EC_{50}) von Carfentanil im Vergleich zu Remifentanil, Fentanyl, Morphin sowie dem endogenen Liganden Endomorphin-1 anhand der cAMP-Akkumulation. Die Ergebnisse zeigen, dass Carfentanil eine etwa zehnfach höhere Affinität zum μ OR besitzt als Remifentanil oder Fentanyl und rund 70-mal stärker bindet als Morphin. Die Hemmung der cAMP-Produktion durch Carfentanil war etwa 85-mal potenter als bei Fentanyl und sogar rund 620-mal stärker als bei Morphin. Neben diesen grundlegenden Betrachtungen zur Potenz und Affinität auf Rezeptorebene galt es ein funktionales *ex vivo* Modell zur Charakterisierung von Agonisten und Antagonisten am μ -Opioidrezeptor zu etablieren.

Für Untersuchungen zur Potenz von Opioidrezeptor Agonisten und Antagonisten werden seit vielen Jahren glattmuskuläre *ex vivo* Modelle genutzt. Meist werden Ratten- oder Meerschweinchendarm durch Elektrostimulation kontrahiert und eine Abnahme der Kraft durch die Inhibition der Darmmotilität durch die Opioide quantifiziert. Die Wirkung entsprechender Antagonisten kann über eine Wiederherstellung der Kontraktionskraft ebenfalls quantifiziert werden. Bisherige Modelle zeigten, dass eine Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Laboren aufgrund unterschiedlicher Stimulation, Spezies und Versuchsaufbauten schwierig sein kann (Gray et al., 2005; Hussain et al., 2016). Daher

wurde ein pharmakologisch stimuliertes *ex vivo* Rattendarm-Modell etabliert. Zur Induktion einer stabilen isometrischen Kontraktion wurde der Darm gegenüber 2 μ M Carbachol, ein stabiles Analogon des Acetylcholins, exponiert. Nach Applikation entsprechender Opioide bzw. der Antagonisten Naloxon, Nalmefen und Naltrexon konnten IC₅₀ Werte berechnet werden (Abb. 5).

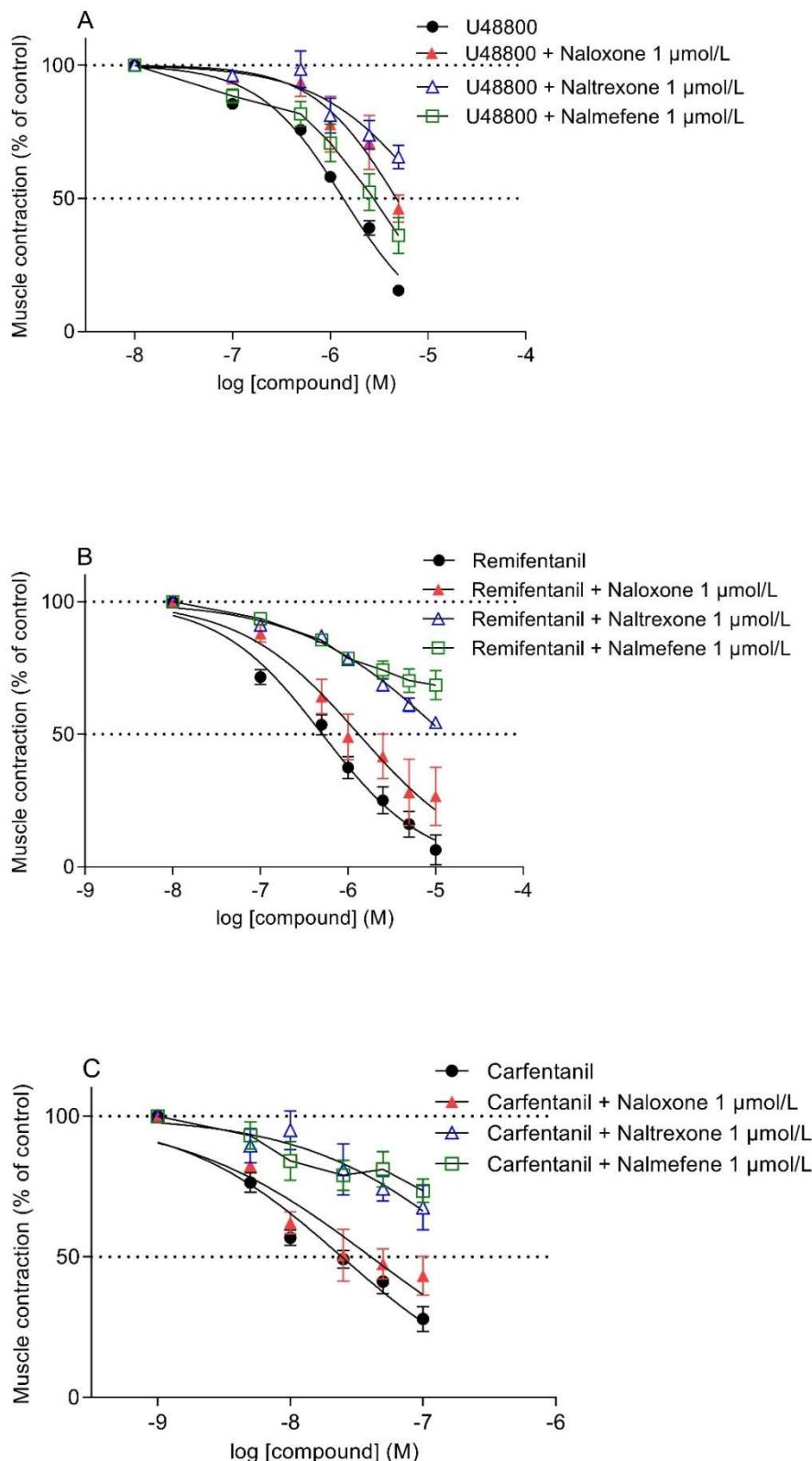


Abb. 5: Abnahme der Muskelkraft durch die hochpotenten Opioide U-48800 (A), Remifentanil (B) und Carfentanil (C) und Darstellung der entsprechenden Effekte der Antagonisten am Opioidrezeptor (Naloxon, Naltrexon und Nalmefen). Die Daten werden als Muskelkraft dargestellt (% der Kontrolle) (Mittelwert \pm SEM) nach Vorbehandlung mit 2 μ mol/L Carbachol. Modifiziert nach (Amend et al., 2023b).

Das gegenwärtige Modell scheint eine geeignete Methode zu sein, Opioidrezeptor Agonist/Antagonist Beziehungen zu untersuchen und perspektivisch eine Vergleichbarkeit der Untersuchungen zwischen verschiedenen Institutionen zu ermöglichen.

2.4. Die Verwendung eines ex vivo Hautmodells zur Untersuchung von Dekontaminationslösungen (Schwab et al., 2025)

Nach einer perkutanen Nervenkampfstoffexposition ist eine effektive Dekontamination essentiell (Thors et al., 2017). Dies kann die Aufnahme des Giftes in die systemische Zirkulation verringern. Insbesondere bei sesshaften Kampfstoffen, wie z.B. VX, kann die Entwicklung systemischer Vergiftungsanzeichen unter Umständen einige Stunden dauern (Mikler et al., 2011). Die oberste Schicht der Epidermis (Stratum corneum), deren Dicke je nach anatomischer Lage und Alter des Patienten variiert, dient als teilweise wirksame Barriere gegen potenziell toxische Chemikalien. Dennoch ist die einfachste Methode der Dekontamination die physische Entfernung von Schadstoffen: Dies kann durch ein Entfernen kontaminiert Kleidung erreicht werden. Wenn der sesshafte Nervenkampfstoff VX die Haut kontaminiert, kommt es zu einer langsamen Penetration des Kampfstoffs. Bei frühzeitigem Beginn der Dekontamination mittels Dekontaminationslösungen kann dieser Prozess unterbrochen werden. Aktuelle Modelle zur Untersuchung der Hautpenetration von Nervenkampfstoffen und der entsprechenden Dekontamination basieren auf teuren, arbeitsintensiven und nicht leicht verfügbaren Methoden, wie z.B. GC-MS-MS und LC-MS-MS. Daher verwendeten wir einen photometrischen Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitionssassay in einem Franz-Zell-Modell (Abb. 6) zur Quantifizierung von Nervenkampfstoffen, wobei VX als Modellsubstanz diente.

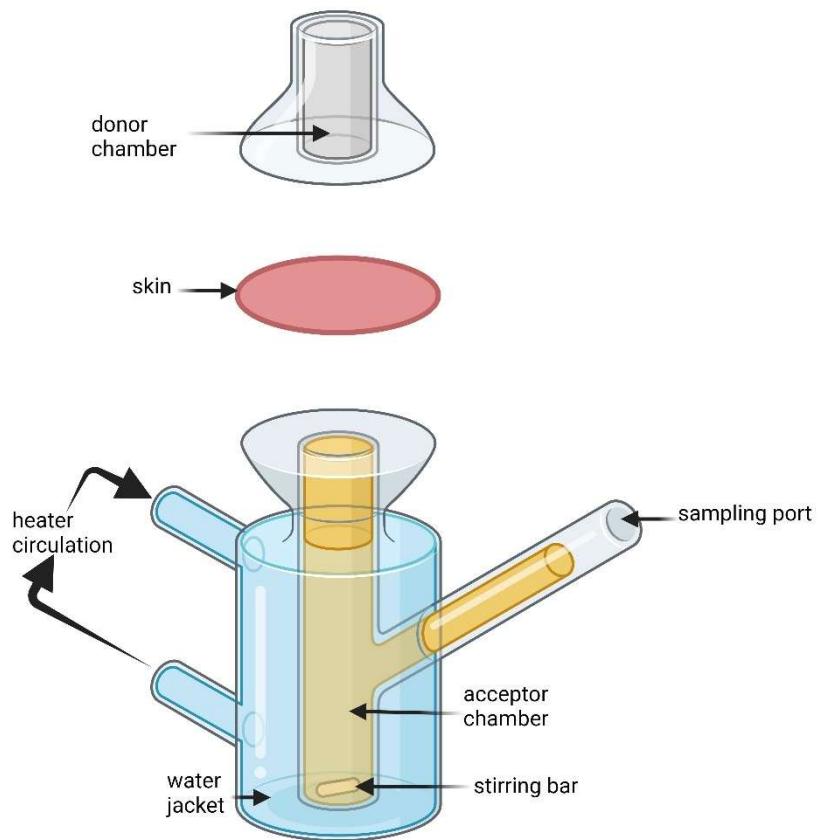


Abb. 6: Exemplarische Darstellung des verwendeten Franz-Zell-Modells zur Quantifizierung von Penetrationsvorgängen des Nervenkampfstoffs VX. Created with BioRender.com.

Das Franz-Zell-Modell besteht aus einer Spender- und einer Empfängerkammer, die durch Haut voneinander getrennt sind. Im gegenwärtigen Modell wurde frische Rattenhaut verwendet, die weder gelagert noch eingefroren wurde, um mittels modifiziertem AChE-Inhibitionsassay die Penetration von VX zu quantifizieren. In Abb. 7 zeigen sich die Ergebnisse der Dekontamination.

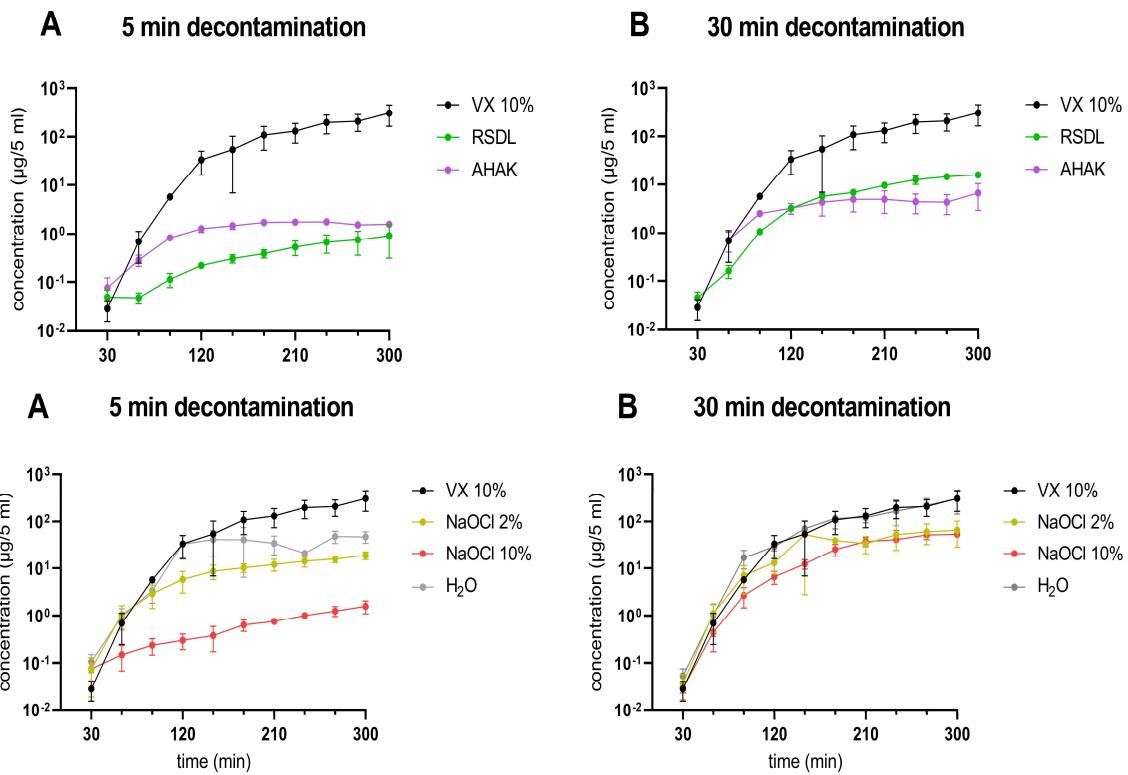


Abb. 7: Konzentrations-Zeit-Kurve für VX $\mu\text{g}/5\text{ mL}$ in der Empfängerkammer des Franz-Zell-Modells über 300 Minuten und Anwendung der Dekontaminationslotions RSDL, AHAK, NaOCl 2%, NaOCl 10% und H_2O nach 5 (A) und 30 Minuten (B) nach VX-Exposition (10 % VX-Lösung in IPA). Die VX-Konzentrationen werden durch den modifizierten AChE-Inhibitionsassay gemessen. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt ($n = 3$). Modifiziert nach (Schwab et al., 2025).

Im Franz-Zell-Modell wurden 5 verschiedene Dekontaminationsprodukte (RSDL, NaOCl 2% und NaOCl 10%, AHAK und Wasser) getestet, um die unterschiedlichen Wirksamkeiten und die Robustheit des modifizierten AChE-Inhibitionsassays zu zeigen. In Abb. 8 wird schematisch der verwendete Ellman Assay dargestellt.

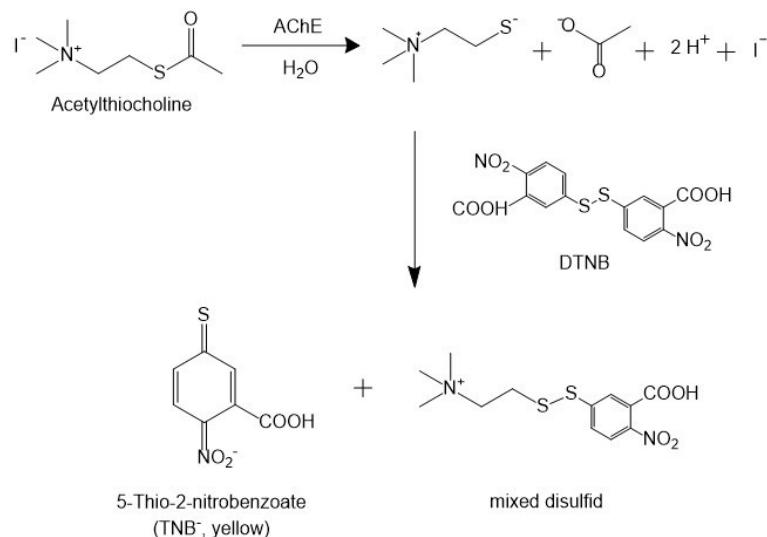


Abb. 8: Hauptreaktionen des Ellman Assays zur Bestimmung der AChE Aktivität. Das Substrat Acetylthiocholin wird von der AChE hydrolysiert, und das erzeugte Thiocholin reagiert mit dem Chromogen DTNB unter Bildung von TNB⁻, das bei 412 nm spektralphotometrisch gemessen wird. Dabei ist die Bildung von TNB⁻ direkt proportional zur Hydrolyse von Acetylthiocholin. Modifiziert nach (Worek et al., 2012).

Nach der VX-Exposition (10% v/v Lösung in IPA) der Rattenhaut wurde die Dekontamination entweder 5 oder 30 Minuten später begonnen, und die VX-Konzentrationen wurden über einen Zeitraum von 300 Minuten zeitabhängig gemessen. Es zeigte sich eine hohe Effizienz der Dekontamination für RSDL und AHAK. NaOCl und Wasser waren weder nach 5, noch nach 30 Minuten effektive Dekontaminationslösungen.

Das aktuelle Franz-Zell-Modell zeigt, dass der AChE-Inhibitionsassay für eine Quantifizierung der Penetration des Nervenkampfstoffs VX durch die Haut geeignet ist. Diese Methodik kann perspektivisch für verschiedene AChE-Inhibitoren angewendet werden und ist kostengünstiger sowie weniger zeitaufwendig als aufwendige GC- oder LC-MS-MS-Verfahren.

3. Entwicklung und Charakterisierung von *in vitro* Modellen

3.1. Microelectrode array Systeme als *in vitro* Modelle zur Untersuchung der Kardiotoxizität hochtoxischer Verbindungen (Amend et al., 2019; Amend et al., 2021)

Im Rahmen der Zulassung von Arzneimitteln stellt die Kardiotoxizität einen häufigen Grund für den Widerruf selbiger bzw. für Marktrücknahmen von Arzneimitteln im Allgemeinen dar (Valentin, 2010). Seit vielen Jahren werden *Human induced pluripotent stem cells derived cardiomyocytes (hiPSC-CM)* in der Elektrophysiologie zur Untersuchung der Kardiotoxizität von ausgewählten Wirkstoffen verwendet. Diese zeigen in Mikroelectrode array Systemen nach Exposition charakteristische elektrophysiologische Parameter, die auf entsprechende Kardiotoxizität schließen lassen. Eine der häufigsten Ursachen für das arrhythmogene Potential von Wirkstoffen stellen Veränderungen an schnellen „Delayed Rectifier“ Kaliumkanälen (IK_r) dar. Bereits kleine Veränderungen in der Repolarisation können hierbei zu relevanten Veränderungen in der Weiterleitung der Impulse führen und damit Reentry-Arrhythmien bedingen. Weiterhin kann eine verspätete Repolarisation (frühe Nachdepolarisation) zu abnormer Impulsbildung führen und damit ebenfalls Arrhythmien bedingen.

In einer ersten Untersuchung wurden für die Gruppe der Organophosphate Modellverbindungen hinsichtlich der Kardiotoxizität im Mikroelectrode array System betrachtet (Amend et al., 2019). Bei der Vergiftung durch Organophosphate, seien es Nervenkampfstoffe oder Pestizide, können Patienten Arrhythmien erleiden. Diese arrhythmogenen Ereignisse können sich u.a. allgemein als ventrikuläre Tachyarrhythmien äußern, oder im Speziellen als sog. Torsade-de-Pointes-Tachykardien. Letztere können z.B. aus frühen Nachdepolarisierungen resultieren, welche wiederum durch Veränderungen am IK_r bedingt sein können. Eine exemplarische Darstellung von Feldpotentialveränderungen findet sich in Abb. 9.

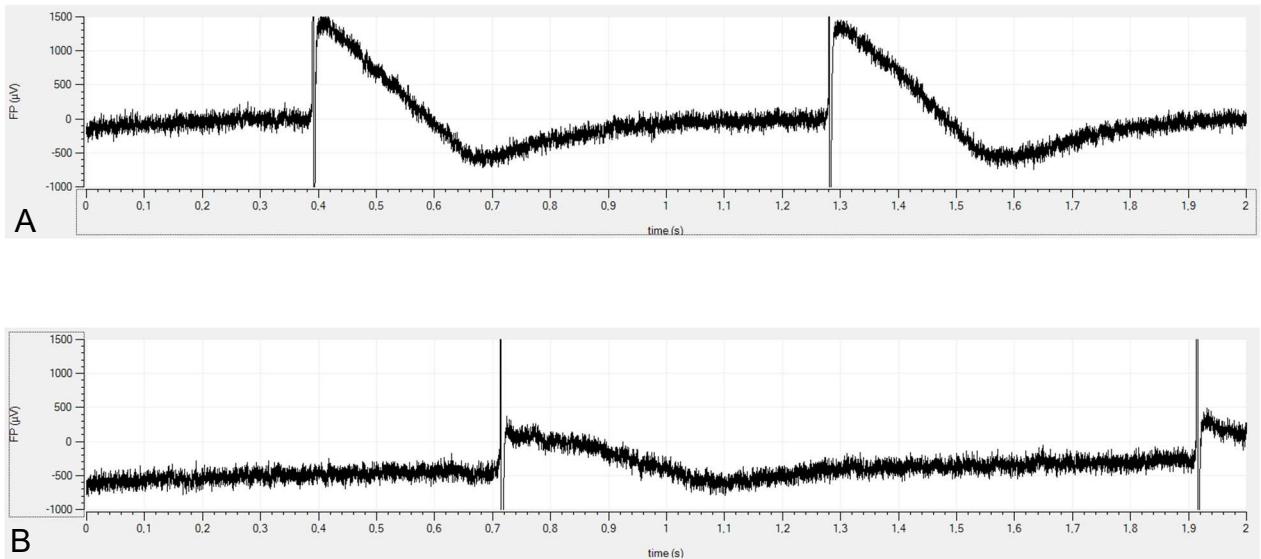


Abb. 9: Exemplarische Darstellung der Feldpotentialverlängerung durch cholinerge Stimulation (100 nmol/L Carbachol). A) stellt exemplarisch Feldpotentiale in Ruhe dar und B) die Verlängerung nach der Applikation von Carbachol. Die X-Achse zeigt die Feldpotentialdauer in Sekunden, die y-Achse die Amplitude in μ V. Modifiziert nach (Amend et al., 2019).

Es zeigte sich bei den Untersuchungen, dass Acetylcholin, Carbachol und der irreversible Hemmer der AChE, der Nervenkampfstoff Cyclosarin, dosisabhängig Feldpotentialverlängerungen auslösen können. Die frequenzkorrigierte Feldpotentialverlängerung beträgt $9,7 \pm 0,6\%$ für Carbachol, $9,7 \pm 1,2\%$ für Acetylcholin und $9,4 \pm 0,5\%$ für Cyclosarin. Diese Veränderungen, die wie eingangs geschildert mit einem erhöhten Risiko für maligne Arrhythmien einhergehen, zeigten sich unter der Gabe von Atropin reversibel. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Atropin nicht nur symptomatisch die Auswirkungen einer cholinergen Krise an den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren behandelt (z.B. Bronchorrhö), sondern auch die kardiotoxischen Auswirkungen einer Vergiftung mit Inhibitoren der AChE adressiert.

Ein weiteres Forschungsprojekt, welches die Pathomechanismen toxischer Substanzen mittels Microelectrode array System untersuchte, stellt die Untersuchung von Herzglykosiden aus *Nerium oleander* und *Thevetia peruviana* dar. Insbesondere im südostasiatischen Raum sind Vergiftungen mit diesen Verbindungen häufig. Hierbei kommen sowohl akzidentielle als auch suizidale Einnahmen in Betracht. Die breite Verfügbarkeit der Pflanzen und die Möglichkeit einer einfachen Extraktion der

Glykoside sorgen für zahlreiche Todesfälle. Hierbei wirken die Glykoside über eine Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase und können dadurch schwerwiegende Arrhythmien und konsekutiv einen Herzstillstand verursachen. Im Microelectrode array System zeigten sich deutliche Feldpotentialverkürzungen der untersuchten Verbindungen (Abb. 10).

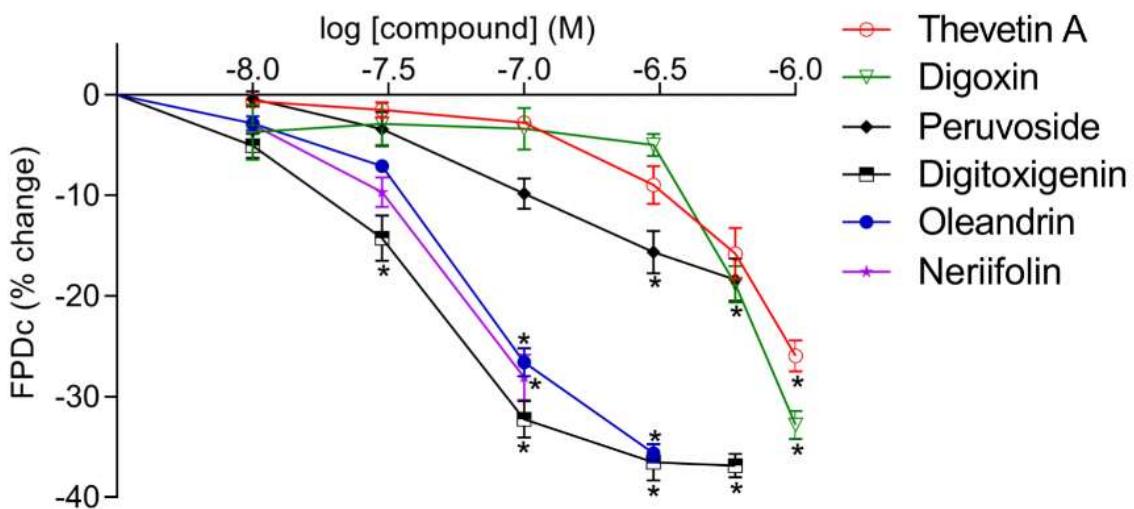


Abb. 10: Die Effekte von Herzglykosiden aus *N. oleander* und *T. peruviana* auf die frequenzkorrigierte Feldpotentialdauer (FPDc) im Microelectrode array System. Die Feldpotentialdauer wird als Mittelwert \pm SEM der FPDc (% der Kontrolle) angegeben; * bedeutet Signifikanz vs. initialer FPDc; $p < 0.05$. Modifiziert nach (Amend et al., 2021).

Neben dieser Zunahme der arrhythmogenen Potentials, manifestierte sich die hohe Toxizität der Glykoside durch Erregungsstillstände der Kardiomyozyten im Modell. Interessanter Weise zeigte Neriifolin bereits bei 300 nmol/L einen vollständigen Stillstand der Erregung in 5/5 Chips. Das Oleandrin selbst war weniger toxisch (Erregungsstillstand bei 600 nmol/L). Für eine Einordnung der Toxizität wurde das Herzglykosid Digoxin als Vergleichssubstanz mit bekannter kardiotoxischer Wirkung verwendet. Dieses zeigte einen vollständigen Stillstand der Erregung erst bei Konzentrationen > 1000 nmol/L. Eine Auflistung der untersuchten Glykoside aus *N. oleander* und *T. peruviana* findet sich in Abb. 11.



Substance	Concentration (nM)	Beat arrest	FPD _c (%)	BR (%)
Thevetin A	10.0	/	-0.7 ± 0.6	-0.7 ± 0.3
	30.0	/	-1.5 ± 0.8	-0.3 ± 0.3
	100.0	/	-2.8 ± 0.7	-0.8 ± 1.1
	300.0	/	-9.0 ± 1.9	0.0 ± 1.3
	600.0	/	-15.8 ± 2.6	-2.5 ± 1.7
	1000.0	/	-26.0 ± 1.6	-2.0 ± 3.1
Digoxin	10.0	/	-3.7 ± 2.7	0.0 ± 3.2
	30.0	/	-2.9 ± 2.1	1.3 ± 4.4
	100.0	/	-3.4 ± 2.1	0.3 ± 2.4
	300.0	/	-5.0 ± 1.1	1.0 ± 2.6
	600.0	/	-18.9 ± 1.8	1.7 ± 0.7
	1000.0	3/6	-32.8 ± 1.4	1.3 ± 0.3
Peruvoside	10.0	/	-0.4 ± 0.8	-0.4 ± 0.3
	30.0	/	-3.4 ± 1.7	0.4 ± 0.3
	100.0	/	-9.8 ± 1.5	1.8 ± 0.6
	300.0	/	-15.7 ± 2.1	-0.2 ± 1.4
	600.0	/	-18.4 ± 2.1	-16.2 ± 10.3
	1000.0	6/6	-	-
Digitoxigenin	10.0	/	-5.1 ± 1.2	1.2 ± 0.3
	30.0	/	-14.3 ± 2.3	1.8 ± 0.4
	100.0	/	-32.3 ± 1.8	1.3 ± 0.4
	300.0	/	-36.5 ± 1.8	-5.7 ± 2.7
	600.0	/	-36.9 ± 1.2	-20.5 ± 3.2
	1000.0	6/6	-	-
Oleandrin	10.0	/	-2.9 ± 0.7	1.5 ± 0.8
	30.0	/	-7.1 ± 0.6	1.8 ± 0.6
	100.0	/	-36.6 ± 1.4	3.2 ± 1.1
	300.0	/	-35.6 ± 0.9	-5.5 ± 4.5
	600.0	6/6	-	-
	1000.0	-	-	-
Neriifolin	10.0	/	-3.0 ± 0.6	-1.2 ± 0.8
	30.0	/	-9.7 ± 1.5	1.8 ± 0.7
	100.0	/	-28.1 ± 2.3	-6.6 ± 5.3
	300.0	6/6	-	-
	600.0	-	-	-
	1000.0	-	-	-

Abb. 11: Zunahme der Erregungsstillstände nach Verabreichung von Herzglykosiden des Cardenolidtyps in menschlichen, induzierten pluripotenten Stammzellen-abgeleiteten Kardiomyozyten (hiPSC-CM) in einem Mikroelektroden Array System (MEA). Jedes Herzglykosid wird nach der Konzentration eingestuft, die den Erregungsstillstand verursacht. Zudem wurden die korrigierte Feldpotentialdauer (FPD_c) und die Schlagfrequenz (BR) berechnet und als Mittelwert ± SEM der FPD_c (% des Kontrollwerts) oder BR (% des Kontrollwerts) dargestellt; alle Ergebnisse wurden in $n \geq 5$ Wells erzielt. Modifiziert nach (Amend et al., 2021).

Bei den Untersuchungen zur Kardiotoxizität der Glykoside aus *N. oleander* und *T. peruviana* zeigten sich also hinsichtlich kausaler Pathomechanismen unterschiedliche Mechanismen. Zum einen besteht ein erhöhtes arrhythmogenes Potential. Dies wird ersichtlich durch die Verkürzung der Feldpotentialdauer. Weiterhin kommt es davon

unabhängig, je nach Verbindung, zu einem vollständigen Erregungsstillstand der Kardiomyozyten im Modell. Insbesondere der bislang nicht erklärbare direkte Stillstand der Erregung sollte in zukünftigen Projekten mittels Patch-Clamp-Technik an Einzelzellen untersucht werden.

3.2. *In vitro* Untersuchungen zur Hepatotoxizität von Organophosphaten (Horn et al., 2024a; Horn et al., 2024b)

Die Gruppe der Organophosphate, seien es Pestizide oder auch Nervenkampfstoffe, haben ausgeprägte toxische Effekte auf eine Vielzahl von physiologischen Vorgängen im menschlichen Körper (Amend et al., 2020b). In zwei Studien wurde die Einflüsse der Organophosphate auf die Cytochrom P450 (CYP) Enzyme in der Leber untersucht. In einer ersten Studie wurden die Einflüsse der Pestizide Parathion und Paraoxon auf CYP und assoziierte Oxygenasen betrachtet. Zahlreiche Pestizide aus der Gruppe der Organophosphate sind Organothiophosphatverbindungen und damit schwache AChE-Inhibitoren, die eine Thiophosphorylgruppe (P=S) enthalten. Sie unterliegen einer metabolischen Aktivierung durch das CYP System zu ihren entsprechenden Oxon-Analoga (P=O), die starke AChE Inhibitoren sind.

Unter Verwendung einer metabolisch kompetenten Zelllinie (HepaRG-Zellen) wurde die hemmende Wirkung beider Pestizide auf CYP 3A4, ein zentrales Enzym im Metabolismus von Xenobiotika untersucht. Es zeigte sich, dass nach einer 24-stündigen Exposition eine ausgeprägte Hemmung der CYP 3A4 Enzymaktivität beobachtet wird. Es ergaben sich effektive Konzentration (EC₅₀) von 1,2 mmol/L (Parathion) bzw. 2,1 mmol/L (Paraoxon).

Veränderungen auf Transkriptionsebene von 92 mit Oxygenasen assoziierten Genen, einschließlich der Gene für wichtige CYP Enzyme, wurden außerdem evaluiert. Es zeigte sich eine signifikante Hochregulierung von Genen, die mit dem Parathion-Metabolismus in Verbindung stehen, wie CYP1A1, 1A2, 2B6, 2C19 und 3A4. Dies könnte nach der Erholung von einer lebensbedrohlichen Vergiftung mit Organophosphaten von Bedeutung sein, insbesondere für gleichzeitig verabreichte Medikamente, die von den beteiligten CYP-Enzymen metabolisiert werden.

Die Forschungen zu den Wechselwirkungen zwischen OP und CYP konzentrierten sich bislang auf Organothiophosphat-Pestizide, die eine CYP-vermittelte Bioaktivierung zu ihren aktiven Oxon-Metaboliten erfordern, um als Hemmer der Acetylcholinesterase (AChE) zu wirken. Da bisher nur wenige Daten zum Einfluss von Nervenkampfstoffen auf CYP vorliegen, führten wir eine Studie mit Cyclosarin (GF) und O-ethyl-S-[2-(diisopropylamino)-ethyl]-methylphosphonothioat (VX) durch, wobei erneut das metabolisch kompetente *in vitro* Lebermodell (HepaRG-Zellen) verwendet wurde. Der hemmende Effekt der Nervenkampfstoffe GF und VX auf CYP3A4 wurde untersucht und zeigte nur eine geringe Hemmwirkung (Abb. 12).

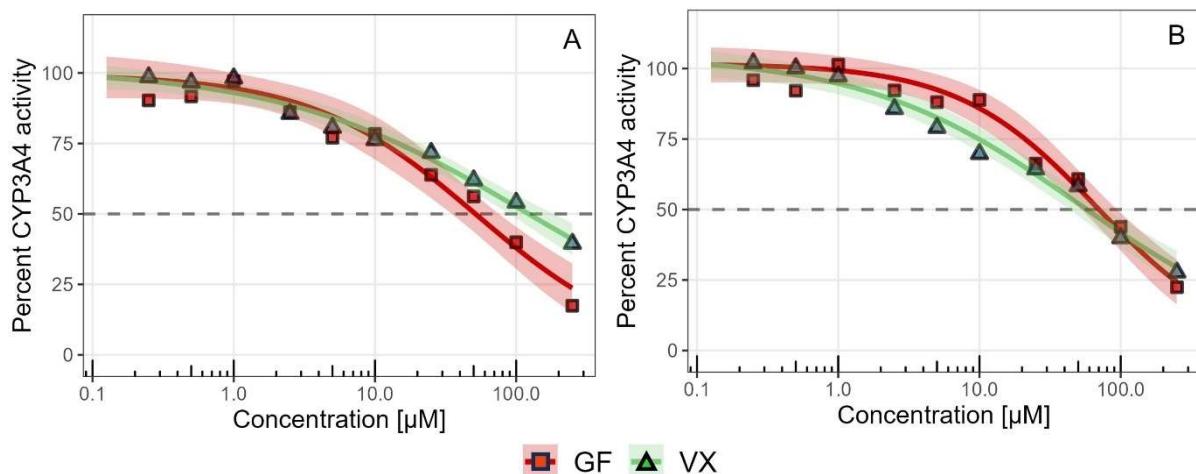


Abb. 12: CYP3A4 Aktivität in HepaRG-Zellen nach Exposition gegenüber Nervenkampfstoffen. HepaRG-Zellen wurden 5 Stunden (A) oder 24 Stunden (B) gegenüber Cyclosarin (GF) (rote Quadrate) und O-ethyl-S-[2-(diisopropylamino)-ethyl]-methylphosphonothioat (VX) (grüne Dreiecke) exponiert. Die CYP3A4 Aktivität wurde auf die entsprechenden Lösungsmittel-Kontrollen normiert. Die Daten sind einschließlich des Mittelwerts und der 99%-Konfidenzintervalle (in der jeweiligen Farbe hervorgehoben) dargestellt und wurden in Duplikaten aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Die horizontale gestrichelte Linie zeigt eine CYP3A4-Aktivität von 50% an. Modifiziert nach (Horn et al., 2024b).

Änderungen auf der Transkriptionsebene von CYP und assoziierten Oxygenasen wurden mittels quantitativer reverser Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) unter Verwendung der beiden Nervenkampfstoffkonzentrationen von 250 nmol/L und 250 μmol/L untersucht. Nach der Exposition gegenüber 250 μM GF wurden verschiedene Gene signifikant hochreguliert. Dabei zeigte sich die höchste Hochregulierung bei den Genen, die mit CYP1A1 und CYP2B6 assoziiert sind.

Andererseits wurden nach der Exposition gegenüber 250 nM GF keine signifikanten Änderungen festgestellt.

Nach der Exposition gegenüber 250 μ M VX wurden vier Gene signifikant hochreguliert. Dabei zeigte sich die höchste Hochregulierung bei den Genen, die mit CYP3A4 und CYP2B6 assoziiert sind, im Vergleich zu CYP3A5 und CYP3A7. Mehrere Gene wurden nach der Exposition gegenüber 250 μ M VX signifikant herunterreguliert, zum Beispiel CYP7A1, FMO5, CYP4B1, CYP4A11, CYP4A22 oder CYP1A2. Zudem wurden nach der Exposition gegenüber 250 nM VX die Gene, die mit CYP3A4 und CYP3A7 assoziiert sind, signifikant herunterreguliert. Insgesamt wurde bei den Untersuchungen deutlich, dass v.a. höhere Nervenkampfstoffkonzentrationen relevante Einflüsse auf das CYP System haben.

Informationen über Veränderungen in CYP könnten für die Verabreichung von Antidotum bei OP-Vergiftungen von Bedeutung sein, wie zum Beispiel Benzodiazepinen oder anderen klinisch verwendeten Medikamenten, die von den betroffenen CYP-Enzymen metabolisiert werden. Darüber hinaus könnten therapeutische Maßnahmen im Verlauf einer Nervenkampfstoffvergiftung durch vorherige Behandlungen mit CYP-induzierenden oder -hemmenden Substanzen beeinflusst werden.

3.3. Organ-on-a-Chip – Chancen und Limitationen für die Untersuchung von Organophosphaten (Amend et al., 2023a; Amend et al., 2024a)

Organ-on-a-chip-Systeme werden als disruptive Technologie in der Toxikologie betrachtet, die die Lücke zwischen *in vivo* und *in-vitro* Modellen überbrücken kann. Im Jahr 2022 entschied die U.S. Food and Drug Administration (FDA), dass neue Medikamente nicht mehr an Tieren getestet werden müssen, um die FDA-Zulassung zu erhalten (Wadman, 2023). Diese Entscheidung könnte die Organ-on-a-Chip (OoC) Technologie in den kommenden Jahren vorantreiben und perspektivisch Tierversuche endgültig ersetzen. Darüber hinaus könnte diese Technologie auch ein vielversprechender Ansatz sein, um neue Therapien hinsichtlich Wirksamkeit, klinischer Umsetzbarkeit und Nebenwirkungsprofil zu überprüfen.

In einer ersten Studie erfolgte die toxikokinetische Charakterisierung des Nervenkampfstoffs VX und des Organophosphat-Pestizids Parathion in einem Co-Kulturmodell, bestehend aus Leber- und neuronalen Sphäroiden. Das verwendete Modell (HUMIMIC von TissUse) nutzt Organchips, die auf dem Polymer Polydimethylsiloxan (PDMS) basieren. Hierbei werden zwei Kompartimente miteinander verbunden. Das Modell besteht aus humanen hepatischen und neuronalen 3D-Sphäroiden (jeweils 10^6 Zellen). Die Zellen wurden mit 1 mmol/L oder 100 μ mol/L VX exponieren. Entsprechende Proben von 10 μ L wurden nach 0, 2, 8, 24, 48 und 72 Stunden entnommen.

Nach 8 Stunden wurden im Chip mit 1000 μ mol/L VX $557 \pm 62 \mu$ mol/L VX nachgewiesen, bzw. $51 \pm 1 \mu$ mol/L VX im Chip mit 100 μ mol/L. Der Rückgang von VX in den mit Sphäroiden gefüllten Chips schien in den ersten 8 Stunden schneller zu erfolgen als in den zellfreien Kontrollchips, war jedoch nur im Chip mit 100 μ mol/L VX signifikant. Die Endkonzentration von VX nach 72 Stunden betrug $168 \pm 19 \mu$ mol/L VX im Chip mit 1000 μ mol/L und $13 \pm 1 \mu$ mol/L VX im Chip mit 100 μ mol/L. Die Ergebnisse in beiden Organ-Chips zu diesem Zeitpunkt unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle.

Nach 2 Stunden wurden im Chip mit 1000 μ mol/L Parathion, 87μ mol/L $\pm 4 \mu$ mol/L und im Chip mit 100 μ mol/L Parathion 7μ mol/L $\pm 1 \mu$ mol/L gefunden. Diese Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle. Nach 72 Stunden konnte im Chip mit 1000 μ mol/L Parathion, 2μ mol/L $\pm 1 \mu$ mol/L nachgewiesen werden. Im Chip mit der niedrigen Parathionkonzentration (100 μ mol/L) konnte überhaupt kein Parathion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle. In Abb. 13 wird exemplarisch die Toxikokinetik von VX und Parathion in zellhaltigen und zellfreien Chips dargestellt.

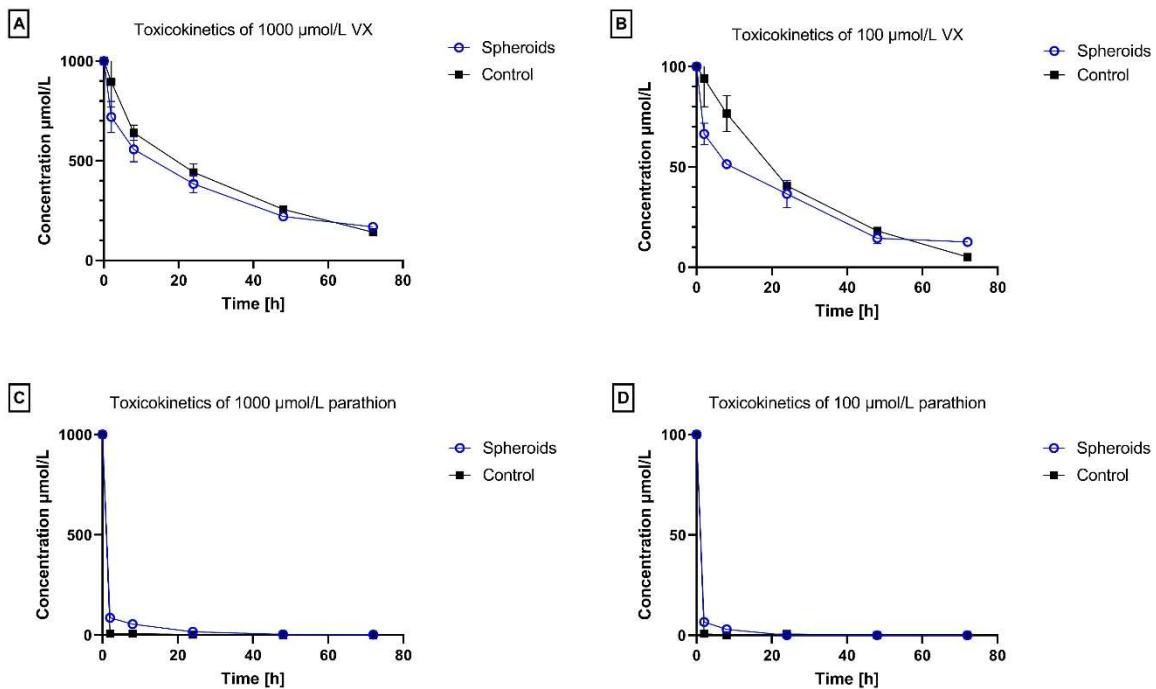


Abb. 13: Die toxikokinetischen Eigenschaften des Nervenkampfstoffs VX und des Organophosphat-Pestizids Parathion in einem Zwei-Kompartiment-Organ-on-a-Chip System, das Leber- und neuronale Sphäroide umfasst, mit insgesamt 1×10^6 Zellen pro Kompartiment. A) und B) zeigen die Toxikokinetik von VX in einer Konzentration von $1000 \mu\text{mol/L}$ bzw. $100 \mu\text{mol/L}$. Kontrollwerte wurden aus zellfreien Chips gewonnen. C) und D) veranschaulichen die jeweiligen Konzentrationen der Enantiomere von VX. E) und F) zeigen die Toxikokinetik von Parathion ($1000 \mu\text{mol/L}$ bzw. $100 \mu\text{mol/L}$). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt und wurden in drei Chips ermittelt. Die jeweiligen Konzentrationen zu $t = 0$ h waren $1000 \mu\text{mol/L}$ bzw. $100 \mu\text{mol/L}$ VX. Modifiziert nach (Amend et al., 2023a).

Mit dem Nachweis einer sehr starken bzw. vollständigen Bindung der Organophosphate VX und Parathion an PDMS wurde somit deutlich, dass Organchips für toxikokinetische Untersuchungen ungeeignet sein könnten. Um die Polymer/Organophosphat Interaktionen weiter zu ergründen, wurden in einem Folgeprojekt alternative Chips, basierend auf dem Polymer cyclic olefin copolymers (CoC) verwendet. Weiterhin wurden Beschichtungen für beide Polymere mit dem biokompatiblen Polymer Polyethyleneimine (PEI) betrachtet. Bei der Studie wurden $1000 \mu\text{mol/L}$ VX in zellfreien Organchips hinsichtlich der Toxikokinetik und der Degradationsprodukte untersucht.

Die auf PDMS basierenden Chips zeigten eine VX-Konzentration von $168 \pm 19 \mu\text{mol/L}$ VX. Die neuartigen, auf CoC basierenden Chips führten zu einer entsprechenden

Konzentration von $360 \pm 1 \mu\text{mol/L}$ VX. Eine zusätzliche Beschichtung mit 0,5% PEI ergab eine Konzentration von $442 \pm 54 \mu\text{mol/L}$ VX. Darüber hinaus waren die Abbauprodukte von VX ebenfalls stark abhängig vom jeweiligen Polymer: Das toxische Metabolit von VX, EA-2192, zeigte eine Konzentration von $203 \pm 7 \mu\text{mol/L}$ VX in einem unbeschichteten, auf PDMS basierenden OoC, während der CoC-Chip mit einer Beschichtung von 0,5% PEI zu einem Rückgang der EA-2192-Konzentration auf $121 \pm 5 \mu\text{mol/L}$ führte (Abb. 14).

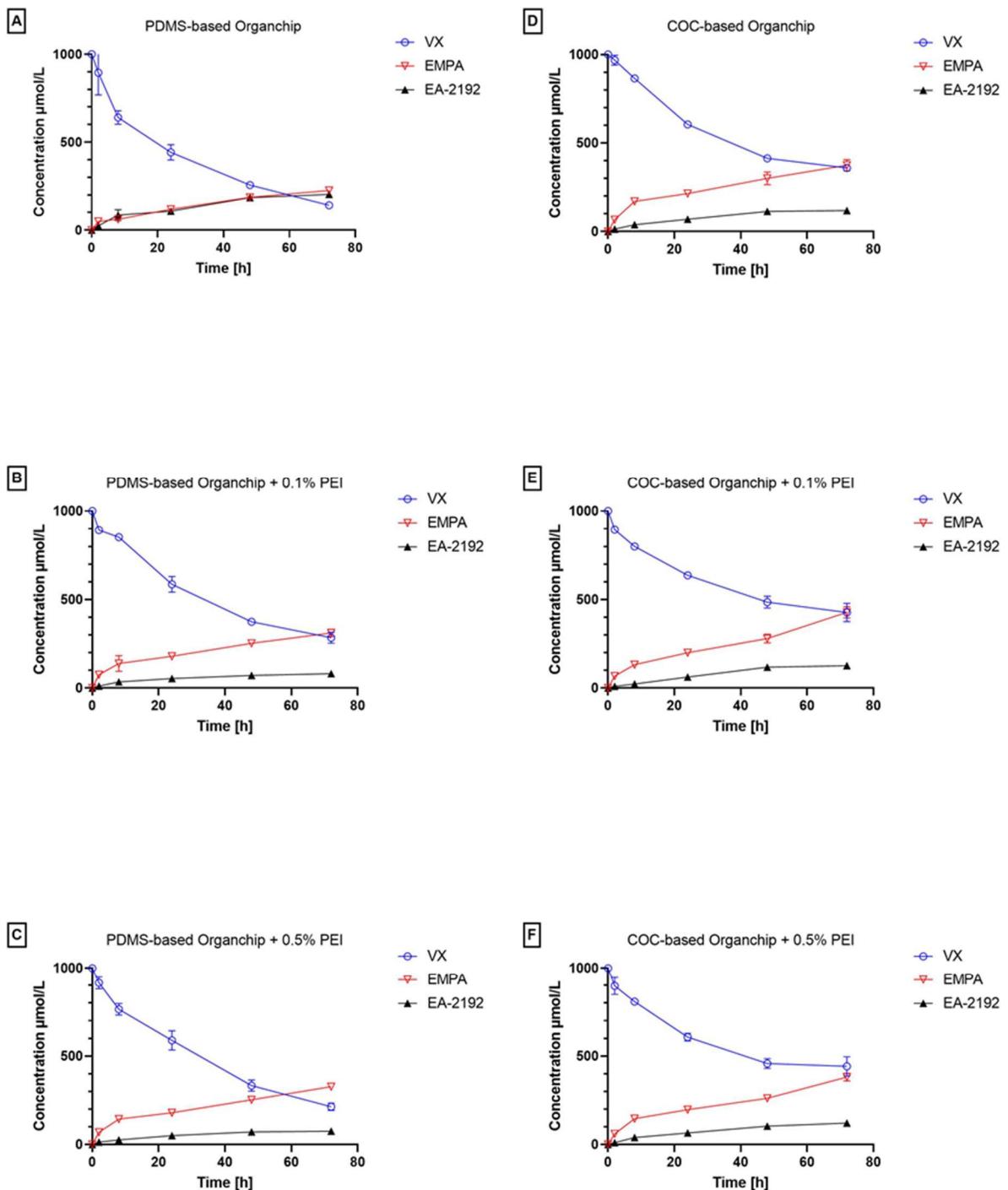


Abb. 14: Die Toxikokinetik des Nervenkampfstoffs VX (1000 $\mu\text{mol/L}$) und seiner jeweiligen Abbauprodukte EMPA und EA-2192 in einem Zwei-Kompartiment-Organ-on-a-Chip Modell. A-C veranschaulichen die Toxikokinetik von PDMS-basierten Organ-Chips mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen. D-E heben die jeweilige Toxikokinetik eines auf CoC basierenden Chips hervor. Die Oberflächenmodifikation wurde durch Beschichtung mit Polyethylenimin (PEI) in einer Konzentration von 0,5% bzw. 0,1% durchgeführt. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte \pm SD dargestellt, und alle Ergebnisse wurden in drei Chips ermittelt. Modifiziert nach (Amend et al., 2024a).

Die aktuelle Studie zeigte, dass die Toxikokinetik des Organophosphats VX in einem OoC-Modell stark vom jeweiligen Polymer und der OoC-Oberflächenbeschichtung abhängt. Matrixeffekte können nicht nur zu einer stark variablen Verbindungsabsorption führen, sondern auch zu variablen Konzentrationen biologisch aktiver Abbauprodukte, in diesem Fall des toxischen VX-Metaboliten EA-2192. Daher könnte die Optimierung von Organ-on-a-Chip Systemen eine bessere Vergleichbarkeit unterschiedlicher Studien und Ergebnisse ermöglichen. Schließlich gilt es zukünftig, vor der Verwendung entsprechender Organchips für pharmako- oder toxikokinetischen Studien, die verwendeten Polymere hinsichtlich der Bindung/Degradation des Wirkstoffs zu charakterisieren.

4. Entwicklung und Charakterisierung translationaler Modelle (Marquart et al., 2019; Amend et al., 2020b; Amend et al., 2020a)

Die Diagnose und Behandlung von Organophosphat- oder Carbamat-Vergiftungen basiert traditionell auf dem klinischen Erscheinungsbild des typischen cholinergen Toxicdroms, wie z. B. Miosis, Salivation, Bradykardie und epileptischen Anfällen. Klinische Anzeichen können jedoch unklar oder sogar irreführend sein (Vale et al., 2018). So hat sich in der Vergangenheit gezeigt, dass bei nur mäßig vorhandener Salivation, die Miosis durchaus als Hinweis auf eine Vergiftung mit Opioiden fehlinterpretiert werden kann (Ciottone, 2018). Verfügbare enzymatische Assays können schnell Informationen zu der Art der Vergiftung und zu möglichen Behandlungsoptionen in der cholinergen Krise liefern und die klinische Entscheidungsfindung unterstützen. Darüber hinaus scheint es wichtig, zwischen Organophosphat- und Carbamat-Vergiftungen zu unterscheiden, da eine Oximtherapie bei Carbamat-Vergiftungen wahrscheinlich keinen Nutzen bringt und – wie jedes pharmazeutische Produkt – auch unerwünschte Nebenwirkungen verursachen kann (Wille et al., 2013). Die frühzeitige Identifikation der Substanzklasse einer cholinergen Krise und der aufgenommenen Menge im Körper ist entscheidend für die Planung des therapeutischen Vorgehens.

Zur weiterführenden Diagnostik im Rahmen einer Vergiftung mit Organophosphaten oder auch Carbamaten steht der „Cholinesterase Status“ zur Verfügung. Das grundsätzliche Prinzip dieses diagnostischen Tools wird in Abb. 15 deutlich.

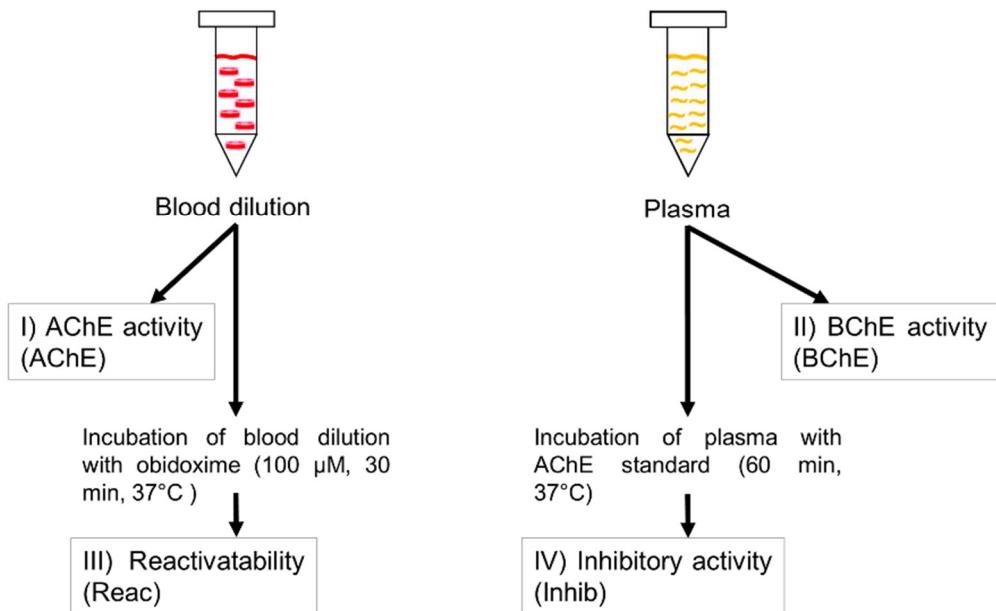


Abb. 15: Das Konzept des Cholinesterase-Status: Der Cholinesterase-Status umfasst vier unabhängige Analysen, die wichtige klinische Entscheidungen unterstützen und eine umfassende Überwachung des Vergiftungskurses des Patienten sowie die Notwendigkeit einer Oximtherapie ermöglichen. Modifiziert nach (Amend et al., 2020a).

Der „Cholinesterase Status“ besteht aus vier verschiedenen Assays, die bei der klinischen Entscheidungsfindung wertvolle Hinweise im Hinblick auf Therapie und Schwere des zu erwartenden Verlaufes liefern können. Es wird zunächst die AChE-Aktivität in einer verdünnten Blutprobe des Patienten bestimmt (1). Eine signifikante Hemmung beweist eine stattgehabte Exposition gegenüber Organophosphaten oder Carbamaten. Im Weiteren wird die BChE-Aktivität in Plasma-Proben des Patienten beurteilt (2). Die BChE wird in vielen Kliniken als Leberfunktionsparameter erhoben und ist nach Exposition mit Organophosphaten oder Carbamaten ebenfalls gehemmt. Damit werden Vergleiche mit den Laborergebnissen der Klinik ermöglicht. Für die therapeutischen Entscheidungen dient aber nur die AChE als Surrogat, die BChE unterliegt großen interindividuellen Schwankungen und korreliert insbesondere was

die Reaktivierbarkeit betrifft nicht mit den *in vivo* Bedingungen (Worek et al., 1999). Weiterhin wird die Reaktivierbarkeit der durch OP inhibierten AChE in einer verdünnten Blutprobe des Patienten nach Inkubation mit einer supratherapeutischen Konzentration eines Oxims (3) bestimmt. So ist es möglich, Aussagen über die Erfolgsaussichten einer Oximtherapie zu treffen. Das in vielen Ländern verwendete Obidoxim ist z.B. bei einer Vergiftung mit dem Organophosphat Pestizid Parathion eine vielversprechende Therapieoption. Wenn allerdings die Vergiftung vor dem Therapiebeginn mehrere Tage (beim Parathion) zurückliegt, kommt es zu einer „Alterung“ des Organophosphat-Enzym-Komplexes. Nachdem das OP-Molekül an AChE gebunden hat, beginnt es, mit dem Enzym zu reagieren. Zunächst ist die Bindung zwischen OP und AChE reversibel, das heißt, das OP-Molekül kann theoretisch durch ein Oxidationsmittel (wie z.B. ein Oxim) entfernt und die Aktivität des Enzyms wiederhergestellt werden. Bei der "Alterung" wird eine zusätzliche chemische Reaktion ausgelöst, bei der das OP-Molekül stärker mit der AChE verbunden wird und die Bindung stabiler und irreversibler wird. Diese Reaktion führt dazu, dass die AChE-Aktivität dauerhaft verloren geht. Schließlich wird beim „Cholinesterase Status“ die hemmende Aktivität des Patientenplasmas gegenüber der nicht inhibierten Kontroll-AChE bestimmt (4). Dieser Parameter gibt Hinweise, wie hoch die tatsächlich aufgenommene Giftmenge war. Bei einer hohen inhibitorischen Aktivität muss dann die Oximtherapie ebenfalls fortgesetzt werden. Dies dient dazu, dass neu synthetisierte AChE, die direkt wieder gehemmt wird, erneut und unmittelbar reaktiviert wird und nicht dem Prozess der Alterung unterzogen wird (Amend et al., 2020a).

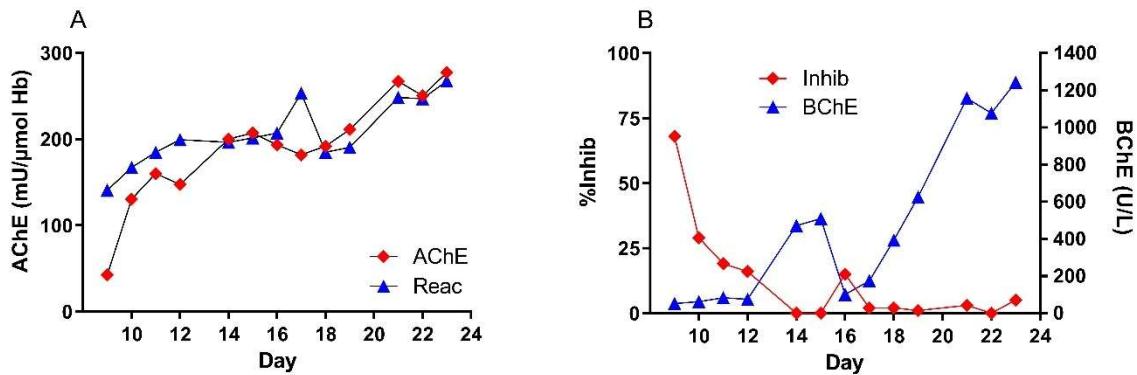


Abb. 16: Der exemplarische ChE-Status eines Patienten, der Obidoxim erhält. Die AChE *in-vivo* Aktivität (AChE) und die maximal mögliche AChE-Aktivität nach Inkubation mit 100 μ M Obidoxim *ex vivo* sind an verschiedenen Tagen nach der Aufnahme in mU/ μ mol Hb angegeben (Reac, A). Die hemmende Aktivität wird in % Hemmung von lyophilisiertem Erythrozyten AChE im Test (Inhib) und die BChE-Aktivität in U/l (B) angegeben. Modifiziert nach (Amend et al., 2020a).

In Abb. 16 werden die Vorteile des „Cholinesterase Status“ nach Vergiftung mit Organophosphaten deutlich. Initial zeigte sich bei Tag 9 eine deutlich gehemmte AChE im Patientenblut (Abb. 16 A). Die Bestimmung der Reaktivierbarkeit (Abb. 16 A) der gehemmten AChE zeigt ein deutliches therapeutisches Potential einer Therapie mit Oximen. Nach Therapiebeginn gleichen sich die Kurven der AChE Aktivität und der Reaktivierbarkeit an. Dies bedeutet, dass die reaktivierbare AChE auf das maximal mögliche Level angehoben wird. In Abb. 16 B wird deutlich, dass zunächst an Tag 9 eine erhebliche inhibitorische Aktivität vorhanden ist, welche bis Tag 14 kontinuierlich abnimmt. Damit ist also eine therapeutische Gabe von Oximen notwendig, um sowohl eine maximale Reaktivierung des gehemmten Enzyms zu erreichen, als auch die neu synthetisierte AChE vor erneuter Hemmung und Alterung zu schützen. Im gegenwärtigen Beispiel kann also spätestens ab Tag 17 auf eine Weiterführung einer Therapie mit Oximen verzichtet werden.

Die hier dargestellte direkte Nutzung von *in vitro* generierten Erkenntnissen und Testverfahren zur Optimierung einer Therapie einer Vergiftung mit Organophosphaten zeigt, dass translationale Ansätze nicht nur akademisch relevante neue Erkenntnisse liefern, sondern dass hier die Therapie optimiert werden kann. Die Steuerung der Medikation mit Oximen und die Abschätzung des Erfolgs etwaiger Extubationsversuche der Patienten können hiermit erfolgen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Der erste Teil der Arbeit zielt im Rahmen der Entwicklung von ex vivo Modellen auf die Nutzung und Etablierung standardisierter Modelle in Hinblick auf eine Vergiftung mit Organophosphaten ab.

Vergiftungen mit hochtoxischen Verbindungen sind eine relevante gesellschaftliche Herausforderung. In Ländern mit niedrigem Einkommen sind v.a. Pestizide aus der Gruppe der Organophosphate oder auch Carbamate relevant. In diesem Bereich der Toxikologie hat es in den letzten 60 Jahren wenig nennenswerte Fortschritte hinsichtlich einer Optimierung der gegenwärtig verfügbaren und zugelassenen Therapien gegeben (Worek et al., 2016; Amend et al., 2020b). Ursächlich hierfür könnte sein, dass diese Thematik für große pharmazeutische Unternehmen wenig lukrativ ist. Vermutlich spielen aber auch weitere Faktoren eine relevante Rolle. Bei der Entwicklung von Oximen zeigte sich, dass viele Ergebnisse aus unterschiedlichen Laboren oftmals nicht vergleichbar sind (Worek et al., 2016). Unterschiede im Versuchsaufbau, in der verwendeten Spezies und in der Modelletablierung verhindern oft eine Vergleichbarkeit der Erkenntnisse.

Die hier dargestellten ex vivo Modelle zur Nephrotoxizität zielen auf eine standardisierte Untersuchung selbiger ab und vereinheitlichen Modell- und Zellkulturbedingungen. Ein besonderer Vorteil der dargestellten Experimentalbedingung im Vergleich z.B. zur Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen ist eine einfache Reproduzierbarkeit. Wesentliche Variablen, wie die Art des verwendeten Mediums in den PCKS und den Zusatz potentiell nephrotoxischer Antibiotika wurde untersucht und die optimalen Bedingungen identifiziert.

In einem weiteren ex vivo Modell wurden Bispyridiniumverbindungen zur Wiederherstellung der neuromuskulären Transmission nach Nervenkampfstoffvergiftung untersucht. Dieses Modell nutzt Ratten-Hemidiaphragmen. Mögliche kausaltherapeutische Optionen der nikotinergen Effekte einer Vergiftung mit Organophosphaten standen hier im Fokus. Dieses Modell bietet für die moderne Wirkstoffentwicklung einen zukunftsträchtigen Ansatz: Wirkstoffkandidaten, die im molekularen Modelling identifiziert wurden, können direkt in diesem biologischen System hinsichtlich der Wirksamkeit getestet werden. Der

Umstand, dass eine Gleichwertigkeit dieses Ratten-Hemidiaphragma-Modells zu humanen neuromuskulären Endplatte in der Vergangenheit gezeigt wurde, ermöglicht eine direkte Translation der Ergebnisse zur tatsächlichen *in vivo* Situation. Perspektivisch sind hier Modelle, die auf induzierten pluripotenten Stammzellen basieren eine interessante Option. Allerdings müssen bereits verfügbare Modelle (Urzi et al., 2023) hierfür standardisiert werden.

In einem *ex vivo* Hautmodell wurde eine generisch nutzbare analytische Methode (Ellman Assay) zur Quantifizierung von Penetrationsvorgängen von Organophosphaten etabliert. Dies ermöglicht die Bewertung von Dekontaminationslösungen ohne auf kostspielige und arbeitsintensive Analytik, wie z.B. GC-MS-MS und LC-MS-MS, zurückgreifen zu müssen. Um hier ebenfalls das genutzte Modell weiter zu optimieren und zu standardisieren, werden perspektivisch Vollhautmodelle genutzt werden. Diese ahmen die physiologischen Prozesse der menschlichen Haut nach und werden standardisiert hergestellt.

Neben der Nutzung von *ex vivo* Modellen zur Charakterisierung von Pathomechanismen toxischer Verbindungen bieten auch *in vitro* Modelle umfangreiche Optionen. Grundsätzliche Fragestellungen zur Kardiotoxizität hochtoxischer Verbindungen wurden mittels induzierten pluripotenten Stammzellen-abgeleiteten Kardiomyozyten (hiPSC-CM) in einem Mikroelektroden Array System (MEA) untersucht. Dieses System wird als Screening Tool in der Pharmaindustrie seit vielen Jahren verwendet und konnte mit einigen Modifikationen zur Aufklärung arrhythmogener Eigenschaften von Nervenkampfstoffen und Glykosiden aus *N. oleander* und *T. peruviana* verwendet werden. Es erwies sich hier als vorteilhaft, dass das Modell zunächst mit bereits bekannten Substanzen, wie beispielsweise Digoxin charakterisiert werden konnte und so eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch in anderen Laboren denkbar ist.

Im Sinne eines translationalen Ansatzes wurde ein weiteres *in vitro* Modell, der sog. Cholinesterase Status verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass hier nicht nur eine gezielte Therapiesteuerung der Vergiftung durch Organophosphate möglich war, sondern auch Aussagen hinsichtlich Schweregrad der Vergiftung und prognostizierten Verlauf möglich war.

Schließlich lag ein weiterer Fokus der gegenwärtigen Arbeit auf der Organ-on-a-Chip Technologie. Dieser innovative Ansatz in der Pharmakologie und Toxikologie soll

perspektivisch aufgrund eines postulierten besseren translationalen Potentials Tierversuche ersetzen können. Hier zeigten sich aber deutliche Limitationen in Bezug auf niedermolekulare Substanzen. Modellverbindungen aus der Gruppe der Organophosphate wiesen eine erhebliche, teilweise sogar vollständige Absorption oder Degradation in Organchips auf. Diesem Aspekt war in der Vergangenheit kaum Aufmerksamkeit gewidmet wurden. Da die unterschiedlichen Polymere der Organchips außerdem auch in erheblichem Maße unterschiedliche Konzentrationen bioaktiver Degradationsprodukte erzeugten, können je nach Art des Polymers eine erhebliche Variabilität hinsichtlich biologischer Effekte erwartet werden. Somit gilt es vermutlich in der Zukunft zunächst die verwendeten Polymere in Bezug auf Interaktionen mit niedermolekularen Substanzen zu charakterisieren und erst danach ggf. über einen möglichen Ersatz für etablierte Tierversuche nachzudenken. Neben dem in der Pharmakologie und Toxikologie etablierten Prinzip der Lösungsmittelkontrolle und ggf. der unbehandelten Kontrolle könnte man analog dazu über die Etablierung von Polymer-Kontrollen diskutieren.

Literaturverzeichnis

- Abend, Y., Goland, S., Evron, E., Sthoeger, Z.M., Geltner, D., 1994. Acute renal failure complicating organophosphate intoxication. *Renal failure* 16 (3), 415–417. 10.3109/08860229409044881.
- Amend, N., Koller, M., Schmitt, C., Worek, F., 2024a. Toxicokinetic analysis of the highly toxic nerve agent VX in commercially available multi-organ-chips - ways to overcome compound absorption. *Toxicol. Lett.* 393, 78–83. 10.1016/j.toxlet.2024.01.013.
- Amend, N., Koller, M., Schmitt, C., Worek, F., Wille, T., 2023a. The suitability of a polydimethylsiloxane-based (PDMS) microfluidic two compartment system for the toxicokinetic analysis of organophosphorus compounds. *Toxicol. Lett.* 388, 24–29. 10.1016/j.toxlet.2023.10.007.
- Amend, N., Langgartner, J., Siegert, M., Kranawetvogl, T., Koller, M., John, H., Pflügler, C., Mögele-Schmid, C., Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2020a. A case report of cholinesterase inhibitor poisoning: Cholinesterase activities and analytical methods for diagnosis and clinical decision making. *Archives of Toxicology* 94 (6), 2239–2247. 10.1007/s00204-020-02741-2.
- Amend, N., Niessen, K.V., Seeger, T., Wille, T., Worek, F., Thiermann, H., 2020b. Diagnostics and treatment of nerve agent poisoning-current status and future developments. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1479 (1), 13–28. 10.1111/nyas.
- Amend, N., Thiermann, H., Worek, F., Wille, T., 2019. The arrhythmogenic potential of nerve agents and a cardiac safety profile of antidotes - a proof-of-concept study using human induced pluripotent stem cells derived cardiomyocytes (hiPSC-CM). *Toxicology letters* 15 (308), 1–6. 10.1016/j.toxlet.2019.03.003.
- Amend, N., Thiermann, H., Worek, F., Wille, T., 2023b. A pharmacologically pre-contracted smooth muscle bowel model for the study of highly-potent opioid receptor agonists and antagonists. *Toxicol. Lett.* 382, 41–46. 10.1016/j.toxlet.2023.05.010.
- Amend, N., Timperley, C.M., Bird, M., Green, A.C., Worek, F., Seeger, T., 2024b. Restoration of nerve agent impaired neuromuscular transmission in rat diaphragm by bispyridinium non-oximes - Structure-activity relationships. *Toxicology* 503, 153741. 10.1016/j.tox.2024.153741.
- Amend, N., Timperley, C.M., Bird, M., Green, A.C., Worek, F., Seeger, T., 2024c. The use of bispyridinium non-oxime analogues for the restoration of nerve agent impaired neuromuscular transmission in rat hemidiaphragms - Structure optimization. *Toxicol. Lett.* 10.1016/j.toxlet.2024.04.015.
- Amend, N., Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2021. Investigation of cardiac glycosides from oleander in a human induced pluripotent stem cells derived cardiomyocyte model. *Toxicol. Lett.* 350, 261–266. 10.1016/j.toxlet.2021.07.020.
- Berlinger J., 2017. North Koreans hiding in Malaysian embassy return to Pyongyang. CNN.
- Cavari, Y., Landau, D., Sofer, S., Leibson, T., Lazar, I., 2013. Organophosphate poisoning-induced acute renal failure. *Pediatric emergency care* 29 (5), 646–647. 10.1097/PEC.0b013e31828e9e45.
- Ciottone, G.R., 2018. Toxidrome Recognition in Chemical-Weapons Attacks. *The New England journal of medicine* 378 (17), 1611–1620. 10.1056/NEJMra1705224.
- Endt, F., Guo, T., Steinritz, D., Amend, N., Gudermann, T., Breit, A., 2025. Carfentanil stabilizes μ opioid receptor conformations that are ultra-efficient in inhibiting cAMP, resistant to naloxone or nalmefene but sensitive to naltrexone. *Arch Toxicol.* 10.1007/s00204-025-04048-6.
- Gray, A.C., White, P.J., Coupar, I.M., 2005. Characterisation of opioid receptors involved in modulating circular and longitudinal muscle contraction in the rat ileum. *British journal of pharmacology* 144 (5), 687–694. 10.1038/sj.bjp.0706107.
- Hoeffner, C., Worek, F., Amend, N., 2024a. Effects of organophosphates on precision-cut kidney slices. *Toxicology mechanisms and methods*, 1–33. 10.1080/15376516.2024.2356184.

- Hoeffner, C., Worek, F., Horn, G., Amend, N., 2024b. Optimization of long-term incubation of precision-cut kidney slices. *Toxicology mechanisms and methods*, 1–31. 10.1080/15376516.2024.2382797.
- Holmstedt, B., 1959. Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacological reviews* 11 (3), 567–688.
- Horn, G., Demel, T., Rothmiller, S., Amend, N., Worek, F., 2024a. The influence of the model pesticides parathion and paraoxon on human cytochrome P450 and associated oxygenases in HepaRG cells. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 62 (5), 288–295. 10.1080/15563650.2024.2361879.
- Horn, G., Frielingsdorf, F., Demel, T., Rothmiller, S., Worek, F., Amend, N., 2024b. Concentration-dependent effects of the nerve agents cyclosarin and VX on cytochrome P450 in a HepaRG cell-based liver model. *Journal of applied toxicology : JAT*. 10.1002/jat.4694.
- Hussain, Z., Rhee, K.W., Lee, Y.J., Park, H., 2016. The Effect of DA-9701 in Opioid-induced Bowel Dysfunction of Guinea Pig. *Journal of neurogastroenterology and motility* 22 (3), 529–538. 10.5056/jnm15194.
- John, H., van der Schans, M.J., Koller, M., Spruit, H.E.T., Worek, F., Thiermann, H., Noort, D., 2018. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: Forensic verification within an international laboratory network. *Forensic Toxicology* 36 (1), 61–71. 10.1007/s11419-017-0376-7.
- Kwong, T.C., 2002. Organophosphate Pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring* 24 (1), 144–149. 10.1097/00007691-200202000-00022.
- Marquart, K., Herbert, J., Amend, N., Thiermann, H., Worek, F., Wille, T., 2019. Effect of cholinergic crisis on the potency of different emergency anaesthesia protocols in soman-poisoned rats. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 57 (5), 343–349. 10.1080/15563650.2018.1520241.
- Marrs, T.C., 2007. Toxicology of Organophosphate Nerve Agents, in: Marrs, T.C., Maynard, R.L., Sidell, F.R. (Eds.), *Chemical Warfare Agents*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 191–221.
- Mew, E.J., Padmanathan, P., Konradsen, F., Eddleston, M., Chang, S.-S., Phillips, M.R., Gunnell, D., 2017. The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review. *Journal of affective disorders* 219, 93–104. 10.1016/j.jad.2017.05.002.
- Mikler, J., Tenn, C., Worek, F., Reiter, G., Thiermann, H., Garrett, M., Bohnert, S., Sawyer, T.W., 2011. Immobilization of Russian VX skin depots by localized cooling: implications for decontamination and medical countermeasures. *Toxicol. Lett.* 206 (1), 47–53. 10.1016/j.toxlet.2011.05.1047.
- Muñoz-Delgado, E., Montenegro, M.F., Campoy, F.J., Moral-Naranjo, M.T., Cabezas-Herrera, J., Kovacs, G., Vidal, C.J., 2010. Expression of cholinesterases in human kidney and its variation in renal cell carcinoma types. *The FEBS journal* 277 (21), 4519–4529. 10.1111/j.1742-4658.2010.07861.x.
- Russell and Burch, 1959. The Principles of Humane Experimental Technique. *Medical Journal of Australia* 1 (13), 500. 10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x.
- Schwab, A., Horn, G., Kehe, K., Worek, F., Amend, N., 2025. A simple acetylcholinesterase inhibition assay for the quantification of the nerve agent VX: Application in a Franz cell model with rat skin and various decontaminants. *Toxicol. Lett.* 404, 20–27. 10.1016/j.toxlet.2025.01.002.
- Sirin, G.S., Zhou, Y., Lior-Hoffmann, L., Wang, S., Zhang, Y., 2012. Aging mechanism of soman inhibited acetylcholinesterase. *The journal of physical chemistry. B* 116 (40), 12199–12207. 10.1021/jp307790v.
- Steindl, D., Boehmerle, W., Körner, R., Praeger, D., Haug, M., Nee, J., Schreiber, A., Scheibe, F., Demin, K., Jacoby, P., Tauber, R., Hartwig, S., Endres, M., Eckardt, K.-U., 2021. Novichok nerve agent poisoning. *Lancet (London, England)* 397 (10270), 249–252. 10.1016/S0140-6736(20)32644-1.

- Thors, L., Lindberg, S., Johansson, S., Koch, B., Koch, M., Hägglund, L., Bucht, A., 2017. RSDL decontamination of human skin contaminated with the nerve agent VX. *Toxicol. Lett.* 269, 47–54. 10.1016/j.toxlet.2017.02.001.
- Timperley, C.M., Bird, M., Green, C., Price, M.E., Chad, J.E., Turner, S.R., Tattersall, J.E.H., 2012. 1,1'-(Propane-1,3-diyl)bis(4-tert-butylpyridinium) di(methanesulfonate) protects guinea pigs from soman poisoning when used as part of a combined therapy. *Med. Chem. Commun.* 3, 352–356. 10.1039/C2MD00258B.
- Urzi, A., Lahmann, I., Nguyen, L.V.N., Rost, B.R., García-Pérez, A., Lelievre, N., Merritt-Garza, M.E., Phan, H.C., Bassell, G.J., Rossoll, W., Diecke, S., Kunz, S., Schmitz, D., Gouti, M., 2023. Efficient generation of a self-organizing neuromuscular junction model from human pluripotent stem cells. *Nature communications* 14 (1), 8043. 10.1038/s41467-023-43781-3.
- Vale, J.A., Marrs, T.C., Maynard, R.L., 2018. Novichok: A murderous nerve agent attack in the UK. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 56 (11), 1093–1097. 10.1080/15563650.2018.1469759.
- Valentin, J.-P., 2010. Reducing QT liability and proarrhythmic risk in drug discovery and development. *British journal of pharmacology* 159 (1), 5–11. 10.1111/j.1476-5381.2009.00547.x.
- Wadman, M., 2023. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. *Science (New York, N.Y.)* 379 (6628), 127–128. 10.1126/science.adg6276.
- Wille, T., Kaltenbach, L., Thiermann, H., Worek, F., 2013. Investigation of kinetic interactions between approved oximes and human acetylcholinesterase inhibited by pesticide carbamates. *Chemico-Biological Interactions* 206 (3), 569–572.
- Worek, F., Eyer, P., Thiermann, H., 2012. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug testing and analysis* 4 (3-4), 282–291. 10.1002/dta.337.
- Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry* 288 (1-2), 73–90; 10.1016/s0009-8981(99)00144-8.
- Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2016. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chemico-Biological Interactions* 259 (Pt B), 93–98. 10.1016/j.cbi.2016.04.032.

6. Danksagung

Ich möchte mich bei den ehemaligen Leitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr Herrn Prof. Dr. Horst Thiermann, Herrn Prof. Dr. Franz Worek und Herrn Prof. Dr. Kai Kehe herzlich für die exzellenten Arbeitsbedingungen bedanken. Insbesondere die geschaffenen Freiräume für Forschung in der Bundeswehr sind sicherlich außergewöhnlich.

Weiterhin möchte ich mich beim aktuellen Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, Herrn Prof. Dr. Dirk Steinritz herzlich bedanken. Er hat meinen Weg zur Habilitation auch in herausfordernden Situationen mit kreativen Lösungsansätzen begleitet und umfangreiche wissenschaftliche Kooperationen intensiv gefördert.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Timo Wille herzlich für die langjährige Unterstützung bedanken. In seiner Arbeitsgruppe habe ich das Handwerkszeug der Toxikologie erlernt und er hat meine Arbeiten, Versuche, Planungen und Auswertungen immer äußerst konstruktiv begleitet.

Zudem gilt mein herzlicher Dank Prof. Dr. Thomas Gudermann, der den Teil meiner Facharztweiterbildung am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München, exzellent betreut hat. Er hat weiterhin eine sehr enge Kooperation im Bereich der Forschung und mein Habilitationsprojekt nachdrücklich unterstützt.

Ich möchte mich weiterhin bei den Mitgliedern des Fachmentorats bedanken. Prof. Dr. Thomas Gudermann, Prof. Dr. Alexander Dietrich und Prof. Dr. Dennis Nowak haben das Habilitationsprojekt nachdrücklich unterstützt.

Weiterhin möchte ich mich für die exzellente Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Andreas Breit am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU bedanken. Die gemeinsamen Projekte sind immer lehrreich, akademisch spannend und bereiten mir große Freude.

Eine großartige administrative Unterstützung habe ich von Frau Jutta Schreier vom Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU erhalten.

Außerdem möchte ich mich bei den Doktoranden Christian Höffner und Amelie Schwab für die konstruktive Zusammenarbeit bedanken. Mein großer Dank für die technische Unterstützung bei den zahlreichen Experimenten gilt Katharina Kettner, Jasmin Rauch und Daniela Wöhl. Organisatorisch und administrativ möchte ich mich bei Madlen Baumann und Stefan Sterr bedanken.

Wissenschaftliche Kooperationsprojekte, die am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr bearbeitet wurden, stellen wichtige Säulen der Zusammenarbeit dar. Ich bedanke mich ausdrücklich bei Dr. Chris Timperley, Dstl, Porton Down, UK für die sehr enge Zusammenarbeit.

Schließlich gilt der größte Dank meiner Familie, die zugunsten der Forschung zahlreiche Entbehrungen hingenommen hat. Daher widme ich diese Arbeit meiner Frau Arlette.