

Nicole Stachel  
Dr. sc. hum.

## ***In vitro* Untersuchungen zur Bildung von Ethylglucuronid und -sulfat und Inhibition durch polyphenolische Nahrungsmittelinhaltsstoffe**

Fach/Einrichtung: Rechtsmedizin  
Doktormutter: Frau apl. Prof. Dr. rer. nat. Gisela Skopp

In Deutschland gelten rund 1,8 Millionen Menschen als alkoholabhängig. Bei forensischen, rechtlichen und therapeutischen Fragestellungen ist eine Objektivierung des Konsumverhaltens suchterkrankter oder gefährdeter Personen unerlässlich. Die Ethanolkonjugate Ethylglucuronid (EtG) und Ethylsulfat (EtS) haben sich in den letzten Jahren als Alkoholkonsummarker mit hoher Spezifität und Sensitivität etabliert. Allerdings sind Untersuchungen zu den an der Konjugation beteiligten Enzymen, den Glucuronyltransferasen (UGT) und den Sulfotransferasen (SULT), bisher unvollständig und teilweise widersprüchlich. In kontrollierten Trinkstudien wurden vermehrt hochvariable Bildungsrate beider Metabolite festgestellt. Bis heute gibt es kaum Untersuchungen dazu, ob und in welchem Ausmaß die Bildung der beiden Phase-II-Metabolite beim Menschen durch Nahrungsmittelinhaltsstoffe beeinflusst wird.

In dieser Studie sollten zunächst diejenigen UGT- und SULT-Isoformen identifiziert werden, die maßgeblich an der Bildung des EtG bzw. EtS beteiligt sind. Es wurden kinetische Profile der identifizierten Enzyme zur Charakterisierung erstellt. Zudem wurde der Einfluss der polyphenolischen Nahrungsmittelinhaltsstoffe Quercetin, Kämpferol und Resveratrol auf die Bildungsrate von EtG und EtS untersucht. Über geeignete Rechenmodelle wurde dann eine Abschätzung vorgenommen, in wieweit diese möglichen Interaktionen als Erklärung für die hochvariablen Bildungsrate dienen können.

Nach Optimierung und Validierung bestehender LC-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung von EtG und EtS wurden die Inkubationsbedingungen optimiert. Zunächst wurden unter Verwendung rekombinanter Enzyme die entsprechenden Isoformen identifiziert und von diesen (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A9, 2B7, 2B10, 2B15 und SULT1A1, 1A3, 1B1, 1E1, 2A1) kinetische Profile erstellt. Die Versuche wurden ebenfalls mit HLM und HLC durchgeführt. Zusätzlich war es erforderlich die Kinetiken der potentiellen Inhibitoren zu ermitteln. Durch nicht-lineare Regressionsanalyse wurden  $K_m$ ,  $V_{max}$  und  $Cl_{int}$  bestimmt. Danach wurden weiterführende kinetische Konstanten ( $IC_{50}$ ,  $K_i$ ,  $K_I$ ,  $k_{inact}$ ) zur Charakterisierung der Hemmung und zur Differenzierung des Hemmtyps ermittelt. Die Interpretation der Hemmkonstanten wurde anhand von Modellen vorgenommen, die für CYP-Enzyme entwickelt und etabliert wurden, da es weder für UGTs noch für SULTs derartige Verfahren gibt.

Die UGT-Enzyme wurden *in vitro* durch alle drei Polyphenole moderat gehemmt. Quercetin beeinflusste hierbei UGT1A1, 1A3 und 1A9; Kämpferol hemmte UGT2B7 und UGT2B10 und Resveratrol beeinträchtigte die EtG-Bildung durch UGT1A1 und UGT1A9, jeweils reversibel und kompetitiv. UGT2B7 wurde durch Quercetin irreversibel, metabolisch-aktiviert gehemmt. Eine Erhöhung des  $AUC_i/AUC$ -

Verhältnisses konnte für UGT1A1 bezüglich Quercetin, für Kämpferol bezüglich UGT2B10 und für Resveratrol bezüglich UGT1A9 aufgezeigt werden, unter der Annahme einer maximalen Plasmakonzentration von 1  $\mu\text{M}$  für alle drei Polyphenole, entsprechend einer Aufnahmemenge von mindestens 10-100 mg Polyphenolen. Die SULT-Enzyme wurden *in vitro* durch die Polyphenole stärker als die UGT-Enzyme gehemmt. Für SULT2A1 und SULT1E1 bezüglich Kämpferol und für SULT2A1 bezüglich Quercetin ergab sich eine moderate, allerdings metabolisch-aktivierte Hemmung, alle anderen Hemmungen verliefen reversibel und kompetitiv. Das  $\text{AUC}_i/\text{AUC}$ -Verhältniss war bei einer maximalen Plasmakonzentration von 1  $\mu\text{M}$  für alle drei Polyphenole für alle Isoformen, mit Ausnahme von SULT2A1 bezüglich Resveratrol und SULT1B1 bezüglich Kämpferol, erhöht. Dieses Ergebnis spricht für eine relevante Beeinflussung der EtS-Bildung durch Polyphenole.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, welche Transferasen an der Bildung von EtG und EtS beteiligt sind und wie diese durch Nahrungsmittelinhaltsstoffe modifiziert werden können. Damit sind grundlegende Daten für weiterführende Untersuchungen wie z.B. kontrollierte Trinkversuche und zur Interpretation von EtG- und EtS-Befunden bei klinischen und forensischen Fragestellungen etabliert worden.