

# **Curcuminoide: Metabolismus, Stabilität und reaktive Glucuronide**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
vorgelegte

**DISSERTATION**

von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

**Simone Höhle**

aus Geislingen an der Steige

**Dekan:** Prof. Dr. Holger Puchta

**Referent:** Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler

**Korreferent:** Prof. Dr. Doris Marko

**Tag der mündlichen Prüfung:** 26.04.2006



*Für meine Eltern*



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung und theoretische Grundlagen</b>	<b>1</b>
1.1 Curcuminoiden	1
1.1.1 Chemische Struktur	1
1.1.2 Chemische und physikalische Eigenschaften	2
1.1.3 Vorkommen und Verwendung	5
1.1.4 Biologische Wirkungen	5
1.1.5 Bisherige Erkenntnisse zur Pharmakokinetik	9
1.1.5.1 Pharmakokinetische Untersuchungen im Tiermodell	9
1.1.5.2 Untersuchungen zum Metabolismus	9
1.1.5.3 Klinische Humanstudien	11
1.2 UDP-Glucuronyltransferasen	12
1.2.1 Konjugationsreaktion und allgemeine Merkmale	12
1.2.2 UGT-Gen-Superfamilie	14
1.2.3 Gewebeverteilung	15
1.2.4 Substratspezifitäten	16
1.2.5 Wichtige Eigenschaften	17
1.2.6 Biologisch aktive und toxische Glucuronide	20
<b>2 Problemstellung</b>	<b>25</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1 Charakterisierung von Curcuminoid-Derivaten	26
3.2 Untersuchungen zur Stabilität von Curcuminoiden in physiologischen Flüssigkeiten	28
3.2.1 Zerfallsprodukte	29
3.2.2 Einfluß von FKS und Zellen	30
3.3 Metabolismusstudien in Präzisions-Leberschnitten	31
3.3.1 Optimierung der Versuchsbedingungen	31
3.3.2 Phase I-Metabolismus von CUR	33
3.3.3 Phase I-Metabolismus von Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR	36
3.3.4 Aufklärung der Phase I-Metaboliten mittels GC/MS-Analyse	36
3.3.5 Phase I- und Phase II-Metaboliten der Curcuminoiden	38
3.3.6 Detaillierte Untersuchung des CUR-Metabolismus	40
3.3.7 Metabolisierung synthetischer CUR-Derivate	42
3.4 Metabolismusstudien mit Zellfraktionen und Zellen	44
3.4.1 Oxidativer Metabolismus	44
3.4.2 Reduktiver Metabolismus	46
3.4.3 Sulfatierung	46
3.4.4 Intestinaler Phase I-Metabolismus	47
3.4.5 Untersuchungen in Zellkultur	47
3.5 Mikrosomale Glucuronidierung	48
3.5.1 Umsetzung von CUR mit Rattenlebermikrosomen	48
3.5.2 Umsetzung von CUR mit humanen Lebermikrosomen	49
3.5.3 Glucuronidierung reduktiver CUR-Metaboliten	50

3.5.4	Intestinale Glucuronidierung . . . . .	51
3.5.5	Etablierung geeigneter Bedingungen für CUR und CUR-Glucuronide . . . . .	52
3.5.6	Spezies- und gewebespezifische CUR-Glucuronidierung . . . . .	53
3.5.7	Umsetzungen mit Curcuminoid-Derivaten . . . . .	54
3.5.8	Strukturaufklärung der Glucuronide mittels LC/MS/MS-Analyse . . . . .	57
3.6	Glucuronidierung mit humanen rekombinanten UGTs . . . . .	59
3.6.1	Phenolisches Curcuminoid-Glucuronid . . . . .	63
3.6.2	Vergleichende Untersuchungen mit hepatischen und intestinalen Mikrosomen verschiedener Spezies . . . . .	65
3.6.3	Einfluß der Curcuminoid-Struktur . . . . .	68
3.6.4	Stabilität . . . . .	68
3.7	Kinetik der Glucuronidierung von CUR . . . . .	70
3.8	Interaktion von Curcuminoid-Glucuroniden mit Mikrotubuli-Proteinen . . . . .	71
3.8.1	Stabilität von Curcuminoid-Glucuroniden . . . . .	71
3.8.2	Hemmung der Mikrotubuli-Polymerisation durch Glucuronide von Curcuminoiden . . . . .	73
3.8.3	Beeinflussung der CUR-Stabilität durch Bestandteile des Polymerisationsansatzes . . . . .	76
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
4.1	Stabilität von Curcuminoiden . . . . .	79
4.2	Metabolismus von Curcuminoiden in Präzisions-Leberschnitten und Zellfraktionen . . . . .	80
4.2.1	Phase I-Metabolismus von CUR . . . . .	80
4.2.2	Phase II-Metabolismus von CUR . . . . .	81
4.2.3	Metabolismus von Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR . . . . .	83
4.3	Glucuronidierung von Curcuminoiden . . . . .	83
4.3.1	Allgemeine Merkmale . . . . .	83
4.3.2	Einsatz von humanen rekombinanten UGTs . . . . .	84
4.3.3	Kinetische Untersuchungen mit CUR . . . . .	85
4.4	Hepatischer Curcuminoid-Metabolismus bei Ratte und Mensch . . . . .	87
4.5	Intestinaler Curcuminoid-Metabolismus und Bioverfügbarkeit . . . . .	87
4.6	Biologische Wirkungen der Metabolite und Zerfallsprodukte von CUR . . . . .	90
4.7	Untersuchungen mit synthetischem Iso-CUR . . . . .	91
4.8	Toxikologische Relevanz von Curcuminoid-Glucuroniden . . . . .	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>98</b>
6.1	Geräte, Chemikalien und Lösungen . . . . .	98
6.1.1	Geräte und Hilfsmittel . . . . .	98
6.1.2	Verbrauchsmaterial . . . . .	99
6.1.3	Chemikalien . . . . .	100
6.1.4	Versuchstiere und biologisches Material . . . . .	101
6.1.5	Pufferlösungen und Kulturmedien . . . . .	102
6.1.5.1	Allgemeine Pufferlösungen . . . . .	102
6.1.5.2	Puffer für Präparation von Zellfraktionen . . . . .	102
6.1.5.3	Puffer und Kulturmedium für Präzisions-Gewebeschnitte . . . . .	103

6.1.5.4	Kulturmedium für Ishikawa-Zellen . . . . .	104
6.1.5.5	Puffer für MTP-Präparation und Polymerisationsassay . . .	104
6.2	Methoden . . . . .	105
6.2.1	Analytik . . . . .	105
6.2.1.1	GC/MS . . . . .	105
6.2.1.2	HPLC/DAD . . . . .	107
6.2.1.3	HPLC/ESI/MS/MS . . . . .	109
6.2.1.4	NMR . . . . .	110
6.2.2	Darstellung von Curcuminoid-Derivaten . . . . .	110
6.2.2.1	Chemische Synthese . . . . .	110
6.2.2.2	Katalytische Hydrierung . . . . .	111
6.2.2.3	Enzymatische Reduktion . . . . .	112
6.2.2.4	Chemische Reduktion . . . . .	112
6.2.2.5	Charakterisierung der Syntheseprodukte . . . . .	113
6.2.3	Präparation und Charakterisierung von Zellfraktionen . . . . .	113
6.2.3.1	Präparation aus Lebergewebe . . . . .	113
6.2.3.2	Präparation aus Darmgewebe . . . . .	114
6.2.3.3	Präparation aus Niere . . . . .	114
6.2.3.4	Bestimmung des Proteingehalts . . . . .	115
6.2.3.5	Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts . . . . .	115
6.2.4	Stabilitätsuntersuchungen . . . . .	116
6.2.4.1	Untersuchungen in Kalium-Phosphat-Puffer . . . . .	116
6.2.4.2	Untersuchungen in Kulturmedium . . . . .	116
6.2.4.3	Einfluß von Mikrosomen . . . . .	117
6.2.4.4	Einfluß von pH-Wert und Pufferzusätzen . . . . .	118
6.2.5	<i>In vitro</i> -Studien mit Präzisions-Gewebeschnitten . . . . .	119
6.2.5.1	Präparation von Leberschnitten . . . . .	119
6.2.5.2	Inkubation von Leberschnitten . . . . .	120
6.2.5.3	Enzymatische Hydrolyse und Extraktion . . . . .	120
6.2.6	<i>In vitro</i> -Assays mit Zellfraktionen: Phase I-Reaktionen . . . . .	122
6.2.6.1	Oxidative Umsetzungen . . . . .	122
6.2.6.2	Reduktive Umsetzungen . . . . .	123
6.2.6.3	Umsetzungen mit intestinaler S9-Fraktion . . . . .	123
6.2.7	<i>In vitro</i> -Assays mit Zellfraktionen: Phase II-Reaktionen . . . . .	124
6.2.7.1	Konventioneller Glucuronidierungsassay . . . . .	124
6.2.7.2	Kombinierter Reduktions- und Glucuronidierungsassay . . .	124
6.2.7.3	Glucuronidierungen mit intestinaler S9-Fraktion . . . . .	125
6.2.7.4	Modifizierter Glucuronidierungsassay . . . . .	125
6.2.7.5	Umsetzungen mit rekombinanten humanen UGTs . . . . .	126
6.2.7.6	Umsetzungen mit gewebe- und speziesspezifischen Mikro- somen . . . . .	128
6.2.7.7	Inhibitionsassay . . . . .	128
6.2.7.8	Kinetische Untersuchungen . . . . .	128
6.2.7.9	Sulfatierungsassay . . . . .	129
6.2.8	Allgemeine Methoden für Glucuronide . . . . .	130
6.2.8.1	Extraktion von Glucuroniden . . . . .	130
6.2.8.2	Anreicherung von Glucuroniden . . . . .	130
6.2.9	Präparation von mikrotubulären Proteinen aus Rinderhirn . . . . .	131

6.2.10 Mikrotubuli-Polymerisationsassay . . . . .	131
<b>7 Literatur</b>	<b>134</b>
<b>A Anhang</b>	<b>155</b>
A.1 Analytische Daten zu Produkten des Curcuminoid-Zerfalls . . . . .	155
A.1.1 HPLC/DAD . . . . .	155
A.1.2 GC/MS . . . . .	156
A.2 Curcuminoid- und Curcuminoid-Glucuronide . . . . .	156
A.2.1 UV/Vis-Spektren . . . . .	156
A.2.2 Externe Kalibrierungen . . . . .	157
A.2.3 Kinetik UGT1A8 . . . . .	157
A.3 GC/MS: Fragmentierungsmuster . . . . .	158
A.3.1 Metaboliten natürlicher Curcuminoid- . . . . .	158
A.3.2 Metaboliten synthetischer Curcuminoid- . . . . .	159
A.4 HPLC/ESI/MS/MS: Fragmentierungsmuster . . . . .	159
A.5 NMR-Spektren . . . . .	160
A.5.1 CUR . . . . .	160
A.5.2 Iso-CUR . . . . .	160
A.6 Polymerisationskurven . . . . .	161
A.6.1 Ketoprofen und Ketoprofen-Acylglucuronide . . . . .	161
A.6.2 CUR und CUR-Glucuronid . . . . .	161
A.6.3 Demethoxy-CUR und Demethoxy-CUR-Glucuronid . . . . .	162
A.6.4 Bisdemethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR-Glucuronid . . . . .	162
A.6.5 Dimethyl-CUR und Dimethyl-CUR-Glucuronid . . . . .	163
A.6.6 Hexahydro-CUR und Hexahydro-CUR-Glucuronid . . . . .	163
<b>B Publikationen</b>	<b>165</b>
<b>C Danksagung</b>	<b>167</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BDMC	Bisdemethoxycurcumin
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(Trimethylsilyl)-trifluoracetamid
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
COSY	Correlation Spectroscopy
COX	Cyclooxygenase
CUR	Curcumin
CYP	Cytochrom P450
DAD	Dioden-Array-Detektor
DiMeCUR	Dimethylcurcumin
DMC	Demethoxycurcumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Dynamic Organ Culture
E2	17 $\beta$ -Estradiol
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylen-glykol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-tetraessigsäure
EI	Electron Impact (Elektronenstoß)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
F12	Nutrient Mixture F-12 Ham
FKS	Fötales Kälberserum
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GST	Glutathion-S-Transferase

## Abkürzungsverzeichnis

---

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HHCUR	Hexahydrocurcumin
HLC	Humanes Lebercytosol
HLM	Humane Lebermikrosomen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
IL	Interleukin
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase (induzierbare Stickoxid-Synthase)
ISTD	Interner Standard
Kap.	Kapitel
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LC/MS	Gekoppelte Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie
LOX	Lipoxygenase
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
mAU	milli Absorption Units (Milliabsorptionseinheiten)
MeOH	Methanol
MES	Morpholinethansulfonsäure
min	Minute(n)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MTP	mikrotubuläre Proteine
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- $\kappa$ B	Nuklearer Faktor $\kappa$ B
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Magnetische Kernresonanz)

## Abkürzungsverzeichnis

---

NSAID(s)	Nonsteroidal anti-inflammatory drug(s) (Nicht-steroidale antiinflammatorische Substanz(en))
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
RI-S9	S9-Fraktion aus Rattendarm
RLC	Rattenlebercytosol
RLM	Rattenlebermikrosomen
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
S.D.	Standard Deviation (Standardabweichung)
Smp.	Schmelzpunkt
SULT	Sulfotransferase
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin
TFMU	4-(Trifluormethyl)umbelliferon
TMBPA	3,5,3',5'-Tetramethyl-bisphenol A
TMS	Trimethylsilyl
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TPA	12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-acetat
$t_R$	Retentionszeit
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Enzymeinheiten)
UDP	Uridindiphosphat
UDPGA	Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure
UGT(s)	Uridin-5'-diphospho-Glucuronyltransferase(n)
UV	Ultraviolett
Vis	Visible



# 1 Einleitung und theoretische Grundlagen

## 1.1 Curcuminoide

Curcuminoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die in den Rhizomen verschiedener *Curcuma*-Gewächse wie z.B. *Curcuma longa* vorkommen. Unter dem Begriff Curcuminoide werden die drei Substanzen Curcumin (CUR), Demethoxycurcumin (Demethoxy-CUR) und Bisdemethoxycurcumin (Bisdemethoxy-CUR) zusammengefasst.

### 1.1.1 Chemische Struktur

Chemisch betrachtet handelt es sich bei den Curcuminoiden um konjugierte Diarylheptanoide. Die drei Curcuminoide unterscheiden sich lediglich in der Anzahl ihrer Methoxygruppen (Abb. 1).

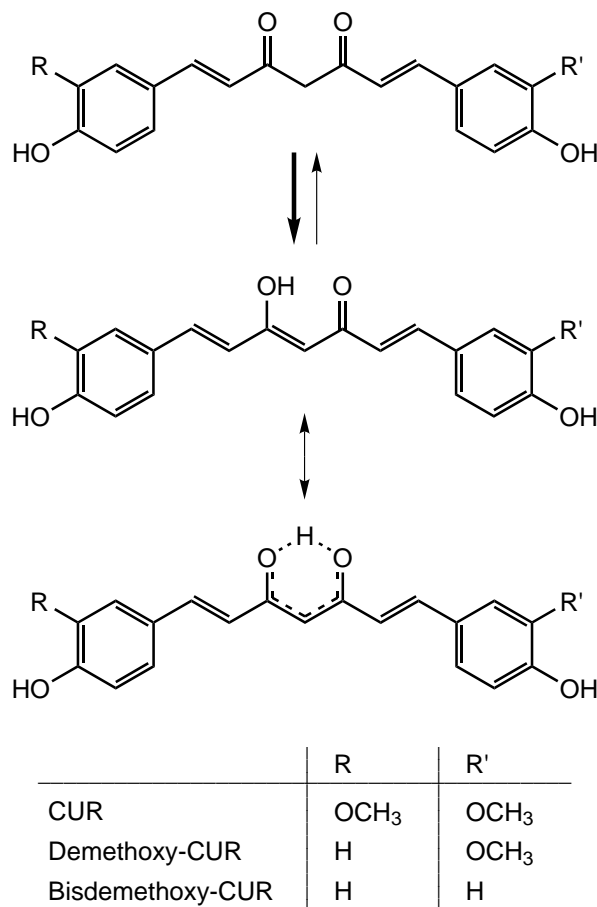


Abbildung 1: Chemische Struktur der Curcuminoide.

Aufgrund ihres konjugierten Doppelbindungssystems sind die Curcuminoide intensiv gelb gefärbt. Der aliphatische Molekülteil enthält ein außergewöhnliches  $\beta$ -Diketo-Strukturelement, wodurch die Curcuminoide einer Keto-Enol-Tautomerisierung unterliegen. Die Diketone liegen in gelöstem und in festem Zustand ausschließlich in der Enol-Form vor [Matthes et al., 1980; Roughley und Whiting, 1973; Sharma et al., 2005; Tønnesen et al., 1982; Tønnesen, 1992; Unterhalt, 1980]. Die Enolisierung wird bevorzugt, da sie aufgrund der Ausbildung von Resonanzstrukturen sowie intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert und damit energetisch begünstigt wird. Dadurch kann ein pseudo-aromatischer Zustand (Abb. 1) ausgebildet werden [Cooper et al., 1994; Tønnesen und Karlsen, 1983; Unterhalt, 1980]. Zudem kann die Enolform als vinyloge Carboxylsäure angesehen werden.

Kristallstruktur-Untersuchungen von CUR haben ergeben, dass das Wasserstoffatom statistisch zwischen den beiden aliphatischen Sauerstoffatomen verteilt ist, anstatt an ein einziges Sauerstoffatom gebunden zu sein. Beide Sauerstoffatome können als Träger des Enol-Wasserstoffs fungieren. Der intramolekulare Wechsel zwischen den äquivalenten Enolen findet in Lösung vermutlich sehr schnell statt [Roughley und Whiting, 1973]. Beide Sauerstoffatome des Enolrings sowie die phenolischen Hydroxylgruppen können intermolekulare Wechselwirkungen eingehen [Tønnesen et al., 1982; Tønnesen, 1992]. Bei rekristallisiertem Bisdemethoxy-CUR (Hydrat, Methanol-Komplex) ist das Wasserstoffatom der Keto-Enol-Struktur an ein einziges Sauerstoffatom gebunden und das andere Sauerstoffatom kann intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden [Karlsen et al., 1988; Tønnesen et al., 1983; Tønnesen, 1992].

### 1.1.2 Chemische und physikalische Eigenschaften

Einen Überblick über die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Curcuminoide gibt Tabelle 1.

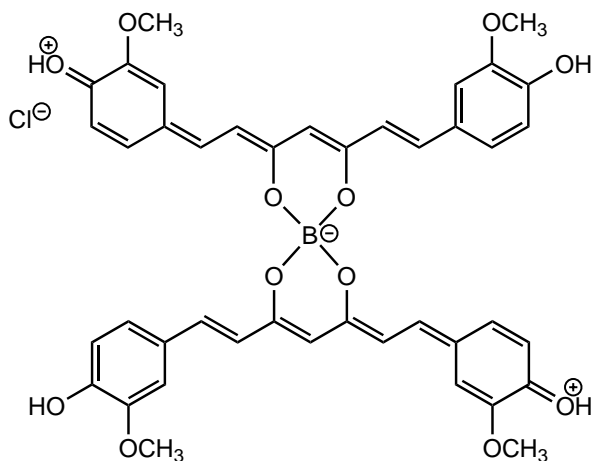
**Tabelle 1:** Physikalische und chemische Eigenschaften von Curcuminoiden [Govindarajan, 1980; Pedersen et al., 1985; Tønnesen et al., 1995].

Trivialname	CUR	Demethoxy-CUR	Bisdemethoxy-CUR
Chemischer Name	Diferuloylmethan	4-Hydroxycinnamoyl-feruloylmethan	Bis-4-Hydroxycinnamoylmethan
Summenformel	$C_{21}H_{20}O_6$	$C_{20}H_{18}O_5$	$C_{19}H_{16}O_4$
Molekulargewicht (g/mol)	368,39	338,36	308,33
Aussehen	gelbes, kristallines Pulver	orange-gelbes, amorphes Produkt	gelbe Platten
Schmelzpunkt ( $^{\circ}C$ )	182-183	172-174	223-224
Absorptionsmax. (EtOH)	427	424	418
Löslichkeit	unlöslich in Wasser, Hexan, Ether; löslich in Alkohol, Aceton, Eisessig, organischen Lösungsmitteln		

Die Farbe von CUR in wässrigen Medien oder organischen Lösungsmitteln ist aufgrund von Änderungen des Dissoziationsgrades oder des Zerfalls (s.u.) nicht konstant. Bei pH 1-7 weist CUR in Lösung eine gelbe Farbe auf, die im basischen Milieu durch Salzbildung mit den Alkalien zu rot-braun bis tiefrot übergeht [Tønnesen, 1992]. Die Curcuminoide besitzen eine Fluoreszenz. Die Anregung erfolgt bei 435 nm, die Emission bei 520 nm [Govindarajan, 1980].

### CUR-Komplexe

Die Keto-Enol-Einheit der Curcuminoide stellt den reaktiven Teil dieser Verbindungen dar. Curcuminoide sind starke Komplexbildner. Als enolisierbare 1,3-Diketone sind sie in der Lage mit Borsäure unter Bildung eines sechsgliedrigen Ringes zu einem charakteristischen roten Komplex zu reagieren. Die Nachweisreaktion von Boraten mit Curcuma-Papier stellt einen altbekannten und sensitiven Test dar [Cooper et al., 1994; Roth und Miller, 1964a,b; Umland und Pottkamp, 1968]. Auch bei der chemischen Synthese von Curcuminoid-Derivaten macht man sich die Komplexierung von Boraten mit Diketonen zu Nutze, um eine selektive Reaktion des entsprechend substituierten Benzaldehyds mit den terminalen Enden des Diketons zu gewährleisten. Der Borsäure-Komplex (Abb. 2) wird anschließend durch saure Hydrolyse unter Freisetzung des Produkts zerstört [Gomes de et al., 2002; Pabon, 1964; Pedersen et al., 1985].

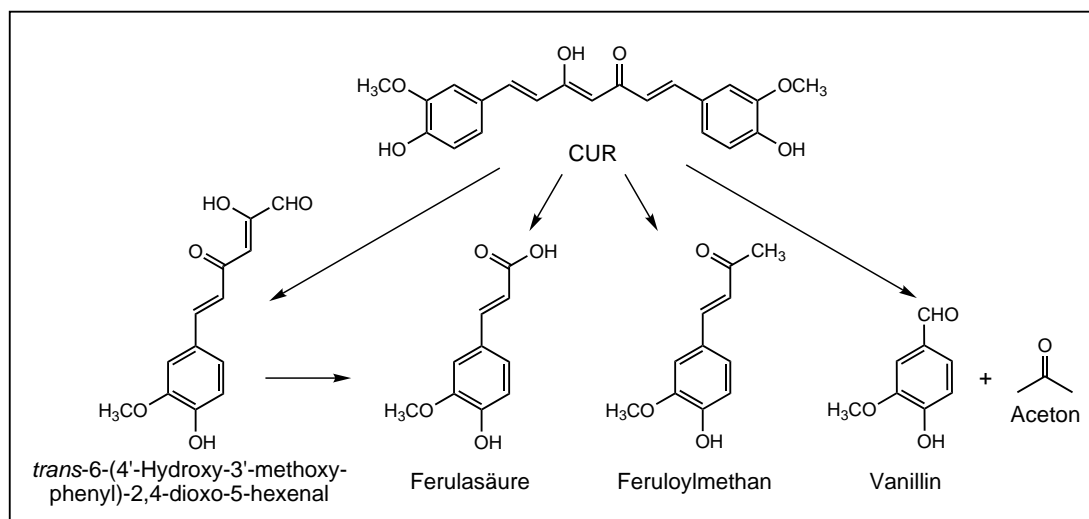


**Abbildung 2:** Postulierte chemische Struktur des CUR-Bor-Komplexes bei der CUR-Synthese nach Pabon [1964].

Von vielen anderen Metallen (Fe, Cu, Ni, Zn, Sn, K, Al) ist bekannt, dass sie mit Curcuminoiden Chelate bilden können [Sorenson, 2002; Tønnesen, 1992]. Schwächere Komplexe bildet Curcumin mit Magnesium und Calcium. Chelatbildner sind *in vivo* als Katalysatoren sowie als Inhibitoren biochemischer Prozesse von Bedeutung [Cooper et al., 1994; Tønnesen, 1992].

### Chemische Stabilität

Die Keto-Enol-Struktur stellt zudem die instabile Stelle des CUR-Moleküls dar. Die chemische Stabilität von CUR in wässrigen Lösungen ist pH- und zeitabhängig. Unter neutralen bis basischen Bedingungen ist CUR in wässriger Lösung nicht stabil. In alkalischer Lösung erfolgt zuerst die Dissoziation des Enols ( $pK_a$  7,8), wodurch die negative Ladung über den Aromaten stabilisiert und die konjugierte Dien-Struktur zerstört wird. Im Alkalischen folgt weiterhin die sukzessive Dissoziation der Phenole ( $pK_a$  8,5 und 9,0) [Tønnesen und Karlsen, 1985b]. Da die Hydroxylgruppen bei saurem pH-Wert in undissoziierter Form vorliegen, weisen die Curcuminoiden in diesem Milieu eine höhere Stabilität auf. Produkte des CUR-Zerfalls bei  $pH > 7$  sind Ferulasäure, Feruloylmethan, Vanillin und Aceton (Abb. 3) [Price und Buescher, 1997; Tønnesen und Karlsen, 1985a; Wang et al., 1997]. Der Zerfall von CUR in alkalischem Milieu ist sehr komplex, mitunter ist die Bildung gelber bis gelb-brauner Kondensationsprodukte von Feruloylmethan beschrieben [Tønnesen und Karlsen, 1985a]. Als weiteres Abbauprodukt von CUR wird *trans*-6-(4'-Hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexenal genannt (Abb. 3). Die Anwesenheit von fötalem Kälberserum (FKS) oder Humanblut reduziert diesen Zerfall von CUR bei  $pH > 7$  in Kulturmedium oder Phosphat-Puffer. In Anwesenheit von 10% FKS oder Humanblut waren weniger als 20% des CUR in 1 h zerfallen, im Vergleich zu 90% nach 30 min in serumfreiem Medium ( $pH$  7,2,  $37^\circ C$ ) [Wang et al., 1997].



**Abbildung 3:** Zerfallsprodukte von CUR in wässrigen Systemen [Tønnesen und Karlsen, 1985a; Wang et al., 1997].

Da CUR eine lipophile und polyphenolische Verbindung darstellt, ist es zur Interaktion mit Makromolekülen imstande. Zur Bindung zwischen CUR und Serumalbumin liegen einige Studien vor [Barik et al., 2003; Pulla Reddy et al., 1999; Zsila et al., 2003a,b]. CUR wird in einer



tiefen hydrophoben Tasche des Proteins komplexiert, wodurch der hydrolytische Zerfall von CUR in biologischen Systemen reduziert wird, z.T. vermutlich dadurch, dass die Zugänglichkeit von Wassermolekülen behindert wird.

Desweiteren wird die Stabilität von CUR in Phosphat-Puffer (pH 7,4) durch Zusatz von Antioxidantien wie Ascorbinsäure, N-Acetylcystein und Glutathion oder durch Rattenleber-Mikrosomen bzw. Cytosol verbessert [Oetari et al., 1996].

Während die Stabilität von CUR untersucht wurde, gibt es für andere Curcuminoid-Kongenerer kaum vergleichende Untersuchungen. Die beiden demethoxylierten Komponenten Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR besitzen in alkalischer Lösung höhere Halbwertszeiten als CUR, wobei Bisdemethoxy-CUR stabiler als Demethoxy-CUR ist [Price und Buescher, 1997].

### 1.1.3 Vorkommen und Verwendung

Die Curcuminoide sind in den Rhizomen der asiatischen *Curcuma*-Pflanze enthalten. Die Gattung *Curcuma* gehört zur Pflanzenfamilie der *Zingiberaceae* (Ingwergewächse). Dieser Gattung gehört eine Vielzahl von Arten wie z.B. *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza*, *Curcuma aromatica* und *Curcuma zedoaria* an. Die *Curcuma*-Gewächse werden hauptsächlich in asiatischen Ländern wie Indien, Indonesien und China kultiviert. Die Curcuminoide sind durchschnittlich mit 2-5% im Rhizom enthalten und für die gelb-orange Farbe verantwortlich. Die Farbpigmente werden durch Extraktion aus dem Rhizom gewonnen. Der Hauptbestandteil des *Curcuma*-Extrakts ist das CUR (50-60%) zusammen mit Demethoxy-CUR (20-30%) und Bisdemethoxy-CUR (7-20%) [Govindarajan, 1980]. Bei kommerziell erhältlichem „Curcumin“ handelt es sich meist um ein Gemisch der drei Curcuminoide mit CUR als Hauptkomponente [Tønnesen, 1992]. Die gelbe Farbe der Curcuminoide, ihr scharfer Geschmack sowie ihre biogene Wirkung (s. Kap. 1.1.4) bedingen ihren vielfältigen Einsatz. Zumeist wird das getrocknete und gemahlene Rhizom als Pulver verwendet. Aufgrund der intensiven gelben Farbe werden die Curcuminoide als Farbstoff für Lebensmittel, Kosmetika und Textilien eingesetzt. In Deutschland ist Curcumin (E100) im Rahmen der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung als Farbstoff für bestimmte Lebensmittel zugelassen. Curcuminoide finden auch als Gewürz Anwendung. Beispielsweise verleihen die Curcuminoide dem Currypulver oder auch dem Speisesenf [Unterhalt, 1980] seine charakteristische Farbe und bereichern das Aroma.

### 1.1.4 Biologische Wirkungen

Der *Curcuma*-Pflanze und ihren Inhaltsstoffen werden nach traditionellen und neueren Erkenntnissen arzneiliche Wirkungen nachgesagt. In der traditionellen indischen (Ayurveda) und chinesischen Medizin wurde die *Curcuma*-Pflanze bereits vor Tausenden von Jahren zur

Heilung verschiedener Krankheiten eingesetzt [Scartezzini und Speroni, 2000]. Das *Curcuma*-Pulver wird z.B. topisch zur Behandlung von Wunden, Entzündungen, Schwellungen, Verstauchungen und Verrenkungen sowie zur Heilung von Rheuma, Husten, Ikterus etc. angewendet [Ammon und Wahl, 1991; Sharma et al., 2005]. Die Wirkung als Choleretikum (erhöhte Galleproduktion) und Cholekinetikum (verstärkter Galleabfluß), die zu einer verbesserten Fettverdauung führt, ist ebenfalls seit langem bekannt [Ammon und Wahl, 1991; Deters et al., 1999; Platel und Srinivasan, 1996]. Obwohl neben den Curcuminoiden z.B. ätherische Öle (15-20%) weitere Inhaltsstoffe des *Curcuma*-Rhizoms darstellen [Govindarajan, 1980], werden hauptsächlich die Curcuminoide als die biologisch aktiven Substanzen angesehen.

Aufgrund des enormen Spektrums an biologischen Aktivitäten ist CUR in den letzten Jahrzehnten Gegenstand hunderter Publikationen, die sich mit seinen antioxidativen, antiinflammatorischen und antikanzerogenen Eigenschaften beschäftigen. In den letzten Jahren sind insbesondere die Pharmakologie und die potentielle chemotherapeutische Wirkung von CUR in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Der heutige Kenntnisstand basiert auf *in vitro*-Studien, Tiermodellen und Humanstudien [Aggarwal et al., 2003; Ammon und Wahl, 1991; Araujo und Leon, 2001; Conney et al., 1997; Joe et al., 2004; Lin et al., 2000; Lin und Lin-Shiau, 2001; Miquel et al., 2002; Nakatani, 2000; Sharma et al., 2005].

Als Pflanzenpolyphenol besitzt CUR antioxidative Eigenschaften, die neben den phenolischen Hydroxygruppen zusätzlich durch die  $\beta$ -Diketo-Struktur und die Bildung relativ stabiler freier Radikale aufgrund der konjugierten Doppelbindungsstruktur vermittelt werden [Jovanovic et al., 1999, 2001; Naidu und Thippeswamy, 2002; Patro et al., 2002; Wright, 2002]. CUR fungiert als Radikalfänger für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B. Superoxidationenradikale und Hydroxylradikale [Chen et al., 2005b; Kunchandy und Rao, 1990] und interagiert mit der Lipidperoxidation [Donatus et al., 1990; Masuda et al., 2001; Naidu und Thippeswamy, 2002; Okada et al., 2001; Patro et al., 2002; Reddy und Lokesh, 1992; Sharma, 1976; Sharma et al., 2001a; Sreejayan und Rao, 1994] und kann so Lipide und DNA vor oxidativen Schäden schützen. Außerdem inhibiert CUR die Stickoxid-Synthase (iNOS), die bei Entzündungsprozessen induziert wird [Brouet und Ohshima, 1995; Chan et al., 1998; Rao et al., 1999]. Die antiinflammatorische Wirkung von CUR [Chainani-Wu, 2003] wird z.B. durch die Beeinflussung der am Entzündungsprozess beteiligten Enzyme der Prostaglandin-Biosynthese (Cyclooxygenase (COX), Lipoxxygenase (LOX)) hervorgerufen [Began et al., 1998; Huang et al., 1991a; Lin und Lin-Shiau, 2001; Skrzypczak-Jankun et al., 2003, 2000]. Beispielsweise inhibiert CUR die COX-2-Expression und hemmt damit nicht die Enzymaktivität, sondern bereits auf der Ebene der Transkription [Ireson et al., 2001; Zhang et al., 1999]. Im Folgenden sind weitere Effekte von CUR beispielhaft aufgelistet:

- Cholesterolsenkende Wirkung [Asai und Miyazawa, 2001; Hussain und Chandrasekhara, 1992; Rao et al., 1970; Soni und Kuttan, 1992; Soudamini et al., 1992; Yasni et al., 1993]

- Antibakterieller und antiviraler Effekt [Dahl et al., 1989; Lutomski et al., 1974; Sharma et al., 2000]
- Antiproliferative Effekte in Zellkulturen [Aggarwal et al., 2003; Chen und Huang, 1998; Chen et al., 1999; Mori et al., 2001; Shao et al., 2002; Verma et al., 1997], z.B. durch Zellzyklus-Arrest [van Erk et al., 2004; Hanif et al., 1997; Holy, 2002; Shishodia et al., 2005] oder Induktion von Apoptose [Anto et al., 2002; Bush et al., 2001; Dorai et al., 2001; Jana et al., 2004; Jiang et al., 1996b; Kuo et al., 1996; Pan et al., 2001; Yan et al., 2005]
- Inhibitor der Mutagenese und chemisch induzierten Kanzerogenese nach topischer Anwendung [Huang et al., 1995, 1997; Li et al., 2002] sowie nach Aufnahme über den Gastrointestinaltrakt [Inano et al., 1999, 2000; Kawamori et al., 1999; Rao et al., 1995; Shukla et al., 2002] im Tiermodell; CUR kann dabei Einfluß auf die Tumor-Initiation, Promotion und Progression haben.
- Effekte auf Phase I- und Phase II-metabolisierende Enzyme [Dinkova-Kostova und Talalay, 1999; Iqbal et al., 2003; van der Logt et al., 2003; Thapliyal et al., 2002], z.B. Inhibition von Cytochrom P450 (CYP)-Isoenzymen (Schutz vor Kanzerogenen) [Ciolino et al., 1998; Firozi et al., 1996; Oetari et al., 1996; Thapliyal und Maru, 2001] oder Induktion von Glutathion-S-Transferase (GST) [Nijhoff et al., 1993; Piper et al., 1998; Sharma et al., 2001a; Singh et al., 1998; Susan und Rao, 1992] sowie Inhibition von Sulfotransferase (SULT) [Vietri et al., 2003]
- Inhibition der Angiogenese [Arbiser et al., 1998; Robinson et al., 2003; Thaloor et al., 1998]
- Inhibition von DNA-Topoisomerase II [Martin-Cordero et al., 2003]
- ...

Die molekularen Wirkmechanismen von CUR sind komplex und vielfältig. Bisher bekannte Mechanismen basieren auf der Modulation diverser Signaltransduktionswege, die bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen. Die Angriffsorte von CUR befinden sich dabei auf verschiedenen Regulationsebenen und reichen von der Enzymebene über die mRNA-Ebene bis hin zur DNA-Ebene [Gescher et al., 2001; Joe et al., 2004; Leu und Maa, 2002; Lin und Lin-Shiau, 2001; Lu et al., 1994]. CUR supprimiert die Aktivitäten von Protein-Kinasen [Korutla und Kumar, 1994; Korutla et al., 1995; Reddy und Aggarwal, 1994] wie z.B. Protein-Kinase C [Liu et al., 1993] und Protein-Tyrosin-Kinase [Chen und Huang, 1998]. Weiterhin hat CUR Einfluß auf verschiedene Transkriptionsfaktoren [Chen und Tan, 1998; Dickinson et al., 2003; Huang et al., 1991b; Kakar und Roy, 1994; Lu et al., 1994]. Beispielsweise kann CUR in die Signalübertragung des Transkriptionsfaktors

Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), der bei Entzündungsprozessen, der Regulation der Immunantwort, sowie bei der Zell-Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle spielt, eingreifen [Belakavadi und Salimath, 2005; Shishodia et al., 2005; Singh und Aggarwal, 1995]. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B kann beispielsweise durch den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ausgelöst werden. NF- $\kappa$ B liegt in inaktiver Form als cytosolischer Komplex mit I $\kappa$ B vor. Durch Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch die aktivierte I $\kappa$ B-Kinase und anschließende Ubiquitinierung wird I $\kappa$ B abgespalten und damit NF- $\kappa$ B aktiviert. Nach Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern reguliert dieser letztendlich die Freisetzung von z.B. Zytokinen, wie beispielsweise Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), sowie iNOS oder COX-2. CUR greift in diese Signalkaskade an diversen Stellen ein und bewirkt eine Suppression der Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Im Folgenden sind einige der bisher bekannten Angriffsorte von CUR genannt:

- Inhibition von TNF- $\alpha$  [Abe et al., 1999; Chan, 1995]
- Inhibition der von NF- $\kappa$ B regulierten Gene wie z.B. IL-1 $\alpha$  [Abe et al., 1999; Kang et al., 1999, 2004]
- direkte Interaktion mit der p50-Untereinheit von NF- $\kappa$ B, wodurch die Abspaltung von I $\kappa$ B verhindert wird [Brennan und O'Neill, 1998]
- Hemmung der aktivierten I $\kappa$ B-Kinase, wodurch die Phosphorylierung von I $\kappa$ B verhindert wird [Jobin et al., 1999; Plummer et al., 1999]
- Verhinderung der Aktivierung (Phosphorylierung) der I $\kappa$ B-Kinase [Jobin et al., 1999]

Da die über NF- $\kappa$ B regulierten Gene bei der Entzündungsreaktion sowie der Steuerung des Zellzykluses eine wichtige Rolle spielen, kann die Suppression der NF- $\kappa$ B-Aktivierung die antiinflammatorischen Eigenschaften sowie antiproliferative und Apoptose-induzierende Effekte von CUR teilweise erklären.

Außer zur Krebstherapie ist der positive Einfluß von CUR für diverse andere Krankheiten beschrieben. Beispielsweise supprimiert CUR die Symptome von Typ II-Diabetes [Babu und Srinivasan, 1995, 1997; Srinivasan, 1972], rheumatischer Arthritis [Deodhar et al., 1980], Multipler Sklerose [Natarajan und Bright, 2002], Alzheimer [Frautschy et al., 2001; Lim et al., 2001; Park und Kim, 2002] und inhibiert die HIV-Replikation [Barthelemy et al., 1998; Jiang et al., 1996a; Jordan und Drew, 1996; Li et al., 1993; Mazumder et al., 1997; Sui et al., 1993].

CUR wird als gesundheitsförderndes Präparat unter Namen wie „Vita Curcumin“ und mit Schlagworten wie „Life Extension - Super Curcumin“ in Form von Curcuma-Kapseln (z.B. 500 mg/Kapsel) angeboten. Es handelt sich häufig um einen Extrakt mit einem Curcuminoid-Anteil von mind. 95%. Problematisch dabei ist, dass weder ausreichende Studien zur Wirksamkeit noch zur Pharmakologie und Toxikologie für solche Präparate vorgelegt werden müssen. Daher sind genaue Kenntnisse über Metabolismus, Elimination und Toxikologie sowie Reaktivität der Metabolite von allgemeinem Interesse.

### 1.1.5 Bisherige Erkenntnisse zur Pharmakokinetik

Die Resorption, Distribution, Eliminierung und der Metabolismus von CUR war in den letzten Jahrzehnten bereits Gegenstand einiger Studien, allerdings ist das Schicksal von CUR im Säugerorganismus bisher nicht vollständig geklärt.

#### 1.1.5.1 Pharmakokinetische Untersuchungen im Tiermodell

*In vivo*-Studien mit Ratten zeigten, dass CUR nach oraler Aufnahme im Darm nur schlecht resorbiert wird. Nach Verabreichung einer einmaligen hohen Dosis von 1 g/kg CUR wurden durchschnittlich 75% des CUR unverändert über die Fäces ausgeschieden [Wahlström und Blennow, 1978], während nach Einmal-Dosen bis zu 400 mg CUR 60-66% resorbiert wurden. Da die Resorptionsrate unabhängig von der Dosis war, lässt dies auf einen passiven Diffusionsprozess schließen [Ravindranath und Chandrasekhara, 1980, 1982].

CUR unterliegt einer presystemischen Transformation, da es bereits während der Resorption an der Darmmukosa metabolisiert wird (First-pass-Effekt). Insgesamt gelangt nur ein sehr geringer Teil des CUR unverändert ins Blut, während der größte Teil in transformierter Form ins Plasma übergeht. Maximale Plasmakonzentrationen der konjugierten Metaboliten wurden 15-60 min nach Verabreichung erreicht [Ravindranath und Chandrasekhara, 1980, 1981, 1982; Wahlström und Blennow, 1978].

In Geweben wie Leber und Niere wurden nur unbedeutende CUR-Konzentrationen gefunden. Die höchsten Konzentrationen wurden im Intestinaltrakt gemessen. Trotz des hoch lipophilen Charakters von CUR findet keine Verteilung der Substanz im Körperfett statt [Ravindranath und Chandrasekhara, 1980, 1981, 1982; Sharma et al., 2001a]. Nach Gabe von hohen CUR-Dosen (2% im Futter) über 14 Tage an Ratten wurden im Plasma nur niedrige nanomolare CUR-Level detektiert und in der Leber und Darmmukosa lagen die Konzentrationen im Bereich von 0,1-0,9 nmol/g Gewebe und 0,2-1,8 µmol/g Gewebe [Sharma et al., 2001a].

CUR wird hauptsächlich biliär eliminiert. Im Urin dagegen konnten höchstens Spuren der Substanz nachgewiesen werden [Ravindranath und Chandrasekhara, 1980, 1982; Wahlström und Blennow, 1978].

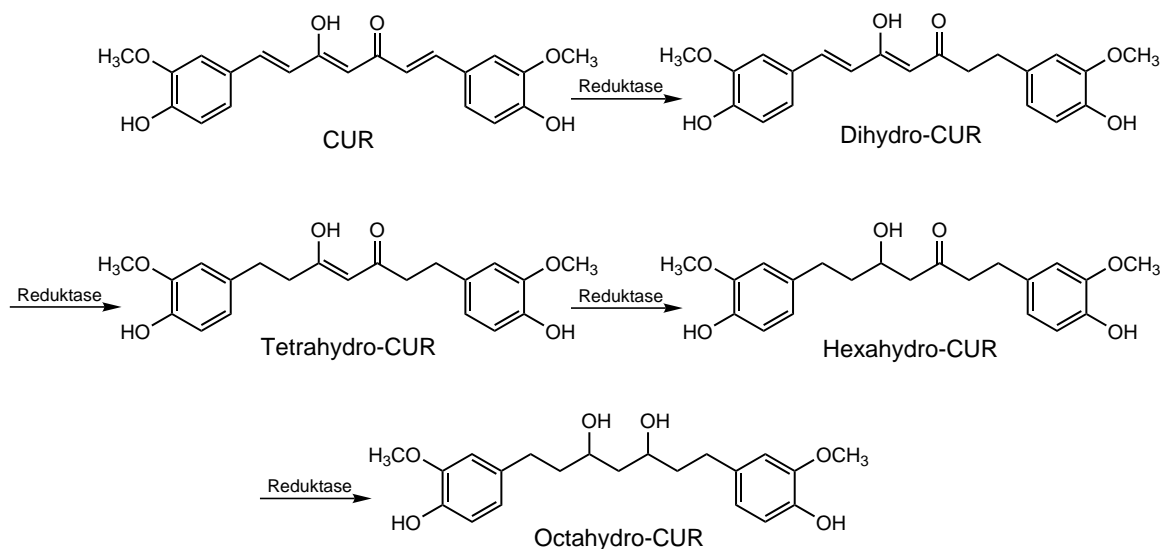
Die geringe Resorptionsquote und der hohe Grad der Metabolisierung deuten auf eine geringe orale Bioverfügbarkeit und schnelle Ausscheidung von CUR über die Galle in Form von Konjugaten in Nagern hin.

#### 1.1.5.2 Untersuchungen zum Metabolismus

Der Phase I- und Phase II-Metabolismus von CUR wurde hauptsächlich in Nagern *in vivo* und *in vitro* untersucht [Asai und Miyazawa, 2000; Holder et al., 1978; Ireson et al., 2001,

2002; Pan et al., 1999]. In neuerer Zeit wurde der CUR-Metabolismus auch im Menschen *in vitro* mit hepatischen und intestinalen Zellen und Zellfraktionen untersucht [Ireson et al., 2001, 2002]. Der gegenwärtige Kenntnisstand kann wie folgt zusammengefasst werden:

Im Phase I-Metabolismus unterliegt CUR der sukzessiven Reduktion der vier Doppelbindungen der Heptatrienon-Kette durch ein endogenes Reduktase-System (Abb. 4). Tetrahydrocurcumin (Tetrahydro-CUR) und Hexahydrocurcumin (Hexahydro-CUR) stellen in den meisten Studien [Asai und Miyazawa, 2000; Holder et al., 1978; Ireson et al., 2001, 2002; Pan et al., 1999] die Hauptprodukte dar, während Dihydrocurcumin (Dihydro-CUR) und Octahydrocurcumin (Octahydro-CUR, auch Hexahydrocurcuminol genannt) Nebenprodukte repräsentieren oder nicht gebildet werden. Die für die Reduktion verantwortlichen Enzyme sind im Cytosol von Leber- und Darmgewebe lokalisiert und schließen Alkoholdehydrogenase ein [Ireson et al., 2002]. Die Reduktion der aliphatischen Doppelbindungen führt zur Eliminierung des konjugierten Systems und letztendlich der Keto-Enol-Tautomerie, wodurch eine Stabilisierung des Moleküls resultiert [Pan et al., 1999]. Die reduktiven Metaboliten stellen farblose Substanzen mit erhöhter Polarität dar.

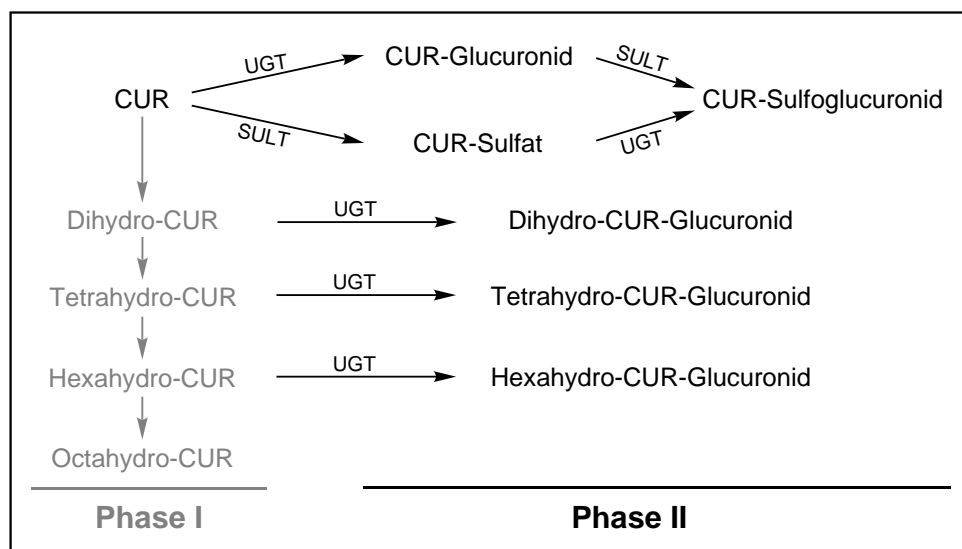


**Abbildung 4:** Reduktiver Phase I-Metabolismus von CUR [Asai und Miyazawa, 2000; Holder et al., 1978; Ireson et al., 2001, 2002; Pan et al., 1999].

CUR und seine reduktiven Metaboliten unterliegen weiterhin einem Phase II-Metabolismus (Abb. 5). Bei CUR wird von einem Monoglucuronid und einem Monosulfat sowie von einem gemischten Glucuronsäure/Sulfat-Konjugat (Sulfolglucuronid) berichtet [Asai und Miyazawa, 2000; Ireson et al., 2001, 2002; Pan et al., 1999]. Die reduktiven Metaboliten werden bevorzugt glucuronidiert. Beispielsweise stellen die Glucuronide der beiden reduktiven Metaboliten Tetrahydro-CUR und Hexahydro-CUR nach intravenöser Injektion von CUR in Ratten die

biliären Hauptausscheidungsprodukte dar [Holder et al., 1978].

Obwohl teilweise Massenspektren der Phase II-Metabolite von CUR publiziert wurden, ist die genaue chemische Struktur dieser Glucuronide noch nicht aufgeklärt [Ireson et al., 2001, 2002; Pan et al., 1999]. Bisher werden die Monoglucuronide und Monosulfate als phenolische Konjugate betrachtet [Pan et al., 1999; Sharma et al., 2005].



**Abbildung 5:** Phase I- und Phase II-Metabolite von CUR. Postulierte Metabolismuswege aus *in vivo*-Studien mit Nagern und *ex vivo*-Studien mit Zellfraktionen und Hepatocyten von Ratte und Mensch [Asai und Miyazawa, 2000; Ireson et al., 2001, 2002; Pan et al., 1999]. UGT, UDP-Glucuronyltransferasen; SULT, Sulfotransferasen.

Die Reduktion, Glucuronidierung und Sulfatierung von CUR findet sowohl in der Leber als auch im Darm von Mensch und Ratte statt. Es werden die gleichen Metaboliten gebildet, jedoch ist das Ausmaß der Metabolisierung bei Mensch und Ratte sowie in Leber und Darm unterschiedlich [Ireson et al., 2001, 2002].

Zum Metabolismus von Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR liegen bis dato keine Untersuchungen vor. Im Gegensatz zu CUR (Kap. 1.1.4) wurde die biologische Aktivität der Metaboliten bisher nur unzureichend untersucht. Das bioaktive Potential der reduktiven CUR-Metaboliten wird bislang kontrovers betrachtet [Huang et al., 1995; Ireson et al., 2001; Okada et al., 2001; Osawa et al., 1995; Pan et al., 2000; Sugiyama et al., 1996].

### 1.1.5.3 Klinische Humanstudien

Die Pharmakokinetik von CUR wurde in einigen neueren Studien mit Probanden, bei denen es sich aufgrund der potentiellen chemopräventiven Wirkung von CUR hauptsächlich um

Krebspatienten handelt, untersucht [Cheng et al., 2001; Garcea et al., 2004, 2005; Ruffin et al., 2003; Sharma et al., 2001b, 2004; Shoba et al., 1998]. Alle diese klinischen Studien weisen, ähnlich wie im Rattenmodell (Kap. 1.1.5.1), auf eine geringe systemische Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme von CUR hin. Auch nach hohen oralen CUR-Dosen (max. 8 g) bei täglicher Aufnahme über einen längeren Zeitraum (7 Tage bis 4 Monate) lagen die CUR-Plasmakonzentrationen nur im nanomolaren Bereich. In einigen Fällen wurden ähnlich niedrige Konzentrationen von CUR-Glucuronid und CUR-Sulfat beobachtet. Während in kolorektalem Gewebe Konzentrationen von CUR, CUR-Glucuronid und CUR-Sulfat in Größenordnungen von nmol/g Gewebe gemessen wurden, waren diese Substanzen in Lebergewebe nicht nachweisbar. Im Urin waren CUR und CUR-Konjugate nicht oder nur in Spuren vorhanden. Die Bildung reduktiver Metaboliten wurde in diesen klinischen Studien bisher nicht beachtet. Somit ist der Verbleib von CUR im menschlichen Organismus bislang ungenügend geklärt.

## 1.2 UDP-Glucuronyltransferasen

Die Konjugation mit Glucuronsäure wird von UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs, EC 2.4.1.17) katalysiert. Die Konjugationsreaktion hat die Aufgabe lipophile Substanzen in wasserlösliche Verbindungen umzuwandeln und ihre Ausscheidung zu fördern. Substrate für die Glucuronidierung sind eine Vielzahl strukturell nicht verwandter endogener und exogener Substanzen. Zu den endogenen Substraten gehören beispielsweise Steroide, Gallensäuren, Hormone, Bilirubin und Retinoide [Czernik et al., 2000; Little et al., 1997; Matern et al., 1984]. Exogene Substrate sind diverse Xenobiotika wie Arzneimittel (z.B. Nicht-steroidale antiinflammatorische Substanzen (NSAIDs), Opiate, Acetaminophen), Umweltschadstoffe oder Karzinogene sowie Lebensmittelinhaltsstoffe wie z.B. Pflanzensteroiden [King et al., 2000; Kuehl et al., 2005]. Auch für CUR und seine reduktiven Metaboliten stellt die Glucuronidierung einen wichtigen Metabolisierungsweg dar.

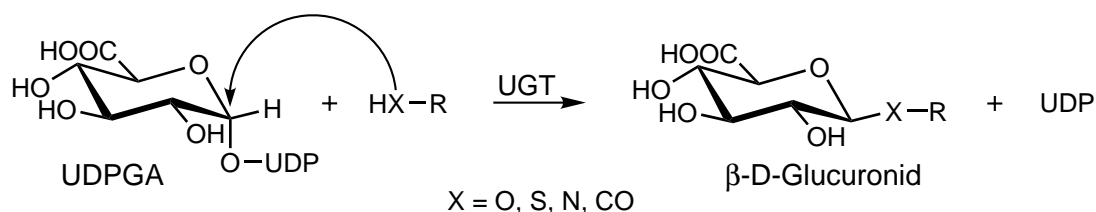
### 1.2.1 Konjugationsreaktion und allgemeine Merkmale

Die UGTs verwenden als Kosubstrat die aktivierte Glucuronsäure Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA) und transferieren sie auf nukleophile Substrate unter Bildung von  $\beta$ -D-Glucuroniden (Abb. 6). Die  $\beta$ -D-Glucuronide können mit Phenolen, aliphatischen Alkoholen, Carbonsäuren (z.B. NSAIDs), Thiolen und primären, sekundären und tertiären Aminen und sogar mit nukleophilen Kohlenstoffatomen gebildet werden [Miners und Mackenzie, 1991; Tukey und Strassburg, 2000]. Bei der Übertragung des Kosubstrats auf phenolische oder aliphatische Hydroxylgruppen entstehen Ether- $\beta$ -Glucuronide.

Die Carboxylfunktion der Glucuronsäure spielt bei der Elimination eine wichtige Rolle, da sie bei physiologischem pH-Wert deprotoniert vorliegt und somit eine zusätzliche, verbesserte



Wasserlöslichkeit bedingt. Die polaren Glucuronide werden renal oder biliär ausgeschieden. Bei der Eliminierung über die Galle können sie einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen, aufgrund der durch  $\beta$ -Glucuronidase katalysierten Hydrolyse und anschließenden intestinalen Reabsorption der Muttersubstanz [Burchell und Coughtrie, 1992; Fisher et al., 2001; King et al., 2000; Tukey und Strassburg, 2000].



**Abbildung 6:** Enzymatische Bildung eines  $\beta$ -D-Glucuronids.

UGTs stellen membrangebundene Enzyme dar, die auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind. Dadurch sind die UGTs optimal platziert, um Produkte aus dem Phase I-Metabolismus umzusetzen. Die luminale Lokalisation führt zur sog. Latenz, da die ER-Membran eine Barriere für den Zugang von Substrat und Kosubstrat sowie den Abtransport der Metabolite und Nebenprodukte repräsentiert [Burchell und Coughtrie, 1992; Radominska-Pandya et al., 1999; Tephly und Burchell, 1990; Tukey und Strassburg, 2000]. Die Latenz der UGTs stellt bei *in vitro*-Experimenten ein Hindernis dar. Sie kann durch den Einsatz von Detergenzien verringert werden. Eine elegante Methode ist die Verwendung des Peptid-Antibiotikums Alamethicin aus dem Schimmelpilz *Trichoderma viride*, das definierte Poren in der ER-Membran erzeugt und im Gegensatz zu Detergenzien CYP-haltige Enzyme nicht inhibiert [Bechinger, 1997; Fisher et al., 2000a]. Es wurden auch UGTs in der Kernmembran nachgewiesen. Jedoch ist deren physiologische Bedeutung noch nicht bekannt [Dutton, 1980].

Zur Untersuchung der Glucuronidierung *in vitro* können die UGTs in Form von Mikrosomen eingesetzt werden. Mikrosomen sind Membranvesikel des ER, die durch Zellfraktionierung aus Geweben wie z.B. Leber oder Darm gewonnen werden. Mit Hilfe der derzeit zur Verfügung stehenden rekombinanten DNA-Methodik ist es möglich, die cDNA einzelner UGT-Isoenzyme in Zelllinien, die keine oder minimale UGT-Level besitzen, spezifisch zu exprimieren. Die rekombinante DNA kann dabei durch transiente Transfektion von Zellen [Wooster et al., 1993] oder durch Infektion mit einem UGT-rekombinanten Virus (z.B. Baculovirus) in Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) eingebracht werden [Nguyen und Tukey, 1997]. Die rekombinanten Zellen können intakt oder als Mikrosomen *in vitro* verwendet werden. Fast alle humanen Isoenzyme sind derzeit in rekombinanter Form verfügbar.

### 1.2.2 UGT-Gen-Superfamilie

Ähnlich wie bei den CYP-Isoenzymen handelt es sich bei den UGTs ebenfalls um eine komplexe Enzymfamilie. Die UGTs gehören zur Superfamilie der UDP-Glykosyltransferasen. Die UGTs werden basierend auf Sequenzhomologien der kodierenden Gene (ca. 60% Identität) in Familien eingeteilt. Beim Menschen gibt es zwei Familien – UGT1 und UGT2 – und drei Subfamilien: UGT1A, 2A und 2B. Das individuelle Gen-Transkript wird durch Anfügen einer zweiten arabischen Zahl an diese Nomenklatur charakterisiert, beispielsweise UGT1A1 [Mackenzie et al., 2005; Tukey und Strassburg, 2000].

Der Genlocus der UGT1A-Subfamilie ist auf Chromosom 2q37 lokalisiert. Alle Mitglieder der UGT1A-Subfamilie werden von einem einzigen Gen kodiert, das aus einem variablen Exon 1 am 5'-Ende und vier identischen Exons (Exons 2-5) am 3'-Ende besteht (Exon sharing). Die Isoenzyme der UGT1A-Subfamilie unterscheiden sich am N-terminalen Ende des Proteins, welches von Exon 1 kodiert wird. Das C-terminale Ende ist für alle Isoenzyme dieser Familie identisch und wird von den Exons 2-5 kodiert. Zur humanen UGT1A-Subfamilie gehören neun funktionsfähige Isoenzyme (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10) und vier Pseudogene (UGT1A2P, 1A11P, 1A12P, 1A13P).

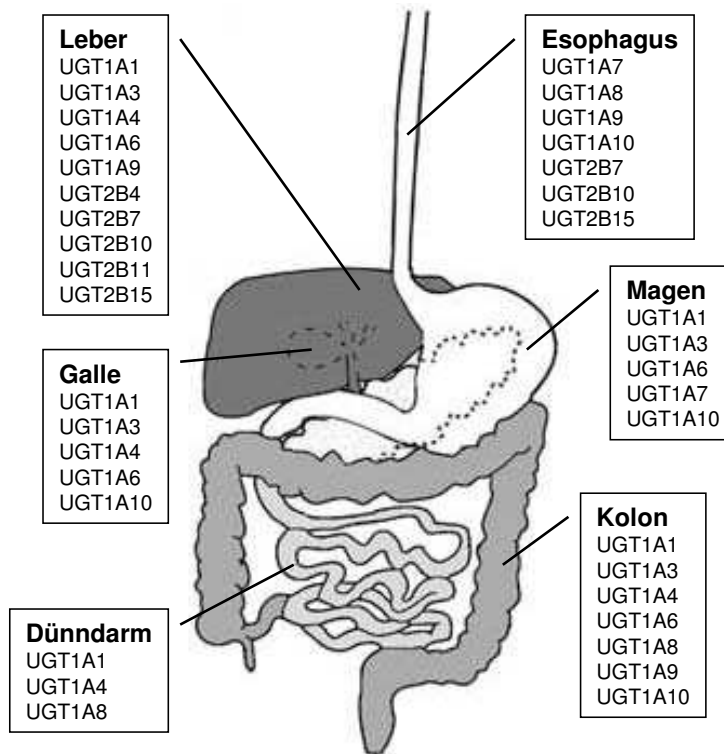
Im Gegensatz zur UGT1A-Subfamilie wird jedes UGT2B-Isoenzym durch ein individuelles Gen kodiert, das aus 6 Exons besteht. Die UGT2B-Gene sind auf Chromosom 4q13 lokalisiert. Die Region der UGT2B-Proteine, die von den Exons 1 und 2 kodiert wird, ist äquivalent zu der die durch das variable Exon 1 der UGT1A-Isoenzyme kodiert wird. Zur humanen UGT2B-Familie gehören sieben aktive Isoenzyme (UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17, 2B28) und fünf inaktive Transkripte (UGT2B24P, 2B25P, 2B26P, 2B27P, 2B29P). Von der UGT2A-Familie sind drei Isoenzyme (UGT2A1, 2A2, 2A3) bekannt [Mackenzie et al., 2005; Radomska-Pandya et al., 1999; Tukey und Strassburg, 2000].

Die UGT-Isoenzyme haben eine Größe von 50-55 kD und bestehen aus 529-534 Aminosäuren. Das N-terminale Ende repräsentiert die luminaire Domäne, besteht aus ca. 280 Aminosäuren und enthält die Substrat-Bindungsstelle. Das C-terminale Ende stellt die restliche luminaire Domäne, die Transmembran-Domäne und den cytosolischen Rest des Proteins dar, besteht aus rund 250 Aminosäuren und beinhaltet die UDPGA-Bindungsstelle. Die Aminosäuresequenzen der C-terminalen Domänen der UGT1- und UGT2-Proteine weisen eine hohe Identität auf, was auf eine konservierte Funktion schließen lässt [Radomska-Pandya et al., 1999; Tukey und Strassburg, 2000].

Zur Zeit sind insgesamt 117 Säuger-Gene der UGT-Superfamilie bekannt. Dazu zählen 28 humane Gene, von denen 19 funktionsfähige UGT-Isoenzyme und 9 Pseudogene darstellen. Verschiedene UGT-Isoenzyme sind beispielsweise auch von Ratte, Maus, Meerschweinchen und Affe bekannt. Die Nomenklatur bei anderen Säugern entspricht dabei der des Menschen [Mackenzie et al., 2005; Tukey und Strassburg, 2000].

### 1.2.3 Gewebeverteilung

Die UGT-Isoenzyme werden in hepatischem und extrahepatischem Gewebe exprimiert. Abbildung 7 zeigt die Gewebeverteilung verschiedener UGT-Isoformen in der Leber und im Gastrointestinaltrakt beim Menschen.



**Abbildung 7:** Gewebeverteilung humaner UGT-Isoenzyme [Tukey und Strassburg, 2000].

Interessanterweise besitzt UGT1A1 im Gastrointestinaltrakt ähnliche Expressionslevel und Aktivitäten wie in der Leber [Fisher et al., 2000b; Strassburg et al., 1999]. Die drei spezifischen extrahepatischen Isoenzyme der UGT1A-Subfamilie sind UGT1A7, 1A8 und 1A10 [Cheng et al., 1999; Mojarrabi und Mackenzie, 1998; Strassburg et al., 1998a]. Im humanen Darm sind die UGTs ausschließlich in den Epithelzellen lokalisiert. Unter den UGT-Isoenzymen besitzt vor allem das extrahepatische UGT1A10 eine sehr breite Substratspezifität, die von einfachen Phenolen bis hin zu Steroiden reicht und liefert damit Hinweise, dass extrahepatisches Gewebe eine wesentliche Rolle für die Glucuronidierung von endogenen und xenobiotischen Stoffen spielt [Tukey und Strassburg, 2000]. Es lässt sich daher vermuten, dass die Glucuronidierung in extrahepatischen Geweben möglicherweise einen signifikanten Einfluß auf die Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von UGT-Substraten haben könnte und der Intestinaltrakt einen

wichtigen Beitrag zum First-pass-Metabolismus leistet. Ein solcher Effekt ist insbesondere bei der Entgiftung von Toxinen vorteilhaft, kann jedoch für die Wirkung von Arzneimitteln Nachteile haben.

Humane UGTs kommen zusätzlich in anderen Geweben wie z.B. Niere, Lunge, Pankreas, Gehirn, Prostata oder olfaktorischem Gewebe vor [Czernik et al., 2000; King et al., 2000; Tukey und Strassburg, 2000]. Beispielsweise wurde UGT1A9 in der Niere [McGurk et al., 1998; Sutherland et al., 1993] und UGT1A6 im menschlichen Gehirn [Suleman et al., 1998] nachgewiesen. UGT2A1 wurde in der nasalen Mukosa gefunden und ist für die Biotransformation von Geruchsmolekülen zuständig [Jedlitschky et al., 1999; Lazard et al., 1991].

Außergewöhnlich ist, dass UGT2B-Enzyme in reichlichen Mengen in Steroidhormonsensitiven Zielgeweben wie Prostata und Brustdrüsen exprimiert werden. Beispielsweise wurden UGT2B10, 2B11, 2B15 und 2B17 in der humanen Prostata identifiziert; UGT2B11 kommt zusätzlich im Brustdrüsengewebe vor [Tukey und Strassburg, 2000; Turgeon et al., 2001].

### 1.2.4 Substratspezifitäten

Die UGT-Familien weisen einen breiten und überlappenden Bereich von Substratspezifitäten auf. UGT1A-Isoenzyme glucuronidieren ein breites Spektrum von phenolischen Substraten. Alle Vertreter dieser Familie, mit Ausnahme von UGT1A4, glucuronidieren beispielsweise das Cumarin-Derivat 4-Methylumbelliferon, welches aufgrund dieser Eigenschaft oft als Positivkontrolle zum Einsatz kommt [Uchaipichat et al., 2004]. Zudem stellen Arzneimittel unterschiedlichster Struktur, z.B. tertiäre Amine oder Carbonsäuren, Substrate der UGT1A-Enzyme dar [King et al., 2000; Radomska-Pandya et al., 1999]. Jedoch können einige Mitglieder der UGT1A-Familie auch endogene Substrate wie z.B. Steroidhormone, Gallensäuren, Retinoide und Thyroid-Hormone glucuronidieren [Gall et al., 1999; Radomska-Pandya et al., 1999]. Im Gegensatz zu den UGT1A-Isoformen sind die UGT2B-Isoenzyme vermutlich weniger für die Glucuronidierung von Xenobiotika verantwortlich, sondern weisen primär Aktivitäten für Steroidhormone, Gallensäuren, hydroxylierte Fettsäuren und andere endogene Substrate auf [Burchell et al., 1991; Gall et al., 1999; Radomska-Pandya et al., 1999; Turgeon et al., 2001]. Trotz der überschneidenden Spezifitäten sind einige wenige Substrate beschrieben, die für einzelne UGT-Isoenzyme spezifisch sind. Einen Einblick in die Substratspezifitäten einiger ausgewählter UGT-Isoenzyme gibt Tabelle 2.

**Tabelle 2:** Endogene und exogene Substratspezifitäten verschiedener UGT-Isoenzyme [Basu et al., 2004c; Cheng et al., 1999; Ebner und Burchell, 1993; Ethell et al., 2001; Kessler et al., 2002; King et al., 2000; Radomska-Pandya et al., 1999; Sakaguchi et al., 2004; Tukey und Strassburg, 2000]. \* spezifisches Substrat.

Isoenzym	Substrate
UGT1A1	Bilirubin*, 17 $\beta$ -Estradiol (E2, 3-HO-Position)*, Catecholestrogene, Flavonoide, Cumarine, Anthrachinone
UGT1A3	Lithocholsäure, Catecholestrogene, Flavonoide, Anthrachinone, primäre Amine, Carbonsäuren
UGT1A4	Tigogenin*, primäre, sekundäre und tertiäre Amine, Androgene
UGT1A6	kleine planare phenolische Verbindungen, z.B. Acetaminophen*, Serotonin
UGT1A7	sperrige aromatische planare Verbindungen, z.B. Benz[a]pyren; Phenole, Cumarine
UGT1A8	Catecholestrogene, Phenole, Cumarine, Flavonoide, Anthrachinone
UGT1A9	sperrige, nicht-planare Phenole, z.B. Propofol*; Thyroid-Hormone, Carbonsäuren, Flavonoide, Anthrachinone
UGT1A10	Epigallocatechin-3- <i>O</i> -gallat*, Catecholestrogene, Cumarine, Flavonoide, Anthrachinone, Phenole
UGT2B7	Morphin*, Codein*, Estrogene, Catecholestrogene, Androgene, Retinoide, Carbonsäuren

### 1.2.5 Wichtige Eigenschaften

Kennzeichnend für humane UGT-Isoenzyme ist, dass sie eine hohe interindividuelle Variabilität aufweisen, die durch Unterschiede in den Expressionsleveln und/oder durch die Anwesenheit allerer Varianten eines Enzyms hervorgerufen wird [Fisher et al., 2000b; Little et al., 1999].

### Induktion und Inhibition

Ähnlich wie bei den CYPs kann die Aktivität der UGTs durch Induktion und Inhibition moduliert werden. Die Induktion von UGT-Isoenzymen wurde bisher in intestinalen und hepatischen Zelllinien (CaCo-2, HepG2) *in vitro* beschrieben. Beispielsweise wurden die Isoenzyme UGT1A1, 1A6, 1A9 und 2B7 in der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie CaCo-2 mit Chrysin, *t*-Butylhydrochinon und 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD) induziert [Galijatovic et al., 2000; Munzel et al., 1999]. Die Induktion von UGT1A1 ist in Primärkulturen menschlicher Hepatocyten mit Phenobarbital, Oltipraz und 3-Methylcholanthren be-

schrieben [Ritter et al., 1999]. Eine Studie [van der Logt et al., 2003] berichtet von einer erhöhten UGT-Aktivität nach oraler Gabe von CUR in intestinalem und hepatischem Gewebe von Ratten.

Die Inhibition von UGT-Aktivitäten kann sowohl die Glucuronidierung endogener (z.B. Bilirubin) als auch exogener (z.B. Arzneistoffe) Verbindungen beeinträchtigen und hat damit Einfluß auf deren Ausscheidung. Als potenter Inhibitor hepatischer UGTs *in vitro* gilt 7,7,7-Triphenylheptyl-UDP. Dem Mechanismus liegt vermutlich eine kompetitive Interaktion mit der UDP-Bindungsstelle des Enzyms zugrunde [Said et al., 1992]. Desweiteren werden z.B. die Aktivitäten verschiedener humaner UGT-Isoenzyme durch die Arzneimittel Diclofenac und Probenecid *in vitro* nicht-selektiv gehemmt. Es handelt sich hier wahrscheinlich ebenfalls um eine kompetitive Inhibition [Miners und Mackenzie, 1991; Uchaipichat et al., 2004]. Für CUR ist beispielsweise ein transienter inhibitorischer Effekt auf die *in vitro*-Glucuronidierung von Mycophenolsäure, einem Immunsuppressivum, in humanen Kolonkarzinomzellen beschrieben. Dabei sind hauptsächlich Isoenzyme des Gastrointestinaltrakts (UGT1A7, 1A8, 1A9, 1A10) betroffen. CUR besitzt damit möglicherweise das Potential die therapeutische Wirkung des Arzneimittels *in vivo* zu verstärken [Basu et al., 2004b].

### Kinetische Profile und Dimerisierung

Ein interessantes Phänomen der UGTs ist, dass die Glucuronidierungsreaktion nicht ausschließlich nach einer Michaelis-Menten-Kinetik verläuft. Atypische kinetische Profile sind bisher für einige UGT-Substrate *in vitro* beschrieben. Beispiele sind die Bildung des E2-3-Glucuronids und Acetaminophen-*O*-Glucuronids durch UGT1A1 [Court et al., 2001; Fisher et al., 2000a,b; Williams et al., 2002] sowie des Morphin-6- und Morphin-3-Glucuronids durch UGT2B7 [Fisher et al., 2000a; Soars et al., 2003; Stone et al., 2003].

Die Kenntnis kinetischer Parameter aus *in vitro*-Untersuchungen ist wichtig, um Metabolismuswege *in vivo* voraussagen zu können. Eine bedeutende Größe stellt die Intrinsische Clearance bzw. katalytische Effizienz dar, welche die tatsächliche metabolische Inaktivierung eines Substrates beschreibt, ohne dass eine Sättigung des Enzyms erreicht wird. Die Clearance wird in  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  Protein ausgedrückt und kann auf die *in vivo*-Gegebenheiten hochgerechnet werden [Houston und Kenworthy, 2000; Soars et al., 2002].

Atypische kinetische Profile werden oft mit der Hill-Gleichung, bei der die Produktbildung einem sigmoidalen Kurvenverlauf folgt, beschrieben [Houston und Kenworthy, 2000]. Zur Unterscheidung, ob die Enzymkinetik für ein bestimmtes Substrat nach Michaelis-Menten oder Hill verläuft, ist eine Auftragung nach Eadie-Hofstee geeignet. Hier ergibt die Hill-Kinetik eine hakenförmige Kurve, während bei einer Michaelis-Menten-Kinetik ein linearer Zusammenhang besteht [Weiss, 1997]. Über den molekularen Mechanismus für die Abweichung von der Michaelis-Menten-Kinetik wird derzeit noch debattiert. Es gibt Vorstellungen,

dass die atypische Kinetik auf der Bindung von zwei Substratmolekülen beruht. Dabei besteht die Möglichkeit, dass die Bindungsstellen von zwei gleichen Substratmolekülen (Autaktivierung, homotrope Kooperation) oder zwei verschiedenen Substratmolekülen (heterotrope Kooperation) besetzt werden. Die beiden Bindungsstellen können auf demselben Enzym oder auf verschiedenen Untereinheiten eines Dimers oder Oligomers lokalisiert sein, die miteinander kooperieren [Bisswanger, 2002; Neet, 1995; Parkin, 2003; Stone et al., 2003; Weiss, 1997; Williams et al., 2002].

Für UGTs gibt es einige Hinweise, dass diese Isoenzyme *in vivo* möglicherweise als Dimere oder Oligomere vorliegen. Die Ausbildung funktionsfähiger Homo- und Heterodimere einiger UGTs ist beschrieben [Ikushiro et al., 1997; Kurkela et al., 2003; Meech und Mackenzie, 1997]; für UGT1A1 wird sogar ein Tetra- oder Hexamer vermutet [Bruni und Chang, 1999; Peters et al., 1984].

### **Polymorphismen und genetische Defekte**

Für die meisten humanen UGT-Isoenzyme sind Polymorphismen bekannt [Burchell et al., 1991, 2000; Coffman et al., 1998; Guillemette, 2003; Strassburg et al., 1998b, 2000]. Polymorphismen können zu teilweise aktiven oder inaktiven Proteinen führen. Beim Menschen sind solche Mutationen im Exon 1 des UGT1A1-Genlocus bekannt. UGT1A1 ist für die Glucuronidierung von endogenem Bilirubin, welches ein Abbauprodukt von Hämproteinen darstellt, verantwortlich. Die Ausscheidung als wasserlösliches Bilirubin-Diglucuronid ist ein essentieller Metabolisierungsweg im menschlichen Stoffwechsel [Bissel, 1986]. Da eine Substitution der Bilirubin-Glucuronidierung durch andere Isoenzyme nicht möglich ist, kann ein Defekt im UGT1A1-Gen zur Akkumulation von unkonjugiertem Bilirubin im menschlichen Körper führen [Bosma et al., 1994].

Beim Menschen bekannte Krankheitsbilder sind das Crigler-Najjar Syndrom und das Gilbert's Syndrom. Charakterisiert werden diese Krankheiten durch fehlende UGT1A1-Bildung oder Produktion eines inaktiven Proteins. Die Krankheitssymptome sind Hyperbilirubinämie ( $>35 \mu\text{mol}$  Bilirubin/l Serum) und Ikterus [Brierley und Burchell, 1993; Hall et al., 1999a]. Beim Crigler-Najjar Syndrom unterscheidet man zwischen Typ I und Typ II. Typ I ist durch den kompletten Verlust der UGT1A1-Aktivität charakterisiert, während beim Typ II noch eine geringfügige Bilirubin-Glucuronidierung (mind. 10%) stattfindet. Beim Gilbert's Syndrom befindet sich die Mutation in der Promotorregion. Die Bilirubin-Glucuronidierungsaktivität beträgt 60-70% des Normalwertes. Eine durch das Gilbert's Syndrom verursachte Hyperbilirubinämie tritt bei 2-12% einer Durchschnittspopulation auf [Monaghan et al., 1996; Tukey und Strassburg, 2000].

Die polymorphe Expression einer UGT-Isoform kann möglicherweise einen signifikanten Einfluß auf die Toleranz und den Metabolismus von Arzneimitteln wie z.B. Acetaminophen haben [Ciotti et al., 1997; Court et al., 2001].

### 1.2.6 Biologisch aktive und toxische Glucuronide

Die Glucuronidierung wird i.A. als Detoxifizierungsreaktion angesehen, welche die biologische Aktivität eines Substrates eliminiert. In neuerer Zeit wird die Glucuronidierung jedoch auch als Toxifizierungs- oder Aktivierungsmechanismus betrachtet, da sie zur Bildung biologisch aktiver oder toxischer Metabolite führen kann [Mulder, 1992; Ritter, 2000]. Ein Beispiel stellt das Morphin-6-Glucuronid dar, welches eine höhere analgetische Wirkung als Morphin besitzt und als eigentlicher biologisch aktiver Metabolit angesehen wird [Gong et al., 1991; Mulder, 1992; Paul et al., 1989]. Toxische Glucuronide stellen beispielsweise die D-Ring-Glucuronide von Steroiden (E2, Estron, Testosteron) dar, da sie zu Cholestase (Verminderung des Galleabflusses) führen können, während das gleiche Steroid den entgegengesetzten Effekt hat und den Gallefluß erhöht, wenn es an der 3-HO-Gruppe konjugiert ist [Meyers et al., 1980, 1981; Vore et al., 1983].

#### Acylglucuronide

Acylglucuronide stellen Esterglucuronide dar und sind das Produkt der Konjugation einer Carboxylgruppe mit Glucuronsäure (Abb. 8). Diese Metaboliten besitzen toxikologische Relevanz und werden z.T. mit den unerwünschten Nebenwirkungen von Medikamenten in Verbindung gebracht [Bailey und Dickinson, 2003; Boelsterli et al., 1995; Boelsterli, 2002; Sakaguchi et al., 2004]. Acylglucuronide werden sowohl aus endogenen Substraten (z.B. Bilirubin, Retinolsäure, Lithocholsäure) als auch aus einer ganzen Reihe von Xenobiotika gebildet. Zu dieser Gruppe gehören einige häufig angewendete Arzneistoffe zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen, wie beispielsweise die NSAIDs, zu denen z.B. Diclofenac und Ketoprofen zählen [King et al., 2001; Sakaguchi et al., 2004; Terrier et al., 1999; Tukey und Strassburg, 2000].

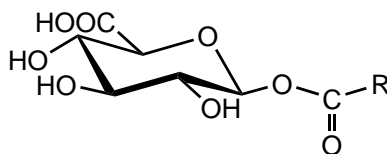


Abbildung 8: Chemische Struktur eines Acylglucuronids.

Beim Menschen wurden einige UGT-Isoenzyme, die die Glucuronidierung der Carboxylsäurefunktion katalysieren, identifiziert. Beispielsweise katalysiert UGT1A1 die Glucuronidierung der Carboxylgruppe von Bilirubin [Ebner und Burchell, 1993; King et al., 1996]. Die humanen Isoenzyme UGT1A3, 1A9 und 2B7 katalysieren die Glucuronidierung vieler NSAIDs [Basu et al., 2004c; Ebner und Burchell, 1993; Green et al., 1998; Jin et al., 1993; Kuehl et al.,



2005; Sakaguchi et al., 2004; Sallustio et al., 2000]. Von diesen drei Isoenzymen katalysiert UGT2B7 die Reaktion i.A. besser als UGT1A3 und 1A9 [Sakaguchi et al., 2004]. Außerdem ist das hepatische UGT2B4 zur Bildung einiger Acylglucuronide fähig [Kuehl et al., 2005]. Interessanterweise können auch die extrahepatischen Isoformen UGT1A7 und 1A10 die Glucuronidierung einiger Carbonsäuren katalysieren [Sakaguchi et al., 2004].

**Reaktivität von Acylglucuroniden** Die Konjugation einer Carboxylgruppe mit Glucuronsäure stellt einen Aktivierungsschritt für das Aglykon dar. Acylglucuronide sind elektrophile, chemisch sehr reaktive Verbindungen. Ihre Reaktivität ergibt sich aus der Chemie der Estergruppe und der inhärenten Reaktivität der Monosaccharide [Sallustio et al., 2000]. Das Kohlenstoffatom der Estergruppe ist elektrophil und kann daher nukleophil angegriffen werden. Das reaktive Verhalten von Acylglucuroniden ist für die Glucuronide der NSAIDs *in vitro* und *in vivo* bereits gründlich erforscht [Bailey und Dickinson, 1996, 2003; Fenselau, 1994; Ruelius et al., 1986; Sallustio et al., 2000; Smith et al., 1990; Spahn-Langguth und Benet, 1992]. Die Metaboliten der NSAIDs sind bei physiologischem pH-Wert chemisch instabil und können folgende typischen nicht-enzymatischen Reaktionen eingehen:

- Spontane Hydrolyse der Esterbindung unter Freisetzung des Zuckers und des Aglykons (Abb. 9) [van Breemen und Fenselau, 1985; Ruelius et al., 1986; Spahn-Langguth und Benet, 1992]

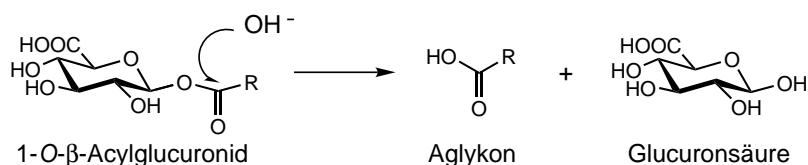


Abbildung 9: Hydrolysereaktion.

- Intramolekulare Umlagerung zu  $\beta$ -Glucuronidase-resistenten 2-, 3-, und 4-Acyl-Isomeren (Acyl-Migration, Abb. 10) [Sallustio et al., 2000; Spahn-Langguth und Benet, 1992]

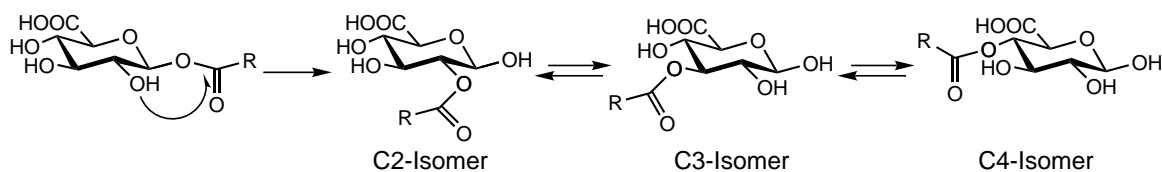


Abbildung 10: Acyl-Migration.

- Transacylierungsreaktionen mit nukleophilen Gruppen (-SH, -OH, -NH<sub>2</sub>) von endogenen Makromolekülen (z.B. Proteine) unter Bildung von Addukten mit kovalentem Bindungscharakter (Abb. 11) [Fenselau, 1994; Spahn-Langguth und Benet, 1992; Zia-Amirhosseini et al., 1994]

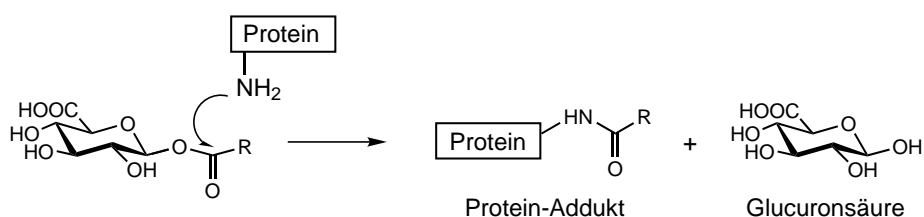


Abbildung 11: Transacylierungsreaktion.

Durch Acyl-Migration und die damit verbundene Freilegung der Halbacetalgruppe ergeben sich zwei weitere mögliche Reaktionen, die über die offenkettige Form (Aldehyd) des Zuckermoleküls verlaufen:

- Anomerisierung (Gleichgewicht von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomer, Abb. 12) [Akira et al., 2002; Spahn-Langguth und Benet, 1992]

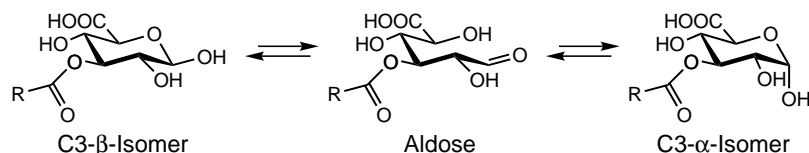
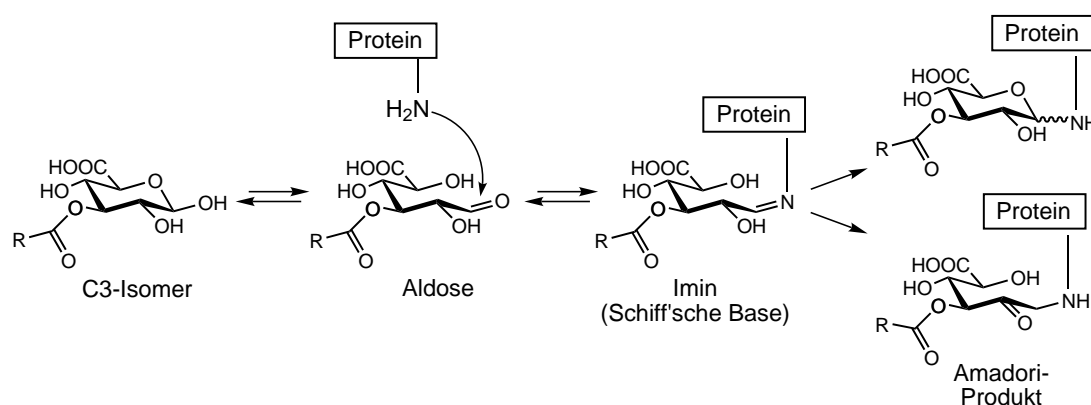


Abbildung 12: Anomerisierungsreaktion am Beispiel des C3-Isomers.

- Glycierungsreaktionen, die über die Reaktion von Proteinen (z.B.  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinrestes) mit dem Aldehyd unter Bildung einer Schiff'schen Base verlaufen. Dieses Imin ist wiederum in der Lage unter Ringschluss des Zuckers oder durch Amadori-Umlagerung zu einem stabileren Aminoketon weiterzureagieren (Abb. 13) [Sallustio et al., 2000; Smith et al., 1990; Spahn-Langguth und Benet, 1992].



**Abbildung 13:** Glycierungsreaktionen am Beispiel des C3-Isomers.

Während beim Glycierungsmechanismus notwendigerweise die Isomere als Substrat involviert sind, wird die Transacylierung von den intakten Acylglucuroniden favorisiert, da die Estergruppe aufgrund der Nähe des Ring-Sauerstoffatoms des Glucuronsäurerestes aktivierter für nukleophile Angriffe ist.

**Toxikologische Relevanz von Acylglucuroniden** Die Toxizität der Acylglucuronide beruht hauptsächlich auf deren Reaktion mit endogenen Proteinen. Da die kovalente Bindung an ein Protein eine Konformationsänderung und den Verlust der Funktionsfähigkeit des Proteins bedeutet, kann sich die toxische Wirkung je nach Funktion des betroffenen Proteins im Zellstoffwechsel in vielfältiger Weise manifestieren.

Irreversible kovalente Bindungen mit Plasmaproteinen sind für die Acylglucuronide vieler NSAIDs wie Ketoprofen [Presle et al., 1996], Tolmetin [Hyneck et al., 1988], Zomepirac [Smith et al., 1990], Ibuprofen und Ibufenac [Castillo und Smith, 1995] sowie Benoxaprofen [Qiu et al., 1998] beschrieben [Benet et al., 1993]. Gewebeproteine können ebenfalls Angriffsorte für die Acylierung darstellen. Betroffen sind insbesondere Proteine in Hepatocysten, da die Leber hohe UGT-Aktivitäten aufweist und damit den bevorzugten Bildungsort für reaktive Acylglucuronide darstellt. Beispielsweise wurden Proteinaddukte in der Leber von Nagern nach oraler Verabreichung der NSAIDs Diclofenac [Hargus et al., 1994; Pumford et al., 1993; Seitz et al., 1998] oder Diflunisal [Dickinson und King, 1993; King und Dickinson, 1993; Wang und Dickinson, 1998] nachgewiesen. Es wurde sogar gezeigt, dass die UGTs selbst potentielle Partner für die Adduktbildung darstellen [Terrier et al., 1999].

Desweiteren wurde Tubulin als intrahepatisches Zielprotein der Acylglucuronid-vermittelten Bildung von Proteinaddukten identifiziert. Das Protein Tubulin ist Bestandteil des Cytoskeletts und ubiquitär in eukaryotischen Zellen präsent. Tubulin besteht aus dimeren  $\alpha$ -/ $\beta$ -Untereinheiten, die durch Polymerisation Mikrotubuli ausbilden. Die Mikrotubuli sind beim Aufbau der Mitosespindel beteiligt und wirken u.a. weiterhin bei intrazellulären Trans-

portvorgängen [Amos und Baker, 1979; Mandelkow et al., 1986a,b]. Für den Aufbau des Mikrotubulus sind eine Reihe weiterer Proteine erforderlich, die als Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) bezeichnet werden. Das heterodimere Tubulin und die MAP werden zusammen als mikrotubuläre Proteine (MTP) bezeichnet. Für zellfreie *in vitro*-Untersuchungen kann Tubulin z.B. aus Rinder- oder Pferdehirn isoliert werden. Bestimmte Stoffe besitzen die Fähigkeit die Polymerisation (Bsp. Colchicin) oder die Depolymerisierung (Bsp. Taxol) zu inhibieren. Beispielsweise wurde durch die kovalente Modifikation der MTP aus Rinderhirn durch das Acylglucuronid des NSAID Zomepirac, sowie durch das durch intramolekulare Acyl-Migration entstandene Acyl-Isomeren-Gemisch, die Aufbau- als auch die Abbaureaktion des Tubulingerüsts im zellfreien System konzentrationsabhängig gehemmt [Bailey et al., 1998]. Aber auch die Acylglucuronide endogener Carboxylsäuren, wie z.B. das Acylglucuronid der Gallensäure Lithocholsäure, gehen kovalente Bindungen mit Proteinen ein und führen zu einer unerwünschten cholestatistischen Wirkung [Ikegawa et al., 1999; Oelberg et al., 1984].

Acylglucuronide können zudem Immunreaktionen auslösen. Der molekulare Mechanismus ist bisher nicht aufgeklärt. Es wird daher die Hapten-Hypothese [Park et al., 1987] vertreten, wonach die durch die Acylglucuronide vermittelte Modifikation von Makromolekülen *in vivo* zur Produktion zirkulierender Antikörper führen kann, die an der Immunantwort beteiligt sein könnten [Bougie et al., 1997; Spahn-Langguth und Benet, 1992; Worrall und Dickinson, 1995]. Ferner wird beschrieben, dass einige Acylglucuronide von NSAIDs Addukte mit der DNA bilden können [Sabordo et al., 2000]. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die direkte Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen sowie die Induzierung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und anderer Faktoren. Dieser Effekt wurde beim Acylglucuronid des Immunsuppressivums Mycophenolsäure beobachtet, welches die Transkription und Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-6 in menschlichen Leukocyten induzierte [Wieland et al., 2000].

## 2 Problemstellung

Curcuminoide sind sekundäre Inhaltsstoffe der *Curcuma*-Pflanze, deren Hauptbestandteil das Curcumin (CUR) darstellt. Dem CUR werden aufgrund einer Fülle von *in vitro*- und *in vivo*-Studien vielfältige gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben. Neben den antiinflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften rückt CUR heutzutage, insbesondere aufgrund seiner antikanzerogenen Wirkungen und damit als potentieller Kandidat für die Chemoprävention, immer deutlicher in das Interesse der Forschung. Als Folge ihrer biologischen Aktivitäten sind Curcuminoide heute nicht nur als farb- und geschmacksgebende Komponenten von Lebensmitteln wie z.B. dem Currygewürz, sondern auch in konzentrierter Form, z.B. als Nahrungsergänzungsmittel, im Handel.

Während der wissenschaftliche Schwerpunkt derzeit eindeutig auf den chemopräventiven Eigenschaften von CUR liegt, ist der Kenntnisstand über die Metabolisierung der Curcuminoide noch lückenhaft. Insbesondere klinische Humanstudien, in denen oral verabreichtes CUR regelrecht „verschwindet“, werfen die Frage nach dem Verbleib der Substanz im Organismus auf. Zum Metabolismus der beiden Curcuminoide Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR, die in CUR-Präparaten stets zusammen mit CUR vorkommen und bis zu 30% ausmachen können, liegen bis dato keine Untersuchungen vor. Darüber hinaus fehlen ausreichende Kenntnisse über potentielle biologische Aktivitäten sowie zur Toxizität von Curcuminoid-Metaboliten.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Phase I- und Phase II-Metabolismus der drei Curcuminoide CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR *in vitro* zu untersuchen. Da solche Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen ablaufen, bei denen CUR chemisch nicht stabil ist, soll das Verhalten diverser Curcuminoid-Kongenerer in physiologischen Flüssigkeiten untersucht werden. Für die Studien zum Metabolismus sollen Präzisions-Gewebeschnitte aus Rattenleber eingesetzt werden, die den Vorteil haben, dass sie der *in vivo*-Situation sehr nahe sind. Ergänzend sollen Zellfraktionen aus Leber- und Darmgewebe sowie Supersomen, welche die Betrachtung der metabolischen Aktivität eines einzelnen Isoenzym ermöglichen, verwendet werden. Dies erfordert die Etablierung geeigneter Methoden. Weiterhin sollen die Metaboliten näher untersucht und charakterisiert werden. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse zum Metabolismus soll die potentielle Reaktivität relevanter Curcuminoid-Metaboliten untersucht werden und eine Einschätzung zur toxikologischen Relevanz erfolgen.

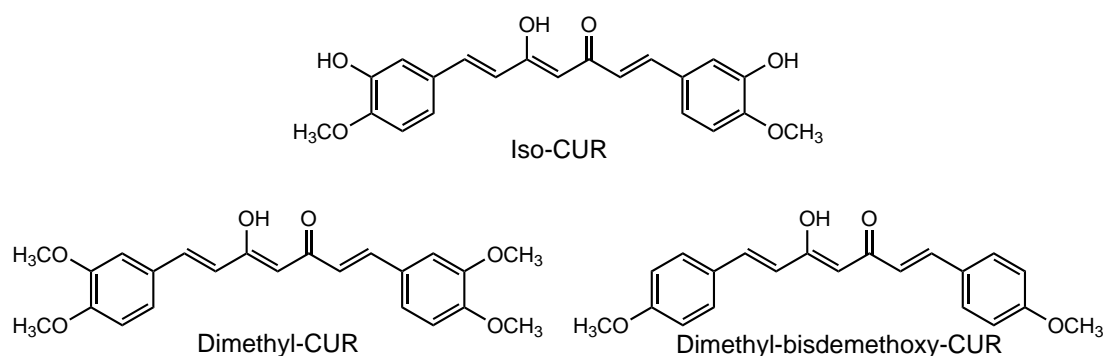
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung von Curcuminoid-Derivaten

Folgende Substanzen wurden durch chemische Synthese nach Pabon [1964](Kap. 6.2.2.1) dargestellt:

- CUR
- Bisdemethoxy-CUR
- Iso-CUR
- Dimethyl-CUR
- Dimethyl-bisdemethoxy-CUR

CUR und Bisdemethoxy-CUR stellen natürlich vorkommende Curcuminoide dar, während Iso-CUR, Dimethyl-CUR und Dimethyl-bisdemethoxy-CUR (Abb. 14) rein synthetische Curcuminoid-Derivate repräsentieren. Bei Iso-CUR sind im Vergleich zu CUR die Positionen der Hydroxy- und Methoxy-Substituenten an beiden Aromaten vertauscht. Bei Dimethyl-CUR und Dimethyl-bisdemethoxy-CUR befinden sich an der Position der beiden phenolischen Hydroxygruppen der entsprechenden natürlichen Analoga Methoxygruppen, die eine erhöhte Lipophilie dieser Substanzen bedingen.



**Abbildung 14:** Chemische Strukturen der synthetischen Curcuminoid-Derivate Iso-CUR, Dimethyl-CUR und Dimethyl-bisdemethoxy-CUR.

Die spektroskopischen und chromatographischen Eigenschaften aller in dieser Arbeit relevanten Curcuminoid-Derivate sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Schmelzpunkte, spektroskopische und chromatographische Eigenschaften von Curcuminoid-Derivaten. HPLC-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.2. <sup>a</sup> Gradient 1 für alle Substanzen mit Ausnahme der drei Dimethyl-CUR-Derivate, für die Gradient 4 verwendet wurde; <sup>b</sup> zwei Isomere; <sup>c</sup> durch chemische Synthese dargestellt; <sup>d</sup> nach Uehara et al. [1987]; <sup>e</sup> isoliert aus *Curcuma*; <sup>f</sup> nach Pedersen et al. [1985]; <sup>g</sup> durch enzymatische Reaktion dargestellt; k.A., keine Angabe.

Substanz	Smp. in °C	UV/Vis-Spektrum	HPLC <sup>a</sup> in min
		$\lambda_{max}$ in nm ( $\varepsilon$ in $l \times mol^{-1} \times cm^{-1}$ )	(Isomeren- Verhältnis) <sup>b</sup>
CUR <sup>c</sup>	179-181	428 (58530) in MeOH	25,4
Dihydro-CUR <sup>d</sup>	k.A.	376 (32000), 285 (7500) in EtOH <sup>d</sup>	24,6; 26,0 <sup>b</sup>
Tetrahydro-CUR <sup>c</sup>	92-94	281 (15100) in MeOH	23,3
Hexahydro-CUR <sup>c</sup>	k.A.	282 (7400) in MeOH	11,4
Octahydro-CUR <sup>c</sup>	k.A.	282 (ca. 7400) im HPLC-Eluent	8,8; 9,1 (1 : 2,5) <sup>b</sup>
Demethoxy-CUR <sup>e</sup>	172-173 <sup>f</sup>	424 (54800) in MeOH	24,7
Hexahydro-demethoxy-CUR <sup>g</sup>	k.A.	282 (ca. 7100) im HPLC-Eluent	11,1
Octahydro-demethoxy-CUR <sup>c</sup>	k.A.	282 (ca. 7100) im HPLC-Eluent	8,6; 8,9 (1 : 2,5) <sup>b</sup>
Bisdemethoxy-CUR <sup>c</sup>	224-225	416 (46400) in MeOH	24,0
Hexahydro-bisdemethoxy-CUR <sup>c</sup>	k.A.	280 (6000) in MeOH	10,8
Octahydro-bisdemethoxy-CUR <sup>c</sup>	k.A.	280 (ca. 6000) im HPLC-Eluent	8,3; 8,7 (1 : 4) <sup>b</sup>
Iso-CUR <sup>c</sup>	186	419 (59241) in EtOH	25,6
Hexahydro-iso-CUR <sup>c</sup>	k.A.	282 (ca. 7400) in MeOH	13,1
Octahydro-iso-CUR <sup>c</sup>	k.A.	282 (ca. 7400) im HPLC-Eluent	10,5; 11,0 <sup>b</sup>
Dimethyl-CUR <sup>c</sup>	128-130	418 (56188) in EtOH	30,7
Hexahydro-dimethyl-CUR <sup>c</sup>	k.A.	280 (5086) in MeOH	17,3
Octahydro-dimethyl-CUR <sup>c</sup>	k.A.	280 (ca. 5086) im HPLC-Eluent	14,6
Dimethyl-bisdemethoxy-CUR <sup>c</sup>	165	415 im HPLC-Eluent	27,7

Die Hexahydro-Produkte der synthetisierten Verbindungen, mit Ausnahme von Dimethyl-bisdemethoxy-CUR, wurden durch katalytische Hydrierung (Kap. 6.2.2.2) und die Octahydro-Produkte der natürlichen Curcuminoiden durch chemische Reduktion (Kap. 6.2.2.4) hergestellt.

Die Charakterisierung der synthetisierten Substanzen erfolgte durch Bestimmung des Schmelzpunktes bei Feststoffen, Aufnahme des UV/Vis-Spektrums und Bestimmung des Extinktionskoeffizienten am Absorptionsmaximum sowie HPLC/DAD-Analyse (Kap. 6.2.1.2 und 6.2.2.5). Die Struktur der thermostabilen Hexahydro- und Octahydro-Verbindungen wurde durch GC/MS-Analyse (Kap. 6.2.1.1) bestätigt, die Struktur von CUR und Iso-CUR zusätzlich mittels NMR (s. Anhang A.5). In einigen wenigen Fällen wurde auf bekannte Literaturwerte zurückgegriffen.

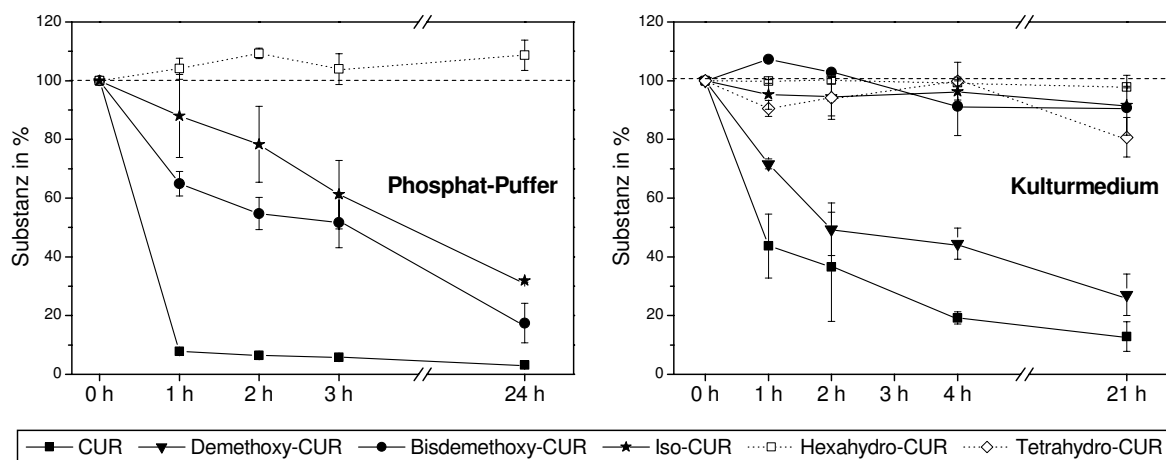
### 3.2 Untersuchungen zur Stabilität von Curcuminoiden in physiologischen Flüssigkeiten

Die chemische Instabilität von CUR in wässrigem Milieu ist Gegenstand einiger Studien [Pfeiffer et al., 2003; Tønnesen und Karlsen, 1985b; Wang et al., 1997] und wurde auch immer wieder während eigenen Untersuchungen beobachtet. Da Metabolismusstudien *in vitro* unter physiologischen Bedingungen ablaufen, wurde das Verhalten von Curcuminoiden in verschiedenen physiologischen Flüssigkeiten untersucht. Im Gegensatz zu den Literaturquellen, die sich fast ausnahmslos mit CUR beschäftigen, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die verwandten Curcuminoid-Derivate Demethoxy-CUR, Bisdemethoxy-CUR, Iso-CUR, Hexahydro-CUR und Tetrahydro-CUR in die Untersuchungen einbezogen.

Die Untersuchungen zur Stabilität wurden wie unter 6.2.4.1 und 6.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Abbildung 15 zeigt das Verhalten verschiedener Curcuminoid-Derivate in Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 (links) und in Kulturmedium ohne FKS (rechts) bei 37°C in einem Zeitfenster bis zu 24 h. Um eine vollständige Löslichkeit der schlecht wasserlöslichen Curcuminoide zu gewährleisten, wurden Substrat-Endkonzentrationen von 20 µM bzw. 30 µM eingesetzt.

In beiden wässrigen Systemen war ein zeitabhängiger Verlust der drei Curcuminoide zu beobachten. Der Zerfall war am deutlichsten bei CUR ausgeprägt: Im Puffer waren nach Langzeit-Inkubation nur noch 3% CUR und im Medium noch 13% CUR präsent. Während Bisdemethoxy-CUR und das synthetische Iso-CUR im Puffer ebenfalls nicht stabil waren, war im Medium nahezu kein Zerfall dieser beiden Derivate zu verzeichnen. Im Gegensatz zu den instabilen Curcuminoiden war Hexahydro-CUR in beiden physiologischen Flüssigkeiten stabil. Erstaunlich war der signifikante Stabilitätsunterschied zwischen CUR und seinem synthetischen Analogon Iso-CUR, die sich in ihrer chemischen Struktur nur durch den Austausch der Methoxy- und Hydroxy-Substituenten an den beiden Aromaten unterscheiden. Die Zerfallsraten waren im Medium ohne FKS trotz niedrigerer Substanzkonzentration im Vergleich zum Puffer geringer.





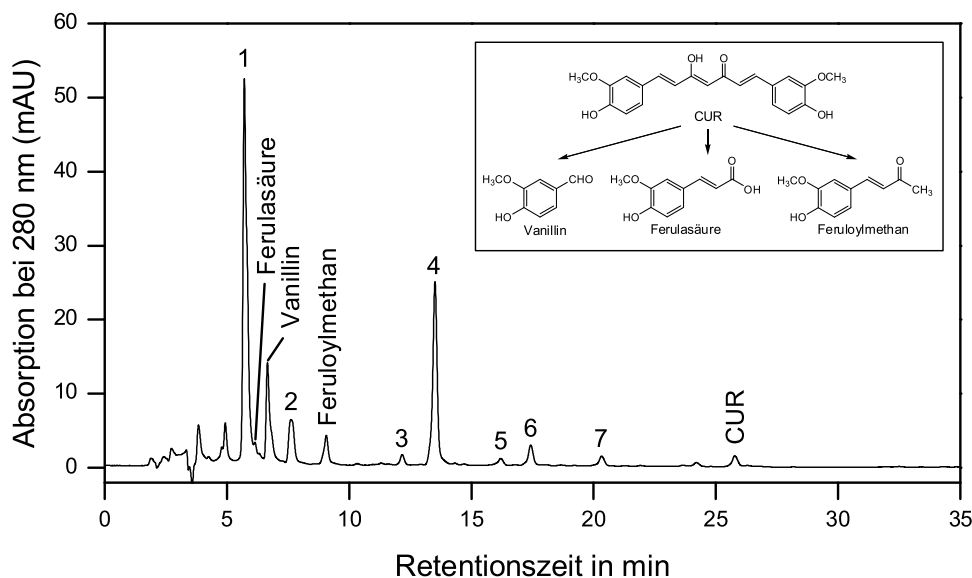
**Abbildung 15:** Zeitabhängiger Substanzverlust von Curcuminoid-Derivaten in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 (links) und in Kulturmedium ohne FKS (rechts). Die Substanzkonzentrationen betragen 30  $\mu\text{M}$  im Puffer und 20  $\mu\text{M}$  im Medium. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Bestimmungen pro Substrat und Zeitpunkt.

### 3.2.1 Zerfallsprodukte

Der starke Zerfall von CUR war vom zeitabhängigen Auftreten mehrerer Abbauprodukte begleitet. Es tauchten insgesamt 10 neue Peaks bei der UV-Detektion bei 280 nm in den HPLC-Chromatogrammen auf (Abb. 16).

Das Spektrum der CUR-Zerfallsprodukte war sowohl in Kalium-Phosphat-Puffer als auch in Kulturmedium reproduzierbar. Vanillin, Ferulasäure und Feruloylmethan wurden als Abbauprodukte von CUR, durch Vergleich von HPLC-Retentionszeiten und UV/Vis-Spektren (s. Anhang A.1.1, Tab. 16) sowie GC-Retentionszeiten und der Fragmentierung in der GC/MS nach Trimethylsilylierung (s. Anhang A.1.2, Tab. 17) mit authentischen Referenzsubstanzen, identifiziert.

Der Zerfall des instabilen Demethoxy-CUR war komplexer, da aufgrund der beiden unterschiedlich substituierten Aromaten dieses Curcuminoids vielfältigere Abbauprodukte entstehen können. Eine partielle Zersetzung (drei Produkte) des deutlich stabileren Bisdemethoxy-CUR wurde nur unter drastischen Bedingungen (Phosphat-Puffer pH 12 für mind. 3 Tage bei 37°C) erreicht. Ähnlich stabil erwies sich das synthetische Iso-CUR bei dem zwei Zersetzungsprodukte nach 60 h in Puffer bei 37°C beobachtet wurden. Eines dieser beiden Produkte wurde anhand von Retentionszeit-Vergleichen in der HPLC tendenziell als Isovanillin angenommen, da aufgrund der geringen Menge weitere Methoden zur Identifizierung nicht möglich waren.



**Abbildung 16:** Repräsentatives HPLC-Profil der Abbauprodukte von CUR nach 21 h-Inkubation bei 37°C in Kulturmedium. Insert: Identifizierte Abbauprodukte von CUR. HPLC-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.2 (Gradient 1).

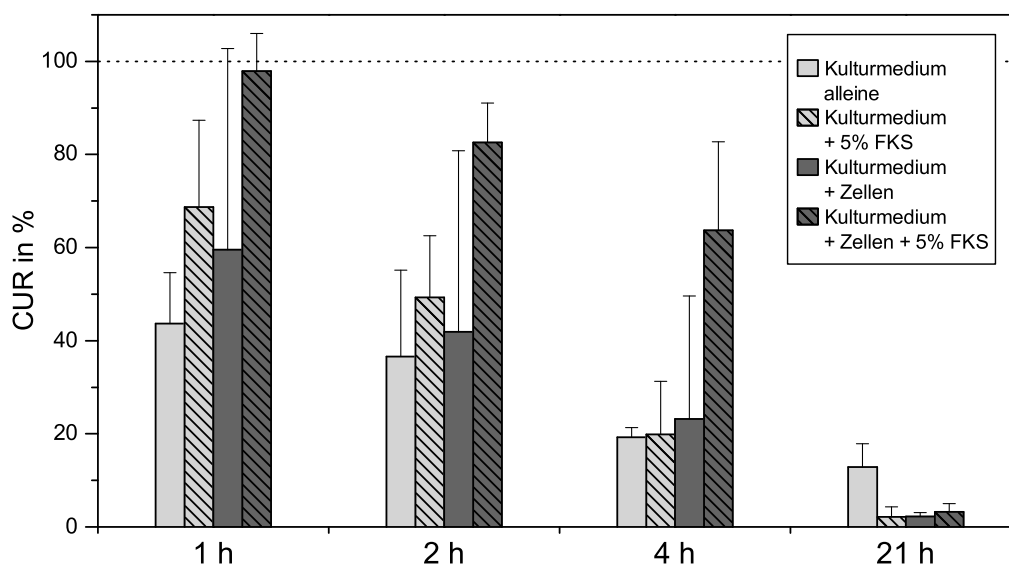
Diverse aromatische Referenzsubstanzen (s. Anhang A.1) mit einer den Curcuminoiden verwandten chemischen Struktur (für CUR und Demethoxy-CUR: Guajacol, Eugenol, Ferulaldehyd, Vanillinsäure, 2-Methoxy-4-Methylphenol; für Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR: 4-Hydroxy-Benzaldehyd, p-Cumarsäure) wurden durch Cochromatographie in der HPLC als potentielle Abbauprodukte der Curcuminoiden ausgeschlossen. Die Aufklärung der Struktur weiterer Abbauprodukte von CUR nach Fraktionierung an der HPLC, Trimethylsilylierung und Analyse mittels GC/MS lieferte keine charakteristischen EI-Massenspektren und damit keine Hinweise auf die chemische Struktur. Möglicherweise waren die Abbauprodukte selbst thermolabil oder für eine Derivatisierung nicht zugänglich und deshalb für eine GC/MS-Analyse ungeeignet.

### 3.2.2 Einfluß von FKS und Zellen

Der Effekt von FKS und Zellen auf den zeitabhängigen Zerfall der Curcuminoiden im Kulturmedium wurde, wie in Kapitel 6.2.4.2 beschrieben, untersucht und ist in Abbildung 17 beispielhaft für CUR gezeigt. In Kurzzeit-Inkubationen bis zu 4 h wurde bei Zusatz von 5% FKS bzw. in Anwesenheit von Zellen im Inkubationsmedium ein verlangsamter Zerfall von CUR im Vergleich zum reinen Medium beobachtet. Dieser „stabilisierende“ Effekt war in Anwesenheit von 5% FKS und Zellen am stärksten ausgeprägt: Es wurden zwei- bis dreimal höhere CUR-Mengen nachgewiesen als im Medium ohne Zusätze. Im Gegensatz dazu war nach Langzeit-Inkubation von CUR für 21 h, unabhängig von den Inkubationsbedingungen,

die Substanz nahezu vollständig zerfallen ( $\leq 10\%$ ).

Demethoxy-CUR verhielt sich gegenüber den Zusätzen ähnlich wie CUR; insgesamt wurde jedoch eine etwas stärkere „Stabilisierung“ beobachtet. Die Gehalte der stabilen Derivate Bisdemethoxy-CUR, Iso-CUR, Hexahydro-CUR und Tetrahydro-CUR wurden von der Ab- oder Anwesenheit von FKS bzw. Zellen nicht signifikant beeinflusst (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 17:** Einfluß von FKS und Zellen auf den Zerfall von CUR in Kulturmedium. Die CUR-Konzentration betrug  $20 \mu\text{M}$ . Die Säulen repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Bestimmungen.

### 3.3 Metabolismusstudien in Präzisions-Leberschnitten

Präzisions-Gewebeschnitte stellen ein nützliches Modellsystem für Metabolismusstudien dar, da sie gewährleisten, dass die Zellen mit ihrer kompletten Enzymausstattung in ihrem physiologischen Gewebeverband belassen werden und z.B. die Zell-Zell-Kommunikation sowie Zell-Matrix-Interaktionen aufrechterhalten bleiben. Somit wird die *in vivo*-Situation hinsichtlich des Phase I- und Phase II-Metabolismus in Leberschnitten sehr gut wiedergespiegelt [Gebhardt et al., 2003]. Der Curcuminoid-Metabolismus wurde mit Präzisions-Leberschnitten männlicher und weiblicher Sprague-Dawley-Ratten untersucht.

#### 3.3.1 Optimierung der Versuchsbedingungen

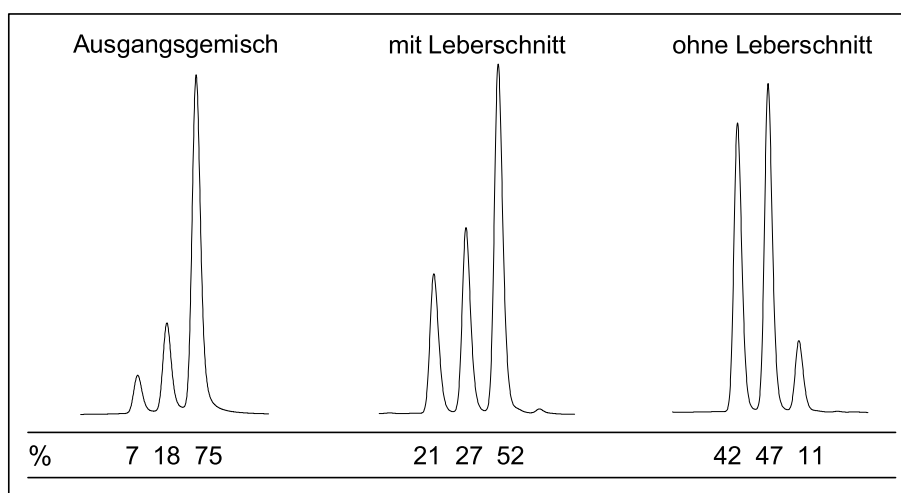
In ersten Vorversuchen wurde ein kommerzielles Curcuminoid-Gemisch, bestehend aus 75% CUR, 18% Demethoxy-CUR und 7% Bisdemethoxy-CUR in Endkonzentrationen von  $100 \mu\text{M}$  und  $200 \mu\text{M}$  mit frisch präparierten Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten für 24 h

bei 37°C unter Gasatmosphäre (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert und anschließend das Kulturmedium auf Phase I- und Phase II-Metabolite mittels HPLC/DAD analysiert. Die Phase I-Metaboliten wurden direkt aus dem Inkubationsansatz durch Extraktion mit Ethylacetat in unkonjugierter Form erfasst, während Glucuronide und Sulfate vor der Extraktion einer enzymatischen Hydrolyse unterworfen und in freier Form bestimmt wurden (Kap. 6.2.5.3).

Unter den gewählten Versuchsbedingungen fand eine Metabolisierung der Curcuminoiden in Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten statt. In den HPLC-Chromatogrammen beider Geschlechter wurden insgesamt jeweils fünf Metabolitengruppen nach enzymatischer Hydrolyse beobachtet, die aus jeweils drei Peaks bestanden und durch eine ähnliche Zusammensetzung wie das eingesetzte Curcuminoid-Gemisch charakterisiert waren. Diese Peaks waren in der Kontrolle mit Substanz aber ohne Gewebeschnitt (Substanzkontrolle), sowie in der Kontrolle mit Leberschnitt und DMSO anstelle von Substrat (Leerwert), nicht sichtbar. Die Metaboliten lagen überwiegend in Form ihrer Konjugate vor.

Geringere Substratkonzentrationen als 200 µM lieferten nach 24-stündiger Inkubation schlechtere Metabolitenausbeuten sowie geringere Wiederfindungen von Muttersubstanzen und Metaboliten relativ zur eingesetzten Substanzmenge.

Nach 24-stündiger Inkubation des Curcuminoid-Gemisches mit einem Leberschnitt war die Zusammensetzung des Ausgangsgemisches verändert: Es war eine Verschiebung der Zusammensetzung von CUR in Richtung Bisdemethoxy-CUR sichtbar (Abb. 18). Dieser Effekt war in der Substanzkontrolle ohne Leberschnitt noch deutlicher ausgeprägt und zeigte die unterschiedliche Stabilität der drei Curcuminoiden im verwendeten Testsystem an.



**Abbildung 18:** HPLC-Profile des kommerziellen Curcuminoid-Gemisches ohne Inkubation (links) und nach 24 h-Inkubation mit einem Leberschnitt (Mitte) und ohne Leberschnitt in der Substanzkontrolle (rechts). Elutionsreihenfolge: Bisdemethoxy-CUR, Demethoxy-CUR, CUR. HPLC-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.2 (Gradient 1).

Die Inkubation des Curcuminoid-Gemisches war, insbesondere in Abwesenheit eines Gewebeschnittes, mit der Bildung der charakteristischen CUR-Abbauprodukte Vanillin und z.T. Ferulasäure (Kap. 3.2.1) verbunden.

Aufgrund der chemischen Instabilität der Curcuminoide (Kap. 3.2) war die Wahl geeigneter Inkubationsbedingungen wichtig, insbesondere hinsichtlich der Inkubationszeit. Deswegen wurden in zusätzlichen Versuchen Leberschnitte einer männlichen Ratte für 2 h, 4 h und 6 h mit 200  $\mu\text{M}$  CUR inkubiert. Es zeigte sich ein ähnliches Metabolitenmuster wie nach 24 h, allerdings waren die Metabolitenausbeuten geringer und der Anteil an unmetabolisiertem CUR höher. Die Wiederfindungen der Muttersubstanz und Metaboliten bezüglich der eingesetzten Substanzmenge waren jedoch bei kürzerer Inkubation höher. Ebenso resultierten bei 6 h-Inkubationen mit 200  $\mu\text{M}$  Demethoxy-CUR bzw. 200  $\mu\text{M}$  Bisdemethoxy-CUR geringe Metabolitenausbeuten (Tab. 4).

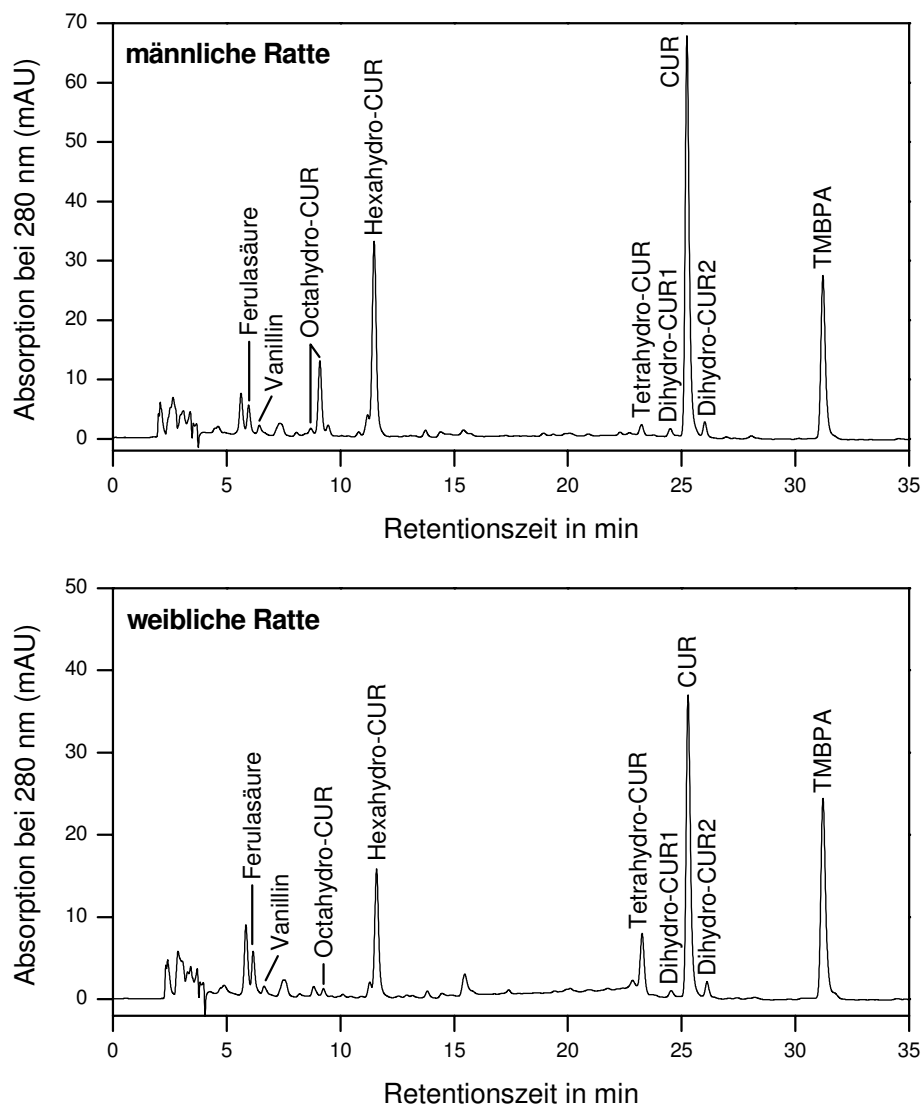
**Tabelle 4:** Umsätze und Wiederfindungen von CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR bei Kurzzeit- und Langzeit-Inkubationen mit Leberschnitten von männlichen Ratten nach Hydrolyse der Konjugate mit  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Kap. 6.2.5.3, Methode I). Die Wiederfindungen setzen sich aus Muttersubstanz und zugehörigen Metaboliten (unkonjugiert und konjugiert) zusammen und sind in Prozent der eingesetzten Substanzmenge angegeben. Die Umsätze sind in Prozent der gesamten wiedergefundenen Substanz in Form von unkonjugierten und konjugierten Metaboliten dargestellt. n.b., nicht bestimmt.

Curcuminoid	Zeit	Umsatz in %	Wiederfindung in %
CUR	2 h	4,3	77,0
	4 h	9,6	77,5
	6 h	16,7	68,5
	24 h	48,0	53,7
Demethoxy-CUR	6 h	11,1	n.b.
	24 h	43,1	52,7
Bisdemethoxy-CUR	6 h	5,0	n.b.
	24 h	37,5	76,3

### 3.3.2 Phase I-Metabolismus von CUR

Frisch präparierte Leberschnitte von je zwei männlichen und zwei weiblichen Ratten wurden mit 200  $\mu\text{M}$  CUR für 24 h inkubiert und das Medium mittels HPLC auf Phase I- und Phase II-Metabolite, wie unter 6.2.5.3 beschrieben, untersucht. Repräsentative HPLC-Chromatogramme der Phase I-Metaboliten von CUR in der männlichen und weiblichen Rattenleber sind nach Hydrolyse der Konjugate in Abbildung 19 wiedergegeben. Referenzsubstanzen waren für die reduktiven CUR-Metaboliten Tetrahydro-CUR, Hexahydro-CUR

und Octahydro-CUR vorhanden, die sich in ihren HPLC-Retentionszeiten unterscheiden, nicht aber in ihrem Absorptionsmaximum (Tab. 3).



**Abbildung 19:** HPLC-Profile der Phase I-Metaboliten von CUR nach 24 h-Inkubation von 200  $\mu\text{M}$  CUR mit dem Leberschnitt einer männlichen (oben) und einer weiblichen (unten) Ratte und enzymatischer Hydrolyse der Konjugate. TMBPA (3,5,3',5'-Tetramethyl-bisphenol A), interner Standard. HPLC-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.2 (Gradient 1).

Um die reduktiven CUR-Metaboliten zu erfassen, wurde die Absorption bei 280 nm gewählt, da die chromophore Diarylheptatrienon-Kette des CUR-Moleküls, welche bei 420 nm absorbiert, durch die Reduktion zerstört wird. Der dominante Metabolitenpeak beider Geschlechter mit einer HPLC-Retentionszeit von 11,4 min coeluierte mit authentischem Hexahydro-CUR und wies das identische UV/Vis-Spektrum auf. Eine GC/MS-Analyse dieses Peaks lieferte zudem eine übereinstimmende GC-Retentionszeit und Fragmentierung mit synthetischem Hexahydro-CUR. Die beiden Peaks der männlichen Ratte, die nach 8,8 und 9,1 min bei der HPLC-Analyse eluierten (Abb. 19, oben), wurden auf gleiche Weise anhand ihrer HPLC- und GC-Retentionszeiten, ihrer UV/Vis-Spektren und mittels GC/MS als Octahydro-CUR identifiziert. Die Fragmentierung bei der GC/MS-Analyse lieferte für diese beiden Peaks ein identisches Spektrum an Fragmentationen, aufgrund dessen sie als Isomere angesehen wurden. Das Octahydro-CUR-Molekül besitzt zwei Chiralitätszentren, welche die aliphatischen Hydroxylgruppen tragen, die zu zwei Diastereomeren führen. Die beiden Diastereomere von Octahydro-CUR entstanden im Verhältnis 1:3. Der zweitgrößte Peak des weiblichen Tiers eluierte nach 23,3 min (Abb. 19, unten) und wies die HPLC-Retentionszeit, das UV/Vis-Spektrum und das GC/MS-Fragmentierungsmuster von synthetischem Tetrahydro-CUR auf. Zwei kleinere Peaks, die in Abbildung 19 bei 24,6 und 26,0 min sichtbar sind, wurden aufgrund ihres identischen Absorptionsmaximums bei 376 nm, das mit dem für Dihydro-CUR publizierten UV/Vis-Spektrum in Ethanol [Uehara et al., 1987] übereinstimmt, tendenziell als Isomere von Dihydro-CUR bestimmt. Die Bildung zweier Isomere ist durch Reduktion der allylischen oder der enolischen Doppelbindung im CUR-Molekül möglich. Keiner dieser identifizierten HPLC-Peaks wurde in Medien von Kontroll-Inkubationen, welche CUR aber keinen Leberschnitt, sowie einen Leberschnitt aber kein CUR enthielten, detektiert. Jedoch hatte die Inkubation von CUR ohne Leberschnitt das Auftreten bekannter Zerfallsprodukte wie Vanillin und Ferulasäure [Pfeiffer et al., 2003; Tønnesen und Karlsen, 1985a; Wang et al., 1997] zur Folge, die auch in den vollständigen Inkubationsansätzen entstanden (Abb. 19).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Suche nach oxidativen CUR-Metaboliten wie z.B. aromatischen Hydroxylierungs- oder Demethylierungsprodukten. Es gab keinerlei Hinweise in den HPLC-Chromatogrammen auf solche Produkte deren Detektion bei 420 nm stattfand, da bei oxidativen Veränderungen das gelb-gefärbte CUR-Chromophor intakt bleibt. Beruhend auf der Nachweisgrenze für CUR bei dieser Wellenlänge, hätten oxidative Metaboliten detektiert werden können, wenn mindestens 0,01% des CUR umgewandelt worden wären.

Weiterhin ist eine zusätzliche oxidative Metabolisierung der reduktiven CUR-Metaboliten vorstellbar. Solche polaren Produkte wurden ebenfalls nicht beobachtet. Ihre Nachweisgrenzen bei 280 nm lagen für Tetrahydro-CUR bei 0,03% und für Hexahydro-CUR und Octahydro-CUR bei 0,05% der eingesetzten Substanzmenge.

### 3.3.3 Phase I-Metabolismus von Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR

Wurden 200  $\mu\text{M}$  Demethoxy-CUR bzw. Bisdemethoxy-CUR unter den gleichen Bedingungen wie CUR mit Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten inkubiert und die Medien per HPLC/DAD analysiert, ergab sich für die beiden Demethoxy-Derivate jeweils ein ähnliches Metabolitenmuster wie für CUR: Insgesamt wurden vier Phase I-Metaboliten gefunden, wobei die Hauptprodukte die Hexahydro-Derivate darstellten, welche durch Cochromatographie mit den entsprechenden Referenzsubstanzen in der HPLC und GC sowie anhand ihrer UV/Vis- und Massenspektren identifiziert wurden. Die Octahydro- und Tetrahydro-Produkte wurden anhand ihrer HPLC- und GC-Retentionszeiten, ihren UV/Vis- und Massenspektren aufgeklärt. Die beiden Isomere der Dihydro-Produkte wurden vorläufig aufgrund ihrer identischen UV/Vis-Spektren zugewiesen.

In Einklang mit den Befunden für CUR wurden auch keine oxidativen Metaboliten der demethoxylierten Curcuminoide gefunden. Ebenso gab es keine Hinweise auf eine oxidative Modifizierung der reduktiven Metaboliten.

### 3.3.4 Aufklärung der Phase I-Metaboliten mittels GC/MS-Analyse

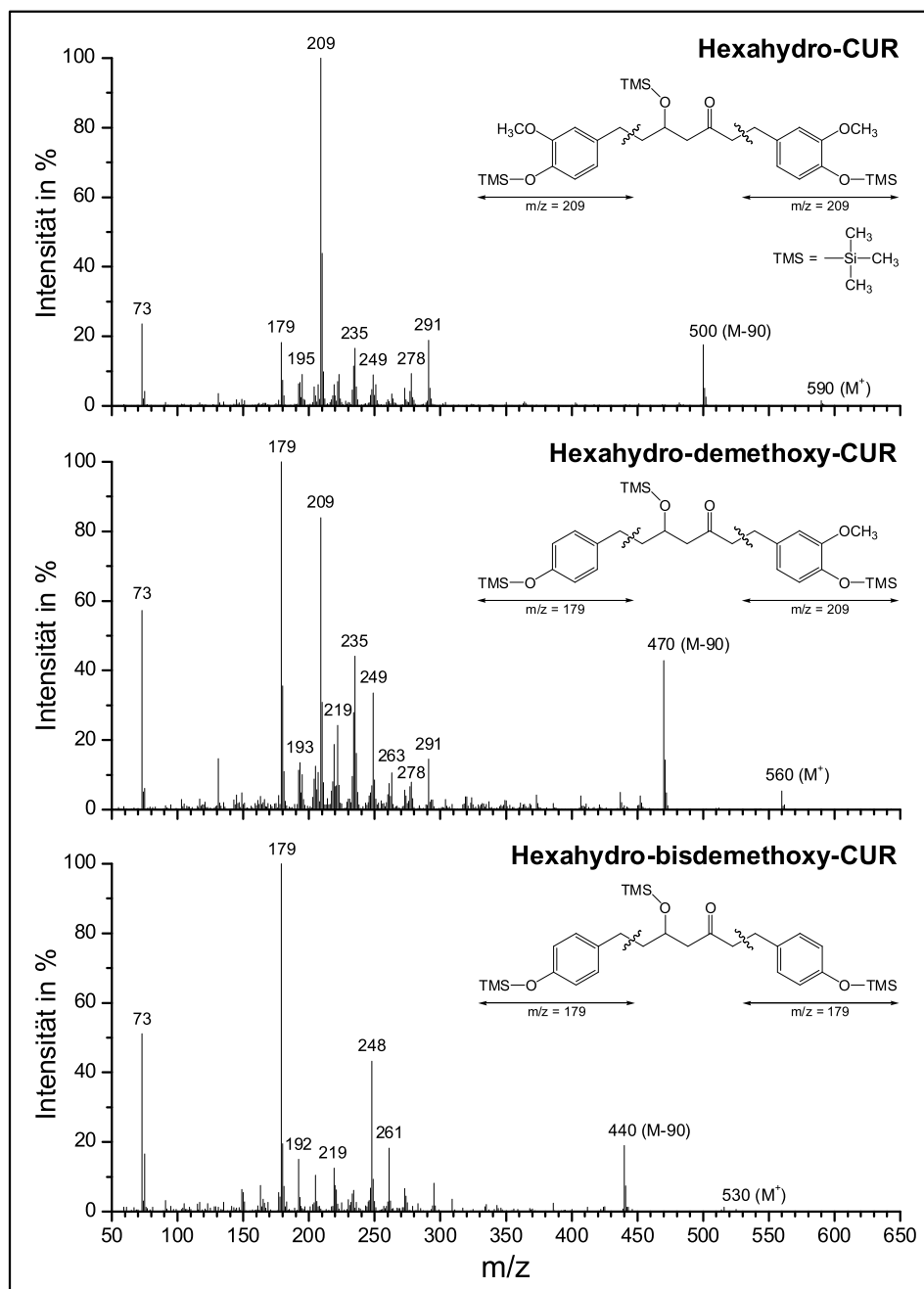
Für die GC/MS-Analyse wurde das Inkubationsmedium nach Hydrolyse der Konjugate extrahiert und der gesamte oder fraktionierte Extrakt verwendet. Die Metaboliten wurden in Form ihrer Trimethylsilylether erfasst (Kap. 6.2.1.1). Die GC-Retentionszeiten und GC/MS-Fragmentierungsmuster befinden sich im Anhang (A.3.1, Tab. 20).

Die Massenspektren der Hexahydro-Metaboliten aller drei Curcuminoide wiesen sehr kleine Molekülionen, sowie den Verlust von 90 Masseneinheiten von den Molekülionen aufgrund der Eliminierung von Trimethylsilanol (M-90), auf. Weitere charakteristische Fragmente entstanden aus der Spaltung der benzyliischen Bindungen (Abb. 20).

Die EI-Massenspektren der Octahydro-Curcuminoide waren durch zwei sukzessive Abspaltungen von Trimethylsilanol sowie der Spaltung der benzyliischen Positionen gekennzeichnet. Eine weitere bedeutende Fragmentierung der Octahydro-Curcuminoide, die zu  $m/z$  262 und 232 führte, trat in der aliphatischen Kette nach Verlust der beiden Trimethylsilanol-Moleküle auf.

Im Gegensatz zu den Hexahydro- und Octahydro-Metaboliten zeigten die Massenspektren der Tetrahydro-Curcuminoide keinen Abgang von Trimethylsilanol. Stattdessen waren charakteristische Ionen mit  $m/z$  365 und 335 sichtbar, die aus der Spaltung der aliphatischen Kette ohne Verlust der Trimethylsilyl-Gruppe resultieren. Benzyliische Spaltungen wurden ebenfalls beobachtet.

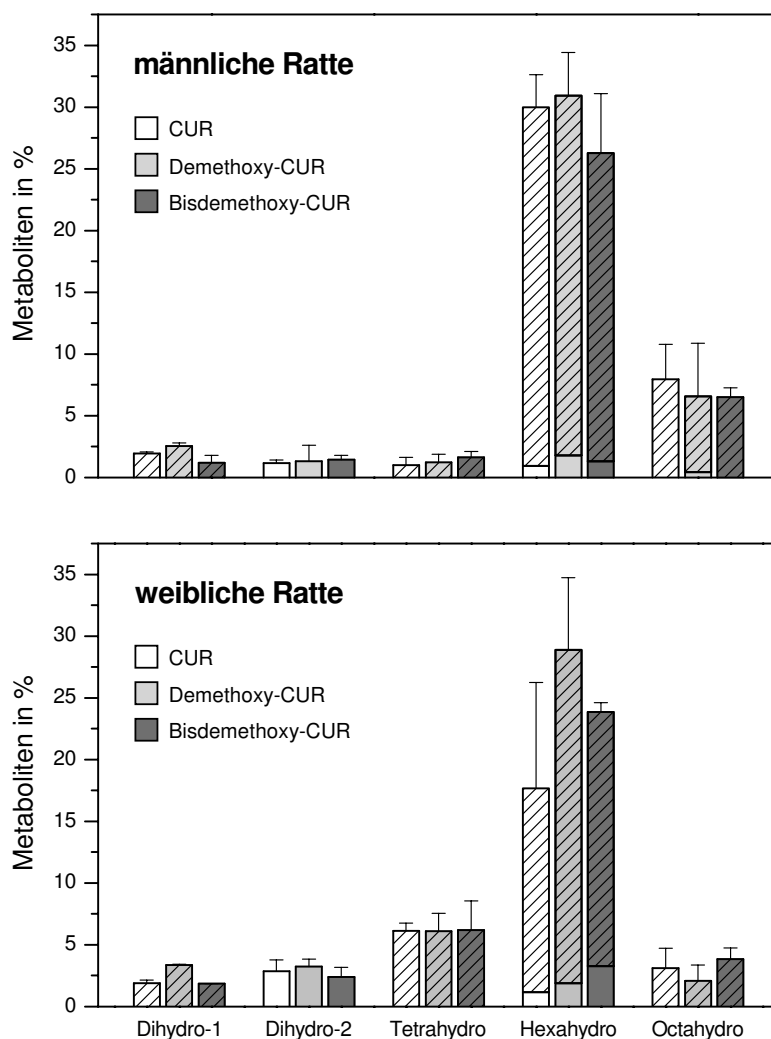




**Abbildung 20:** Repräsentative GC/MS-Fragmentierungsmuster der trimethylsilylierten Hauptmetaboliten Hexahydro-CUR (oben), Hexahydro-demethoxy-CUR (Mitte) und Hexahydro-bisdemethoxy-CUR (unten). GC/MS-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.1.

### 3.3.5 Phase I- und Phase II-Metaboliten der Curcuminoiden

Eine quantitative Betrachtung über die Phase I-Metaboliten der drei Curcuminoiden und das Ausmaß ihrer Konjugation in Leberschnitten von männlichen und weiblichen Ratten liefert Abbildung 21. Die Daten wurden nach enzymatischer Spaltung mit einem Gemisch aus  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* erhalten, so dass die Säulen der Konjugat-Fractionen jeweils die Summe aus Glucuroniden und Sulfaten repräsentieren.



**Abbildung 21:** Zusammensetzung der reductiven Metaboliten von CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR im Inkubationsmedium von Leberschnitten männlicher (oben) und weiblicher (unten) Ratten nach 24 h-Inkubation mit den Curcuminoiden (200  $\mu$ M). Für jeden Metabolit wurde der unkonjugierte (ungemusterter Teil der Säule) und konjugierte (gemusterter Teil der Säule) Anteil durch Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Kap. 6.2.5.3, Methode I) bestimmt. Die Werte sind in Prozent der Summe aus wiedergefundenem Curcuminoid plus Metaboliten dargestellt und repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Spannweite von zwei Ratten pro Geschlecht, sowie drei unabhängig inkubierten Schnitten pro Ratte.

Das Schaubild zeigt, dass die Hexahydro-Produkte aller drei Curcuminoiden überwiegend (>90%) als hydrophile Konjugate vorlagen, welche die vorherrschenden Metaboliten in Leberschnitten von männlichen und weiblichen Ratten darstellten. Die beiden Isomere der Dihydro-Verbindungen wurden von beiden Geschlechtern in geringen Mengen gebildet (2-9% aller Metaboliten). Bemerkenswert war, dass ein Isomer vollständig konjugiert wurde (Dihydro-CUR1), während das andere offensichtlich ein schlechtes Substrat für die Konjugation darstellte und ausschließlich in freier Form vorlag (Dihydro-CUR2). Ein interessanter Unterschied zwischen den Geschlechtern trat im Phase I-Metabolismus für die Tetrahydro- und Octahydro-Produkte auf: Männliche Ratten bildeten größere Mengen Octahydro-Metabolite, aber weniger Tetrahydro-Produkte als weibliche Tiere. Die Tetrahydro- und Octahydro-Verbindungen waren fast ausschließlich in Form ihrer Konjugate vorhanden. Anders als für die reduktiven Curcuminoid-Metaboliten, wurden nach 16-stündiger enzymatischer Hydrolyse (Kap. 6.2.5.3, Methode I) keine Konjugate der Curcuminoiden selbst gefunden.

#### **Wiederfindungen**

Zusätzlich zu den Metaboliten wurde der Gehalt der Muttersubstanzen in den 24 h-Inkubationen mit Gewebeschnitten quantifiziert. Die Ausgangssubstanzen lagen größtenteils in unkonjugierter Form vor. Der Umsatz zu reduktiven Metaboliten und Konjugaten lag im Bereich von 30-50% (Tab. 5). Der Vergleich zwischen der Summe aus wiedergefundener Muttersubstanz und gebildeten Metaboliten mit der eingesetzten Menge zeigte, dass ein beträchtlicher Teil der Substanz nicht nachweisbar war. Die Wiederfindungen betragen ca. 50% für CUR und Demethoxy-CUR sowie ungefähr 75% für Bisdemethoxy-CUR in Inkubationen mit Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten, d.h. die Hälfte des eingesetzten CUR und Demethoxy-CUR sowie ein Viertel des eingesetzten Bisdemethoxy-CUR „gingen verloren“ (Tab. 5). Verluste für die einzelnen Curcuminoiden waren auch nach 24-stündiger Inkubation der Substanzen im Medium ohne Gewebeschnitt zu verzeichnen. Hier war die unterschiedliche Stabilität der drei Curcuminoiden, die sich bereits in den Vorversuchen mit dem kommerziellen Curcuminoid-Gemisch andeutete (Kap. 3.3.1), insbesondere anhand der sehr geringen Wiederfindung für CUR (ca. 10%), noch ausgeprägter zu erkennen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit früheren Studien [Pfeiffer et al., 2003; Wang et al., 1997], welche die Instabilität der Curcuminoiden in wässrigen Systemen beschreiben, wobei CUR das am wenigsten stabilste und Bisdemethoxy-CUR das stabilste Curcuminoid darstellt.

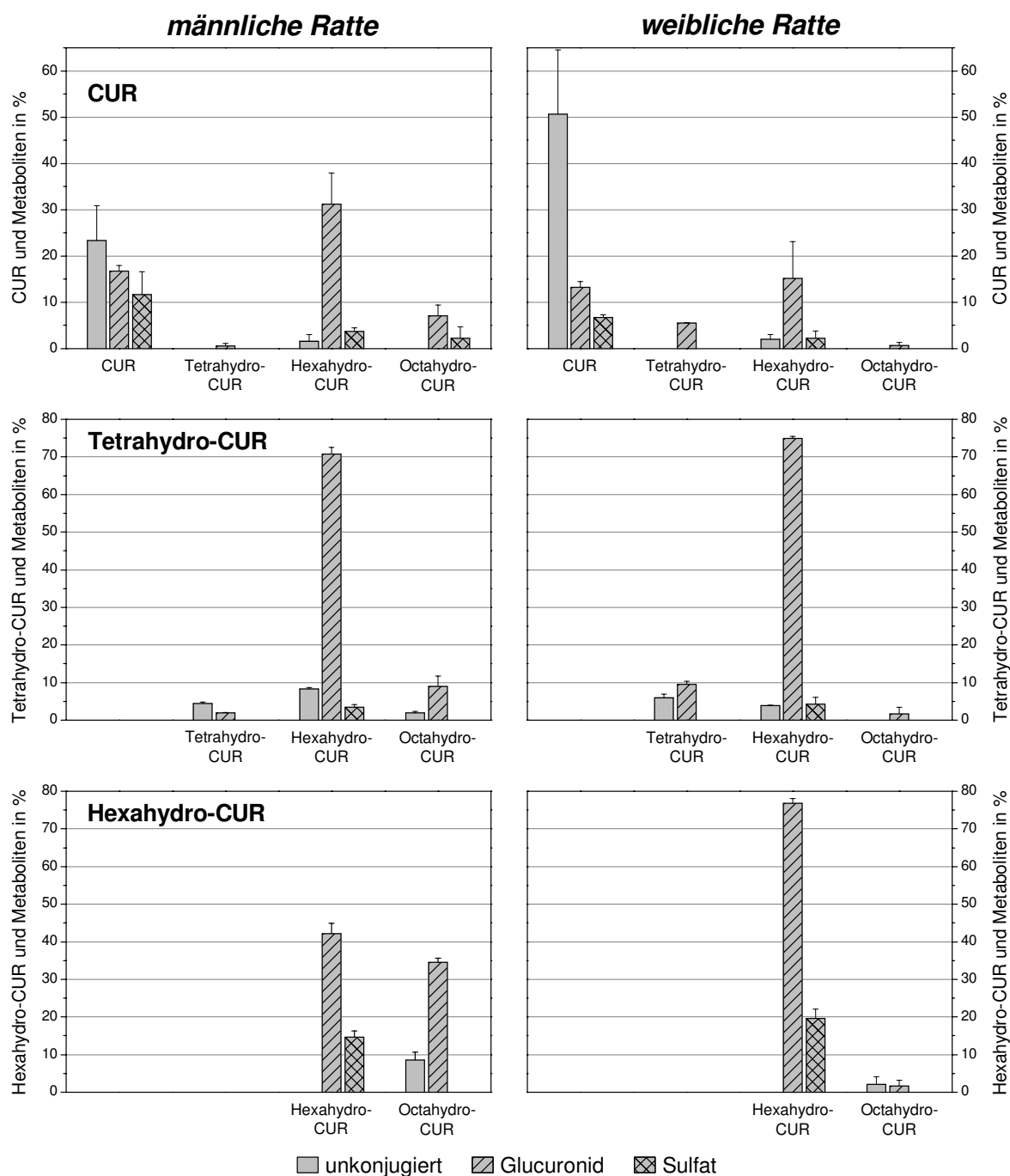
**Tabelle 5:** Wiederfindungen der Curcuminoiden und ihrer reduktiven Metaboliten (unkonjugiert und konjugiert) aus 24 h-Inkubationen mit Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten nach Hydrolyse der Konjugate mit  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Kap. 6.2.5.3, Methode I). Die Werte sind in Prozent der eingesetzten Curcuminoid-Menge dargestellt und repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Experimenten. \* Die Umsätze sind in Prozent der gesamten wiedergefundenen Substanz in Form von reduktiven und konjugierten Metaboliten dargestellt.

Curcuminoid	Geschlecht	Mutter-substanz	Reduktive Metaboliten	Wiederfindung	Umsatz*
CUR	männlich	27,9 $\pm$ 3,2	25,8 $\pm$ 2,9	53,7 $\pm$ 6,1	48,0 $\pm$ 0,1
	weiblich	29,7 $\pm$ 11,6	12,1 $\pm$ 1,1	41,8 $\pm$ 10,5	31,6 $\pm$ 10,7
Demethoxy-CUR	männlich	30,5 $\pm$ 7,9	22,2 $\pm$ 1,3	52,7 $\pm$ 9,2	43,1 $\pm$ 5,1
	weiblich	26,1 $\pm$ 6,6	20,1 $\pm$ 0,5	46,2 $\pm$ 7,1	44,3 $\pm$ 5,7
Bisdemethoxy-CUR	männlich	48,8 $\pm$ 16,0	27,4 $\pm$ 1,1	76,3 $\pm$ 17,1	37,5 $\pm$ 7,0
	weiblich	46,4 $\pm$ 9,7	28,2 $\pm$ 4,1	74,6 $\pm$ 13,8	38,1 $\pm$ 1,5

### 3.3.6 Detaillierte Untersuchung des CUR-Metabolismus

Zur näheren Untersuchung des CUR-Metabolismus wurden zusätzlich zu CUR die beiden reduktiven Metaboliten Tetrahydro-CUR (200  $\mu$ M) und Hexahydro-CUR (50  $\mu$ M) für 24 h mit Leberschnitten einer männlichen und einer weiblichen Sprague-Dawley-Ratte inkubiert. Um die Konjugate genauer zu charakterisieren wurde die enzymatische Hydrolyse modifiziert, indem eine separate Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase mit einer verkürzten Einwirkzeit von 2 h (Kap. 6.2.5.3, Methode II) durchgeführt wurde. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 22 zusammengefasst.

**CUR** In Inkubationen mit 200  $\mu$ M CUR (Abb. 22, oben) waren die dominanten Phase I-Metaboliten, wie bereits zuvor beschrieben (Kap. 3.3.2), Hexahydro-, Tetrahydro- und Octahydro-CUR. Den bevorzugten Konjugationsweg dieser drei reduktiven Metaboliten stellte die Glucuronidierung dar. Für Hexahydro-CUR wurden jedoch auch Sulfate in signifikanten Mengen gefunden. Glucuronide und Sulfate waren in beachtlichen Mengen auch für CUR selbst zu beobachten. Dieser Befund steht in deutlichem Gegensatz zu den früheren Experimenten bei Verwendung von  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Kap. 6.2.5.3, Methode I), in denen die Curcuminoiden nur in unkonjugierter Form erfasst wurden (vgl. Kap. 3.3.5). Die Umsatzraten männlicher und weiblicher Ratten für CUR, einschließlich der Phase II-Metaboliten von CUR, finden sich in Tabelle 6.



**Abbildung 22:** Konjugat-Muster von CUR (oben, n=2), Tetrahydro-CUR (Mitte, n=1) und Hexahydro-CUR (unten, n=1) im Medium nach 24 h-Inkubation mit Leberschnitten von männlichen (links) und weiblichen (rechts) Ratten. Die Daten sind in Prozent der gesamten detektierten Substanzen (Muttersubstanz + Metabolite) angegeben und repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Spannweite einer Doppelbestimmung aus drei unabhängig inkubierten Schnitten pro Ratte. n, Anzahl der Tiere pro Geschlecht.

**Tetrahydro-CUR** Nach 24 h-Inkubation von 200  $\mu\text{M}$  Tetrahydro-CUR (Abb. 22, Mitte) waren neben geringfügigen Mengen unveränderter Muttersubstanz, hauptsächlich Hexahydro-CUR (>80%) und geringe Mengen Octahydro-CUR im Kulturmedium nachweisbar. Wiederum bildeten männliche Ratten mehr Octahydro-CUR als weibliche Ratten und als Konjugate wurden bevorzugt Glucuronide gebildet. Oxidative Demethylierungen sowie aromatische und aliphatische Hydroxylierungen von Tetrahydro-CUR konnten nicht beobachtet werden. Im Vergleich zu CUR wies Tetrahydro-CUR eine deutlich höhere Umsatzrate (Tab. 6) und höhere Wiederfindungen (>90%) von Muttersubstanz und Metaboliten auf.

**Hexahydro-CUR** Die Fähigkeit männlicher Ratten Hexahydro-CUR effizienter zu Octahydro-CUR zu reduzieren als weibliche Ratten, wurde erneut bei Inkubation von 50  $\mu\text{M}$  Hexahydro-CUR mit Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten beobachtet (Abb. 22, unten): Während über 95% von Hexahydro-CUR als Konjugate in der weiblichen Rattenleber vorlagen, waren es beim männlichen Tier nur noch 57%. Hinweise auf oxidative Hexahydro-CUR-Metaboliten gab es nicht. Die Wiederfindungen von Muttersubstanz und Metaboliten betrug nahezu 100%.

Der Vergleich des Metabolismus von Tetrahydro-CUR und Hexahydro-CUR (Abb. 22) verdeutlicht, dass Tetrahydro-CUR von der männlichen und weiblichen Rattenleber sehr effizient zu Hexahydro-CUR reduziert wurde. Die weitere Reduktion zu Octahydro-CUR war bei beiden Geschlechtern weniger wirkungsvoll; dies betraf besonders die weibliche Ratte. Die Glucuronidierung wurde gegenüber der Sulfatierung bei der Konjugation der reduktiven Metaboliten bevorzugt. Es gab zudem Hinweise auf die Bildung von Sulfolglucuroniden von Hexahydro-CUR: Die Summe an freiwerdendem Hexahydro-CUR nach separater Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase war immer kleiner als die Menge an freigesetztem Hexahydro-CUR nach simultaner Spaltung mit beiden Enzymen.

#### 3.3.7 Metabolisierung synthetischer CUR-Derivate

Parallel zu den Experimenten mit CUR wurden die synthetischen CUR-Derivate Dimethyl-CUR (200  $\mu\text{M}$ ) und Iso-CUR (200  $\mu\text{M}$ ) mit Leberschnitten einer männlichen und einer weiblichen Sprague-Dawley-Ratte für 24 h inkubiert und das Medium mittels HPLC/DAD analysiert. Die enzymatische Hydrolyse erfolgte separat mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase (Kap. 6.2.5.3, Methode II).

**Dimethyl-CUR** Bei Dimethyl-CUR sind die beiden phenolischen Hydroxylgruppen von CUR methyliert (Abb. 14). Dimethyl-CUR wurde von der männlichen und weiblichen Rattenleber metabolisiert, im Vergleich zu CUR allerdings mit deutlich geringeren Umsatzraten (Tab. 6). Als Referenzsubstanzen standen Hexahydro- und Octahydro-dimethyl-CUR zur Verfügung.

Nur diese beiden Produkte wurden als Phase I-Metaboliten von Dimethyl-CUR nachgewiesen. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich ihrer HPLC- und GC-Retentionszeiten sowie der UV/Vis- und GC-Massenspektren (s. Anhang A.3.2, Tab. 21) mit denen der Referenzsubstanzen. Die Menge des Octahydro-Metaboliten (6-9%) überwog die des Hexahydro-dimethyl-CUR (3-4%) um ca. das Doppelte. Diese beiden reduktiven Metaboliten waren ausschließlich als Glucuronide nachweisbar. Ebenso war Dimethyl-CUR selbst in beträchtlichem Ausmaß (10-21%) glucuronidiert. Interessanterweise handelt es sich bei den Glucuroniden von Dimethyl-CUR und den resultierenden reduktiven Metaboliten nicht um phenolische Glucuronide, da ausschließlich die OH-Gruppe der aliphatischen Kette für eine Konjugation zur Verfügung steht. Hinweise auf oxidative Demethylierungs- sowie Hydroxylierungsprodukte der Muttersubstanz und der reduktiven Metaboliten gab es nicht. Es wurden ca. 61% der eingesetzten Substanz in unveränderter Form und in Form von Metaboliten wiedergefunden.

**Tabelle 6:** Umsätze von CUR (n=2), Tetrahydro- (n=1), Hexahydro- (n=1), Dimethyl- (n=1) und Iso-CUR (n=1) nach 24 h-Inkubation mit Leberschnitten männlicher und weiblicher Ratten und Konjugathydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase (Kap. 6.2.5.3, Methode II). Die Umsätze sind in Prozent der gesamten wiedergefundenen Substanz (Muttersubstanz + Metabolite) angegeben und repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Spannweite einer Doppelbestimmung aus drei unabhängig inkubierten Schnitten pro Ratte. Die Substratkonzentrationen betragen 200  $\mu$ M für CUR, Tetrahydro-, Dimethyl- und Iso-CUR und 50  $\mu$ M für Hexahydro-CUR. n, Anzahl der Tiere pro Geschlecht; n.n., nicht nachweisbar.

Curcuminoid	Umsatz in %	
	männliche Ratte	weibliche Ratte
CUR	73,8 $\pm$ 5,7	49,3 $\pm$ 14,0
Tetrahydro-CUR	95,6 $\pm$ 0,5	94,1 $\pm$ 1,4
Hexahydro-CUR	100	100
Dimethyl-CUR	19,2 $\pm$ 6,0	33,5 $\pm$ 1,9
Iso-CUR	n.n.	n.n.

**Iso-CUR** Iso-CUR unterscheidet sich von CUR dadurch, dass die Hydroxy- und Methoxygruppen an beiden Aromaten vertauscht sind (Abb. 14). Im Unterschied zu CUR, das von der männlichen und weiblichen Rattenleber stark metabolisiert wurde, fand unter gleichen Bedingungen keine Metabolisierung von Iso-CUR statt: Es waren keine reduktiven oder oxidativen Phase I-Metaboliten und keine Glucuronide oder Sulfate von Iso-CUR selbst nachweisbar. Das synthetische Derivat war in den 24 h-Inkubationen mit Gewebeschnitt sowie in den Kontrollen ohne Gewebeschnitt deutlich stabiler als CUR. Die Wiederfindungen für Iso-CUR nach Inkubation in Anwesenheit eines Gewebeschnitts lagen bei ca. 72% im Vergleich zu ca. 50% für CUR. Iso-CUR erwies sich damit als ähnlich stabil wie Bisdemethoxy-CUR (vgl. Tab. 5), welches das Stabilste der drei Curcuminoiden darstellt. Bei der Untersuchung

der HPLC-Chromatogramme auf potentielle Abbauprodukte von Iso-CUR analog zum CUR-Zerfall, waren keine solchen Produkte nachweisbar, vermutlich aufgrund der höheren Stabilität von Iso-CUR.

## 3.4 Metabolismusstudien mit Zellfraktionen und Zellen

### 3.4.1 Oxidativer Metabolismus

Ein gängiges Modellsystem für die Untersuchung des oxidativen Metabolismus *in vitro*, stellen Mikrosomen dar, in denen das für den Fremdstoffmetabolismus wichtige CYP-abhängige Monooxygenase-System lokalisiert ist. Da keine aromatischen Hydroxylierungs- und Demethylierungsprodukte im Curcuminoid-Metabolismus in Leberschnitten beobachtet wurden (Kap. 3.3.2), wurde zusätzlich mit Lebermikrosomen von unbehandelten und Aroclor-behandelten Ratten überprüft, ob die Rattenleber die Fähigkeit besitzt oxidative Curcuminoid-Metaboliten zu bilden. Die Umsetzungen (Tab. 7) wurden mit einem Curcuminoid-Gemisch in Anwesenheit eines NADPH-generierenden Systems, wie unter 6.2.6.1 beschrieben, durchgeführt.

Neben den unveränderten Curcuminoiden wurden nur Spuren der reduktiven Metaboliten, hauptsächlich Hexahydro-Curcuminoiden, beim Einsatz nicht-induzierter sowie Aroclor-induzierter Rattenlebermikrosomen im Extrakt mittels HPLC/DAD nachgewiesen. Die Nachweisgrenze für oxidative Curcuminoid-Metaboliten lag bei 0,01% der eingesetzten Curcuminoiden.

Zusätzlich wurde der oxidative Metabolismus des reduktiven CUR-Hauptmetaboliten Hexahydro-CUR mit Lebermikrosomen von Sprague-Dawley- und Wistar-Ratten untersucht (Tab. 7). Da im Hexahydro-CUR-Molekül die Doppelbindungen in der aliphatischen Kette vollständig entfernt wurden (Abb. 4), besteht die Möglichkeit aliphatischer Hydroxylierungen an der Kette. Bei Verwendung nicht-induzierter Rattenlebermikrosomen von Sprague-Dawley-Ratten waren keine solchen oxidativen Produkte von Hexahydro-CUR nachweisbar (Nachweisgrenze 0,05% des eingesetzten Hexahydro-CUR). Auch die Reduktion von Hexahydro-CUR zu Octahydro-CUR, die nach Ireson et al. [2002] mit Mikrosomen/NADPH möglich ist, konnte mit Mikrosomen von Sprague-Dawley-Ratten nicht beobachtet werden, jedoch mit Mikrosomen von Wistar-Ratten. Die beiden Isomere von Octahydro-CUR waren mit nicht-induzierten sowie mit Aroclor-induzierten Mikrosomen von Wistar-Ratten nachweisbar. Zusätzlich wurden mehrere kleine Peaks, die kürzere Retentionszeiten und ähnliche Peakmuster wie die beiden Octahydro-Isomere aufwiesen und die in den Kontrollen nicht vorhanden waren, detektiert. Das Elutionsverhalten läßt darauf schließen, dass es sich bei diesen Produkten eher um oxidative Metaboliten der Octahydro-CUR-Isomere als von Hexahydro-CUR handelt.



Um sicherzustellen, dass in den Mikrosomen Monooxygenase-Aktivität vorhanden war, wurden Inkubationen mit Testosteron durchgeführt, die das erwartete Spektrum an oxidativen Metaboliten lieferten [Pfeiffer und Metzler, 2004]. Curcuminoide und vermutlich auch der reduktive Metabolit Hexahydro-CUR stellen damit keine Substrate dieser Monooxygenasen dar. Das Ausmaß der nebenbei beobachteten Reduktion von Hexahydro-CUR zu Octahydro-CUR hängt zudem vom verwendeten Rattenstamm ab.

**Tabelle 7:** Untersuchungen zum Phase I-Metabolismus mit Mikrosomen und Cytosol aus Lebern männlicher Sprague-Dawley- (SD) und Wistar-Ratten (W), mit Cytosol aus humaner Leber und mit Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber. Experimentelle Details siehe Kapitel 6.2.6.1 und 6.2.6.2. <sup>a</sup> CYP-Gehalt 0,84 nmol/mg mikrosomales Protein; <sup>b</sup> NADPH-generierendes System; <sup>c</sup> bestehend aus 75% CUR, 18% Demethoxy-CUR und 7% Bisdemethoxy-CUR; <sup>d</sup> CYP-Gehalt 0,57 nmol/mg mikrosomales Protein; <sup>e</sup> CYP-Gehalt 1,63 nmol/mg mikrosomales Protein; nicht-ind., nicht-induziert; ind., Aroclor-induziert.

Testsystem	Substrat	Ergebnisse aus HPLC/DAD-Analyse
Mikrosomen(SD), nicht-ind. <sup>a</sup> /NADPH <sup>b</sup>	Curcuminoid-Gemisch <sup>c</sup>	Curcuminoide, keine oxidativen Metaboliten, Spuren von Hexahydro-Curcuminoiden
	Hexahydro-CUR	Hexahydro-CUR, keine oxidativen und reduktiven Metaboliten
Mikrosomen(W), nicht-ind. <sup>d</sup> /NADPH <sup>b</sup>	Hexahydro-CUR	Hexahydro-CUR, Octahydro-CUR und kleine unbekannte Metabolitenpeaks
Mikrosomen(W), ind. <sup>e</sup> /NADPH <sup>b</sup>	Curcuminoid-Gemisch <sup>c</sup>	Curcuminoide, keine oxidativen Metaboliten, Spuren von Hexahydro-Curcuminoiden
	Hexahydro-CUR	Hexahydro-CUR, Octahydro-CUR und kleine unbekannte Metabolitenpeaks
Alkoholdehydrogenase/ NADH	Curcuminoid-Gemisch <sup>c</sup>	Reduktive Curcuminoid-Metaboliten (Hexahydro > Tetrahydro $\cong$ Octahydro >> Dihydro-1 und Dihydro-2)
Ratten-Cytosol(SD)/ NADH	Curcuminoid-Gemisch <sup>c</sup>	Reduktive Curcuminoid-Metaboliten (Hexahydro > Tetrahydro $\cong$ Octahydro >> Dihydro-1 und Dihydro-2)
	CUR	Reduktive CUR-Metaboliten (Hexahydro > Tetrahydro)
	Iso-CUR	Reduktive Iso-CUR-Metaboliten (Hexahydro > Tetrahydro)
Human-Cytosol/ NADH	Curcuminoid-Gemisch <sup>c</sup>	Reduktive Curcuminoid-Metaboliten (Hexahydro > Tetrahydro $\cong$ Octahydro >> Dihydro-1 und Dihydro-2)
	Tetrahydro-CUR	Reduktive Metaboliten (Hexahydro > Octahydro)
	Hexahydro-CUR	Reduktiver Metabolit Octahydro-CUR

### 3.4.2 Reduktiver Metabolismus

Reduktionsreaktionen werden v.a. von cytosolischen Enzymen katalysiert. Die *in vitro*-Experimente zum reduktiven Curcuminoid-Metabolismus sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Die Curcuminoiden wurden mit Ratten- und humanem Lebercytosol bzw. isolierter Alkoholdehydrogenase (aus Pferdeleber) in Gegenwart von NADH, wie in Kapitel 6.2.6.2 beschrieben, inkubiert und mittels HPLC/DAD analysiert. Das gesamte Spektrum an reduktiven Phase I-Metaboliten, die in den Leberschnitten gebildet wurden (Kap. 3.3), wurde in allen Umsetzungen beobachtet. Die dominierenden Metaboliten waren die Hexahydro-Produkte.

Entsprechende Umsetzungen von reinem CUR und synthetischem Iso-CUR mit Rattenlebercytosol ergaben für Iso-CUR ein analoges Muster an reduktiven Metaboliten wie für CUR. In Inkubationen der reduktiven Metaboliten Tetrahydro-CUR und Hexahydro-CUR mit humanem Cytosol wurden beachtliche Mengen Octahydro-CUR gebildet.

CUR kann durch lösliche Enzyme des Cytosols offensichtlich vollständig bis zum Octahydro-CUR reduziert werden. Da die mikrosomalen Enzyme von Sprague-Dawley-Ratten im Gegensatz zu Wistar-Ratten keine reduktiven Aktivitäten besaßen (Kap. 3.4.1), deutet dies darauf hin, dass der cytosolischen Reduktion eine größere Bedeutung im Curcuminoid-Metabolismus zukommt, als der durch Mikrosomen vermittelten.

### 3.4.3 Sulfatierung

Die Konjugation mit Sulfat ist neben der Glucuronidierung (s. Kap. 3.5) eine weitere Phase II-Reaktion, die von löslichen Sulfotransferasen katalysiert wird. Da in den Leberschnitten Sulfate von CUR und Hexahydro-CUR beobachtet wurden (Kap. 3.3.6), wurde die Sulfatierung dieser beiden Substrate mit Cytosol aus Rattenleber und aktiviertem Sulfat (PAPS) *in vitro* verfolgt. Um die starke Dissoziation der Sulfat-Gruppe bei der HPLC/DAD-Analyse zurückzudrängen, enthielt der Eluent zur Erfassung der Sulfate ein Ionenpaar-Reagenz.

Die Sulfatierung von Hexahydro-CUR wurde nach Hydrolyse mit Sulfatase durch Zunahme bzw. Wiederauftreten des Hexahydro-CUR-Peaks in den HPLC-Chromatogrammen nachgewiesen. Die eindeutige Zuordnung des Hexahydro-CUR-Sulfat-Peaks vor der enzymatischen Spaltung war nicht möglich, da dieser Peak vermutlich mit anderen Komponenten der injizierten Probelösung coeluierte. Ein CUR-Sulfat war vor und nach enzymatischer Hydrolyse unter vergleichbaren Bedingungen nicht detektierbar.

Die Sulfotransferase-Aktivität des Cytosols wurde durch Inkubation mit 4-Methylumbelliferon, dessen Sulfat als Referenzsubstanz zur Verfügung stand, nachgewiesen. Zusätzlich wurde mit Hilfe des 4-Methylumbelliferon-Sulfats die Aktivität der Sulfatase sichergestellt. Der reduktive Metabolit Hexahydro-CUR scheint ein besseres Substrat für die Sulfatierung *in vitro* darzustellen als die Muttersubstanz.

#### 3.4.4 Intestinaler Phase I-Metabolismus

Obwohl die Leber als wichtigstes metabolisches Organ angesehen wird, ist insbesondere für viele Pflanzeninhaltsstoffe bekannt, dass die Metabolisierung im Gastrointestinaltrakt eine bedeutende Rolle spielt [Chen et al., 2003, 2005a]. Aus diesem Grund wurde der Phase I-Metabolismus von CUR mit S9-Fraktion (enthält cytosolisches und mikrosomales Protein) aus dem Darm männlicher Sprague-Dawley-Ratten im Vergleich zur Leber untersucht.

Nach Inkubation von CUR mit dieser Zellfraktion in Anwesenheit von NADH, wurde das komplette Spektrum an reduktiven CUR-Metaboliten erhalten. Die CUR-reduzierende Fähigkeit intestinaler Enzyme war im Vergleich zur hepatischen Reduktion um Faktor 2,5 geringer. Dieser Effekt wurde zusätzlich anhand des Metabolitenspektrums deutlich. Im Darm stellten Tetrahydro-CUR und Hexahydro-CUR die dominanten Metaboliten dar (50% bzw. 38% aller Metaboliten), während in der Leber unter gleichen Bedingungen Hexahydro-CUR eindeutig das Hauptprodukt (69% aller Metaboliten) war.

Bei Einsatz von NADPH-generierendem System anstelle von NADH wurden ebenfalls nur die reduktiven Metaboliten beobachtet. Oxidative Metaboliten von CUR und seinen reduktiven Produkten waren auch im Darm nicht nachweisbar.

#### 3.4.5 Untersuchungen in Zellkultur

Bei der Inkubation verschiedener Curcuminoid-Derivate mit menschlichen Endometrium-Karzinomzellen (Ishikawa-Zellen) wurden, neben dem stabilisierenden Effekt der Zellen, der bereits in Kapitel 3.2.2 Erwähnung fand, reduktive Metaboliten im Inkubationsmedium nach 21 h-Inkubation mittels HPLC/DAD-Analyse nachgewiesen. Die Substanzinkubationen (20  $\mu$ M) fanden dabei unter nicht zytotoxischen Bedingungen statt. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte durch Vergleich der HPLC- und GC-Retentionszeiten, der UV/Vis-Spektren und nach Fraktionierung der Metabolitenpeaks an der HPLC und anschließender GC/MS-Analyse der Trimethylsilylether mit Referenzsubstanzen. Einen qualitativen Überblick über die von den Zellen gebildeten Metaboliten gibt Tabelle 8.

Insbesondere der stabile Metabolit Tetrahydro-CUR wurde schnell zu Hexahydro-CUR reduziert. Bereits nach 2-stündiger Inkubation waren 27% metabolisiert und nach 21 h waren nur noch 12% in unveränderter Form vorhanden. Hingegen verlief die Reduktion von Hexahydro-CUR zu Octahydro-CUR deutlich ineffizienter. Hier wurden erst nach 21 h signifikante Mengen (16%) Octahydro-CUR detektiert.

Humane Zellen waren damit in der Lage die Testsubstanzen aufzunehmen, zu metabolisieren und die reduktiven Metaboliten anschließend aus der Zelle zu schleusen. Die Reduktion erfolgte dabei vermutlich durch zelleigene unspezifische Reduktasen.

**Tabelle 8:** Qualitatives Spektrum reduktiver Metaboliten im Medium nach Inkubation von Ishikawa-Zellen mit CUR, Demethoxy-, Bisdemethoxy-, Iso-, Tetrahydro- und Hexahydro-CUR für 21 h bei 37°C. entf., entfällt.

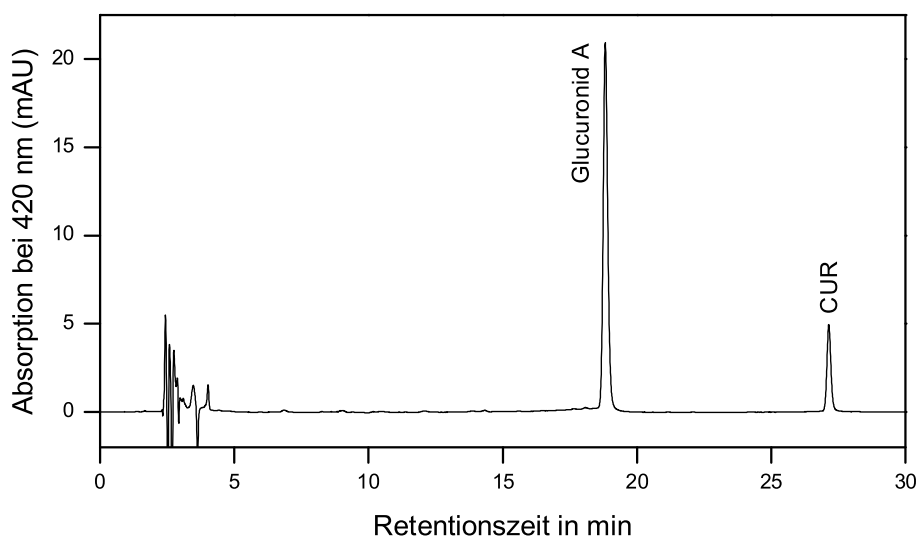
Substrat	Metabolit		
	Tetrahydro-	Hexahydro-	Octahydro-
CUR	+	++	+
Demethoxy-CUR	+	++	+
Bisdemethoxy-CUR	+	++	+
Iso-CUR	–	++	+
Tetrahydro-CUR	entf.	++	+
Hexahydro-CUR	entf.	entf.	+

### 3.5 Mikrosomale Glucuronidierung

Die Metabolismusuntersuchungen mit CUR und seinen reduktiven Metaboliten in Präzisions-Leberschnitten von Sprague-Dawley-Ratten (Kap. 3.3) wiesen darauf hin, dass CUR und insbesondere seine reduktiven Metaboliten offensichtlich gute Substrate für UDP-Glucuronyltransferasen darstellen und damit ihre Glucuronidierung eine zentrale Rolle im Metabolismus spielt. Die *in vitro*-Glucuronidierung von CUR wurde deshalb mit verschiedenen Mikrosomen, wie unter 6.2.7.1 beschrieben, detaillierter untersucht (Tab. 9).

#### 3.5.1 Umsetzung von CUR mit Rattenlebermikrosomen

Bei der Glucuronidierung von CUR mit hepatischen Rattenmikrosomen in Anwesenheit von UDPGA wurden die Proteine nach der Inkubation mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und der Überstand nach Neutralisation ohne Extraktion mittels HPLC/DAD analysiert, um Glucuronid-Verluste zu vermeiden. Im HPLC-Chromatogramm tauchte bei einer Detektionswellenlänge von 420 nm ein neues Produkt (Absorptionsmaximum bei 423 nm) mit kürzerer Retentionszeit (18,8 min) als CUR auf, welches nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* verschwand und vermutlich das CUR-Glucuronid A repräsentierte (Abb. 23). Jedoch war die Fläche des CUR-Peaks nach Hydrolyse kleiner als die Fläche der Summe des CUR-Peaks und des Glucuronid-Peaks vor der Hydrolyse. Diese Beobachtung untermauerte die in den Leberschnitten aufgezeigten Diskrepanzen für die Gehalte an CUR-Konjugaten in Abhängigkeit der verwendeten enzymatischen Hydrolysemethode (Kap. 3.3.5 und 3.3.6) und ist vermutlich der Instabilität des freiwerdenden CUR zuzuschreiben. Eine eindeutige Identifizierung des CUR-Glucuronids wurde mittels LC/MS/MS erreicht (s. Kap. 3.5.8).

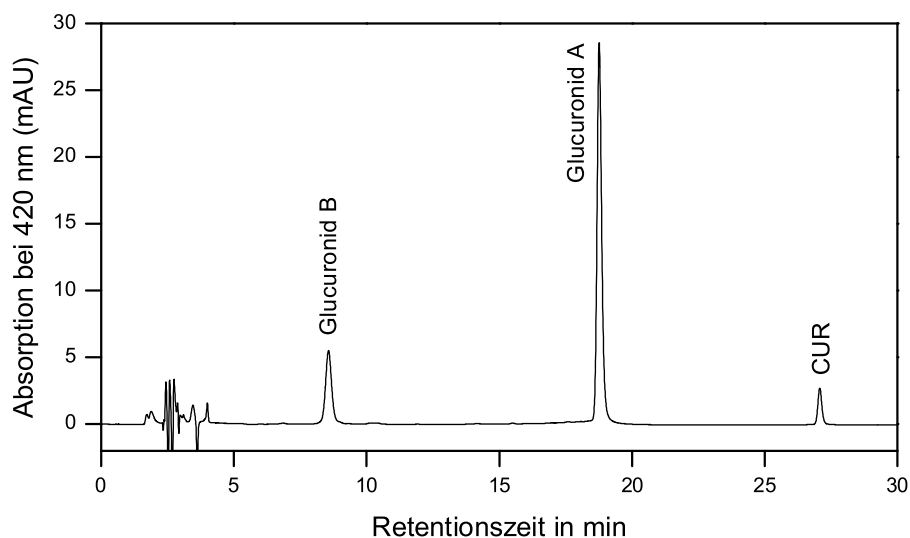


**Abbildung 23:** Repräsentatives HPLC-Profil des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubation von CUR (100  $\mu$ M) mit Rattenlebermikrosomen/UDPGA. HPLC-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.2 (Gradient 1).

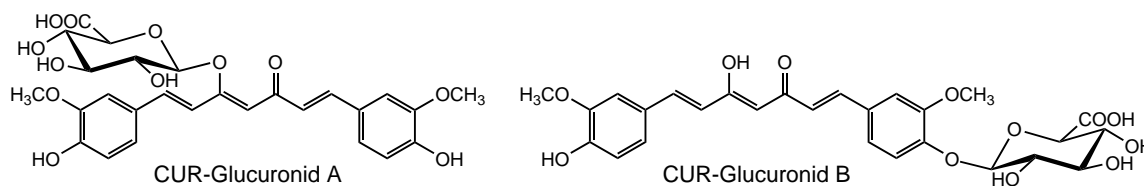
### 3.5.2 Umsetzung von CUR mit humanen Lebermikrosomen

Wurde die Glucuronidierung von CUR nicht mit Rattenlebermikrosomen sondern mit humanen Lebermikrosomen und anschließender HPLC/DAD-Analyse des Überstandes nach Proteinfällung mit TCA und Neutralisation durchgeführt, war in den HPLC-Chromatogrammen neben dem in der Rattenleber identifizierten CUR-Glucuronid A-Peak ein weiterer kleinerer Peak B mit kürzerer Retentionszeit (8,8 min) bei 420 nm (Absorptionsmaximum bei 418 nm) sichtbar (Abb. 24).

Durch Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* wurde dieser Peak vorläufig als weiteres CUR-Glucuronid B angesehen. Die Bildung von zwei verschiedenen Monoglucuroniden aus CUR ist aufgrund der chemischen Struktur möglich: Die Konjugation der aromatischen Hydroxylgruppen führt jeweils zu einem identischen phenolischen Glucuronid, die der enolischen Hydroxylgruppe hingegen zu einem aliphatischen Glucuronid (Abb. 25). Da die kurze Elutionszeit des CUR-Glucuronid B im Vergleich zum CUR-Glucuronid A die hohe Polarität dieses Konjugats charakterisiert, lag die Vermutung nahe, dass es sich um ein Diglucuronid handelte, welches unter den *in vitro*-Bedingungen entstanden war. Diese Möglichkeit wurde jedoch durch eine spätere LC/MS/MS-Analyse nicht bestätigt (s. Kap. 3.5.8).



**Abbildung 24:** Repräsentatives HPLC-Profil des wässrigen Überstandes nach Proteinpräzipitation mit TCA und Neutralisation einer Inkubation von CUR (100  $\mu\text{M}$ ) mit humanen Lebermikrosomen/UDPGA. HPLC-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.2 (Gradient 1).



**Abbildung 25:** Chemische Struktur der CUR-Glucuronide A (links) und B (rechts).

### 3.5.3 Glucuronidierung reduktiver CUR-Metaboliten

Um neben der Glucuronidierung von CUR die Konjugation der reduktiven Metaboliten zu berücksichtigen, wurden diese *in situ* durch simultane Inkubation von CUR mit Cytosol/NADH und Mikrosomen/UDPGA erzeugt. Auf diese Weise wurde das dominante CUR-Glucuronid A gemeinsam mit geringen Mengen unkonjugierter reduktiver CUR-Metaboliten im neutralisierten Überstand nach Proteinfällung und vor enzymatischer Hydrolyse mittels HPLC/DAD detektiert. In den Kontroll-Inkubationen ohne UDPGA wurden die reduktiven CUR-Metaboliten Tetrahydro-, Hexahydro- und Octahydro-CUR in deutlichen Mengen nachgewiesen. Nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* war der CUR-Glucuronid-Peak verschwunden und die Peaks der reduktiven Metaboliten hatten deutlich zugenommen. Es wird angenommen, dass die Glucuronide der reduktiven Metaboliten aufgrund ihrer hohen Polarität unter den verwendeten HPLC-Bedingungen (Kap. 6.2.1.2, Gradient 1) mit der Lösungsmittelfront eluierten.

In diesem Testsystem zeichnete sich, gleichfalls wie in den Leberschnitten, eine effiziente Glucuronidierung der reduktiven CUR-Metaboliten ab. Umsetzungen mit hepatischen Ratten- und Human-Mikrosomen lieferten hierbei für die reduktiven CUR-Metaboliten qualitativ das gleiche Glucuronidierungsprofil (Tab. 9).

**Tabelle 9:** Untersuchungen zur Glucuronidierung von CUR mit hepatischen Mikrosomen und Cytosol von Ratte (RLM, RLC) und Mensch (HLM, HLC) sowie mit intestinaler S9-Fraktion der Ratte (RI-S9). Experimentelle Details siehe Kapitel 6.2.7.1-6.2.7.3.

Testsystem	Aufarbeitung	Ergebnisse aus HPLC/DAD-Analyse
RLM/UDPGA	Proteinfällung	CUR-Peak und CUR-Glucuronid A-Peak
	Proteinfällung und Konjugathydrolyse	CUR-Peak mit geringerer Fläche als die Summe aus CUR-Peak und CUR-Glucuronid A-Peak
HLM/UDPGA	Proteinfällung	CUR-Peak und CUR-Glucuronid A- und B-Peak
	Proteinfällung und Konjugathydrolyse	CUR-Peak mit geringerer Fläche als die Summe aus CUR-Peak, CUR-Glucuronid A- und B-Peak
RLC/NADH + RLM/UDPGA	Proteinfällung	CUR-Peak und CUR-Glucuronid A-Peak; kleiner Peak von unkonjugiertem Hexahydro-CUR
	Proteinfällung und Konjugathydrolyse	CUR-Peak und Peaks von Hexahydro-, Tetrahydro- und Octahydro-CUR
HLC/NADH + HLM/UDPGA	Proteinfällung	CUR-Peak und CUR-Glucuronid A- und B-Peak; kleiner Peak von unkonjugiertem Hexahydro-CUR
	Proteinfällung und Konjugathydrolyse	CUR-Peak und Peaks von Hexahydro-, Tetrahydro- und Octahydro-CUR
RI-S9/UDPGA	Proteinfällung	CUR-Peak und CUR-Glucuronid A-Peak; Umsatz im Vergleich zur Leber ähnlich
	Proteinfällung und Konjugathydrolyse	CUR-Peak mit geringerer Fläche als die Summe aus CUR-Peak und CUR-Glucuronid A-Peak

### 3.5.4 Intestinale Glucuronidierung

Neben der hepatischen CUR-Glucuronidierung wurden Inkubationen mit CUR und S9-Fraktion (enthält mikrosomales und cytosolisches Protein) aus dem Dünndarm von Ratten in Gegenwart von UDPGA, wie unter 6.2.7.3 beschrieben, durchgeführt und nach Proteinfällung mit TCA mittels HPLC/DAD analysiert. Um einen Vergleich mit der hepatischen Glucuronidierung zu ermöglichen, wurde die Glucuronidierungsreaktion auf gleiche Weise mit S9-Fraktion aus Rattenleber durchgeführt.

Unter den Versuchsbedingungen wurde im Darm und in der Leber ausschließlich das CUR-Glucuronid A gebildet (Tab. 9). Das Ausmaß der CUR-Glucuronidierung war im Darm ähnlich hoch wie in der Leber. Wurden beispielsweise 100  $\mu\text{M}$  CUR eingesetzt, waren im Darm 54% des detektierten CUR glucuronidiert, in der Leber lagen 58% als CUR-Glucuronid vor.

Da bereits eine intestinale Reduktion von CUR mit Darmgewebe von Ratten festgestellt wurde (Kap. 3.4.4), wurde zusätzlich der reduktive Hauptmetabolit Hexahydro-CUR eingesetzt. Die intestinalen Glucuronyltransferasen zeigten auch gegenüber Hexahydro-CUR Aktivität. Diese Beobachtungen liefern Hinweise, dass oral aufgenommenes CUR bereits im Darm ohne oder nach vorausgehender Reduktion effizient glucuronidiert werden kann.

#### 3.5.5 Etablierung geeigneter Bedingungen für CUR und CUR-Glucuronide

Der Nachweis der CUR-Glucuronide erfolgte aus dem wässrigen Überstand des Inkubationsansatzes nach vorangehender Proteinpräzipitation mit 20%iger wässriger TCA und anschließender Rückneutralisation (pH 6-7) mit 1 M wässriger NaOH (s. Kap. 6.2.7.1). Diese konventionelle Methode findet häufig Anwendung, um störende Proteine zu entfernen und saure Hydrolysereaktionen der Glucuronide zu vermeiden.

Die quantitative Betrachtung des Überstandes nach HPLC/DAD-Analyse verdeutlichte jedoch, dass mit der Proteinfällung mit TCA enorme Substanzverluste einhergingen: Nach Proteinfällung wurden nur ca. 20% der eingesetzten Substanz in Form von CUR und CUR-Glucuroniden mittels HPLC/DAD detektiert, d.h. der Hauptteil der Substanz wurde nicht erfasst. Wurde hingegen auf den Einsatz von TCA verzichtet und der Überstand nach Zentrifugation analysiert, war die Wiederfindung von CUR und CUR-Glucuroniden deutlich höher (65-95%).

Der Substanzverlust im Überstand konnte zusätzlich anhand der starken Gelbfärbung der ausgefällten Proteine verfolgt werden. Um nicht-kovalent anhaftendes CUR zu entfernen, wurde das Protein-Pellet mit Ethylacetat extrahiert. Neben CUR wurden im Extrakt des Niederschlages geringe Mengen CUR-Glucuronid A ( $\leq 10\%$  der gesamten wiedergefundenen Substanz in Lösung und Niederschlag) nachgewiesen. Eine vollständige Entfärbung des Pellets wurde nicht erreicht. Eine starke, eventuell kovalente Interaktion von CUR oder seines Glucuronids mit den mikrosomalen Proteinen [Barik et al., 2003; Oetari et al., 1996; Tønnesen, 1992] oder eine Einlagerung von CUR in die ER-Membran [Jaruga et al., 1998a,b] liefern eine mögliche Erklärung für die nicht erfasste Substanz.

Wurde der Überstand ohne (pH 7,4) oder nach Zusatz von TCA/NaOH (pH 6-7) mit Ethylacetat extrahiert fiel auf, dass neben CUR außergewöhnliche Mengen CUR-Glucuronid A im Extrakt mittels HPLC/DAD nachgewiesen wurden. Der überwiegende Teil des Konjugats war erwartungsgemäß hydrophil und wurde in der zurückbleibenden gelben wässrigen Lösung detektiert. Der ungewöhnlich „lipophile“ Charakter des CUR-Glucuronid A und die daraus resultierende Extrahierbarkeit des Glucuronids wurde durch Änderung der Aufarbeitung beeinflusst. Wurde nach Zugabe von TCA auf eine Neutralisation mit NaOH verzichtet und direkt aus saurer Lösung (pH 2-3) extrahiert, zeigte sich, dass der extrahierbare Anteil des



CUR-Glucuronids erhöht, aber nicht vollständig war. Zur Schaffung eines gepufferten sauren Milieus mit definiertem pH-Wert wurde in Anlehnung an Matern et al. [1994] die TCA-Fällung durch die Verwendung von Glycin-HCl-Puffer ersetzt. Die Funktionsfähigkeit dieses Systems wurde anhand der Glucuronidierung von Testosteron überprüft, für dessen Glucuronid eine vollständige Extrahierbarkeit unter diesen Bedingungen beschrieben ist [Matern et al., 1994]. Als optimal für die vollständige Extraktion von CUR-Glucuronid A erwies sich ein pH-Wert des Ansatzes von 1,8. Im Gegensatz dazu verblieb das polare CUR-Glucuronid B vollständig im Wasser. Durch Verwendung des Glycin-HCl-Puffers wurden die durch TCA-Fällung hervorgerufenen Substanzverluste zudem verringert. Die vollständige Extrahierbarkeit des CUR-Glucuronid A unter diesen Bedingungen bot mehrere Vorteile: Die HPLC-Analyse konnte aus methanolischer Lösung erfolgen, was insbesondere von Nutzen war, wenn hohe Proteinkonzentrationen verwendet werden mussten und es war eine Stabilisierung und Aufkonzentrierung des CUR-Glucuronid A möglich (s. Kap. 3.8). Zudem konnten durch Einsatz des Porenbildners Alamethicin die Proteinkonzentrationen verringert und die Glucuronidausbeuten gesteigert werden.

### 3.5.6 Spezies- und gewebespezifische CUR-Glucuronidierung

Die *in vitro*-Glucuronidierung von CUR wurde mit Mikrosomen aus Leber-, Darm- und Nierengewebe von männlichen Ratten sowie mit humanen hepatischen und intestinalen Mikrosomen untersucht (Tab. 10). Um die beiden CUR-Glucuronide A und B simultan zu erfassen, erfolgte die HPLC/DAD-Analyse ohne Extraktion und ohne Ansäuern aus dem Überstand nach Zentrifugation (s. Kap. 6.2.7.4).

**Tabelle 10:** Bildung der CUR-Glucuronide A und B in verschiedenen Geweben von Ratte und Mensch. Der Nachweis erfolgte im wässrigen Überstand nach Zentrifugation. +++,  $\geq 50\%$ ; ++,  $\leq 50\%$ ; +,  $\leq 25\%$  bezogen auf beide Glucuronide; ( ), Bildung des Glucuronids von den Versuchsbedingungen abhängig.

Spezies	Gewebe	CUR-Glucuronid A	CUR-Glucuronid B
Ratte	Leber, nicht-induziert	+++	(+)
	Leber, Aroclor-induziert	+++	+
	Darm	+++	–
	Niere	+++	–
Mensch	Leber	+++	++
	Darm	+++	–

Neben der Leber war auch in der Niere und im Darm eine Glucuronidierung von CUR möglich. Das Hauptprodukt war bei allen getesteten Mikrosomen das „lipophile“ CUR-Glucuronid A.

Die größten Mengen an polarem Glucuronid B wurden mit humanen Lebermikrosomen beobachtet. Im Vergleich dazu waren Rattennierenmikrosomen unter gleichen Bedingungen nicht fähig dieses Glucuronid zu bilden. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass CUR ein Substrat verschiedener spezies- und gewebespezifischer UGT-Isoenzyme ist, die möglicherweise bevorzugt die Bildung des einen oder des anderen CUR-Glucuronids katalysieren.

### 3.5.7 Umsetzungen mit Curcuminoid-Derivaten

Zusätzlich zu CUR wurde die Glucuronidierung weiterer Curcuminoid-Derivate mit Rattenlebermikrosomen untersucht. Die Identifizierung der Glucuronide erfolgte durch Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase und anhand ihrer UV/Vis-Spektren (s. Anhang A.2.1) und Retentionszeiten in der HPLC (Tab. 3). In manchen Fällen wurde zusätzlich eine LC/MS/MS-Analyse durchgeführt (s. Kap. 3.5.8). Einen Überblick der getesteten Substanzen gibt Tabelle 11.

**Tabelle 11:** Glucuronide diverser Curcuminoid-Derivate nach Umsetzung mit Rattenlebermikrosomen und HPLC/DAD-Analyse der wässrigen Phase ggf. nach Zentrifugation. n.n., nicht nachweisbar (Nachweisgrenze 0,5 pmol Dimethyl-bisdemethoxy-CUR); ( ), Bildung des zweiten Glucuronids von den Versuchsbedingungen abhängig.

Glucuronide	Anzahl	Strukturelle Merkmale
CUR	1-(2)	unterschiedliche chemische Struktur A und B
Demethoxy-CUR	1-(2)	unterschiedliche chemische Struktur A und B
Bisdemethoxy-CUR	1-(2)	unterschiedliche chemische Struktur A und B
Dimethyl-CUR	1	enolische Struktur
Dimethyl-bisdemethoxy-CUR	n.n.	–
Iso-CUR	2	unterschiedliche chemische Struktur A und B
Hexahydro-CUR	1	phenolische oder aliphatische Struktur möglich
Hexahydro-bisdemethoxy-CUR	2	unterschiedliche chemische Struktur oder Isomere eines Glucuronids möglich
Hexahydro-dimethyl-CUR	2	aliphatische Struktur; Isomere
Hexahydro-iso-CUR	2	unterschiedliche chemische Struktur oder Isomere eines Glucuronids möglich
Tetrahydro-CUR	2	unterschiedliche chemische Struktur oder Dissoziationseffekt möglich

Da mit Ausnahme der synthetischen dimethylierten Derivate alle Substrate mehr als eine Hydroxylgruppe tragen, sind grundsätzlich mehrere Monoglucuronide eines Substrates möglich. Zwei Glucuronid-Peaks waren für alle möglichen Substrate bis auf Hexahydro-CUR in den HPLC-Chromatogrammen sichtbar. Eine Besonderheit stellte Hexahydro-dimethyl-CUR dar, das obwohl es nur eine aliphatische OH-Gruppe besitzt, zwei Glucuronide bildete. Dabei

handelt es sich vermutlich um zwei Isomere, die durch das asymmetrische C-Atom der aliphatischen Kette, welche die OH-Gruppe trägt und einem zusätzlichen Chiralitätszentrum in der Glucuronsäure zu erklären sind.

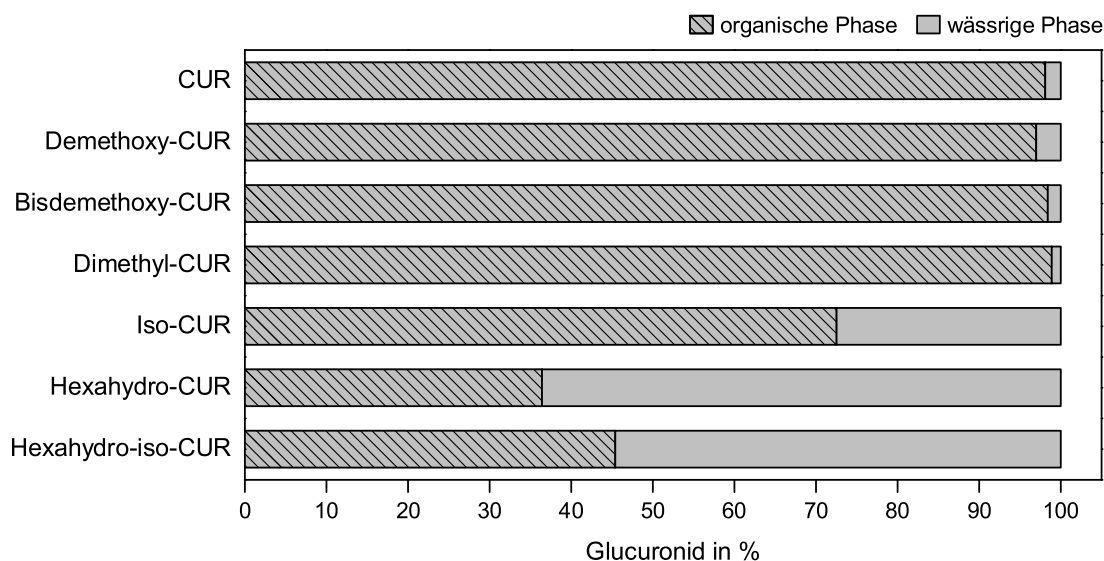
Das synthetisch hergestellte Dimethyl-bisdemethoxy-CUR wurde unter den gewählten Bedingungen nicht glucuronidiert. Dementsprechend war das synthetische Dimethyl-CUR ein sehr schlechtes UGT-Substrat. Das Dimethyl-CUR-Glucuronid stellt ein enolisches Glucuronid dar, da die beiden phenolischen Hydroxylgruppen in diesem synthetischen CUR-Derivat nicht vorhanden sind (Abb. 14). Im Gegensatz dazu wurde das synthetische Iso-CUR nur in etwas geringerem Umfang wie CUR konjugiert, wobei im Vergleich zu CUR mit Rattenlebermikrosomen stets das polarere Glucuronid neben dem dominanten Produkt nachgewiesen wurde.

Die beiden demethoxylierten Curcuminoide Demethoxy- und Bisdemethoxy-CUR wurden analog zu CUR umgesetzt, jedoch wies das Ausmaß der Glucuronidierung deutliche Unterschiede auf: CUR wurde am effizientesten glucuronidiert, Bisdemethoxy-CUR war das schlechteste Substrat.

Als sehr gute Substrate der Glucuronyltransferasen mit höheren Glucuronidierungsraten als CUR erwiesen sich die beiden reduktiven Metaboliten Tetrahydro- und Hexahydro-CUR. Dies ist mit den Beobachtungen in den Präzisions-Leberschnitten (Kap. 3.3) und im kombinierten Reduktions-Glucuronidierungs-Ansatz (Kap. 3.5.3) konform. Die Glucuronidierung von Tetrahydro-CUR war problematisch, da Tetrahydro-CUR in der HPLC mit UV-Detektion als unsymmetrischer Peak mit einer breiten Schulter und zwei Peakmaxima erfasst wurde. Aufgrund dieses Phänomens, das auch von Ireson et al. [2002] beobachtet wurde, war nicht auszuschließen, dass es sich bei den beiden Glucuronid-Peaks von Tetrahydro-CUR um das identische Glucuronid handelte.

Die in Tabelle 11 aufgeführten Curcuminoid-Derivate stellten ebenfalls Substrate humaner Glucuronyltransferasen dar. Im Unterschied zur Ratte bildeten die beiden Curcuminoide Demethoxy- und Bisdemethoxy-CUR, wie für CUR beschrieben (Kap. 3.5.2), mit humanen Lebermikrosomen immer ein zweites polares Glucuronid B. Für Iso-CUR wurde, ebenfalls analog zu CUR, nach saurer Extraktion ein wasserlösliches und ein extrahierbares Glucuronid nachgewiesen. Dimethyl-CUR wurde auch von humanen Glucuronyltransferasen am schlechtesten umgesetzt.

Das Verhalten einiger Curcuminoid-Glucuronide gegenüber der Extraktion mit Ethylacetat aus saurer Lösung nach Zugabe von Glycin-HCl-Puffer wurde getestet (Abb. 26). Die Glucuronide wurden dazu, wie in Kapitel 6.2.7.4 beschrieben, im modifizierten Glucuronidierungsassay hergestellt und die Extraktionsprozedur erfolgte wie unter 6.2.8.1 dargestellt.



**Abbildung 26:** Extrahierbarkeit verschiedener Curcuminoid-Glucuronide aus saurer Pufferlösung nach Behandlung mit Glycin-HCl-Puffer.

Bei den drei Curcuminoiden und Iso-CUR wurden ausschließlich jeweils die dominanten Glucuronide A betrachtet. Die beiden Glucuronid-Peaks von Hexahydro-iso-CUR wurden als Summe erfasst.

Die drei Curcuminoid-Glucuronide und das Dimethyl-CUR-Glucuronid waren nahezu ohne Verluste ( $\geq 97\%$ ) im organischen Extrakt nachweisbar. Die Glucuronsäure-Konjugation, deren Aufgabe darin besteht, Substanzen in wasserlösliche und ausscheidbare Produkte umzuwandeln, führte bei diesen Substraten hingegen zu lipophilen Konjugaten. Eine geringere Lipophilie wies das Glucuronid A von synthetischem Iso-CUR auf, von dem 28% nach Extraktion im Puffer zurückblieben. Im Gegensatz dazu war der Großteil der Glucuronide der Hexahydro-Metaboliten (55% bzw. 64%) nicht extrahierbar und damit hydrophiler.

Die Glucuronidierung von synthetischem Dimethyl-CUR zeigte, dass eine Konjugation der enolischen Hydroxylgruppe möglich ist. Da dieses synthetische Derivat sich bei Extraktion aus saurer Lösung wie die lipophilen Glucuronide der drei Curcuminoiden verhielt, läßt dies eine ähnliche chemische Struktur dieser Konjugate vermuten.

Wurden im Vergleich zu den Glucuroniden der Curcuminoid-Derivate die phenolischen Glucuronide der beiden Cumarine Umbelliferon und Scopoletin (Methoxygruppe in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe) unter den gleichen sauren Bedingungen extrahiert, befanden sich nur 29% des Umbelliferon-Glucuronids und 15% des Scopoletin-Glucuronids im Extrakt. Ebenso war das Glucuronid des CUR-Abbauproduktes Vanillin kaum extrahierbar.

Die Tatsache, dass die Glucuronide der Hexahydro-Metaboliten in ähnlichem Ausmaß wie die phenolischen Glucuronide der Cumarine extrahiert wurden, sowie die Beobachtung, dass

die Proteinpräzipitation mit TCA nicht, wie für CUR beschrieben (Kap. 3.5.5), zu Verlusten an Hexahydro-CUR und seinem Glucuronid führten, lieferten Anhaltspunkte, dass sich die Glucuronide von CUR und Hexahydro-CUR in ihrer chemischen Struktur unterscheiden.

Desweiteren wurden einige Auffälligkeiten des CUR-Glucuronid A im Gegensatz zum Hexahydro-CUR-Glucuronid beobachtet, wie z.B. die Bindung an Mikrosomen und damit eine mögliche Reaktivität gegenüber Proteinen und Membranen sowie die Instabilität des Glucuronids in wässrigen Medien, auf die in dieser Arbeit in Kapitel 3.8 genauer eingegangen wird. Ähnliche Reaktivitäten (kovalente Bindung an Proteine, kurze Halbwertszeiten) sind für Acylglucuronide beschrieben [Spahn-Langguth und Benet, 1992; Zia-Amirhosseini et al., 1994], die aliphatische Glucuronide darstellen, da die Konjugation an der Hydroxylgruppe einer Carboxylfunktion erfolgt. Strukturell gesehen verhält sich CUR als vinyloge Carbonsäure bei der Glucuronidierung möglicherweise ähnlich wie übliche Carbonsäuren.

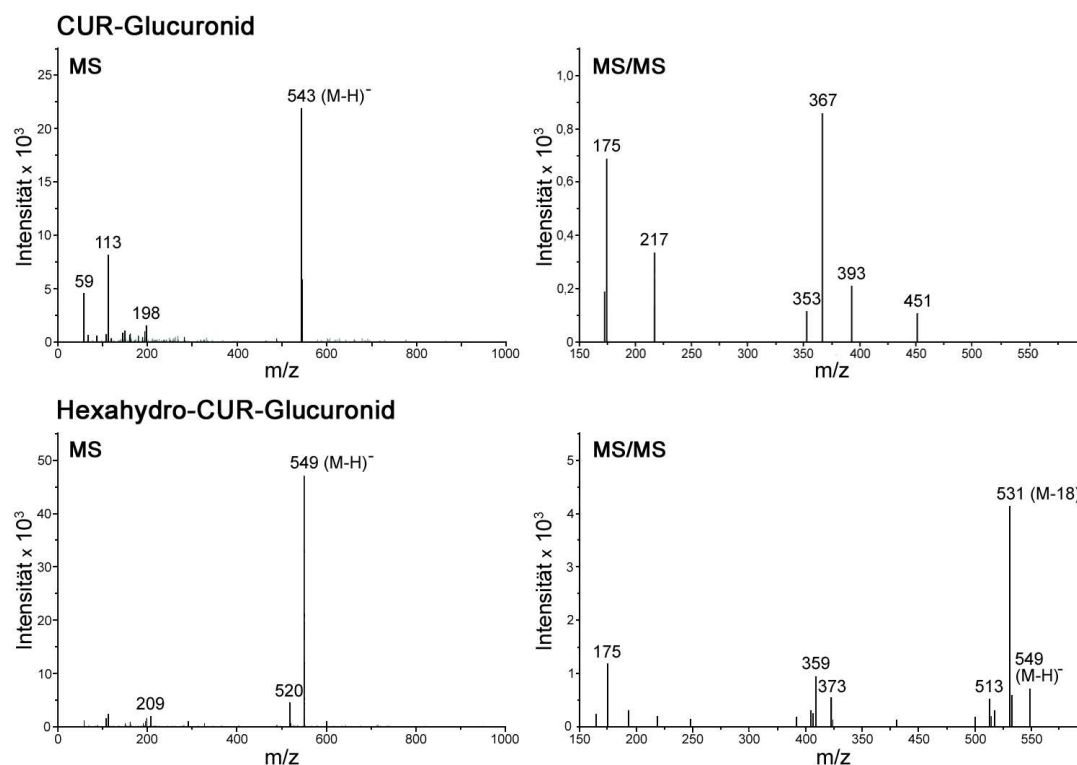
Entgegen der in der Literatur [Pan et al., 1999] vertretenen Auffassung, dass die Konjugation mit Glucuronsäure an einer der phenolischen Hydroxylgruppen stattfindet, lieferten die genannten Beobachtungen verschiedene Hinweise, dass es sich beim dominanten CUR-Glucuronid A eher um ein aliphatisches CUR-Glucuronid handelt.

#### 3.5.8 Strukturaufklärung der Glucuronide mittels LC/MS/MS-Analyse

Um die oben beschriebenen Hinweise auf die unterschiedliche chemische Struktur der beiden CUR-Glucuronide A und B einerseits, sowie von extrahierbarem CUR-Glucuronid A und polarem Hexahydro-CUR-Glucuronid andererseits zu untermauern, wurden die Glucuronide von CUR, Bisdemethoxy-CUR und Dimethyl-CUR sowie die Glucuronide ihrer entsprechenden Hexahydro-Metaboliten im Glucuronidierungsassay (Kap. 6.2.7.4) hergestellt und die Inkubationslösung einer HPLC/ESI/MS/MS-Analyse, wie unter 6.2.1.3 beschrieben, unterworfen.

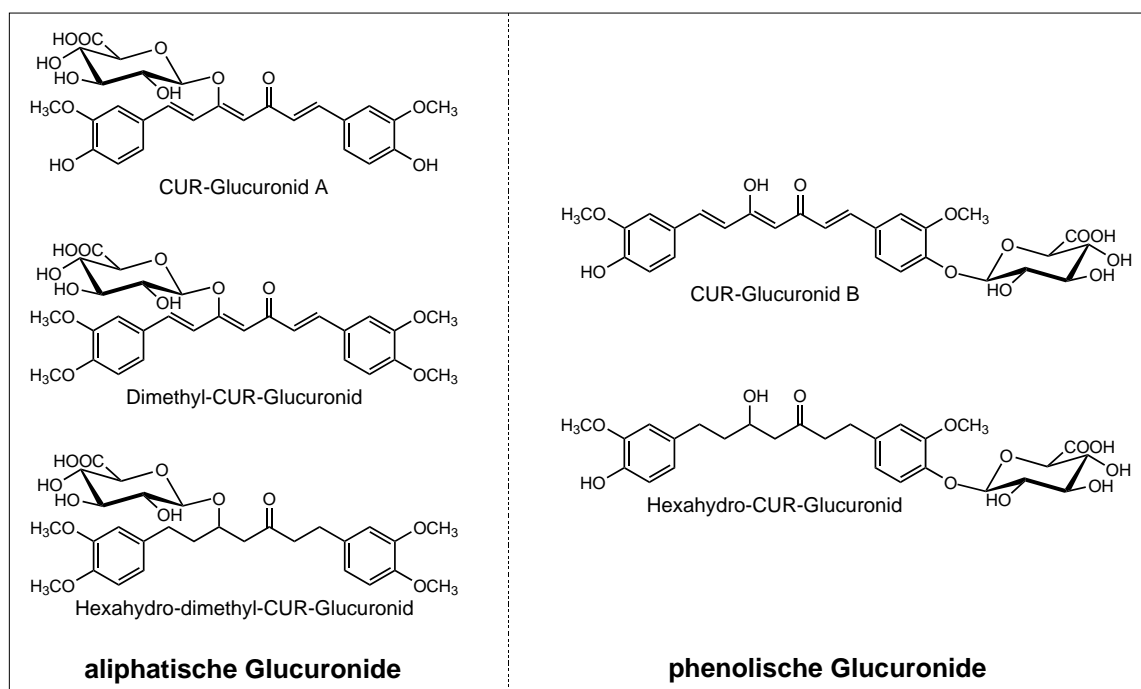
Die Tochterionen-Spektren aller Glucuronide (s. Anhang A.4) wiesen  $[M-H]^-$ -Ionen bei  $m/z$  175 auf, die der Glucuronsäure entsprechen. Die Molekularmasse der Molekülionen zeigte, dass jedes der gebildeten Glucuronide nur eine Glucuronsäure enthielt, d.h. es handelte sich ausschließlich um Monoglucuronide.

Die Massenspektren der beiden CUR-Glucuronide zeigten ein ähnliches Fragmentierungsmuster und waren vom Verlust der Glucuronsäure dominiert. Charakteristisch war zudem ein Verlust von 150 Masseneinheiten vom Molekülion, der für CUR sowie das lipophile CUR-Glucuronid A beobachtet wurde und auf eine benzyliche Spaltung unter Erhaltung des Aromaten in unveränderter Form zurückzuführen war (Abb. 27, oben). Bisdemethoxy-CUR und seine beiden Glucuronide verhielten sich analog zu CUR und wiesen eine Abspaltung von 120 Masseneinheiten auf. Beim enolischen Dimethyl-CUR-Glucuronid (Dimethyl-CUR besitzt keine phenolischen OH-Gruppen) war ebenfalls der Abgang der Glucuronsäure dominant.



**Abbildung 27:** LC/MS- und LC/MS/MS-Spektren des Glucuronids von CUR (oben) und von Hexahydro-CUR (unten). LC/MS-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.3.

Im Gegensatz dazu war nach Fragmentierung der Glucuronide von Hexahydro-CUR (Abb. 27, unten) und Hexahydro-bisdemethoxy-CUR neben dem Verlust der Glucuronsäure eine Wasserabspaltung (M-18) sichtbar, die auf eine freie aliphatische Hydroxylgruppe hinwies. Da dieser Wasserverlust nicht resultiert, wenn die aliphatische OH-Gruppe mit Glucuronsäure konjugiert ist, handelt es sich bei den hydrophileren Glucuroniden dieser Hexahydro-Derivate um phenolische Glucuronide. Diesen Befund bestätigte das Tochterionen-Spektrum des aliphatischen Hexahydro-dimethyl-CUR-Glucuronids, welches diese Wasserabspaltung nicht zeigte. Der Verlust von Wasser wurde jedoch nicht nur bei den Glucuroniden der Hexahydro-Metaboliten, sondern z.B. auch bei Hexahydro-CUR selbst festgestellt, während CUR und seine beiden Glucuronide, die eine ungesättigte aliphatische Kette besitzen, diesen nicht aufwiesen. Die LC/MS/MS-Analyse der beiden Curcuminoid-Glucuronide war mit den unter 3.5.7 präsentierten Beobachtungen konsistent, die zu der Annahme führten, dass das dominante lipophile Curcuminoid-Glucuronid A das enolische Glucuronid darstellt, führte aber nicht zu einem eindeutigen Beweis dieser Hypothese. Über die strukturellen Merkmale der verschiedenen Curcuminoid-Glucuronide gibt Abbildung 28 zusammenfassend Auskunft.



**Abbildung 28:** Chemische Strukturen der Monoglucuronide verschiedener Curcuminoid-Derivate. Beim enolischen (A) und phenolischen (B) CUR-Glucuronid handelt es sich um postulierte Strukturen. Links, enolische bzw. aliphatische Glucuronide; rechts, phenolische Glucuronide.

### 3.6 Glucuronidierung mit humanen rekombinanten UGTs

Glucuronidierungsreaktionen werden von der UGT-Superfamilie, zu der mehrere Isoenzyme gehören, katalysiert. Da die Glucuronidierung im Metabolismus von Curcuminoiden von Bedeutung ist, war von Interesse welche UGTs beim Menschen bei der Glucuronidierung der Curcuminoiden und ihrer Metabolite involviert sind.

Die Glucuronidierung verschiedener Curcuminoid-Derivate wurde mit den humanen rekombinanten UGT-Isoenzymen UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10 und 2B7, wie in Kapitel 6.2.7.5 beschrieben, untersucht. Die HPLC/DAD-Analyse erfolgte aus der wässrigen Gesamtlösung, ggf. nach Abtrennung der Proteine, um das aliphatische und phenolische Curcuminoid-Glucuronid nebeneinander zu erfassen. Da die Glucuronidierung von 4-(Trifluormethyl)umbelliferon (TFMU) von vielen humanen UGT-Isoformen katalysiert wird, repräsentiert TFMU eine geeignete Substanz für den Vergleich von Glucuronidierungsaktivitäten von rekombinanten Enzymen sowie von Geweben [Baranczewski et al., 2004; Uchaipichat et al., 2004]. Die Aktivität jeder UGT-Isoform wurde durch Glucuronidierung von TFMU oder E2 und im Falle von UGT1A9 zusätzlich mit Propofol (2,6-Diisopropylphenol) als spezifisches Substrat [King et al., 2000] überprüft. Die 2% DMSO, die notwendig waren um eine vollständige Solvatisierung der Curcuminoiden zu gewährleisten, hatten einen ver-

nachlässigbaren Effekt auf die katalytische Aktivität der UGTs. Für jedes Substrat und jedes Isoenzym wurde sichergestellt, dass die Glucuronid-Bildung linear verlief. Die spezifischen Glucuronidierungsaktivitäten der Testsubstanzen und Kontrollen sind in Tabelle 12 wiedergegeben.

Die Glucuronide wurden durch Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase und anhand ihrer UV/Vis-Spektren (s. Anhang A.2.1) und Retentionszeiten in der HPLC (Tab. 3) identifiziert. Das 3-HO-Glucuronid von E2 war als Referenzsubstanz vorhanden und wurde mittels Cochromatographie zugewiesen. Das Hauptprodukt war für die drei Curcuminoide immer das aliphatische lipophile Glucuronid A. Bei Bildung mehrerer Produkte ist die Aktivität in Tabelle 12 als Summe der Einzel-Aktivitäten angegeben.

Die drei Curcuminoide und der CUR-Hauptmetabolit Hexahydro-CUR waren Substrate der meisten Isoenzyme. Die höchsten Aktivitäten wurden i.A. für CUR und die geringsten für Hexahydro-bisdemethoxy-CUR und Dimethyl-CUR beobachtet. Wichtige UGTs für die Glucuronidierung von CUR und Demethoxy-CUR waren die Isoformen UGT1A1, 1A8 und 1A10. Während UGT1A1 ein wichtiges Isoenzym der humanen Leber darstellt, sind UGT1A8 und 1A10 dort nicht zu finden, sondern werden im Gastrointestinaltrakt exprimiert. Im Vergleich dazu spielte neben hepatischem UGT1A1 für die Glucuronidierung von Bisdemethoxy-CUR UGT1A3 eine bedeutendere Rolle als das extrahepatische UGT1A8.

Der reduktive Metabolit Hexahydro-CUR wurde hauptsächlich von UGT1A8 sowie von UGT1A9 und 2B7 konjugiert, während die Glucuronidierung von Hexahydro-bisdemethoxy-CUR unter den gewählten Bedingungen nur mit UGT1A1, 1A9 und 2B7 nachgewiesen wurde. Die Konjugation der enolischen Hydroxylgruppe von Dimethyl-CUR wurde von UGT1A1 und 1A9 in geringem Ausmaß katalysiert.

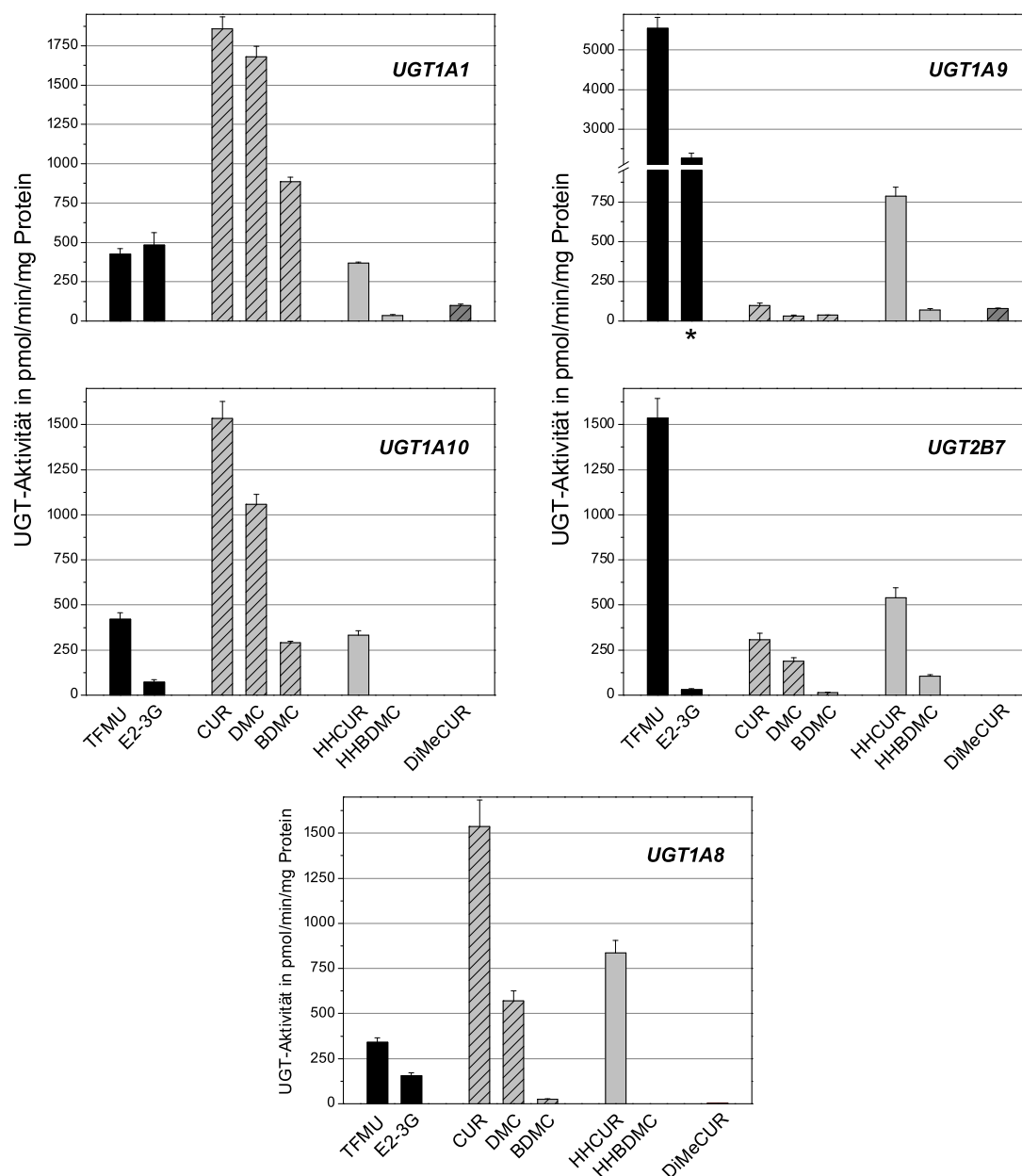
UGT1A3, 1A7 und 2B7 wiesen für die meisten Testsubstanzen im Vergleich zu den Positivkontrollen moderate Aktivitäten auf. Dagegen war die Glucuronidierung durch UGT1A6 unbedeutend. UGT1A4 war gegenüber CUR und Hexahydro-CUR inaktiv, die i.A. gute Substrate für UGTs darstellten, weshalb auf eine Glucuronidierung der übrigen Testsubstanzen verzichtet wurde. Die Aktivität von UGT1A4 wurde anhand der Glucuronidierung von E2 [King et al., 2000] sichergestellt, da laut Literatur [Baranczewski et al., 2004; Uchaipichat et al., 2004] TFMU als Positivkontrolle für UGT1A4 nicht geeignet ist. Da UGT1A4 jedoch primär *N*-Glucuronidierungen durchführt [King et al., 2000], war die fehlende Aktivität gegenüber den Curcuminoiden zu erwarten.

Die detaillierten Glucuronidierungsprofile der wichtigsten UGTs des Curcuminoid-Metabolismus repräsentiert Abbildung 29. UGT1A1, 1A8 und 1A10 (links und Mitte) zeigten signifikant höhere Enzymaktivitäten für CUR als für die Positivkontrollen. Dagegen lagen die Aktivitäten von UGT1A9 und 2B7 (rechts) für die Curcuminoid-Derivate deutlich unter denen für die Positivkontrollen TFMU bzw. Propofol. Hexahydro-CUR stellte für diese beiden Isoenzyme das beste Substrat unter den Curcuminoid-Derivaten dar.



**Tabelle 12:** Spezifische Glucuronidierungsaktivitäten in pmol/min/mg Protein von humanen rekombinanten UGTs für verschiedene Substrate. Die Aktivitäten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Bestimmungen für jedes Substrat und jedes Isoenzym angegeben. Die Substratkonzentrationen betragen jeweils 20  $\mu$ M. Die Nachweisgrenzen waren 1 pmol/min/mg Protein für CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR, 4 pmol/min/mg Protein für Hexahydro-CUR, 6 pmol/min/mg Protein für Hexahydro-bisdemethoxy-CUR und 0,5 pmol/min/mg Protein für Dimethyl-CUR. n.n., nicht nachweisbar; n.b., nicht bestimmt; \* Es wurden zwei Glucuronide gebildet; die Aktivität ist als Summe der beiden Einzel-Aktivitäten angegeben.

Substrat	UGT1A1	UGT1A3	UGT1A4	UGT1A6	UGT1A7	UGT1A8	UGT1A9	UGT1A10	UGT2B7
TFMU	426 $\pm$ 33	422 $\pm$ 49	n.b.	3886 $\pm$ 227	8735 $\pm$ 306	341 $\pm$ 24	5547 $\pm$ 278	421 $\pm$ 35	1537 $\pm$ 108
E2	482 $\pm$ 79	36* $\pm$ 5	10 $\pm$ 1	n.b.	n.b.	155 $\pm$ 16	n.b.	73 $\pm$ 13	31 $\pm$ 6
CUR	<b>1858*</b> $\pm$ 77	540 $\pm$ 14	n.n.	20 $\pm$ 2	187 $\pm$ 4	<b>1537*</b> $\pm$ 146	97* $\pm$ 15	<b>1535*</b> $\pm$ 92	306 $\pm$ 38
Demethoxy-CUR	1679 $\pm$ 69	440 $\pm$ 45	n.b.	9 $\pm$ 1	107 $\pm$ 8	569 $\pm$ 58	33* $\pm$ 5	1058 $\pm$ 54	188 $\pm$ 21
Bisdemethoxy-CUR	885* $\pm$ 30	151 $\pm$ 22	n.b.	n.n.	19 $\pm$ 2	25 $\pm$ 2	38* $\pm$ 1	292 $\pm$ 8	14 $\pm$ 3
Hexahydro-CUR	367 $\pm$ 7	66 $\pm$ 10	n.n.	n.n.	211 $\pm$ 5	<b>837</b> $\pm$ 68	<b>787</b> $\pm$ 56	332 $\pm$ 25	<b>539</b> $\pm$ 55
Hexahydro-bisdemethoxy-CUR	36* $\pm$ 4	n.b.	n.b.	n.b.	n.n.	n.n.	70* $\pm$ 9	n.n.	105* $\pm$ 8
Dimethyl-CUR	99 $\pm$ 8	5 $\pm$ 2	n.b.	n.n.	8 $\pm$ 1	2	80 $\pm$ 2	n.n.	n.n.

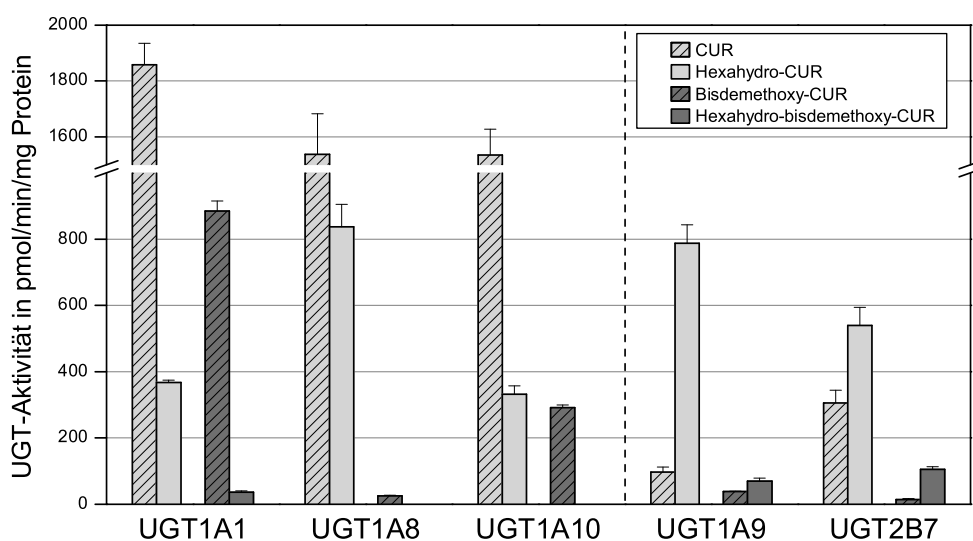


**Abbildung 29:** Glucuronidierungsprofile von UGT1A1, 1A8, 1A9, 1A10 und 2B7 für Positivkontrollen und Testsubstrate. Die Aktivitäten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Bestimmungen pro Substrat und Isoenzym. Die Substratkonzentrationen betragen jeweils 20  $\mu$ M. \* Propofol; TFMU, 4-(Trifluormethyl)umbelliferon; E2-3G, 3-HO-Glucuronid von E2; DMC, Demethoxy-CUR; BDMC, Bisdemethoxy-CUR; HHCUR, Hexahydro-CUR; HHBDMC, Hexahydro-bisdemethoxy-CUR; DiMeCUR, Dimethyl-CUR.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Glucuronidierung der Curcuminoiden und Hexahydro-Produkte nicht spezifisch von einem bestimmten Isoenzym katalysiert wurde, sondern dass die UGTs für jedes Substrat überlappende Spezifitäten aufwiesen. Neben hepatischen Isoformen

spielten die UGTs des Gastrointestinaltrakts im Curcuminoid-Metabolismus eine bedeutende Rolle.

Der direkte Vergleich der UGT-Aktivitäten für CUR bzw. Bisdemethoxy-CUR und die Analoga Hexahydro-CUR bzw. Hexahydro-bisdemethoxy-CUR ist in Abbildung 30 für einige Isoenzyme dargestellt. Während CUR und Bisdemethoxy-CUR von UGT1A1, 1A8 und 1A10 (Abb. 30, links) effizient zu den aliphatischen Glucuroniden umgesetzt wurden, waren für UGT1A9 und 2B7 (Abb. 30, rechts) Hexahydro-CUR bzw. Hexahydro-bisdemethoxy-CUR unter Bildung phenolischer Glucuronide die bevorzugten Substrate. Beispielsweise glucuronidierte UGT1A9 den CUR-Metabolit Hexahydro-CUR 8 Mal besser als CUR, hingegen war UGT1A1 4 Mal aktiver gegenüber CUR als gegenüber Hexahydro-CUR. Außerdem war UGT1A1 eines der wenigen Isoenzyme das fähig war, das enolische Dimethyl-CUR-Glucuronid zu bilden (Tab. 12). Trotz überlappender Substratspezifitäten war damit eine gewisse Tendenz der humanen Isoenzyme zu erkennen: Alle Isoenzyme favorisierten die Bildung aliphatischer Curcuminoid-Glucuronide mit Ausnahme von UGT1A9 und 2B7, die bevorzugt phenolische Hydroxylgruppen von Hexahydro-Verbindungen konjugierten.

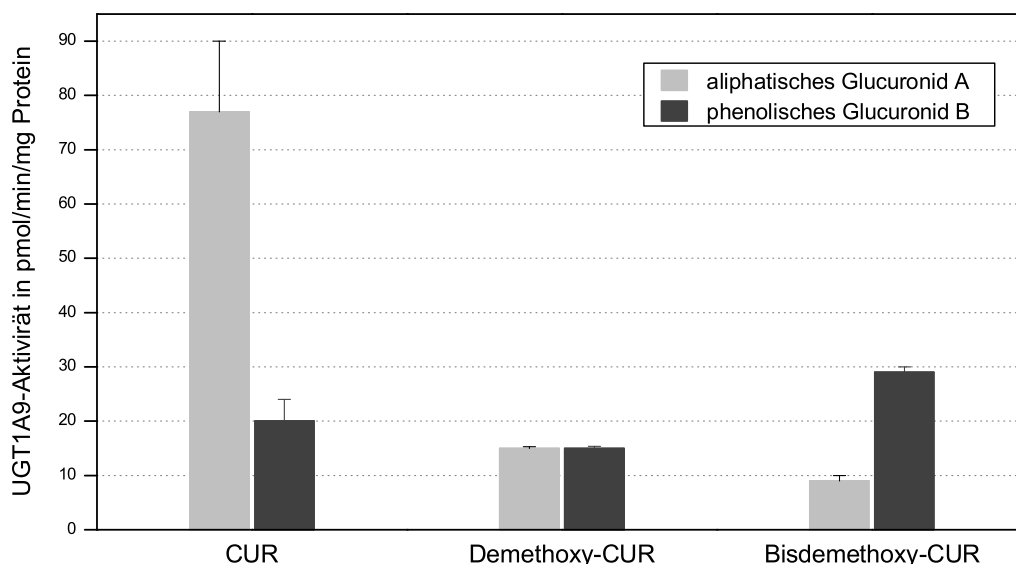


**Abbildung 30:** Spezifische Glucuronidierungsaktivitäten einiger humaner UGTs für CUR und Hexahydro-CUR bzw. Bisdemethoxy-CUR und Hexahydro-bisdemethoxy-CUR im Vergleich. Die Aktivitäten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Bestimmungen pro Substrat und Isoenzym. Die Substratkonzentrationen betragen jeweils 20  $\mu$ M.

### 3.6.1 Phenolisches Curcuminoid-Glucuronid

UGT1A9 war das einzige Isoenzym, welches das phenolische Glucuronid B für jedes der drei Curcuminoiden zusätzlich zu den aliphatischen Glucuroniden A in merklichen Anteilen bil-

dete (Tab. 12). Eine detaillierte Betrachtung der spezifischen Glucuronidierungsaktivitäten von UGT1A9 für die Bildung der phenolischen und aliphatischen Curcuminoid-Glucuronide liefert Abbildung 31. Die anteilig größte Menge an polarem phenolischem Glucuronid B im Vergleich zum lipophilen aliphatischen Glucuronid A war für Bisdemethoxy-CUR zu verzeichnen, bei dem ca. drei Viertel der gebildeten Glucuronide phenolisch waren, während die Zusammensetzung bei Demethoxy-CUR ausgeglichen war. Bei CUR verschob sich das Verhältnis wieder zugunsten des aliphatischen Glucuronids, so dass nur noch ca. ein Fünftel der Konjugate das phenolische CUR-Glucuronid repräsentierten. Zusätzlich war bei den aktivsten Isoformen UGT1A1, 1A8 und 1A10 eine geringfügige Nebenaktivität für die Bildung von phenolischem CUR-Glucuronid B zu beobachten, die aber im Vergleich zum aliphatischen Glucuronid A zu vernachlässigen war.



**Abbildung 31:** Spezifische Aktivitäten von UGT1A9 für das aliphatische (A) und phenolische (B) Glucuronid von CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR. Die Aktivitäten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Bestimmungen pro Substrat. Die Substratkonzentrationen betragen jeweils 20  $\mu$ M.

### Inhibitorischer Effekt von Propofol auf die phenolische CUR-Glucuronidierung

Propofol ist in der Literatur als spezifisches Substrat für UGT1A9 [King et al., 2000] mit einem  $K_m$ -Wert von 170  $\mu$ M [Ebner und Burchell, 1993] und einem  $IC_{50}$ -Wert von 55  $\mu$ M [Mano et al., 2004] beschrieben. Die gemessene Glucuronidierungsaktivität von UGT1A9 für Propofol (20  $\mu$ M) betrug  $2263 \pm 129$  pmol/min/mg Protein. Da sich CUR als deutlich schlechteres Substrat für UGT1A9 (Gesamtaktivität für beide Glucuronide  $97 \pm 15$  pmol/min/mg Protein) erwies, führte dies zu der Annahme, dass UGT1A9 für CUR eine geringere Affinität besitzt als für Propofol. Deshalb wurde geprüft,

ob Propofol das Potential besitzt mit der Glucuronidierung von CUR zum phenolischen Glucuronid B zu interagieren. Aufgrund der oben genannten Daten sollte eine Reduktion der phenolischen Glucuronidierung von CUR möglich sein.

Deshalb wurden in Konkurrenzexperimenten CUR und Propofol mit humanen Lebermikrosomen glucuronidiert. Es wurden humane Lebermikrosomen verwendet, da diese ebenso wie UGT1A9 imstande waren das phenolische CUR-Glucuronid B zu bilden (Kap. 3.5.2) und ihre Menge nicht limitiert war. Die Aktivität der humanen Lebermikrosomen für Propofol (20  $\mu\text{M}$ ) betrug  $182 \pm 17$  pmol/min/mg Protein.

In den HPLC-Chromatogrammen war bei konstanter CUR-Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) mit steigender Propofol-Konzentration (0-200  $\mu\text{M}$ ) eine signifikante Abnahme des Peaks des polaren phenolischen CUR-Glucuronids zu sehen. Die Bildung des polaren CUR-Glucuronids wurde mit 50  $\mu\text{M}$  Propofol durchschnittlich um 40%, mit 100  $\mu\text{M}$  um 58% und mit 200  $\mu\text{M}$  um 67% relativ zur Kontroll-Inkubation in Abwesenheit von Propofol inhibiert. Die notwendige Propofol-Konzentration um eine 50%ige Hemmung der phenolischen CUR-Glucuronidierung hervorzurufen, lag damit im Bereich von 50-100  $\mu\text{M}$ . In diesem Konzentrationsbereich liegt auch der von Mano et al. [2004] veröffentlichte  $\text{IC}_{50}$ -Wert. Eine deutlich weniger ausgeprägte und bei höheren Propofol-Konzentrationen stagnierende Inhibierung wurde für das aliphatische CUR-Glucuronid A beobachtet (max. 17% Inhibition).

Unter Berücksichtigung, dass der inhibitorische Effekt in humanen Lebermikrosomen, die neben UGT1A9 diverse andere Isoenzyme enthalten, die CUR glucuronidieren können, festgestellt wurde, und unter der Annahme, dass die geringeren Ausbeuten an phenolischem CUR-Glucuronid auf die spezifische Hemmung von UGT1A9 durch Propofol zurückzuführen waren, bedeutet dies, dass die Entstehung des polaren CUR-Glucuronids B in den humanen Lebermikrosomen auf UGT1A9 zurückzuführen war. Dass die Bildung des polaren CUR-Glucuronids mit Rattenlebermikrosomen nur teilweise stattfand (Kap. 3.5.6), liegt möglicherweise daran, dass das homologe Isoenzym UGT1A9p der Ratte ein Pseudogen und damit inaktiv ist. Die geringfügige Bildung des phenolischen CUR-Glucuronids bei der Ratte wird vermutlich durch andere Isoenzyme hervorgerufen.

#### **3.6.2 Vergleichende Untersuchungen mit hepatischen und intestinalen Mikrosomen verschiedener Spezies**

Die Glucuronidierung wurde mit Mikrosomen aus hepatischem und intestinale Gewebe verschiedener Spezies, wie unter 6.2.7.6 dargestellt, durchgeführt. Die spezifischen UGT-Aktivitäten der Gewebe für die Positivkontrollen und Curcuminoid-Kongeneren sind in Tabelle 13 zusammengefasst, wobei bei der Bildung mehrerer Glucuronide aus einem Substrat, die Werte wiederum die Summe der Einzel-Aktivitäten repräsentieren.

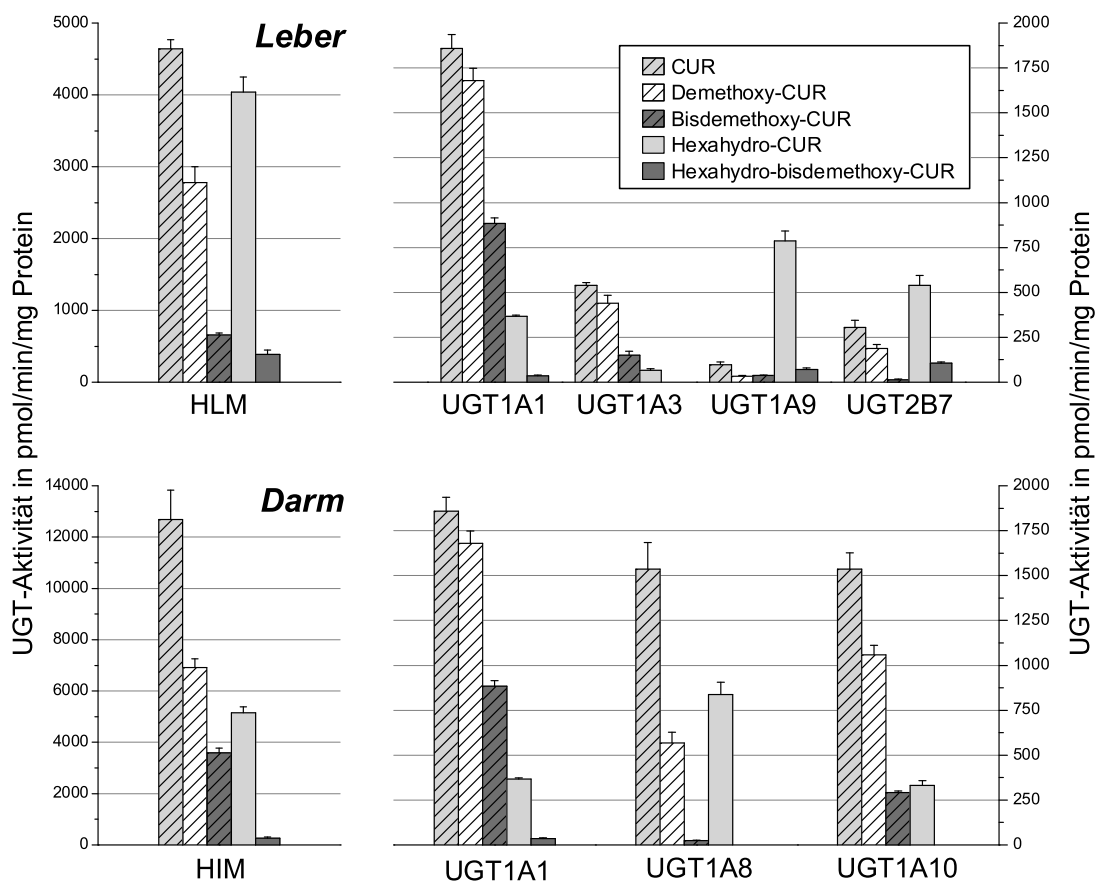
**Tabelle 13:** Spezifische Glucuronidierungsaktivitäten in pmol/min/mg Protein von hepatischen Mikrosomen von Mensch und Ratte und intestinalen Mikrosomen von Mensch, Ratte und Schwein für verschiedene Substrate. Die Aktivitäten sind als Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Bestimmungen für jedes Substrat und jede mikrosomale Fraktion angegeben. Die Substratkonzentrationen betragen jeweils 20  $\mu$ M. \* Es wurden zwei Glucuronide gebildet; die Aktivität ist als Summe der beiden Einzel-Aktivitäten angegeben.

Substrat	Leber		Darm		
	Human	Ratte	Human	Ratte	Schwein
TFMU	24079 $\pm$ 1361	29654 $\pm$ 859	10326 $\pm$ 499	13817 $\pm$ 640	7096 $\pm$ 577
E2	534* $\pm$ 38	1145* $\pm$ 102	5029 $\pm$ 248	120 $\pm$ 14	7402 $\pm$ 713
CUR	<b>4641*</b> $\pm$ 126	4589 $\pm$ 170	<b>12687</b> $\pm$ 1138	3933 $\pm$ 104	<b>4635</b> $\pm$ 449
Demethoxy-CUR	2777 $\pm$ 221	3480 $\pm$ 59	6917 $\pm$ 341	2603 $\pm$ 72	3966 $\pm$ 191
Bisdemethoxy-CUR	658* $\pm$ 29	1637 $\pm$ 168	3592 $\pm$ 182	843 $\pm$ 93	2297 $\pm$ 136
Hexahydro-CUR	4036 $\pm$ 214	<b>7935</b> $\pm$ 343	5145 $\pm$ 238	3863 $\pm$ 53	787 $\pm$ 61
Hexahydro- bisdemethoxy-CUR	385 $\pm$ 60	1704 $\pm$ 187	264 $\pm$ 39	956 $\pm$ 109	47 $\pm$ 8
Dimethyl-CUR	76 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5	36 $\pm$ 6	59 $\pm$ 2	12 $\pm$ 1

Jede mikrosomale Fraktion glucuronidierte jedes Testsubstrat. Die enolische Glucuronidierung von Dimethyl-CUR wurde stets am schlechtesten katalysiert. Die Produkte der Curcuminoiden waren fast ausschließlich die lipophilen aliphatischen Glucuronide. Eine Ausnahme bildete die humane Leber in der zusätzlich geringe Mengen des polaren phenolischen CUR-Glucuronids entstanden. Trotz des unterschiedlichen UGT-Expressionsmusters in Leber und Darm einer Spezies war kein verändertes Glucuronidierungsprofil für die Substrate in den beiden Organen zu erkennen. Die humane Leber sowie die Rattenleber glucuronidierten CUR ähnlich effizient, im Vergleich zur Positivkontrolle TFMU aber um Faktor 5 schlechter. Im Gegensatz zur humanen Leber war die Rattenleber i.A. etwas aktiver und bildete bevorzugt die phenolischen Hexahydro-Glucuronide. Beispielsweise glucuronidierte die Rattenleber Hexahydro-CUR doppelt so schnell wie die humane Leber.

Im Darm dagegen wurden die höchsten Aktivitäten beim Menschen festgestellt. Besonders die drei Curcuminoide stellten gute Substrate dar. Die UGT-Aktivität für das aliphatische CUR-Glucuronid war im humanen Darm 3 Mal höher als in der humanen Leber, sowie in intestinale Gewebe von Ratte und Schwein und lag im Bereich der Positivkontrolle TFMU. Im Gegensatz dazu wurde die phenolische Glucuronidierung der Hexahydro-Curcuminoide in Darm und Leber vom Mensch in vergleichbarem Ausmaß katalysiert. Obwohl die Mikrosomen aus Schweinedünndarm geringere Aktivitäten als das menschliche Darmgewebe aufwiesen, war das Glucuronidierungsprofil ähnlich. Im Gegensatz zur Ratte war die phenolische Glucuronidierung der Hexahydro-Metaboliten im Schweinedünndarm deutlich reduziert.

Während bei der Ratte die Glucuronidierung in Leber und Darm ähnlich effizient ablief, spielte beim Menschen die intestinale Glucuronidierung eine wichtigere Rolle als die hepatische Metabolisierung.



**Abbildung 32:** Spezifische Aktivitäten von humanen hepatischen (oben) und intestinalen (unten) Mikrosomen und UGTs im Vergleich. Die Aktivitäten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus drei unabhängigen Bestimmungen pro Substrat und mikrosomaler Fraktion. Die Substratkonzentrationen betragen jeweils  $20 \mu\text{M}$ . HLM, Humane Lebermikrosomen; HIM, Humane intestinale Mikrosomen.

Die Glucuronidierungsprofile von humanem Leber- und Darmgewebe für die Curcuminoid-Derivate stimmten mit den Glucuronid-Mustern der gewebespezifischen UGT-Isoenzyme überein (Abb. 32). Die Gegenüberstellung von Gewebe und Isoenzymen verdeutlicht, dass die hohe Bildungsrate zum phenolischen Hexahydro-CUR-Glucuronid in der humanen Leber auf die Isoenzyme UGT1A9 und 2B7 zurückzuführen war, die wie die Leber hohe Aktivitäten für TFMU aufwiesen (Tab. 12 und 13). Anhand der Glucuronidierungsprofile des humanen Darms und der intestinalen Isoenzyme für Bisdemethoxy-CUR und Hexahydro-CUR ist zu erkennen, dass im Darm die extrahepatischen Isoenzyme UGT1A8 und 1A10 stärker an der Glucuronidierung beteiligt sind als UGT1A1.

#### 3.6.3 Einfluß der Curcuminoid-Struktur

Allen *in vitro*-Glucuronidierungen mit Leber- und Darmmikrosomen verschiedener Spezies sowie mit den rekombinanten humanen Isoenzymen war gemein, dass die Aktivität für die Bildung der dominanten aliphatischen Curcuminoid-Glucuronide vom Methoxyierungsgrad des Curcuminoids abhing (Abb. 29 und 32): CUR (zwei Methoxygruppen) war stets das beste UGT-Substrat, gefolgt von Demethoxy-CUR (eine Methoxygruppe) und schließlich Bisdemethoxy-CUR, das keine Methoxygruppe besitzt, als schlechtestes Substrat. Ähnliche Beobachtungen beschreibt eine Studie von Ireson et al. [2002] mit intestinalen Mikrosomen für die drei Curcuminoiden, allerdings unter der Annahme, dass die Glucuronidierung der Curcuminoiden an einer der phenolischen OH-Gruppen erfolgte. Die zunehmende Resistenz gegenüber einer Konjugation bei Entfernung der Methoxygruppen war auch für die phenolischen Glucuronide von Hexahydro-CUR und Hexahydro-bisdemethoxy-CUR sichtbar. Beispielsweise katalysierten humane Lebermikrosomen die Glucuronidierung der methoxylierten Derivate CUR und Hexahydro-CUR 7 bzw. 10 Mal effizienter als die der vollständig demethoxylierten Kongenere. Die Anzahl der Methoxygruppen beeinflusste die Glucuronidausbeute offensichtlich unabhängig von der chemischen Struktur des gebildeten Glucuronids. Da die Anwesenheit der Methoxygruppen keine sterische Hinderung darstellte, sondern zu einer erhöhten Enzymaktivität führte, ist anzunehmen, dass die Methoxygruppen für die Bindung des Substrates an das Enzym von Bedeutung sind.

#### 3.6.4 Stabilität

Da die Glucuronidierungen unter physiologischen Bedingungen stattfanden, bei denen die chemische Instabilität der Curcuminoiden (Kap. 3.2) zum Tragen kommt, wurden die Wiederfindungen der Curcuminoiden in den Glucuronidierungsansätzen mit humanen rekombinanten UGTs bzw. spezies- und gewebespezifischen Mikrosomen quantifiziert. Für die Curcuminoiden zeichneten sich, wie bei den Inkubationen mit Leberschnitten (Kap. 3.3.5), deutliche Substanzverluste ab. Die Wiederfindungen betragen durchschnittlich 50-70% für die drei Cur-



cuminoide, wobei für Bisdemethoxy-CUR die höchsten Wiederfindungen erhalten wurden (Tab. 14). Die Verluste an synthetischem Dimethyl-CUR waren i.A. etwas geringer ( $\leq 30\%$ ) und für die stabilen Hexahydro-Curcuminoiden wurden, auch nach Abzentrifugieren der Proteine, keine signifikanten Substanzverluste beobachtet. Allgemein war zu bemerken, dass Umsetzungen mit zunehmenden Inkubationszeiten sowie mit abnehmenden Proteinkonzentrationen in geringeren Wiederfindungen der Curcuminoiden resultierten, jedoch blieb das Verhältnis von Glucuronid zu Muttersubstanz unverändert.

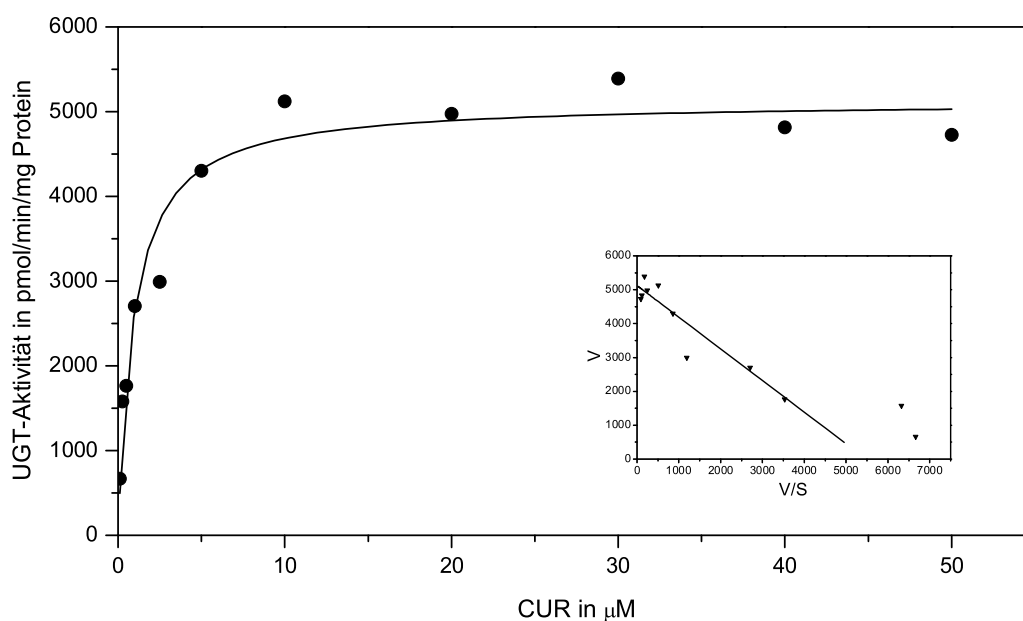
Zusätzlich wurde das Verhalten der instabilen Curcuminoid-Derivate, wie unter 6.2.4.3 beschrieben, in Tris-Puffer pH 7,5 alleine und in einem Modellansatz, der Mikrosomen enthielt, bestimmt. Es erfolgte keine Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$ , sondern die HPLC/DAD-Analyse wurde sofort nach dem Pipettieren des Ansatzes durchgeführt. In reinem Puffer wurde für jedes der drei Curcuminoiden nur ca. die Hälfte der eingesetzten Menge nachgewiesen. In Anwesenheit von Mikrosomen lagen die Wiederfindungen dagegen bis zu 20% darüber und zeigten eine ähnliche Größenordnung wie in den Glucuronidierungsansätzen (Tab. 14). Dies bedeutet, dass die max. 70% Substanz, die für eine Reaktion zur Verfügung standen, nur geringfügig zusätzlichen, inkubationsbedingten Verlusten unterlagen. Höhere Wiederfindungen als die Curcuminoiden lieferte wiederum das synthetische Dimethyl-CUR mit und ohne Mikrosomen. Offensichtlich wurden die Curcuminoiden durch die Anwesenheit von Mikrosomen, ähnlich wie für FKS und Zellen (Kap. 3.2.2) beobachtet, „stabilisiert“. Im Gegensatz dazu zeigten die Hexahydro-Metaboliten keine Interaktionen mit den Mikrosomen.

**Tabelle 14:** Wiederfindungen von CUR, Demethoxy-, Bisdemethoxy- und Dimethyl-CUR in Tris-Puffer pH 7,5 in Ab- und Anwesenheit von Mikrosomen und in Glucuronidierungsansätzen mit Mikrosomen bzw. Supersomen. Die Wiederfindungen sind in Prozent der eingesetzten Substanzmenge angegeben und repräsentieren in Tris-Puffer ohne und mit Mikrosomen Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Bestimmungen und in den Glucuronidierungsansätzen Mittelwerte aller Bestimmungen (drei unabhängige Bestimmungen für jede mikrosomale Fraktion).

Curcuminoid	Wiederfindung in %			
	Tris-Puffer	Tris-Puffer + Mikrosomen	Ansatz mit Mikrosomen	Ansatz mit Supersomen
CUR	54,6 $\pm$ 0,3	65,4 $\pm$ 0,8	62,4 $\pm$ 6,0	49,5 $\pm$ 16,3
Demethoxy-CUR	51,3 $\pm$ 1,9	71,4 $\pm$ 0,1	59,8 $\pm$ 3,8	67,3 $\pm$ 15,1
Bisdemethoxy-CUR	53,1 $\pm$ 2,3	70,2 $\pm$ 0,3	60,8 $\pm$ 7,2	71,6 $\pm$ 12,0
Dimethyl-CUR	81,2 $\pm$ 3,9	92,8 $\pm$ 1,9	73,4 $\pm$ 1,6	78,0 $\pm$ 5,7

### 3.7 Kinetik der Glucuronidierung von CUR

Die Glucuronidierungskinetik von CUR wurde in humanen Lebermikrosomen und mit humanem rekombinantem UGT1A8, als Stellvertreter für die extrahepatische CUR-Glucuronidierung, untersucht. Die Glucuronidierungen wurden mit verschiedenen CUR-Konzentrationen (0,1-50  $\mu\text{M}$ ), wie unter 6.2.7.8 beschrieben, durchgeführt und die Reaktionsgeschwindigkeit  $V$  der Bildung des dominanten CUR-Glucuronids für jede Konzentration berechnet. Das polare CUR-Glucuronid entstand in seltenen Fällen in vernachlässigbaren Mengen. Wie das kinetische Profil in Abbildung 33 am Beispiel der humanen Leber zeigt, folgte die Glucuronidierung im Bereich von 0,1-50  $\mu\text{M}$  CUR einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Auftragung im Eadie-Hofstee-Plot führt zu einer linearen Abhängigkeit und unterstützt damit das kinetische Profil nach Michaelis-Menten. Die Glucuronidierung durch UGT1A8 verlief ebenfalls nach Michaelis-Menten (s. Anhang A.2.3, Abb. 43).



**Abbildung 33:** Kinetisches Profil der Glucuronidierung von CUR mit humanen Lebermikrosomen. Die Kurvenanpassung erfolgte nach der Michaelis-Menten-Gleichung. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus drei unabhängigen Bestimmungen. Insert: Eadie-Hofstee-Plot.  $V$ , Reaktionsgeschwindigkeit in pmol/min/mg Protein;  $S$ , Substratkonzentration in  $\mu\text{M}$ .

Die Berechnung der kinetischen Parameter mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung wies UGT1A8 als Enzym mit hoher Affinität und hoher Kapazität für CUR aus. Die gleichen Charakteristika zeigten die humanen Lebermikrosomen in ausgeprägterer Form (Tab. 15). Das Verhältnis  $V_{max}/K_m$  gibt die katalytische Effizienz bzw. intrinsische Clearance an. Sie ist ein nützlicher Parameter zur Extrapolation von *in vitro*-Daten auf die *in vivo*-Situation.

Erwähnenswert ist die besonders hohe katalytische Effizienz von 5484,8  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  Protein der humanen Lebermikrosomen.

**Tabelle 15:** Kinetische Parameter der CUR-Glucuronidierung mit humanen Lebermikrosomen (HLM) und extrahepatischem rekombinantem UGT1A8. Die kinetischen Parameter wurden mit der Michaelis-Menten-Gleichung aus Aktivitäten bei Substratkonzentrationen von 0,1-50  $\mu\text{M}$  berechnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  S.D. aus drei bzw. zwei unabhängigen Bestimmungen für HLM bzw. UGT1A8.

Mikrosomen/ Supersomen	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\text{pmol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ Protein)
HLM	$0,9 \pm 0,2$	$5122,5 \pm 190,2$	5484,8
UGT1A8	$14,5 \pm 3,6$	$2486,3 \pm 218,2$	171,5

### 3.8 Interaktion von Curcuminoid-Glucuroniden mit Mikrotubuli-Proteinen

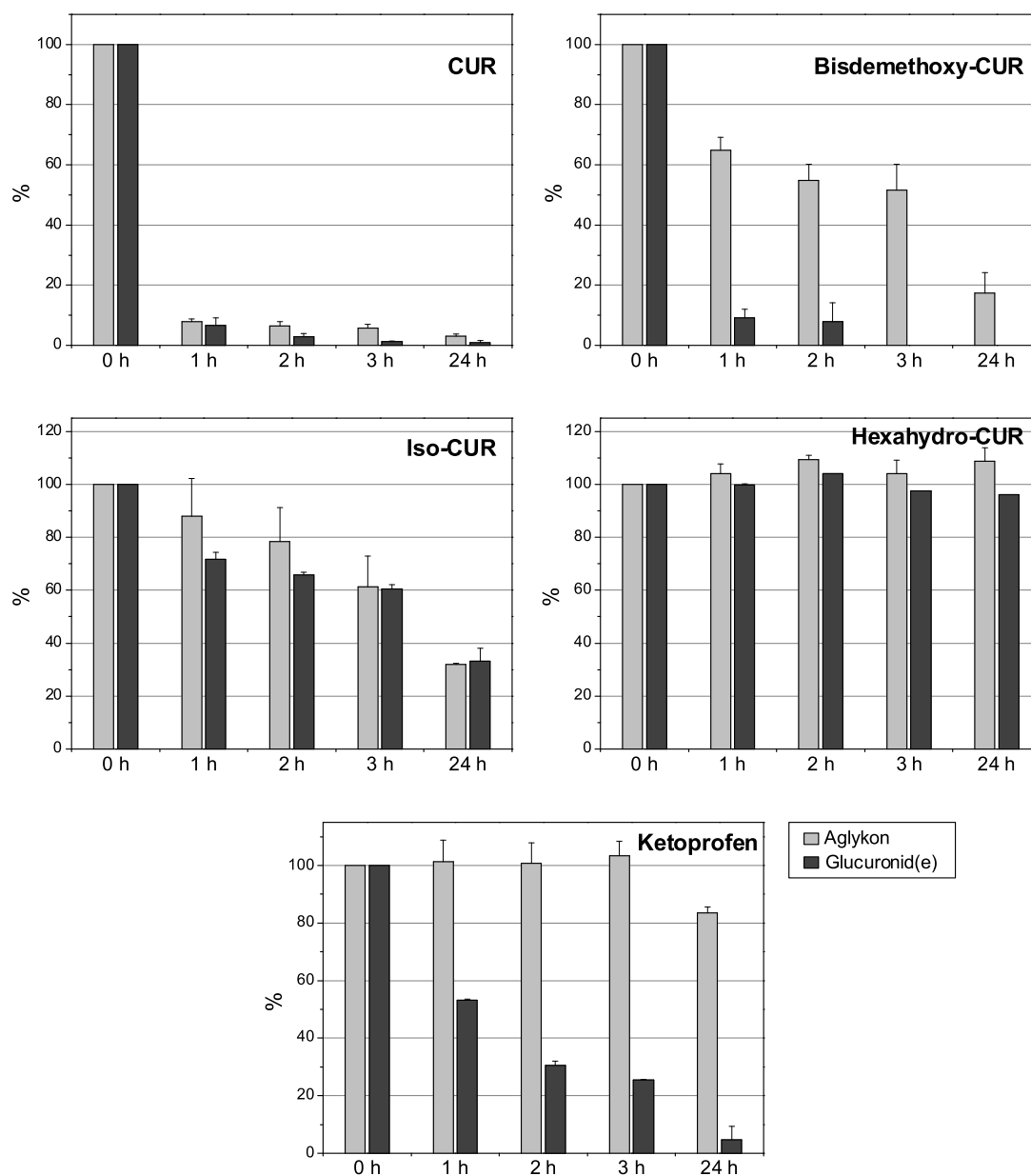
#### 3.8.1 Stabilität von Curcuminoid-Glucuroniden

Acylglucuronide können unter physiologischen Bedingungen unter Freisetzung der Glucuronsäure und Rückbildung des Aglykons hydrolysieren [Zia-Amirhosseini et al., 1994]. Instabile Glucuronide besitzen in der Regel ein hohes Vermögen kovalente Bindungen mit Proteinen einzugehen. Da zwischen der Stabilität von Acylglucuroniden und ihrer Reaktivität gegenüber Proteinen, die aus dem elektrophilen Charakter des Carbonyl-Kohlenstoffs der Esterbindung resultiert, ein Zusammenhang besteht, kann die Stabilität eines Glucuronids Hinweise auf die potentielle Reaktivität liefern [Bolze et al., 2002; Bolze, 2004].

Das Verhalten der Glucuronide verschiedener Curcuminoid-Derivate wurde bei 37°C in Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4, im Vergleich zum Acylglucuronid des NSAID Ketoprofen, über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Die verwendeten Glucuronide wurden wie unter 6.2.7.4 hergestellt. Zusätzlich zu den Glucuroniden wurde die Stabilität der Muttersubstanzen betrachtet (Abb. 34).

Die Glucuronidierung der Positivkontrolle Ketoprofen lieferte zwei Produkte, die durch Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase als Glucuronide identifiziert wurden. Da Ketoprofen als Racemat vorliegt, also ein inhärentes Chiralitätszentrum besitzt, resultierte die Glucuronidierung aufgrund des zusätzlichen asymmetrischen Kohlenstoffatoms der Glucuronsäure in zwei diastereomeren Acylglucuroniden (Abb. 35), die chromatographisch getrennt werden können. In den Untersuchungen wurde zwischen den beiden Glucuroniden des Ketopropens nicht unterschieden, sondern die Summe beider Produkte berechnet.

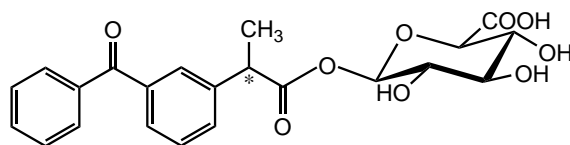
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 34:** Hydrolytische Stabilität von Curcuminoid-Derivaten bzw. Ketoprofen und zugehörigen Glucuroniden in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer bei pH 7,4. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Spannweite aus zwei unabhängigen Bestimmungen. Die Substanz-Ausgangskonzentrationen betragen 30  $\mu$ M.

Die Acylglucuronide von Ketoprofen zeigten wie zu erwarten einen zeitabhängigen Substanzverlust, jedoch ohne Rückbildung von Ketoprofen. Im Gegensatz zur glucuronidierten Form war freies Ketoprofen über 3 h stabil und zeigte nach 24 h einen Verlust von 16%, während die Glucuronide zu diesem Zeitpunkt zu 95% abgebaut waren. Die aliphatischen Glucuronide von CUR und Bisdemethoxy-CUR wiesen ebenfalls einen zeitabhängigen

Zerfall auf und waren deutlich instabiler als die Ketoprofen-Acylglucuronide. Insbesondere das Bisdemethoxy-CUR-Glucuronid zeigte eine hohe Zerfallsrate: Bereits nach 3 h konnte das Glucuronid nicht mehr nachgewiesen werden. Trotz des starken Zerfalls dieser beiden Curcuminoid-Glucuronide wurde auch hier eine hydrolysebedingte Rückbildung der Muttersubstanzen nicht beobachtet. Während CUR selbst nur geringfügig stabiler als das zugehörige Glucuronid war, wies Bisdemethoxy-CUR im Vergleich zu seinem Glucuronid und zu CUR eine signifikant höhere Stabilität auf.



**Abbildung 35:** Chemische Struktur der Ketoprofen-Acylglucuronide.

Im Vergleich zu CUR verhielt sich das synthetische Iso-CUR in freier und glucuronidierter Form während des zeitabhängigen Zerfalls nicht unterschiedlich und nach 24 h war noch ca. ein Drittel der Ausgangsmenge präsent. Damit war das Glucuronid von Iso-CUR auch stabiler als die Ketoprofen-Acylglucuronide. Das phenolische Glucuronid des stabilen reduktiven CUR-Metaboliten Hexahydro-CUR zeigte wie das Aglykon über den gesamten Inkubationszeitraum keine merklichen Verluste.

Die erhöhte Instabilität der Ketoprofen-Acylglucuronide und der natürlichen Curcuminoid-Glucuronide stellt einen Aktivierungsschritt dar und bekräftigt frühere Vermutungen (Kap. 3.5.5), dass die enolischen Curcuminoid-Glucuronide zu potentiellen Interaktionen mit Proteinen fähig sind.

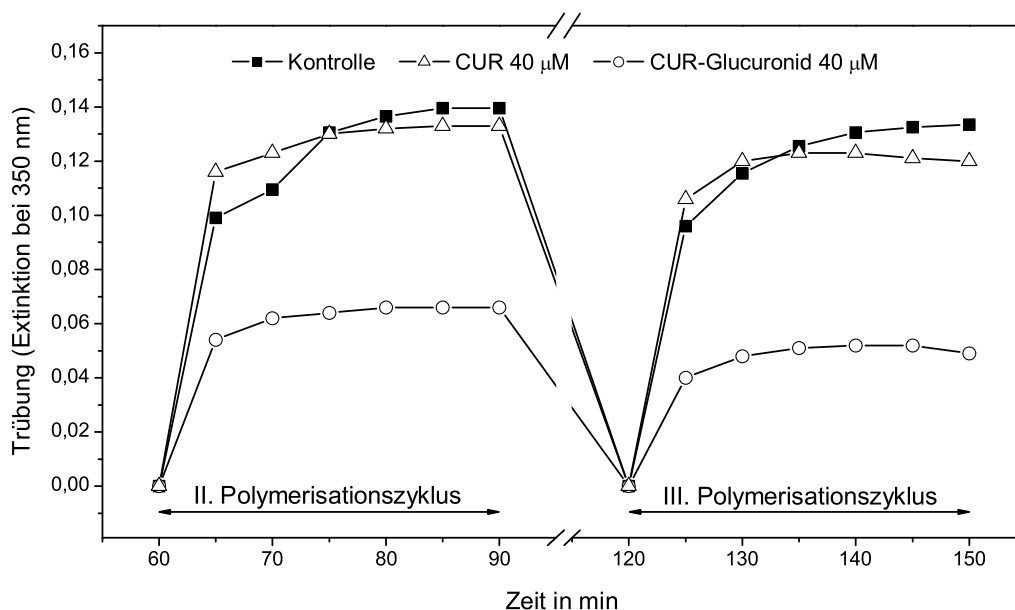
### 3.8.2 Hemmung der Mikrotubuli-Polymerisation durch Glucuronide von Curcuminoiden

Der Effekt verschiedener Curcuminoid-Glucuronide sowie der zugehörigen Muttersubstanzen auf die Polymerisation von MTP zu Mikrotubuli wurde, wie in Kapitel 6.2.10 beschrieben, im zellfreien System mit Tubulin, das wie unter 6.2.9 dargestellt, aus Rinderhirn isoliert wurde, untersucht. Die verwendeten Glucuronide wurden enzymatisch, wie unter 6.2.8.2 beschrieben, hergestellt und angereichert. Die Muttersubstanzen wurden in mindestens der gleichen Konzentration wie die Glucuronide eingesetzt, jedoch waren die Konzentrationen der drei Curcuminoiden sowie des synthetischen Dimethyl-CUR aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit limitiert (max. 100  $\mu\text{M}$ ). Als Positivkontrolle wurde das Alkaloid Colchicin (2  $\mu\text{M}$ ) aus *Colchicum autumnale* (Herbstzeitlose), das die Mikrotubuli-Bildung durch nicht-kovalente Bindung hemmt [Andreu und Timasheff, 1982; Little und Luduena, 1985; Saltarelli und Pantaloni, 1982; Wallin et al., 1988], eingesetzt. Weiterhin dienten die Acylglucuronide von Ketoprofen

als Positivkontrolle, da diese zu Reaktionen mit Proteinen fähig sind [Presle et al., 1996; Terrier et al., 1999].

Teilweise wurde während der Vorinkubation der Testsubstanz mit den MTP eine Zunahme der Trübung beobachtet, die vermutlich auf zu hohe GTP-Restkonzentrationen, welche bei der Tubulin-Präparation nicht entfernt wurden, zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu den ersten beiden Polymerisationszyklen eine dritte Polymerisation durchgeführt. Die Polymerisation der MTP zu Mikrotubuli wurde nach Vorinkubation für 20 min bei Raumtemperatur durch Zugabe von GTP gestartet.

Die Curcuminoid-Derivate mit intaktem konjugiertem Doppelbindungssystem wiesen bei der Wellenlänge von 350 nm, bei der die Trübungsmessung stattfand, eine Eigenabsorption auf. Um diese zu korrigieren wurde parallel eine Curcuminoid-Probe in Abwesenheit von GTP inkubiert und damit die Vergleichbarkeit der graphisch dargestellten Polymerisationskurven für verschiedene Substanzen gewährleistet. Eine repräsentative Polymerisationskurve ist in Abbildung 36 beispielhaft für CUR und das CUR-Glucuronid dargestellt.



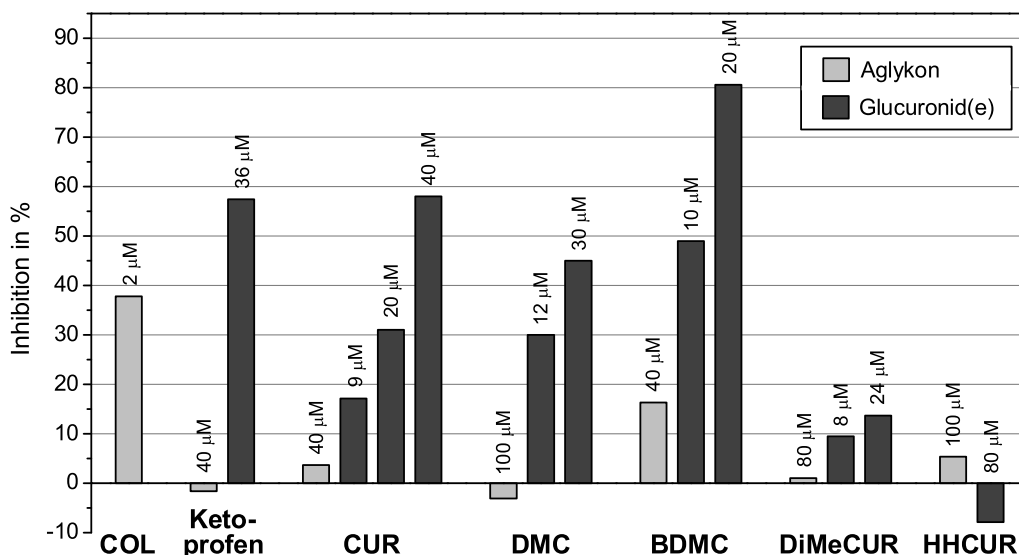
**Abbildung 36:** Polymerisationskurve der Mikrotubuli im zellfreien System in Anwesenheit von CUR (40 µM) bzw. CUR-Glucuronid (40 µM). Dargestellt ist der zweite und dritte Polymerisationszyklus bei 35°C für 30 min. Die Depolymerisation erfolgte bei 4°C für 30 min.

Beide Polymerisationszyklen zeigen, dass durch Vorinkubation mit 40 µM CUR-Glucuronid die Polymerisation zu Mikrotubuli gehemmt wurde. Relativ zur DMSO-Kontrolle betrug die Hemmung durch das CUR-Glucuronid im Mittel 58% und lag damit im Bereich der Ketoprofen-Acylglucuronide, die bei einer Endkonzentration von 36 µM zu einer Hemmung von 57% relativ zur Kontrolle führten. 40 µM freies CUR hingegen hatte, ebenso wie unkon-

jugiertes Ketoprofen, keinen Effekt auf die Polymerisation. Ebenso beeinflusste die doppelte CUR-Konzentration die Mikrotubuli-Bildung nicht (s. Anhang A.6.2).

Die Effekte weiterer Curcuminoid-Muttersubstanzen und ihrer respektiven Glucuronide auf die Mikrotubuli-Polymerisation sind in Abbildung 37 zusammengefasst. Die Messungenauigkeiten bei der Bestimmung der Trübung können bis zu 10% betragen, so dass Inhibitionen <10% nicht signifikant sind und teilweise negative Werte resultieren. Die detaillierten Polymerisationskurven befinden sich im Anhang (s. Kap. A.6).

Jedes der getesteten Glucuronide, mit Ausnahme des phenolischen Hexahydro-CUR-Glucuronids, war in der Lage die Mikrotubuli-Polymerisation zu inhibieren. Der Hemmeffekt war konzentrationsabhängig. Die verbleibende Polymerisation war bei allen potenten Glucuroniden in der Kälte nahezu reversibel. Die beiden aliphatischen Glucuronide der demethoxylierten CUR-Kongeneren Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR zeigten ebenso wie CUR eine konzentrationsabhängige Inhibition der Mikrotubuli-Bildung. Ein besonders hohes Potential zur Hemmung besaß das äußerst instabile Glucuronid von Bisdemethoxy-CUR (Kap. 3.8.1). Bereits eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  dieses Glucuronids führte zu einer 50%igen Inhibition der Tubulin-Polymerisation relativ zur DMSO-Kontrolle. Für das Aglykon ergab sich ebenfalls ein Effekt, da jedoch bei der doppelten Konzentration an Bisdemethoxy-CUR keine Steigerung der Inhibition zu beobachten war (s. Anhang A.6.4) und die Methode einen relativ großen Schwankungsbereich aufweist, handelt es sich vermutlich eher um eine Messungenauigkeit als um eine tatsächliche Inhibition.



**Abbildung 37:** Mittlere Hemmung der Mikrotubuli-Polymerisation durch verschiedene Curcuminoid- und Curcuminoid-Glucuronide relativ zur DMSO-Kontrolle (100% Polymerisation). COL, Colchicin; DMC, Demethoxy-CUR; BDMC, Bisdemethoxy-CUR; DiMeCUR, Dimethyl-CUR; HHCUR, Hexahydro-CUR.

Obwohl Dimethyl-CUR als schlechtes UGT-Substrat nicht vollständig zum enolischen Glucuronid umgesetzt werden konnte (max. 40% Umsatz), war der inhibitorische Effekt dem Glucuronid und nicht dem Aglykon zuzuschreiben, da höhere Konzentrationen von freiem Dimethyl-CUR (80  $\mu\text{M}$ ), als sie in der Glucuronid-Lösung vorhanden waren, die Polymerisation nicht beeinflussten (s. Anhang A.6.5).

Im Vergleich zu den Glucuroniden zeigten die Muttersubstanzen sowie das phenolische Glucuronid des reduktiven CUR-Metaboliten Hexahydro-CUR bei gleicher oder höherer Konzentration keine Interaktion mit der Polymerisation bzw. Depolymerisation der MTP zu Mikrotubuli. Desweiteren wurden die beiden CUR-Abbauprodukte Vanillin und Ferulasäure (200  $\mu\text{M}$ ) im Polymerisationsassay getestet. Eine Hemmung durch diese Substanzen wurde nicht festgestellt (Daten nicht dargestellt).

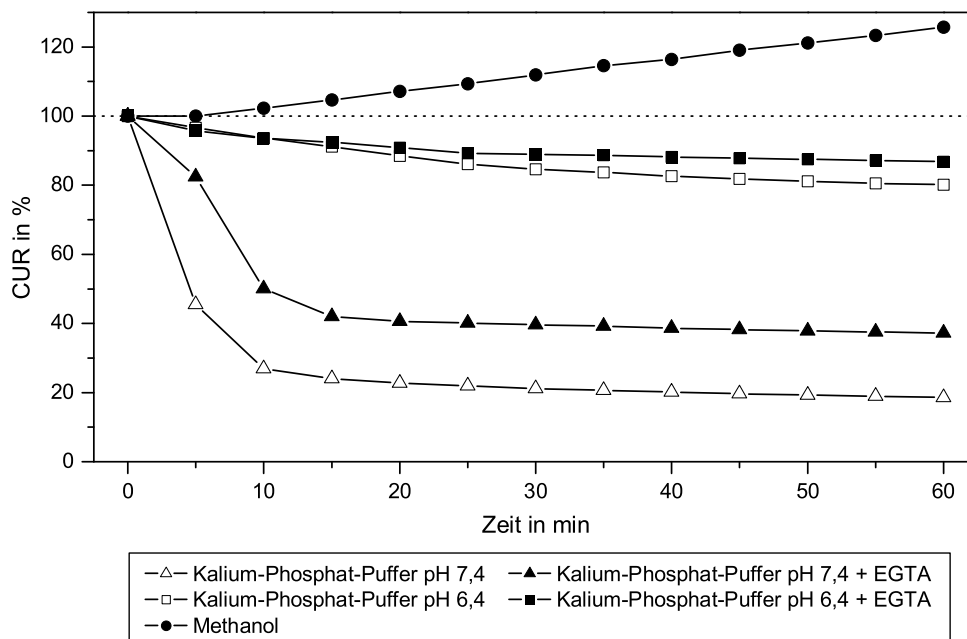
Die Glucuronidierung von Curcuminoid-Derivaten mit intaktem Doppelbindungssystem zu enolischen Konjugaten stellt offensichtlich eine Aktivierung dar. Diese Glucuronide waren damit in der Lage, durch Reaktion mit nukleophilen funktionellen Gruppen der MTP, diese Proteine zu verändern. Die Instabilität und Reaktivität von freien ungesättigten Curcuminoid-Derivaten reichte im Gegensatz dazu nicht aus, um die Polymerisation von MTP zu Mikrotubuli zu hemmen. Das stabile Hexahydro-CUR war in freier und konjugierter Form nicht reaktiv.

#### 3.8.3 Beeinflussung der CUR-Stabilität durch Bestandteile des Polymerisationsansatzes

Bei der Durchführung des Polymerisationsassays war außergewöhnlich, dass die Eigenabsorption der Curcuminoid-Derivate sich während der gesamten Versuchsdauer nicht änderte und die Substanzen damit in diesem Testsystem stabil erschienen. Da die Art der Puffersubstanz (Phosphat- oder MES-Puffer) keinen merklichen Effekt auf die Instabilität von CUR in Puffer hatte, wurde am Beispiel von CUR der Einfluß des pH-Wertes und des REA-Pufferzusatzes EGTA in Kalium-Phosphat-Puffer auf den Substanzzerfall untersucht. Die Absorption von CUR wurde photometrisch bei 420 nm über einen Zeitraum von 60 min bei 37°C bestimmt. Als Vergleichslösung diente eine methanolische CUR-Lösung, da CUR in diesem Medium chemisch stabil ist (Abb. 38).

Eine starke Reduktion des rapiden CUR-Zerfalls in Puffer ohne Zusätze (ca. Faktor 4) fand bereits bei Erniedrigung des neutralen pH-Werts um eine pH-Wert-Einheit statt. Diese Beobachtung stand im Einklang mit Angaben anderer Autoren [Tønnesen und Karlsen, 1985b; Wang et al., 1997]. Durch Zusatz des Komplexbildners EGTA wurde dieser stabilisierende Effekt weiter verstärkt. Im Gegensatz zu den Substanzverlusten in den wässrigen Lösungen, war in Methanol eine Aufkonzentrierung zu erkennen, die durch das zeitabhängige Verdampfen dieses leicht flüchtigen Lösungsmittels bedingt war.

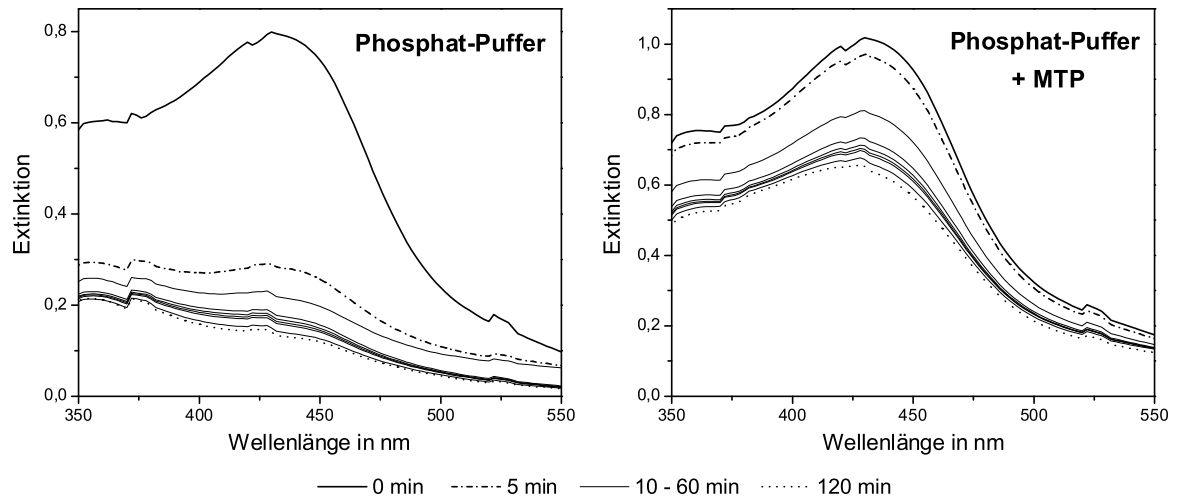




**Abbildung 38:** Zeitabhängige CUR-Verluste in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 und pH 6,4 in Ab- und Anwesenheit von EGTA. Die CUR-Ausgangskonzentration betrug 30  $\mu$ M. Methanol repräsentiert ein Medium in dem CUR nicht zerfällt.

Da der pH-Wert von 6,4 und der EGTA-Zusatz den Zerfall von CUR nicht vollständig verhinderten, wurde weiterhin der Effekt der MTP auf die chemische Stabilität von CUR untersucht. Dazu wurde Kalium-Phosphat-Puffer mit MTP (0,2 mg/ml) versetzt und das Absorptionsspektrum im Bereich von 350-550 nm über 2 h bei 37°C aufgenommen (Abb. 39).

Die Anwesenheit der MTP führte zu einer deutlichen Stabilisierung von CUR. Im Gegensatz zu reinem Puffer, in dem nach 5 min bereits über 60% des CUR nicht mehr nachweisbar waren, waren in Anwesenheit von MTP nach 2 h noch ca. 65% der Ausgangsmenge vorhanden. Es ist bekannt, dass CUR mit Proteinen wie z.B. Serumalbumin interagieren kann und dies einen stabilisierenden Effekt auf CUR ausübt [Barik et al., 2003; Pulla Reddy et al., 1999; Zsila et al., 2003a]. Analoge Untersuchungen mit Rinderserumalbumin (BSA) zeigten, dass eine Reduktion des CUR-Verlustes auch mit 1 mg/ml BSA möglich war, aber nicht in dem Ausmaß wie mit 0,2 mg/ml MTP (Daten nicht dargestellt). Die MTP scheinen damit ein größeres Potential für die Stabilisierung von Curcuminoiden zu besitzen als Serumproteine.



**Abbildung 39:** Überlagerte UV/Vis-Spektren einer 30  $\mu\text{M}$  CUR-Lösung in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 in Ab- und Anwesenheit von 0,2 mg/ml MTP bei 37°C. Die Aufnahme erfolgte nach 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 60 min und 120 min.

Die chemische Stabilität der Curcuminoide während der Durchführung des Polymerisationsassays beruhte damit auf einer kombinatorischen Wirkung von schwach saurem Milieu und den stabilisierenden Effekten von EGTA und MTP.

## 4 Diskussion

### 4.1 Stabilität von Curcuminoiden

In allen *in vitro*-Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde die Instabilität der Curcuminoiden unter physiologischen Bedingungen deutlich. Bei den näheren Untersuchungen zur Stabilität der Curcuminoiden in verschiedenen physiologischen Flüssigkeiten wurde erstmalig ein Vergleich zwischen der chemischen Stabilität von CUR und den beiden Demethoxy-Analoga Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR sowie seinen reduktiven Metaboliten Hexahydro-CUR und Tetrahydro-CUR gezogen. Die reduzierten Verbindungen waren in allen Testsystemen – auch bei den Metabolismusuntersuchungen – chemisch stabil, im Gegensatz zu den drei Curcuminoiden unter denen Bisdemethoxy-CUR (keine Methoxygruppe) eine höhere Stabilität als Demethoxy-CUR (eine Methoxygruppe) und CUR (zwei Methoxygruppen) aufwies (Abb. 15). Diese Tendenz ist auch bei der zeitabhängigen Inkubation verschiedener Curcuminoid-Mischungen in Kulturmedium zu beobachten [Pfeiffer et al., 2003]. Zudem beschreiben Price und Buescher [1997] die unterschiedliche Stabilität der drei Curcuminoiden in alkalischen Pufferlösungen (pH 7,5-13). Offensichtlich reduziert die Anwesenheit von Methoxygruppen die Stabilität der Curcuminoiden. Über 95% des CUR (30  $\mu\text{M}$ ) war nach einstündiger Inkubation in Phosphat-Puffer bei 37°C zerfallen. Vom spontanen zeit- und pH-abhängigen Zerfall berichten auch Wang et al. [1997], die bereits nach 30-minütiger Inkubation von 100  $\mu\text{M}$  CUR bei 37°C in Phosphat-Puffer pH 7,2 weniger als 10% CUR nachwies. Solche hohen Verluste fanden Oetari et al. [1996] bereits nach 10 min mit 25  $\mu\text{M}$  CUR in Phosphat-Puffer pH 7,4 bei Raumtemperatur.

Die instabilen Curcuminoiden waren in Anwesenheit von FKS oder Zellen im Kulturmedium stabiler als in serumfreiem Medium. Einen solchen stabilisierenden Effekt beobachteten Wang et al. [1997] für CUR zusätzlich durch humanes Serum. Eine weitere Studie [Oetari et al., 1996] beschreibt die Reduktion des CUR-Zerfalls in Puffer durch Zusatz von Cytosol oder Mikrosomen aus Rattenleber. Dieser Effekt konnte auch bei den Umsetzungen mit Zellfraktionen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, beobachtet werden (Tab. 14). Die instabilen Curcuminoiden sind offenbar zur Interaktion mit Protein- und/oder Membranstrukturen fähig, aus der eine Stabilisierung resultiert. Zur gleichen Schlussfolgerung kam Tønnesen [1992], die bei *in vitro*-Experimenten, Interaktionen von CUR mit biologischen Makromolekülen, wie z.B. Serumproteinen, Albumin oder Hyaluronsäure, beobachtete.

Da die Zerfallsprodukte von CUR bei einer Wellenlänge von 280 nm erfasst wurden, war der Zerfall mit einer Zerstörung des konjugierten Diarylheptanoid-Chromophors von CUR verbunden. Außer den bekannten Zerfallsprodukten Vanillin, Ferulasäure und Feruloylmethan wurde eine Anzahl weiterer Zerfallsprodukte von CUR beobachtet. Es wurde ausgeschlossen, dass es sich bei diesen Verbindungen um Zerfallsprodukte wie z.B. Ferulaaldehyd oder Vanillinsäure, die bei der Photooxidation von CUR gebildet werden [Khurana und Ho, 1988;

Tønnesen et al., 1986], handelt. Die Struktur weiterer Zerfallsprodukte konnte mit Hilfe der GC/MS nicht aufgeklärt werden. Es wird vermutet, dass es sich bei diesen Produkten zum Teil um instabile Intermediate handelt, die die Aufarbeitung (Extraktion und Evaporation) nicht intakt überstehen, diese Verbindungen thermolabil sind oder aufgrund ihrer Struktur (z.B. Kettenbruchstücke) nicht derivatisiert werden können und deshalb nicht gaschromatographierbar sind. Da beim CUR-Zerfall reaktive Substanzen wie Aldehyde und Ketone entstehen können, besteht zudem die Möglichkeit, dass Dimere oder höhere Oligomere sowie Kondensationsprodukte gebildet werden. Das Auftreten von Kondensationsprodukten von Feruloylmethan aus dem CUR-Zerfall wurde in alkalischer Lösung beobachtet [Tønnesen und Karlsen, 1985a]. Desweiteren ist die Bildung eines CUR-Dimers mit intakter Chromophorstruktur über einen radikalischen Mechanismus beschrieben [Masuda et al., 1999]. Aufgrund der Absorption dieser Verbindungen im sichtbaren Bereich, können diese Substanzen als mögliche Zersetzungsprodukte ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die höhere chemische Stabilität der synthetischen CUR-Derivate Iso-CUR und Dimethyl-CUR sowie ihrer Glucuronide, im Vergleich zu CUR bzw. CUR-Glucuronid, hängt mit der chemischen Struktur zusammen. Das Fehlen der para-ständigen Hydroxylgruppen führt zu einer geringeren Delokalisierung der Elektronen über das konjugierte Doppelbindungssystem, da die Mesomeriestabilisierung der para-ständigen Hydroxylgruppen mit dem Keto-Enol-Strukturelement nicht mehr möglich ist.

Die Kenntnis über die chemische Instabilität der Curcuminoiden unter *in vitro*-Bedingungen ist insbesondere bei der Beurteilung biologischer Effekte relevant. Es ist nicht auszuschließen, dass der hervorgerufene Effekt, der z.B. dem CUR zugeschrieben wird, nicht durch seine Zerfallsprodukte moduliert wird (s. Kap. 4.6).

## 4.2 Metabolismus von Curcuminoiden in Präzisions-Leberschnitten und Zellfraktionen

### 4.2.1 Phase I-Metabolismus von CUR

Die Untersuchung des CUR-Metabolismus in Präzisions-Leberschnitten von männlichen und weiblichen Sprague-Dawley-Ratten und mit hepatischen Mikrosomen und Cytosol hat frühere Befunde anderer Laboratorien [Holder et al., 1978; Ireson et al., 2001, 2002; Pan et al., 1999] bestätigt, dass die sukzessive Reduktion des aliphatischen Molekülteils von CUR der einzige Weg der Phase I-Metabolisierung ist. Es wurden keine Hinweise auf die Bildung von Hydroxylierungs- bzw. Demethylierungsprodukten von CUR in den Experimenten erhalten. Obwohl keine Referenzsubstanzen für solche oxidativen CUR-Metaboliten zur Verfügung standen, hätten diese aufgrund ihrer mutmaßlich ähnlichen Absorption wie CUR und anhand ihrer erwarteten verkürzten Retentionszeiten auf der Reversed Phase-Säule mit dem verwendeten HPLC/DAD-System detektiert werden können. Der dominante Metabolit in Leberschnitt-

ten und mit Lebercytosol war Hexahydro-CUR, der zusammen mit geringeren Mengen an Tetrahydro-CUR und Octahydro-CUR auftrat. Dies stimmt mit einer Studie von Holder et al. [1978] überein, die Glucuronide von Hexahydro-CUR und Tetrahydro-CUR als die vorherrschenden biliären Metaboliten nach intravenöser Injektion von Tritium-markiertem CUR in männliche Sprague-Dawley-Ratten beschreibt. Nach intraperitonealer Injektion von CUR in weibliche BALB/c-Mäuse waren Glucuronide von Tetrahydro-CUR und Dihydro-CUR die überwiegenden Phase I-Metaboliten im Plasma [Pan et al., 1999]. Ireson et al. [2001] berichteten, dass CUR zu Hexahydro-CUR und Octahydro-CUR in Hepatocyten von männlichen und weiblichen Fischer 344-Ratten metabolisiert wird.

Ein eindeutiger Unterschied zwischen den Geschlechtern war bei der Reduktion von CUR zu erkennen: Während Hexahydro-CUR der Hauptmetabolit bei männlichen und weiblichen Ratten war, bildeten männliche Ratten immer mehr Octahydro-CUR und weniger Tetrahydro-CUR als weibliche Ratten. Dieser Unterschied beruht möglicherweise auf einer geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Ausstattung an den für die Reduktion verantwortlichen Enzymen und/oder auf geschlechtsspezifisch unterschiedlichen Aktivitäten dieser Enzyme. Bisher ist weitgehend ungeklärt, welche Enzyme für die Reduktion von CUR verantwortlich sind. Es gibt Hinweise, dass cytosolische Proteine, u.a. Alkoholdehydrogenase beteiligt sind [Ireson et al., 2002]. Eventuelle Auswirkungen dieser ungleichen Metabolisierung können nicht eingeschätzt werden, da die biologischen Wirkungen der Phase I-Metaboliten von CUR unzureichend geklärt sind (s. Kap. 4.6).

Das metabolische als auch das synthetische Octahydro-CUR setzte sich aus zwei Isomeren mit identischen UV/Vis-Spektren und GC-Massenspektren zusammen, die als Diastereomere angesehen wurden, da diese aufgrund der beiden neu entstandenen Chiralitätszentren in der aliphatischen Kette von CUR möglich sind. Zwei Isomere mit übereinstimmenden UV/Vis-Spektren wurden auch für Dihydro-CUR beobachtet; in diesem Fall ist es wahrscheinlich, dass diese aus der Reduktion verschiedener olefinischer Doppelbindungen resultieren, beispielsweise der allylischen oder der enolischen Doppelbindung von CUR.

### 4.2.2 Phase II-Metabolismus von CUR

Zusätzlich zur Reduktion unterlagen CUR und seine reduktiven Metaboliten der Konjugation mit Glucuronsäure und Sulfat in Leberschnitten. Die Bildung solcher Konjugate wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, z.B. von Asai und Miyazawa [2000] im Plasma von Ratten, sowie von Ireson et al. [2001] in Ratten-Hepatocyten *in vitro* und in Ratten *in vivo*, von Holder et al. [1978] in der Galle von Ratten mit gelegtem Gallengang und von Pan et al. [1999] im Blutplasma von Mäusen. Die Art der Konjugation wurde meist durch Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase oder Sulfatase nachgewiesen. In einigen Fällen wurden Massenspektren der Glucuronide und Sulfate mittels LC/MS bzw. LC/MS/MS erhalten [Ireson et al., 2001, 2002; Pan et al., 1999].

Anders als in den Leberschnitten wurde die Sulfatierung von CUR bei Verwendung von Lebercytosol männlicher Sprague-Dawley-Ratten nicht beobachtet. Die Bildung von CUR-Sulfat wurde jedoch *in vitro* mit hepatischem und intestinalem Cytosol von männlichen F344-Ratten sowie mit humanem hepatischem und intestinalem Cytosol und mit rekombinanten Phenol-Sulfotransferasen (SULT1A1, SULT1A3) nachgewiesen [Ireson et al., 2002]. Auch *in vivo* wurde beim Menschen nach oraler Verabreichung CUR-Sulfat in geringen Mengen im Blut und im Urin mittels LC/MS nachgewiesen [Garcea et al., 2004; Sharma et al., 2004]. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die Sulfatierung von Hexahydro-CUR mit Rattenlebercytosol und in den Leberschnitten nachgewiesen. Die Entstehung von Hexahydro-CUR-Sulfat ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Allerdings ist beispielsweise bekannt, dass die Sulfatierung von Ferulasäure, einem Abbauprodukt von CUR, in der Ratte den Hauptausscheidungsweg darstellt [Rondini et al., 2002].

Neben der Bildung von Monokonjugaten wurden im Plasma von Ratten nach oraler Verabreichung auch Sulfoglucuronide von CUR gefunden [Asai und Miyazawa, 2000; Ireson et al., 2001]. Hinweise auf die Bildung solcher gemischten Konjugate gab es in den Leberschnitten anstatt für CUR, für den reduktiven Hauptmetabolit Hexahydro-CUR. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund liefert die geringere chemische Stabilität von CUR im Vergleich zu Hexahydro-CUR (Abb. 15).

Die Analyse der Kulturmedien auf Konjugate erfolgte zuerst nach enzymatischer Spaltung mit einem  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase-Gemisch aus *Helix pomatia* für 16 h bei 37°C (Kap. 6.2.5.3, Methode I). Mit dieser etablierten Hydrolysemethode wurden ausschließlich Konjugate der reduktiven Curcuminoid-Metaboliten in hohem Ausmaß nachgewiesen. Der Nachweis von Curcuminoid-Konjugaten war nicht möglich, obwohl verschiedene Arbeitsgruppen über die Bildung von CUR-Glucuroniden und Sulfaten berichten [Asai und Miyazawa, 2000; Ireson et al., 2001, 2002; Pan et al., 1999]. Um eine detaillierte Analyse der Konjugate vorzunehmen, wurde eine separate Hydrolyse der Glucuronide und Sulfate durch den Einsatz von  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase mit einer verkürzten Inkubationszeit von 2 h (Kap. 6.2.5.3, Methode II) durchgeführt. Signifikante Mengen an Glucuroniden und Sulfaten der reduktiven Metaboliten sowie CUR-Glucuronide und Sulfate wurden unter diesen Bedingungen nachgewiesen (Abb. 22). Diese Diskrepanz beruht hauptsächlich auf der chemischen Instabilität von CUR (Kap. 3.2). Offensichtlich war nach 16-stündiger Inkubation das aus den Glucuronsäure- und Sulfat-Konjugaten freigesetzte CUR bereits wieder vollständig zerfallen, während dieser Abbau nach 2 h noch nicht stattgefunden hatte. Dieser Befund wird durch ähnliche Beobachtungen von Asai und Miyazawa [2000] gestützt, die Curcuminoid-Verluste von bis zu 30%, während einer maximalen enzymatischen Hydrolysedauer von 4 h, beschreiben. Im Gegensatz zu CUR, wurden von den reduktiven Metaboliten ähnliche Mengen an Konjugaten nach 16-stündiger und nach 2-stündiger Hydrolyse gefunden, was auf eine höhere Stabilität der reduktiven Metaboliten hinweist und damit in Einklang mit den Befunden der separaten Untersuchungen zur Stabilität (Abb. 15) steht. Pan et al. [1999] berichten, dass

Tetrahydro-CUR im Vergleich zu CUR in Puffer deutlich stabiler ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die weitverbreitete Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* nicht für jedes Substrat eignet.

### 4.2.3 Metabolismus von Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR

Gegenwärtig existieren in der Literatur keine Berichte über den Phase I-Metabolismus von Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR, die in kommerziellen Curcuma-Präparaten bis zu 30% ausmachen können. Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig, dass diese Curcuminoiden dem gleichen Schicksal wie CUR unterliegen: Es wurden keine oxidativen Metaboliten beobachtet und das Muster der reduktiven Produkte war dem von CUR sehr ähnlich. Für die reduktiven Hauptmetaboliten von Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR lieferten die nach GC/MS-Analyse der trimethylsilylierten Verbindungen erhaltenen EI-Massenspektren charakteristische Merkmale, die für die eindeutige Identifizierung geeignet waren (Anhang A.3, Tab. 20).

## 4.3 Glucuronidierung von Curcuminoiden

### 4.3.1 Allgemeine Merkmale

Bei der Etablierung und Optimierung des Glucuronidierungsassays zeigte sich, dass der Einsatz von Alamethicin zur Reduktion der Latenz der UGTs für die Glucuronidierung der Curcuminoiden essentiell war. Ohne Alamethicin war z.T. kein Umsatz nachweisbar und die Anreicherung der Curcuminoid-Glucuronide, die für den Einsatz im Mikrotubuli-Polymerisationsassay notwendig war, wäre nicht möglich gewesen.

Insbesondere CUR erwies sich als gutes Substrat für die Glucuronidierung *in vitro*. Eine effiziente Glucuronidierung von CUR ist auch *in vivo* vorstellbar, da durch die hohe Lipidlöslichkeit von CUR möglicherweise die Penetration des Curcuminoids durch die ER-Membran und damit der Zugang zur Substrat-Bindungsstelle, im Vergleich zu weniger lipophilen UGT-Substraten, erleichtert ist.

Die Glucuronidierung ist ein metabolischer Schlüsselprozess, der darauf ausgelegt ist, endogene und exogene Substanzen aus dem Körper zu eliminieren. Die Aufgabe der UGTs ist es, unpolare und lipidlösliche Substanzen in wasserlösliche Verbindungen umzuwandeln, um eine anschließende Eliminierung über den Urin oder die Galle zu ermöglichen. Bei CUR führt dieser Prozess jedoch hauptsächlich zur Bildung eines Glucuronids mit lipophilem Charakter. Dieses Glucuronid zeichnet sich dadurch aus, dass es unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) teilweise und aus saurem Milieu (pH 1,8) vollständig in den organischen Extrakt überführt wird. Weshalb die Konjugation der Curcuminoiden mit Glucuronsäure nicht zu einer ausreichenden Polaritätssteigerung führt, lässt sich anhand der chemischen Struktur des

Curcuminoid-Moleküls nicht erklären. Möglicherweise hängt die Extrahierbarkeit der Glucuronide mit der Art der Konjugation (phenolisch oder aliphatisch) zusammen. Beispielsweise ist das phenolische Hexahydro-CUR-Glucuronid schlecht extrahierbar, während das aliphatische Dimethyl-CUR-Glucuronid vollständig extrahierbar ist. Gleichermaßen unterscheiden sich die beiden CUR-Glucuronide in ihrer Extrahierbarkeit aus saurer Lösung: Das in geringen Mengen gebildete polarere CUR-Glucuronid ist im Gegensatz zum dominanten Glucuronid nicht extrahierbar. Dieser Aspekt führte in Verbindung mit der mittels Dimethyl-CUR nachgewiesenen Bildung aliphatischer Curcuminoid-Glucuronide und der vermuteten Interaktion des dominanten CUR-Glucuronids mit Membranen und/oder Proteinen dazu, dass das lipophile CUR-Glucuronid als enolisches Glucuronid angesehen wurde. Die eindeutige Aufklärung der chemischen Struktur der beiden CUR-Glucuronide steht jedoch noch aus.

Die verwendeten humanen Lebermikrosomen wurden aus der Leber eines Individuums gewonnen. Aufgrund der i.A. großen interindividuellen Variabilität der Enzymaktivitäten beim Menschen, wurde anhand der E2- und Propofol-Kontrollen sichergestellt, dass die untersuchte Leber repräsentativ war. Die katalytischen Aktivitäten der verwendeten Leber für die E2-Glucuronidierung ( $534 \pm 38$  pmol/min/mg Protein) lagen im Bereich publizierter Werte für Lebermikrosomen verschiedener Individuen ( $797 \pm 573$  pmol/min/mg Protein). Das Verhältnis des 3-HO- und 17-HO-E2-Glucuronids ähnelte ebenfalls den veröffentlichten Daten. Die Kinetik der 3-HO-Glucuronidierung von E2 folgte der üblichen Hill-Kinetik (Daten nicht dargestellt). Im Vergleich zum verwendeten Pool intestinaler humaner Mikrosomen war die Bildungsrate für das 3-HO-E2-Glucuronid in der humanen Leber, wie in der Literatur beschrieben, mehrfach niedriger [Fisher et al., 2000b]. Die Aktivität der humanen Lebermikrosomen für das spezifische Substrat Propofol lag ebenfalls in der für menschliche Leber üblichen Größenordnung ( $0,2$  nmol/min/mg Protein) [Ethell et al., 2001; Soars et al., 2001].

### 4.3.2 Einsatz von humanen rekombinanten UGTs

Die detaillierte Untersuchung der Glucuronidierung mit humanen rekombinanten UGT-Isoenzymen zeigte, dass die Konjugation von Curcuminoiden, ihren Hexahydro-Metaboliten sowie des synthetischen Derivats Dimethyl-CUR mit Glucuronsäure von mehreren Isoenzymen katalysiert wird. Curcuminoide stellen damit keine spezifischen Substrate für eine bestimmte humane Isoform dar. Eine Präferenz der wichtigsten Isoenzyme für die Bildung enolischer Glucuronide durch UGT1A1, 1A8 und 1A10 oder phenolischer Glucuronide durch UGT1A9 und 2B7 war jedoch zu erkennen.

Von humanem UGT1A9 ist bekannt, dass dieses Isoenzym bevorzugt die Glucuronidierung phenolischer OH-Gruppen sperriger Substrate katalysiert [Ebner und Burchell, 1993]. Dieses Isoenzym war hauptverantwortlich für die Bildung der phenolischen Glucuronide der Hexahydro-Metaboliten und besaß als einziges Isoenzym die Fähigkeit wesentliche Mengen des phenolischen Curcuminoid-Glucuronids neben dem aliphatischen Glucuronid zu bilden. Die



Bildung des phenolischen CUR-Glucuronids war in geringem Ausmaß auch in der humanen Leber möglich. Die geringe Aktivität der humanen Lebermikrosomen für dieses Glucuronid ist vermutlich auf die niedrige Expression von UGT1A9 in den hepatischen Mikrosomen zurückzuführen. Der Vergleich der Glucuronidierungsaktivitäten für Propofol, dem spezifischen Substrat von UGT1A9, in den humanen Lebermikrosomen und in den UGT1A9-exprimierenden Supersomen zeigt, dass Propofol von den humanen Lebermikrosomen ca. 12 Mal schlechter glucuronidiert wurde (HLM, 182 pmol/min/mg Protein; UGT1A9, 2263 pmol/min/mg Protein). Ähnliche Aktivitätsunterschiede zwischen humanen Lebermikrosomen und in V79-Zellen exprimiertem UGT1A9 beobachteten Ethell et al. [2001]. UGT1A9 wird außer in der Leber auch in vielen extrahepatischen Geweben exprimiert. Hohe mRNA-Level wurden in der humanen Niere mit bis zu dreimal höheren Gehalten als in der humanen Leber beobachtet [Ethell et al., 2001; Sutherland et al., 1993]. Obwohl die Bildung des polaren phenolischen Curcuminoid-Glucuronids in der humanen Leber eine untergeordnete Rolle spielt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Metabolit in der Niere des Menschen in bedeutenden Mengen gebildet wird.

#### 4.3.3 Kinetische Untersuchungen mit CUR

Die Bildung des dominanten CUR-Glucuronids folgte einer typischen Michaelis-Menten-Kinetik. Die kinetischen Parameter der Glucuronidierung mit humanen Lebermikrosomen und extrahepatischem UGT1A8 zeigten, dass hepatische als auch intestinale Glucuronyltransferasen hohe Affinitäten und Glucuronidierungskapazitäten für CUR aufweisen. In Übereinstimmung mit den Befunden dieser Arbeit beschreibt eine Studie [Basu et al., 2004a] mit Homogenaten von COS-1-Zellen, die mit der cDNA von UGT1A1, 1A7, 1A8 und 1A10 transfiziert wurden, für diese Isoenzyme des Gastrointestinaltrakts ebenfalls einen kinetischen Verlauf nach Michaelis-Menten. Jedoch wird im Vergleich zur vorliegenden Arbeit ( $K_m$ -Wert, 15  $\mu\text{M}$ ;  $V_{max}$ , 2486 pmol/min/mg Protein) von deutlich höheren  $K_m$ -Werten (100  $\mu\text{M}$ ) und einer signifikant geringeren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von nur 13 pmol/min/mg Protein für UGT1A8 berichtet. Diese Unterschiede beruhen vermutlich darauf, dass die Aktivität der COS-1-Zellen auf den Gesamtproteingehalt und im Falle der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Isoenzyme auf mikrosomales Protein bezogen wurde und könnten weiterhin das Ergebnis eines höheren Expressionslevels der UGTs in den Sf9-Zellen, als in den COS-1-Zellen, sein. Außerdem waren vermutlich niedrigere Nachweisgrenzen (0,5 pmol CUR) bei der verwendeten DAD-Detektion aufgrund des hohen Extinktionskoeffizienten von CUR möglich, als bei Dünnschichtchromatographie mit radioaktiv-markierten Substanzen.

Die CUR-Glucuronidierung mit humanen Lebermikrosomen läßt sich mit Hilfe der *in vitro* ermittelten kinetischen Parameter auf die gesamte Leber hochrechnen und liefert damit eine Einschätzung der Situation *in vivo*. Unter Einbezug der von Soars et al. [2002] publizierten Angaben, dass 45 mg mikrosomales Protein in einem Gramm Leber und 20 g Leber pro kg

Körpergewicht enthalten sind, berechnet sich die katalytische Effizienz der menschlichen Leber für CUR zu dem enormen Wert von 4,9 l/min/kg Körpergewicht. Die Clearance von CUR liegt unter dem *in vivo* beobachteten hepatischen Blutfluß, der mit 20 l/min/kg Körpergewicht limitiert ist [Fisher et al., 2001].

Ein Vergleich der kinetischen Parameter der CUR-Glucuronidierung durch humane Lebermikrosomen mit anderen Substraten ist aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen (insbesondere Vorbehandlung mit Alamethicin) und aufgrund der individuellen Unterschiede humaner Gewebeproben sehr problematisch. Dennoch zeigte die Recherche, dass solche hohen katalytischen Effizienzen, wie für CUR ermittelt, nicht zu finden waren. Sogar für das Breitbandssubstrat 4-Methylumbelliferon [Miners et al., 1988; Uchaipichat et al., 2004] oder auch für die dem aliphatischen CUR-Glucuronid strukturell verwandten Acylglucuronide von NSAIDs [King et al., 2001; Kumar et al., 2002; Soars et al., 2001, 2002] lagen die Glucuronidierungseffizienzen bis zu einer Größenordnung niedriger.

Die extrem hohe Affinität (niedriger  $K_m$ -Wert) von UGTs für CUR führt zu der Schlussfolgerung, dass CUR mit der Glucuronidierung anderer UGT-Substrate interagieren kann und als bevorzugtes Substrat möglicherweise deren Glucuronidierung inhibiert. Eine reversible und konzentrationsabhängige Inhibition der UGT-Aktivität durch CUR für die Substrate Eugenol, Phloretin, Capsaicin, Epigallocatechin-3-*O*-Gallat, Bilirubin, Anthraflavinsäure und Mycophenolsäure wurde von Basu et al. [2003, 2004a,b,c], nach Behandlung von Kolon-Zellen mit CUR, *in vitro* aufgezeigt. Beispielsweise regulierte 50  $\mu$ M CUR die Glucuronidierung von Capsaicin um 50-90% innerhalb von 15 min in LS180- und HT29-Kolon-Zellen herunter, unter vollständiger Wiedergewinnung der Aktivität nach 24 h. Diese Beobachtungen im Zusammenhang mit der Kenntnis, dass CUR, wie in Kapitel 3.6 demonstriert, Substrat vieler UGT-Enzyme ist, bekräftigen die Vermutung, dass der Pflanzenstoff CUR die Aufnahme und Glucuronidierung von Substanzen mit unterschiedlichster chemischer Struktur beeinflussen kann. Eine verzögerte Ausscheidung von Substanzen, bei denen die Glucuronidierung als Entgiftungsreaktion notwendig ist, kann zu potentiellen toxischen Effekten führen. Beispielsweise kann die Hemmung der UGT1A1-vermittelten Glucuronidierung des endogenen Hämoglobin-Abbauprodukts Bilirubin zu Ikterus führen [Burchell et al., 2000]. Andererseits ist eine verbesserte Aufnahme und längere Präsenz im Organismus, insbesondere bei manchen Arzneimitteln erwünscht, um eine möglichst effektive und lang anhaltende Wirkung zu erzielen. Vom Effekt von CUR auf die therapeutische Wirkung von Mycophenolsäure, die als Immunsuppressivum Anwendung findet, wird in einer Studie [Basu et al., 2004b] berichtet. Demnach besitzt CUR das Potential die Glucuronidierung der Mycophenolsäure *in vitro* zu inhibieren und erhöht damit die Bioverfügbarkeit des freien Arzneimittels, wodurch die immunsuppressive Wirkung verstärkt wird. Zusätzlich wird die Entstehung des toxischen Acylglucuronids der Mycophenolsäure reduziert [Basu et al., 2004b]. Die Glucuronidierung von CUR und Mycophenolsäure wird hauptsächlich von den extrahepatischen humanen Isoenzymen UGT1A8 und 1A10 katalysiert. Diese Übereinstimmung, zusammen mit den in dieser Arbeit ermittelten kinetischen

Parametern der CUR-Glucuronidierung, deuten auf eine kompetitive Hemmung durch CUR als Mechanismus hin. Basu et al. [2004a] beobachteten bei der Inhibition der Capsaicin-Glucuronidierung mit CUR gleichzeitig eine zeitabhängige Zunahme des CUR-Glucuronids. Trotzdem erklärt diese Arbeitsgruppe [Basu et al., 2003] die Inhibition durch die Wirkung von CUR als Proteinkinase-Inhibitor [Chen und Huang, 1998], da eine Phosphorylierung für die UGT-Aktivität essentiell ist [Basu et al., 2005].

### 4.4 Hepatischer Curcuminoid-Metabolismus bei Ratte und Mensch

Die Untersuchung des reduktiven Curcuminoid-Metabolismus mit hepatischem Cytosol von Ratte und Mensch hat gezeigt, dass der Mensch die gleichen reduktiven Metaboliten wie die Ratte bildet. Bei der Kombination von hepatischer Reduktion und Glucuronidierung von CUR wurden für den Menschen ebenfalls keine anderen Metaboliten wie für die Ratte gefunden. Unterschiede zwischen den beiden Spezies waren jedoch bei genauerer Untersuchung der hepatischen Glucuronidierung mit Mikrosomen von Mensch und Ratte zu beobachten. Bei der Ratte ist eine Präferenz für die phenolische Glucuronidierung, also die Konjugation der Hexahydro-Produkte, sichtbar, die beim Menschen nicht auftritt.

Außerdem scheint die mikrosomal-vermittelte hepatische Reduktion von Hexahydro-CUR zu Octahydro-CUR der Ratte vom verwendeten Rattenstamm abzuhängen. Sprague-Dawley-Ratten sind nicht in der Lage diese Reduktion vorzunehmen, Wistar-Ratten hingegen sind potent. Ebenso beschreibt eine Studie mit Mikrosomen von F344-Ratten diesen Reaktionsschritt [Ireson et al., 2002].

### 4.5 Intestinaler Curcuminoid-Metabolismus und Bioverfügbarkeit

Der Dünndarm dient prinzipiell zur Resorption von Nährstoffen sowie nützlichen als auch potentiell schädlichen Xenobiotika, exprimiert aber auch metabolische Enzyme der Phase I und II sowie assoziierte Transporter, die in den Epithelzellen der Darmmukosa lokalisiert sind [Kaminsky und Zhang, 2003]. Studien aus den 70er und 80er Jahren [Ravindranath und Chandrasekhara, 1980; Wahlström und Blennow, 1978] berichten, dass nach oraler Gabe von CUR an Ratten 40-85% der Substanz unverändert über die Fäces ausgeschieden wurden. Zusätzlich deuten diese Studien darauf hin, dass eine Metabolisierung von CUR an der Darmmukosa stattfindet [Ravindranath und Chandrasekhara, 1980, 1981, 1982; Wahlström und Blennow, 1978]. Die Untersuchung des intestinalen Phase I-Metabolismus von CUR mit S9-Fraktion aus dem Dünndarm männlicher Sprague-Dawley-Ratten lieferte alle für die Leber beschriebenen reduktiven CUR-Metaboliten. Jedoch war das Ausmaß der intestinalen Reduktion geringer als in der Leber. Ireson et al. [2002] fanden mit intestinale Cytosol von männlichen F344-Ratten die beiden reduktiven Metaboliten Tetrahydro-CUR und Hexahydro-CUR.

Obwohl die Leber als Hauptmetabolisierungsorgan angesehen wird, demonstriert die Glucuronidierung von CUR mit S9-Fraktion aus Rattendarm, dass ferner der Darm im Curcuminoid-Metabolismus eine entscheidende Rolle spielt. Weitere Glucuronidierungen der drei Curcuminoiden sowie der Hexahydro-Produkte von CUR und Bisdemethoxy-CUR mit intestinalen Mikrosomen von Mensch, Ratte und Schwein waren stark ausgeprägt und bestätigen die wesentliche Bedeutung der intestinalen Mukosa. Ireson et al. [2002] wiesen in der oben erwähnten Studie mit intestinalen Ratten- und Human-Mikrosomen ebenfalls ein CUR-Glucuronid *in vitro* nach.

Während die intestinalen UGTs der Ratte die Bildung von Hexahydro-curcuminoid-Glucuroniden und Curcuminoid-Glucuroniden in vergleichbarem Ausmaß katalysieren, steht beim Mensch im Darm die Glucuronidierung der Curcuminoiden deutlich im Vordergrund. Im Vergleich zum Menschen wird damit die Curcuminoid-Glucuronidierung im Darm bei Verwendung von Rattenmikrosomen unterbewertet, so dass die Ratte als *in vitro*-Modell für die Gegebenheiten im humanen Organismus nicht geeignet ist. Es wurden Mikrosomen aus Schweinedünndarm hergestellt, unter der Annahme, dass das Schwein als Omnivor dem Menschen im Metabolismus nahe steht. Trotz deutlich geringerer Enzymaktivitäten ähnelte das Glucuronidierungsprofil des Schweinedünndarms dem des Menschen. Darmmikrosomen aus Schwein sind deshalb als *in vitro*-Modell für die Curcuminoid-Glucuronidierung geeignet und können humane Darmproben, die schwer zugänglich sind, substituieren. Der Einsatz von Schweinedarm als *in vitro*-System zur Untersuchung intestinaler Metabolismuswege ist in der Literatur nicht weit verbreitet, stellt aber möglicherweise auch für andere Pflanzeninhaltsstoffe ein nützliches Modell dar. Zwei ältere Quellen [Götze et al., 1971; Grube et al., 1971] berichten beispielsweise von der Bestimmung der E2-Glucuronidierungsaktivität und -kinetik mit Mikrosomen aus Schweinedünndarm. Die dem Menschen homologen UGTs des Schweins sind bisher noch nicht identifiziert.

Die detaillierte Untersuchung der Glucuronidierung der Curcuminoiden mit humanen rekombinanten Isoenzymen zeigte, dass hauptsächlich die intestinalen Isoformen UGT1A8 und 1A10 verantwortlich sind. Die signifikant höhere Glucuronidierungsaktivität des humanen Darms für die drei Curcuminoiden im Vergleich zur humanen Leber ist auf die Expression dieser beiden UGTs zurückzuführen, die vermutlich auch *in vivo* bedeutend sein könnten. UGT1A8 und 1A10 kommen ausschließlich in extrahepatischen Geweben vor, v.a. im Dün- und Dickdarm, werden in geringen Mengen aber z.B. auch im Esophagus exprimiert. Diese beiden Isoenzyme besitzen neben ihrer hohen Aktivität für Curcuminoiden, für eine Vielzahl anderer natürlich vorkommender und biologisch aktiver Verbindungen, wie Flavonoide, z.B. das Isoflavon Genistein, Anthrachinone oder Cumarine, wie z.B. Scopoletin, hohe Glucuronidierungseffizienzen [Cheng et al., 1999]. Dagegen ist die Curcuminoid-Glucuronidierung durch UGT1A1, welches das am stärksten exprimierte UGT im humanen Dünndarm mit höheren Aktivitäten als in der Leber darstellt [Fisher et al., 2000b], weniger bedeutend.

Die intestinale Mukosa repräsentiert den ersten Expositionsort für Xenobiotika und könnte im First-pass-Metabolismus von Curcuminoiden eine wichtige Rolle spielen. Über die reduktive Metabolisierungskapazität in der Darmmukosa ist wenig bekannt. In den Metabolismusuntersuchungen dieser Arbeit wurde im Falle von CUR gezeigt, dass bei der Ratte die Reduktion in der Leber effizienter abläuft als im Darm. Ireson et al. [2002] zeigten zudem, dass humanes intestinales Gewebe eine deutlich höhere reduktive Kapazität für CUR (Faktor 18) besitzt als das entsprechende Gewebe aus F344-Ratten. Desweiteren wurde für die Curcuminoide gezeigt, dass die Aktivität von Konjugationsenzymen im Darm, die der Leber sogar übertrifft. Die höchste intestinale Glucuronidierungskapazität wurde beim Menschen festgestellt. Diese Beobachtung impliziert, dass vor allem die intestinale Glucuronidierung einen großen Beitrag zum First-pass-Metabolismus der Curcuminoide leistet. Dass dem Intestinaltrakt eine bedeutendere Rolle im Metabolismus zukommt als der Leber, wurde bereits bei einigen Arzneimitteln festgestellt [Back und Rogers, 1987; Doherty und Pang, 1997; Hall et al., 1999b; Lin et al., 1999]. Angesichts der presystemischen Eliminierung durch die UGTs ist vermutlich die Bioverfügbarkeit von Curcuminoiden nach oraler Aufnahme reduziert.

Aufgrund der starken Metabolisierung der Curcuminoide an der intestinalen Mukosa, die insbesondere beim Menschen stark ausgeprägt zu sein scheint, ist anzunehmen, dass die antikanzerogene Wirkung, die dem CUR zugeschrieben wird, beim Menschen *in vivo* nach oraler Aufnahme auf den Gastrointestinaltrakt beschränkt bleibt, da nur lokal pharmakologisch effektive CUR-Konzentrationen erreicht werden können. Eine aktuelle Studie von Garcea et al. [2005] mit Darmkrebs-Patienten belegt diese Vermutung. Es wurde eine Verringerung von DNA-Addukten bei Konzentrationen von 8 nmol CUR/g kolorektalem Gewebe beobachtet, die nach einwöchiger oraler Gabe von täglich 3,6 g CUR erreicht wurde. Außerhalb des Darms waren nur unbedeutende CUR-Konzentrationen vorhanden.

Auf eine geringe systemische Bioverfügbarkeit von CUR nach oraler Verabreichung deuten derzeit auch die in klinischen Humanstudien [Cheng et al., 2001; Garcea et al., 2004, 2005; Ruffin et al., 2003; Sharma et al., 2001b, 2004; Shoba et al., 1998] festgestellten sehr geringen Konzentrationen von CUR und CUR-Konjugaten im Blut und Urin der Patienten hin. Die starke Metabolisierung, aber auch die chemische Instabilität von CUR, könnten den Misserfolg dieser Studien signifikante Mengen an CUR im Plasma und Urin der Patienten auch nach extrem hoher Dosierung nachzuweisen, zumindest teilweise erklären. Beispielsweise wurden nur maximale Konzentrationen von 1,8  $\mu\text{mol/l}$  CUR im Plasma nach oraler Gabe von 8 g CUR über drei Monate erreicht; im Urin konnte kein CUR detektiert werden [Cheng et al., 2001]. Nach täglichen oralen Dosen von 180 mg CUR an Darmkrebs-Patienten über vier Monate war kein CUR im Plasma oder Urin nachweisbar [Sharma et al., 2001b]. In einer weiteren Studie von Sharma et al. [2004] mit Darmkrebs-Patienten, denen täglich 3,6 g CUR über vier Monate verabreicht wurden, lagen die maximalen Plasmakonzentrationen bei 11, 16 und 9 nmol/l für CUR, CUR-Glucuronid bzw. CUR-Sulfat. Im Urin derselben Patienten lagen die höchsten Konzentrationen im Bereich von 1  $\mu\text{mol/l}$ , 500 und 40 nmol/l. Unter Berücksichtigung der in

der vorliegenden Arbeit beschriebenen höheren chemischen Stabilität der reduktiven CUR-Metaboliten, im Vergleich zu CUR, führt dies zu dem Schluss, dass sich die Glucuronide von Hexahydro-CUR und Octahydro-CUR als Marker für die systemische Bioverfügbarkeit von CUR in künftigen klinischen Studien eignen würden. Diese dominanten CUR-Metaboliten haben zudem den Vorteil, dass sie den extensiven Metabolismus von CUR berücksichtigen.

#### 4.6 Biologische Wirkungen der Metabolite und Zerfallsprodukte von CUR

In Anbetracht des Zerfalls von CUR in physiologischen Flüssigkeiten und des exzessiven Metabolismus sollte bedacht werden, dass die diversen biologischen Effekte möglicherweise nicht einzig und allein dem CUR zuzuschreiben sind, sondern teilweise durch Metaboliten und/oder Zerfallsprodukte von CUR vermittelt sein könnten. Obwohl sich unzählige Studien mit den positiven biologischen Effekten von CUR, im Speziellen im Hinblick auf eine potentielle antikanzerogene Wirkung beschäftigen (s. Kap. 1.1.4), wurden antiinflammatorische und antioxidative Effekte von reduktiven CUR-Metaboliten bisher nur in einigen wenigen Studien untersucht, die zudem z.T. kontroverse Befunde bezüglich der biologischen Funktion liefern.

Beispielsweise zeigten Pan et al. [2000], dass Tetrahydro-, Hexahydro- und Octahydro-CUR eine Hemmung der iNOS bewirken, welche bei Entzündungen induziert wird, jedoch mit schwächerem Effekt als CUR. Ähnliche Befunde lieferte eine Studie [Ireson et al., 2001], die die Inhibition der COX-2 untersuchte, wobei zusätzlich CUR-Sulfat erfasst wurde, ebenfalls mit geringerem Effekt als CUR. Huang et al. [1995] fanden, dass CUR und Demethoxy-CUR die TPA-induzierte Tumorpromotion stark inhibieren, während Tetrahydro-CUR weniger aktiv war. Hingegen zeigte die Untersuchung antioxidativer Effekte von Tetrahydro-CUR, dass dieser Metabolit *in vitro* ein größeres Potential zur Hemmung der Lipidperoxidation besitzt als CUR [Osawa et al., 1995; Sugiyama et al., 1996]. In Tierversuchen war nach oraler Verabreichung von Tetrahydro-CUR ebenfalls die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten inhibiert und Tetrahydro-CUR wurde im Serum und in der Leber hauptsächlich in Form von Glucuroniden und Sulfaten wiedergefunden [Naito et al., 2002; Okada et al., 2001]. Es wird deshalb vermutet, dass Tetrahydro-CUR ähnliche physiologische und pharmakologische Aktivitäten wie CUR *in vivo* besitzt und eine biologisch aktive Form der Muttersubstanz repräsentiert. Die Klärung, ob Curcuminoid-Glucuronide und Konjugate der Metaboliten, die *in vitro* und vermutlich auch *in vivo* die vorherrschenden Verbindungen darstellen, biologische Effekte aufweisen, steht bislang noch aus.

Bei der Frage der biologischen Aktivität von CUR ist es zudem erforderlich die Zerfallsprodukte von CUR, die unter physiologischen Bedingungen resultieren, in die Überlegungen einzubeziehen. Zum Beispiel stellt Vanillin ein bekanntes Antioxidans dar, das die Fähigkeit besitzt Superoxid- und Hydroxyl-Radikale einzufangen [Liu und Mori, 1993].

Eine endgültige Aussage über die pharmakologische Wirksamkeit von CUR ist aufgrund des unzureichenden Kenntnisstandes über potentielle Effekte der Metabolisierungs- und Zerfallsprodukte von CUR derzeit nicht möglich.

#### 4.7 Untersuchungen mit synthetischem Iso-CUR

Die Untersuchungen zur Stabilität haben gezeigt, dass das synthetische Derivat Iso-CUR in wässrigem Milieu signifikant stabiler ist als CUR, obwohl bei diesen beiden Kongeneren lediglich die zwei Substituenten der beiden aromatischen Ringe vertauscht sind (Abb. 1 und 14). Während CUR in den Rattenleberschnitten einem starken Metabolismus unterlag, wurde das synthetische Iso-CUR im selben System nicht metabolisiert. Jedoch zeigten Metabolismusstudien mit Cytosol und Mikrosomen, dass Iso-CUR analog zu CUR verstoffwechselt wird: Es werden reduktive Iso-CUR-Metaboliten sowie zwei Iso-CUR-Glucuronide gebildet. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch der reduktive Hauptmetabolit Hexahydro-iso-CUR glucuronidiert wird. Obwohl das dominante Iso-CUR-Glucuronid ähnliche Wechselwirkungen mit der stationären Phase bei der HPLC-Analyse sowie ein vergleichbares UV/Vis-Spektrum wie das dominante CUR-Glucuronid aufwies, ist dieses Glucuronid deutlich hydrophiler, d.h. aus saurer Lösung unvollständig extrahierbar und zusätzlich stabiler als das lipophile CUR-Glucuronid. Die erhöhte Stabilität von Iso-CUR und seinem Glucuronid unter physiologischen Bedingungen (Abb. 34) führt zu der Annahme, dass möglicherweise höhere Konzentrationen dieses synthetischen CUR-Derivats *in vivo* erreicht werden können und durch Substitution von CUR durch Iso-CUR die geringe Bioverfügbarkeit von CUR umgangen werden könnte. Als Maß für die Reaktivität gegenüber Proteinen läßt die höhere Stabilität des Iso-CUR-Glucuronids vermuten, dass dieser Metabolit wahrscheinlich unbedenklicher als das CUR-Glucuronid (s. Kap. 4.8) ist. Falls diese Annahme zutrifft, wäre es von Interesse, zu untersuchen, ob Iso-CUR ähnliche biologische Aktivitäten wie CUR besitzt. Möglicherweise stellt dieses stabilere und vermutlich weniger reaktive synthetische CUR-Kongener einen vielversprechenden Kandidaten für die Chemoprävention dar.

#### 4.8 Toxikologische Relevanz von Curcuminoid-Glucuroniden

Die Untersuchungen zur Interaktion von Curcuminoiden und Curcuminoid-Glucuroniden mit der Mikrotubuli-Polymerisation zeigen erstmals, dass die dominanten Glucuronide der drei natürlich vorkommenden Curcuminoiden CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR reaktive Verbindungen repräsentieren. Sie besitzen das Potential die Mikrotubuli-Bildung aus MTP im zellfreien System konzentrationsabhängig zu hemmen. Im Gegensatz dazu interagieren die Muttersubstanzen und das phenolische Hexahydro-CUR-Glucuronid nicht mit den MTP.

Für die Bildung von reaktiven Glucuroniden scheint das konjugierte Doppelbindungssystem, das durch die Substituenten der beiden Aromaten beeinflusst wird, eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies wird auch durch die unterschiedliche Stabilität der Glucuronide dieser Curcuminoid-Kongeneren gestützt. Im Fall von Dimethyl-CUR, dem die para-ständigen Hydroxylgruppen der Aromaten fehlen, können diese Elektronenpaare nicht mehr in das konjugierte Doppelbindungssystem miteinbezogen werden. Es wird vermutet, dass sich dadurch insgesamt die Reaktivität der Verbindung verringert.

Bei den dominanten Glucuroniden der Curcuminoide ist die Glucuronsäure an der enolischen Hydroxylgruppe lokalisiert, die eine vinyloge Carboxylsäurefunktion repräsentiert. Diese enolischen Glucuronide der Curcuminoide, nicht aber das phenolische Glucuronid des Metaboliten Hexahydro-CUR, ähneln damit strukturell den Acylglucuroniden klassischer NSAIDs, wie z.B. Ketoprofen, bei denen es sich um Carbonsäuren handelt. Acylglucuronide sind elektrophile Metabolite und besitzen eine intrinsische Reaktivität, die in spontanen Reaktionen resultieren kann und beispielsweise die Bildung kovalenter Proteinaddukte beinhaltet [Sallustio et al., 2000; Smith et al., 1990].

Die MTP sind als Zielproteine solcher Adduktbildungen beispielsweise für die Acylglucuronide der NSAIDs Zomepirac und Valproinsäure [Bailey et al., 1998; Cannell et al., 2002] beschrieben. Die MTP stellen die Hauptkomponenten der Mikrotubuli dar und bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (ca. 80%) und verschiedenen MAP (ca. 20%). Sowohl die Tubulin-Heterodimere als auch die MAP stellen Reaktionspartner für die Acylglucuronide von NSAIDs dar. Eine Arbeitsgruppe [Cannell et al., 2002] berichtet von der konzentrationsabhängigen Hemmung der Polymerisation von MTP aus Rinderhirn zu Mikrotubuli *in vitro* durch das Acylglucuronid des Antiepileptikums Valproinsäure, die vermutlich durch kovalente als auch durch reversible Bindungen, vordergründig mit den MAP, hervorgerufen wurde. Im gleichen zellfreien System wies diese Arbeitsgruppe weiterhin die konzentrationsabhängige Hemmung der Mikrotubuli-Bildung durch das Acylglucuronid des Schmerzmittels Zomepirac und die damit verbundene kovalente Adduktbildung mit den MTP nach. Zudem wurde *in vivo* im Lebercytosol von Ratten eine durch das Acylglucuronid von Zomepirac vermittelte Modifikation von Tubulin nach oraler Verabreichung von Zomepirac gefunden [Bailey et al., 1998].

Der Auf- und Abbauprozess der Mikrotubuli ist für viele zelluläre Funktionen essentiell, wie z.B. den Erhalt der Zell-Konformation und Motilität und ist insbesondere bei der Mitose für die Ausbildung der Mitosespindel wichtig. Ein Eingriff in die Mitose wurde bei der Inkubation von humanen MCF-7-Brustkrebszellen mit CUR in Zellkultur beobachtet, der auf einer gestörten Ausbildung der Mitosespindel beruhte und mit der Induktion von Mikrokernen verbunden war [Holy, 2002]. Aufgrund der nachgewiesenen Reaktivität des CUR-Glucuronids, nicht aber von freiem CUR, gegenüber MTP, besteht die Möglichkeit, dass ein solcher Effekt nicht auf unverändertes CUR, sondern auf den glucuronidierten Metabolit zurückzuführen ist, da MCF-7-Zellen UGTs exprimieren [Adams et al., 1989]. Desweiteren sind die Mikrotubuli



am trans- und intrahepatischen Transport vieler Biomoleküle (z.B. Gallensäuren, Bilirubin-Glucuronid) involviert [Andreini et al., 1994; Crawford und Gollan, 1988]. Möglicherweise besteht zwischen manchen Aspekten der Toxizität von NSAIDs und der Störung der Mikrotubuli ein Zusammenhang.

Die Hemmung der Mikrotubuli-Polymerisation kann durch eine nicht-kovalente (z.B. Colchicin, Taxol) [Wallin et al., 1988] oder eine kovalente Bindung (z.B. Thiocyanat) [Bai et al., 1989] hervorgerufen werden. Für die Acylglucuronide von NSAIDs wird überwiegend von kovalenten Bindungen mit den MTP berichtet [Bailey et al., 1998; Cannell et al., 2002]. Die durch Acylglucuronide vermittelte Bildung eines Proteinadduktes verläuft für das intakte Acylglucuronid meistens über eine direkte Transacylierung des Proteins unter Freisetzung der Glucuronsäure (Abb. 11). Aber auch ein Glycierungsmechanismus ist möglich, der durch die spontane Isomerisierung des Acylglucuronids unter physiologischen Bedingungen ermöglicht wird und zur Bildung eines Imins führt, wobei die Glucuronsäure im Addukt verbleibt (Abb. 13).

Die Reaktion der elektrophilen Acylglucuronide findet an nukleophilen Stellen des Proteins, bevorzugt mit der  $\varepsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten bzw. terminalen Aminogruppen oder auch mit Tyrosin- und Cysteinresten, statt [Kretz-Rommel und Boelsterli, 1993; Presle et al., 1996; Smith et al., 1990]. Die  $\beta$ -Untereinheit von Tubulin besitzt bestimmte Thiolgruppen, die für die Polymerisation der MTP zu Mikrotubuli essentiell sind [Krauhns et al., 1981]. Diese Reste stellen vermutlich auch potentielle Angriffsorte für die Curcuminoid-Glucuronide dar. Dabei ist es möglich, dass die durch die Curcuminoid-Glucuronide hervorgerufene Inhibition der Mikrotubuli-Bildung durch eine kovalente oder nicht-kovalente Modifikation der MTP hervorgerufen wird.

Neben Tubulin ist die Reaktivität der Acylglucuronide von NSAIDs nur gegenüber wenigen anderen intrazellulären Proteinen beschrieben. Interessant ist, dass die Acylglucuronide *in vitro* unmittelbar an ihrem Bildungsort mit ihren Erzeugern, den UGTs, unter Bildung irreversibler mikrosomaler Addukte, abreagieren können. Es gibt Hinweise, dass die Reaktion in der hoch konservierten UDPGA-Bindungsstelle stattfindet, so dass dadurch nahezu alle Isoenzyme betroffen wären [Terrier et al., 1999]. Ein partieller Funktionsverlust der UGTs könnte möglicherweise fatale Folgen haben, da dadurch zusätzlich die Eliminierung anderer UGT-Substrate beeinträchtigt wird. Als weiterer Reaktionspartner für die Acylglucuronid-vermittelte Adduktbildung ist das Plasmamembranprotein Dipeptidylpeptidase IV beschrieben. Ein kovalentes 110 kD-Addukt wurde bei Gabe von Diclofenac an Ratten nach Aktivierung zum Acylglucuronid durch die UGTs im Leberhomogenat nachgewiesen [Hargus et al., 1994; McCaughan et al., 1990]. Eingehender untersucht ist bisher die Bindung von NSAID-Acylglucuroniden an extrazelluläre Proteine wie Serumalbumin. Eine irreversible Bindung an Serumalbumin ist beispielsweise für die Acylglucuronide von Ketoprofen [Dubois et al., 1993; Presle et al., 1996] und Zomepirac [Smith et al., 1990] *in vitro* gezeigt. Die Nebenwirkungen

von NSAIDs werden teilweise mit der Modifikation von Proteinen durch ihre Acylglucuronid-Metaboliten in Verbindung gebracht, da die Adduktbildung die Funktionsfähigkeit eines Proteins beeinträchtigen bzw. inaktivieren kann oder sich in einer Immunantwort bzw. in Form anderer toxischer Auswirkungen *in vivo* manifestieren kann [Bougie et al., 1997; Worrall und Dickinson, 1995].

Insbesondere zelluläre Proteine der Leber sind aufgrund ihrer hohen metabolischen Enzymaktivitäten Angriffspunkte für Acylglucuronide von NSAIDs [Bailey und Dickinson, 2003; Hargus et al., 1994; Kretz-Rommel und Boelsterli, 1993, 1994; Wang und Dickinson, 1998]. Im Falle von reaktiven Curcuminoid-Glucuroniden sind beim Menschen aber möglicherweise zelluläre Proteine des Intestinaltrakts stärker betroffen als intrahepatische Proteine, da die humane intestinale Mukosa besonders hohe Glucuronidierungsaktivitäten und -kapazitäten für die Curcuminoide (Tab. 13 und 15) aufweist.

Die Acylglucuronide von NSAIDs reagieren unspezifisch mit verschiedenen Proteinen und besitzen die Fähigkeit sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Proteine zu modifizieren. Beispielsweise wurden für das Acylglucuronid von Zomepirac zusätzlich zur Adduktbildung mit MTP auch Addukte mit Serumalbumin und hepatischen Proteinen nachgewiesen [Bailey und Dickinson, 1996; Bailey et al., 1998; Smith et al., 1990]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch die reaktiven Glucuronide der Curcuminoide, für die in dieser Arbeit die Hemmung der Mikrotubuli-Polymerisation *in vitro* gezeigt wurde, das Potential besitzen mit anderen zellulären Proteinen zu reagieren. Die Fähigkeit von Curcuminoid-Glucuroniden an Proteine zu binden, könnte auch eine Erklärung für die geringen Wiederfindungen bei den *in vitro*-Untersuchungen zum Curcuminoid-Metabolismus (Tab. 5 und 14) liefern.

Die durch Curcuminoid-Glucuronide vermittelte Inhibition der Mikrotubuli-Polymerisation liefert erste konkrete Hinweise auf eine toxikologische Relevanz der Curcuminoide nach Aktivierung durch die UGTs, die möglicherweise auch *in vivo* beim Menschen nach oraler Aufnahme eine Rolle spielen könnte. Um mögliche biologische Konsequenzen evaluieren zu können sind weitere Untersuchungen, welche die Identifizierung weiterer Reaktionspartner sowie die Klärung des Bindungscharakters (kovalent oder nicht-kovalent) der Proteinaddukte beinhalten sollten, notwendig. Wenn kovalente Proteinaddukte in intakten Zellen gebildet werden, könnte dies wichtige pharmakologische und toxikologische Auswirkungen für die Curcuminoide *in vivo* haben.

## 5 Zusammenfassung

Curcumin (CUR) und seine natürlichen Kongenere sind aufgrund ihrer vermeintlichen krebspräventiven Eigenschaften von aktuellem Interesse, jedoch sind Kenntnisse über ihre Biotransformation ungenügend. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit dem Metabolismus von Curcuminoiden *in vitro*, wobei ein Schwerpunkt auf der Glucuronidierung liegt. Auf der Grundlage der Ergebnisse zur Glucuronidierung wurde die Reaktivität von Curcuminoid-Glucuroniden anhand ihres Effekts auf die Mikrotubuli-Polymerisation untersucht.

*In vitro*-Studien zum Metabolismus laufen unter physiologischen Bedingungen ab, bei denen CUR chemisch instabil ist. Bei Stabilitätsuntersuchungen in Phosphat-Puffer und Kulturmedium war ein zeitabhängiger Verlust der drei Curcuminoiden CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR zu verzeichnen, wobei CUR die instabilste Verbindung repräsentierte und der Zerfall im Puffer stärker war als im Medium. Der CUR-Zerfall war mit der Bildung von bis zu 10 Produkten verbunden, von denen Vanillin, Ferulasäure und Feruloylmethan identifiziert wurden, die auch bei den Metabolismusstudien immer wieder auftraten. Durch die Anwesenheit von fötalem Kälberserum bzw. Zellen im Kulturmedium, sowie durch Mikrosomen im Puffer, wurde der Zerfall von CUR reduziert. Im Gegensatz zu CUR war Hexahydro-CUR chemisch stabil. Auch das synthetische Iso-CUR, das sich von CUR nur durch die inversen Substituenten an den Aromaten unterscheidet, war in beiden Testsystemen stabiler als CUR.

Bei der Untersuchung des Phase I- und Phase II-Metabolismus mit Präzisions-Leberschnitten männlicher und weiblicher Sprague-Dawley-Ratten wurden fünf reduktive, aber keine oxidativen Metaboliten von CUR und seinen Demethoxy- und Bisdemethoxy-Analoga beobachtet. Die Identifizierung erfolgte mittels HPLC/DAD- und GC/MS-Analyse, hauptsächlich durch Vergleich mit authentischen Referenzsubstanzen, die durch chemische Synthese hergestellt wurden. Reduktive Hauptmetaboliten waren bei männlichen und weiblichen Ratten die Hexahydro-Curcuminoiden. Männliche Ratten bildeten mehr Octahydro- als Tetrahydro-Curcuminoiden und weibliche Ratten mehr Tetrahydro- als Octahydro-Produkte. Die Tetrahydro-, Hexahydro- und Octahydro-Curcuminoiden lagen hauptsächlich in Form ihrer Glucuronide vor, es wurden aber zusätzlich signifikante Mengen an Sulfat-Konjugaten beobachtet. Oxidative Metaboliten der Curcuminoiden traten in Leberschnitten nicht auf. Ihre fehlende Bildung durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen wurde durch den Einsatz von Rattenlebermikrosomen bestätigt. Die reduktiven Metaboliten konnten auch durch Rattenlebercytosol sowie durch Alkoholdehydrogenase hergestellt werden. Die Sulfatierung von Hexahydro-CUR wurde zusätzlich mit Rattenlebercytosol und aktiviertem Sulfat als Kofaktor nachgewiesen. Die Ergebnisse der enzymatischen Konjugathydrolyse, die unterschiedlich durchgeführt wurde, zeigten, dass CUR und Demethoxy-CUR weniger stabil sind als Bisdemethoxy-CUR, wobei die reduktiven Metaboliten aller drei Curcuminoiden stabile Verbindungen repräsentieren; dies steht im Einklang mit den Untersuchungen zur Stabilität.

Wegen der chemischen Instabilität der Muttersubstanzen eignen sich die stabilen reduktiven Phase I-Metaboliten, v.a. die Hexahydro-Curcuminoiden, als Biomarker für die Exposition in klinischen Studien.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Intestinaltrakt der Ratte sowie kultivierte Zellen (Ishikawa-Zellen) die Fähigkeit besitzen die reduktiven Curcuminoid-Metaboliten zu bilden. Metabolismusstudien mit den synthetischen CUR-Derivaten Iso-CUR und Dimethyl-CUR führten ebenfalls zu reduktiven Phase I-Metaboliten und Glucuroniden.

In Anbetracht der hohen Glucuronidierungsraten für die Curcuminoiden und ihre reduktiven Metaboliten in den Leberschnitten wurde die Glucuronidierung im Folgenden mit verschiedenen spezie- und gewebespezifischen Mikrosomen sowie mit humanen rekombinanten Uridindiphospho-Glucuronyltransferasen (UGTs, Supersomen) detaillierter untersucht. Die hepatische Curcuminoid-Glucuronidierung führte bei der Ratte vorwiegend zu einem Glucuronid, wohingegen beim Menschen ein zweites polareres Glucuronid in geringeren Mengen gebildet wurde. Das dominante CUR-Glucuronid wies eine erhöhte Lipophilie auf, da es schon aus neutraler wässriger Lösung teilweise mit Ethylacetat extrahiert werden konnte. Um eine quantitative Analyse der Curcuminoiden und ihrer Glucuronide zu gewährleisten, wurde eine Methode zur nahezu vollständigen Extraktion der dominanten Curcuminoid-Glucuronide entwickelt, während das zweite Glucuronid in der wässrigen Phase verblieb. Die Glucuronide der Hexahydro-Curcuminoiden waren im Gegensatz zu den dominanten Curcuminoid-Glucuroniden nur teilweise extrahierbar, was auf eine unterschiedliche chemische Struktur der Glucuronide hindeutete, da die Glucuronsäure an den beiden phenolischen sowie an der aliphatischen Hydroxylgruppe des Curcuminoid-Moleküls lokalisiert sein kann. Die LC/MS-Analyse der Glucuronide von CUR, Bisdemethoxy-CUR und Dimethyl-CUR sowie der Glucuronide der entsprechenden Hexahydro-Curcuminoiden zeigte, dass ausschließlich Monoglucuronide entstanden und die Hexahydro-Curcuminoiden phenolische Glucuronide bildeten. Da die dominanten Curcuminoid-Glucuronide und das enolische Dimethyl-CUR-Glucuronid (phenolische Hydroxylgruppen fehlen) extrahierbar waren, wurde dieses CUR-Glucuronid als aliphatisches und das nicht-extrahierbare Glucuronid als phenolisches Konjugat betrachtet.

Die detaillierte Untersuchung der Glucuronidierung mit humanen rekombinanten UGTs zeigte, dass alle getesteten Isoenzyme – ausgenommen UGT1A4 – Aktivitäten für die Curcuminoid-Derivate aufwiesen. Während hepatisches UGT1A1 und die intestinalen Isoformen UGT1A8 und 1A10 eine Präferenz für die Glucuronidierung der Curcuminoiden zeigten, wurde die Bildung phenolischer Hexahydro-Glucuronide bevorzugt von UGT1A9, 2B7 sowie 1A8 katalysiert. Hexahydro-bisdemethoxy-CUR und Dimethyl-CUR stellten schlechte UGT-Substrate dar. UGT1A9 repräsentierte das einzige Isoenzym, welches beide Curcuminoid-Glucuronide (phenolisch und aliphatisch) mit ähnlichen Aktivitäten bildete und war damit vermutlich für die Bildung des zweiten Curcuminoid-Glucuronids beim Menschen verantwortlich. Diese Annahme wurde durch die Inhibition der Bildung dieses CUR-Glucuronids

mit dem spezifischen UGT1A9-Substrat Propofol bestätigt. Die bedeutende Rolle intestinaler UGTs im Curcuminoid-Metabolismus belegten weitere Glucuronidierungen mit intestinalen bzw. hepatischen Mikrosomen von Mensch, Ratte und Schwein. Hier wurden insbesondere die hohen Glucuronidierungsaktivitäten des humanen Gastrointestinaltrakts für die Curcuminoide deutlich, welche die der Leber übertrafen. Da die Ratte bevorzugt phenolische Hexahydro-Curcuminoide in der Leber und im Darm bildete, erwiesen sich Schweinedünndarmmikrosomen als geeigneter zur Imitation der Gegebenheiten beim Menschen. Bei allen *in vitro*-Glucuronidierungen war zu beobachten, dass Curcuminoid-Kongeneren mit zwei Methoxygruppen stets die besten und Analoga ohne Methoxygruppen die schlechtesten UGT-Substrate repräsentierten.

Die Glucuronidierungsreaktion von CUR folgte – bei Verwendung von humanen Lebermikrosomen sowie intestinalem UGT1A8 – einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die kinetischen Parameter zeigten sehr hohe Glucuronidierungseffizienzen an, die auch *in vivo* in beiden Geweben zu erwarten sind.

Im Hinblick auf die untypische Struktur der aliphatischen Glucuronide der Curcuminoide, deren Keto-Enol-Teil eine vinyloge Carbonsäure repräsentiert, ähneln diese strukturell klassischen Acylglucuroniden, die aus nicht-steroidalen antiinflammatorischen Substanzen (NSAIDs), wie z.B. Ketoprofen, generiert werden. Acylglucuronide sind elektrophile Metabolite, die kovalente Proteinaddukte bilden können. Da u.a. Tubulin als Partner solcher Reaktionen identifiziert wurde, wurde der Effekt von Curcuminoid-Glucuroniden auf die Polymerisation der Tubulin-Heterodimere zu Mikrotubuli unter zellfreien Bedingungen untersucht. Die hohe Instabilität der Curcuminoid-Glucuronide deutete bereits auf eine potentielle Reaktivität dieser Verbindungen hin. Für die Glucuronide von CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR wurde gezeigt, dass diese die Mikrotubuli-Bildung konzentrationsabhängig hemmen. Der stärkste Effekt wurde für das Bisdemethoxy-CUR-Glucuronid mit einem  $IC_{50}$ -Wert von ca. 10  $\mu$ M beobachtet, während das phenolische Hexahydro-CUR-Glucuronid und die unkonjugierten Muttersubstanzen keine Hemmung der Mikrotubuli-Polymerisation zeigten. Die Acylglucuronide von Ketoprofen wurden als Positivkontrolle eingesetzt und inhibierten die Polymerisation etwa in ähnlichem Ausmaß wie das CUR-Glucuronid. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Curcuminoide reaktive Glucuronide bilden, die möglicherweise kovalent an Tubulin binden können. Die Bildung solcher Proteinaddukte in intakten Zellen könnte pharmakologische und toxikologische Folgen für die Curcuminoide haben.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

#### 6.1.1 Geräte und Hilfsmittel

<b>Synthese</b>	Exsikator Magnetrührer Ikamag RCT (IKA Labortechnik) Rotationsverdampfer Rotavapor Re 111 mit Wasserbad (Büchi) und Membran-Vakuumpumpe mit Druckregler CVC24 (Vacuubrand) Schmelzpunktbestimmungsapparat nach Dr. Tottoli (Büchi); Silikonöl AK 200 (Fa. Wacker)
<b>Zellfraktionierung</b>	Pinzette Potter S, B. Braun (Biotech International) Schere Stabmixer Ultrazentrifuge Centrikon T-1080 (Kontron Instruments)
<b>Zellkultur</b>	Autoklav (F. Gösser, Medizin- und Labortechnik) Brutschrank Hera Cell (Heraeus) Handzählgeräte Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 C; Objektive: 5×/0.12 Ph0, 10×/0.25 Ph1 (Zeiss) Pipetus (Hirschmann Laborgeräte) Sterilbank Hera Safe (Heraeus)
<b>Photometrie</b>	Präzisions-Küvetten aus Quarzglas Suprasil <sup>®</sup> ; Typ QS 1.000; Schichttiefe 10,00 mm (Hellma) UV/Vis Photometer V-550; Software SpectraManager 1.53 M (Jasco); mit Thermostat julabo 5 (Julabo Labortechnik) UV/Vis Photometer Uvikon 860; Software: Version 8832 (Kontron Instruments); mit Thermostat colora K3 (Colora Messtechnik)

<b>Tissue Slicer-System</b>	Schneide-Einheit und „Dynamic Organ Culture“ (DOC)- Rotationsinkubator (Vitron Inc., Tucson, AZ, USA)  Edelstahlnetze  Hohlzylinder  Szintillationsgläschen (20 ml) mit Plastikschaubdeckeln mit einem 2 mm-Loch in der Mitte
<b>Biofreezer</b>	(GFL)
<b>Evaporatorzentrifuge</b>	RC 10.10 mit Kühlfalle RCT 90 (Jouan)
<b>Kühlschrank</b>	Premium (Liebherr)
<b>pH-Meter</b>	CG 817 mit pH-Elektrode BlueLine 12 (Schott)
<b>Pipetten</b>	Eppendorf Reference 0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl  Eppendorf Research 2-20 µl, 20-200 µl, 500-5000 µl
<b>Thermomixer</b>	Eppendorf 5436  Eppendorf comfort
<b>Vortex</b>	Genie 2 (Scientific Industries)
<b>Waagen</b>	Analysenwaage Sartorius handy; Typ H51  Präzisionswaage Sartorius excellence; Typ E2000D  Präzisionswaage Sartorius portable; Typ PT 1200
<b>Zentrifugen</b>	Centrifuge 5417R (Eppendorf)  Megafuge 1.0R (Heraeus)  Mikroliter (Hettich)

### 6.1.2 Verbrauchsmaterial

<b>Cryoröhrchen</b>	2 ml (NeoLab)
<b>Halb-Mikro-Küvetten</b>	Plastik (Sarstedt)
<b>Pipettenspitzen</b>	Plastik 10 µl, 200 µl, 1000 µl (Sarstedt)
<b>Reaktionsgefäße</b>	1,5 ml, 2 ml (Sarstedt)
<b>Rundfilter</b>	595, Ø 55 mm (Schleicher & Schüll)
<b>Zellkulturschalen</b>	Ø 100 mm (Biochrom AG)
<b>Zentrifugenröhrchen</b>	15 ml (Sarstedt), 50 ml (Greiner)

### 6.1.3 Chemikalien

Nicht näher spezifizierte Chemikalien stammten von VWR/Merck (Darmstadt), Fluka/Sigma/Aldrich/Serva (Taufkirchen) oder Carl Roth (Karlsruhe) in der Reinheit mind. „zur Analyse“.

#### Curcuminoid-Standards

<b>kommerzielles „Curcumin“</b>	Zusammensetzung laut HPLC-Analyse: 75% CUR, 18% Demethoxy-CUR, 7% Bisdemethoxy-CUR (Fluka)
<b>CUR</b>	aus <i>Curcuma</i> isoliert und säulenchromatographisch aufgereinigt; Reinheit mind. 99% (Arizona Center for Phytomedicine Research, Tucson, AZ, USA) bzw. chemische Synthese (s. Kap. 6.2.2.1)
<b>Demethoxy-CUR</b>	aus <i>Curcuma</i> isoliert und säulenchromatographisch aufgereinigt; Reinheit mind. 99% (Arizona Center for Phytomedicine Research, Tucson, AZ, USA)
<b>Bisdemethoxy-CUR</b>	aus <i>Curcuma</i> isoliert und säulenchromatographisch aufgereinigt; Reinheit mind. 99% (Arizona Center for Phytomedicine Research, Tucson, AZ, USA) bzw. chemische Synthese (s. Kap. 6.2.2.1)
<b>Iso-CUR</b>	chemische Synthese (s. Kap. 6.2.2.1)
<b>Dimethyl-CUR</b>	chemische Synthese (s. Kap. 6.2.2.1)
<b>Dimethyl-bisdemethoxy-CUR</b>	chemische Synthese (s. Kap. 6.2.2.1)
<b>Tetrahydro-CUR</b>	chemische Synthese (Sabinsa Corporation, Payson, UT, USA)
<b>Tetrahydro-demethoxy-CUR</b>	enzymatische Reduktion (s. Kap. 6.2.2.3)
<b>Tetrahydro-bisdemethoxy-CUR</b>	enzymatische Reduktion (s. Kap. 6.2.2.3)
<b>Hexahydro-CUR</b>	katalytische Hydrierung (s. Kap. 6.2.2.2)
<b>Hexahydro-demethoxy-CUR</b>	enzymatische Reduktion (s. Kap. 6.2.2.3)
<b>Hexahydro-bisdemethoxy-CUR</b>	katalytische Hydrierung (s. Kap. 6.2.2.2)
<b>Hexahydro-iso-CUR</b>	katalytische Hydrierung (s. Kap. 6.2.2.2)
<b>Hexahydro-dimethyl-CUR</b>	katalytische Hydrierung (s. Kap. 6.2.2.2)
<b>Octahydro-CUR</b>	chemische Reduktion (s. Kap. 6.2.2.4)
<b>Octahydro-demethoxy-CUR</b>	chemische Reduktion (s. Kap. 6.2.2.4)
<b>Octahydro-bisdemethoxy-CUR</b>	chemische Reduktion (s. Kap. 6.2.2.4)



### Enzyme

$\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase	aus <i>Helix pomatia</i> (Roche)
$\beta$ -Glucuronidase Typ B-1	aus Rinderleber (Sigma)
Sulfatase Typ VI	aus <i>Acetobacter aerogenes</i> ; gelöst in Glycerin (Sigma)
Alkoholdehydrogenase	aus Pferdeleber (Sigma)

### Kulturmedien und Zusätze

DMEM/F12	mit Phenolrot, L-Glutamin und 15 mM HEPES; ohne Natriumcarbonat (Sigma)
Waymouth MB 752/1	(Gibco BRL)
FKS	(Gibco BRL)
Gentamicin	Lösung; 50 mg/ml (Gibco BRL)
Penicillin/Streptomycin	Lösung; 5000 U Penicillin, 5 mg/ml Streptomycin (Sigma)

### Gase

Helium	4.6 (Air Liquide)
Kohlenmonoxid	3.7 (Air Liquide)
Stickstoff	5.0 (Air Liquide)
Wasserstoff	5.0 (Air Liquide)

#### 6.1.4 Versuchstiere und biologisches Material

##### Versuchstiere

Männliche und weibliche Sprague-Dawley- und Wistar-Ratten wurden von der Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) bezogen. Die Tiere wurden in Standard-Käfigen unter einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 h gehalten und bekamen Wasser und kommerzielles Labor-Futter *ad libitum*.

Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 200-300 g wurden für die Präparation von Präzisions-Gewebeschnitten und Zellfraktionen verwendet.

Männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 300-350 g wurden zur Präparation von Mikrosomen eingesetzt. Die Ratten wurden zuvor in zwei Gruppen aufgeteilt, von denen eine mit Aroclor 1254 behandelt wurde.

### Zellfraktionen

Die verwendeten Supersomen<sup>TM</sup> (UGT Control, UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B7) sowie die humanen intestinalen Mikrosomen wurden von der Firma Gentest (Woburn, MA, USA) über NanuTec (Frankfurt/Main) bezogen.

### Zelllinie

**Ishikawa-Zellen** Humane endometriale Adenokarzinom-Zellen; kultiviert in DMEM/F12-Medium mit 10 % FKS

### 6.1.5 Pufferlösungen und Kulturmedien

Wenn nicht anders angegeben, wurde entionisiertes Wasser aus der Hausversorgung verwendet.

#### 6.1.5.1 Allgemeine Pufferlösungen

##### 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4

17,418 g/l  $K_2HPO_4$

13,609 g/l  $KH_2PO_4$

Vorlegen der basischen Komponente und mit der sauren Komponente auf pH 7,4 einstellen und mit entionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen.

##### 50 mM Tris-Puffer pH 7,5

6,057 g/l Tris in entionisiertem Wasser lösen; der pH-Wert wird mit 1 M HCl eingestellt.

#### 6.1.5.2 Puffer für Präparation von Zellfraktionen

##### Mic-I-Puffer

Reagenzien	g/l	mM
KCl	11,18	150
Tris	6,06	50
$Na_2EDTA \times 2 H_2O$	0,372	1

Lösen, mit  $HCl_{konz}$  auf pH 7,4 einstellen und mit entionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen.

**Mic-II-Puffer**

Reagenzien	g/l	mM
HEPES	5,96	25
Na <sub>2</sub> EDTA × 2 H <sub>2</sub> O	0,558	1,5
1,4-Dithiothreitol	0,154	1
NaCl	5,84	100

Lösen, mit NaOH auf pH 7,6 einstellen und nach Zugabe von 115 ml Glycerin (87%) mit entionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen.

**6.1.5.3 Puffer und Kulturmedium für Präzisions-Gewebeschnitte****Krebs-Henseleit-Puffer** (auf Natrium-Bicarbonat-Basis)

Reagenzien	g/l	mM
NaCl	6,9	118,0
KCl	0,36	4,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,13	0,95
NaHCO <sub>3</sub>	2,0	23,8
D-Glucose	4,5	25,0
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,295	1,2
CaCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,498	2,89
Gentamicin (50 mg/ml)	1ml/l	50 mg/l

Der pH-Wert wird mit NaOH oder HCl auf pH 7,2 eingestellt und sterilfiltriert (pH 7,4).

**Kulturmedium nach Waymouth**

Reagenzien	g/l	mM
Waymouth MB 752/1	13,84	—
NaHCO <sub>3</sub>	2,24	26,67
L-Glutamin	0,35	2,40
Gentamicin (50 mg/ml)	1 ml/l	50 mg/l

Lösen in bidestilliertem Wasser, Sterilfiltrieren und Zusatz von 10% FKS.

## 6.1.5.4 Kulturmedium für Ishikawa-Zellen

## DMEM/F12-Kulturmedium

Reagenzien	Endkonz.
DMEM/F12	15,6 g/l
Streptomycin	0,1 mg/ml
Penicillin	100 U

Lösen in bidestilliertem Wasser, Sterilfiltrieren und Zusatz von 10% FKS.

## 6.1.5.5 Puffer für MTP-Präparation und Polymerisationsassay

Reagenzien	REA-Puffer		REA-4 M-Puffer		REA-8 M-Puffer	
	g/l	mM	g/l	mM	g/l	mM
MES	19,520	100	19,520	100	19,520	100
EGTA	0,308	1	0,308	1	0,308	1
MgCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,101	0,5	0,101	0,5	0,101	0,5
Glycerin	–	–	368,4	4000	736,8	8000

Der pH-Wert wird mit NaOH auf pH 6,4 eingestellt.

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Analytik

#### 6.2.1.1 GC/MS

Kapillargaschromatograph mit Ionenfalle als Massenanalysator der Serie GCQ Finnigan MAT (Thermo Finnigan) und programmierbarem Injektor Optic 2 (AI Qualitek LTD); die Aufnahme, Analyse und Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GCQ Analysis, Version 2.31 und GCQ Data Processing, Version 2.3.

Eine Analyse mittels GC/MS war nur von den reduzierten Curcuminoid-Derivaten (Tetrahydro-, Hexahydro- und Octahydro-Produkte) möglich, da diese im Gegensatz zu den Curcuminoiden thermostabil sind.

#### *Derivatisierung*

Die methanolische Probelösung wurde in ein GC-Gläschen überführt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im N<sub>2</sub>-Strom erfolgte die Trimethylsilylierung mit 30 µl *N,O*-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA), die zu einer Massenerhöhung von 72 Masseneinheiten pro OH-Gruppe führt. Nach Derivatisierung über Nacht bei Raumtemperatur erfolgte die GC/MS-Analyse der in BSTFA gelösten Probe mittels Splitless-Injektion.

#### *Identifizierung von Syntheseprodukten*

Für die synthetisierten reduzierten Curcuminoid-Derivate (s. Kap. 6.2.2.1-6.2.2.4) wurden nach Trimethylsilylierung charakteristische Fragmentationen-Spektren erhalten, die zur eindeutigen Identifizierung der Substanzen herangezogen wurden. Die beiden Isomere der Octahydro-Derivate lieferten hierbei eine identische Fragmentierung, die sich jedoch in den Intensitäten der einzelnen Fragmentationen unterschied. Im Anhang (A.3, Tab. 20) sind die GC/MS-Daten des dominanten Octahydro-Isomers angegeben.

#### *Identifizierung von Curcuminoid-Metaboliten*

Die Curcuminoid-Metabolite wurden als Metaboliten-Gemisch aus den Inkubationen mit Leberschnitten (Kap. 3.3) durch Extraktion oder nach Fraktionierung des Gemisches an der HPLC und Extraktion mit Ethylacetat isoliert und anschließend das Lösungsmittel an der Evaporatorzentrifuge entfernt und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Die so erhaltenen methanolischen Metaboliten-Lösungen wurden zur Derivatisierung eingesetzt. Die Metaboliten wurden durch den Vergleich ihrer GC-Retentionszeiten und ihrer Massenspektren mit den synthetischen Referenzsubstanzen identifiziert.

### **Identifizierung von CUR-Zerfallsprodukten**

Die bei den Stabilitätsuntersuchungen aus dem CUR-Zerfall (Kap. 3.2.1) resultierenden Peaks wurden an der HPLC fraktioniert, extrahiert, das Ethylacetat an der Evaporatorzentrifuge entfernt und der Rückstand in Methanol gelöst. Nach Derivatisierung mit BSTFA wurden Vanillin, Ferulasäure und Feruloylmethan durch den Vergleich ihrer GC-Retentionszeiten und ihrer Massenspektren mit authentischen Referenzsubstanzen identifiziert.

### **GC/MS-Bedingungen**

Säule:	MDN-5S Fused Silica, 5% Phenylmethyl, 30 × 0,25 mm i.d., 0,25 µM Filmdicke (Supelco)
Trägergas:	Helium (83 kPa)
Injektorprogramm:	Initialtemperatur: 60°C Aufheizrate: 5°C/s Endtemperatur: 275°C
Injektionsvolumen:	1 µl
Transferline-Temperatur:	275°C
Transferline-Druck:	83 kPa
Temperatur der Ionenquelle:	250°C
Ionisation:	Electron Impact (EI) bei 70 eV
Massenbereich:	m/z 50-650
Scanrate:	0,5 s/Scan
Operierender Modus:	Full Scan

*Temperaturprogramm 1:* Analyse von Tetrahydro-, Hexahydro- und Octahydro-Curcuminoiden.

Initialtemperatur:	150°C
Isotherme 1:	1 min
Aufheizrate:	10°C/min
Endtemperatur:	295°C
Isotherme 2:	10 min

Temperaturprogramm 2: Analyse von CUR-Zerfallsprodukten.

Initialtemperatur:	80°C
Isotherme 1:	4 min
Aufheizrate:	8°C/min
Endtemperatur:	240°C
Isotherme 2:	1 min

### 6.2.1.2 HPLC/DAD

Analytisches Hochdruckgradientensystem der Serie HP 1100 mit Degasser, binärer Pumpe und Dioden-Array-Detektor (DAD); die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software HP ChemStation, Version Rev.A.07.01 (Agilent Technologies).

Autosampler:	717plus (Waters)
Manueller Injektor:	Injektionsventil Modell 7725i (Rheodyne)
Vorsäule:	SecurityGuard C18 (ODS), 4,0 × 3,0 mm i.d. (Phenomenex)
Reversed Phase-Säulen:	Prodigy 5ODS(2), 250 × 4,6 mm i.d., 5 µm Partikelgröße; Luna C18(2), 250 × 4,6 mm i.d., 5 µm Partikelgröße (Phenomenex)
Flußrate:	1 ml/min
Eluent A:	entionisiertes Wasser pH 3,0, eingestellt mit konz. Ameisensäure
Eluent B:	Acetonitril

Für die Detektion von Sulfaten enthielt der Eluent A zusätzlich 5 mM Tetrabutylammonium-dihydrogenphosphat als Ionenpaar-Reagenz.

*Gradient 1:* Phase I-Metabolite von Curcuminoiden und Iso-CUR; Glucuronidierung von Curcuminoiden, Iso-CUR und Dimethyl-bisdemethoxy-CUR; Sulfatierung von CUR; Glucuronidierung von Ketoprofen.

Zeit (min)	0	35
Eluent A (%)	70	30
Eluent B (%)	30	70

Detektion: DAD (260 nm, 280 nm, 420 nm)

*Gradient 2:* Glucuronidierung von Hexahydro-CUR.

Zeit (min)	0	6	7	17	32
Eluent A (%)	85	85	70	65	55
Eluent B (%)	15	15	30	35	45

Detektion: DAD (280 nm)

*Gradient 3:* Glucuronidierung von Hexahydro-bisdemethoxy-CUR.

Zeit (min)	0	5	15	20
Eluent A (%)	70	70	67	62
Eluent B (%)	30	30	33	38

Detektion: DAD (280 nm)

*Gradient 4:* Phase I-Metabolite von Dimethyl-CUR; Glucuronidierung von Dimethyl-CUR.

Zeit (min)	0	35
Eluent A (%)	70	20
Eluent B (%)	30	80

Detektion: DAD (280 nm, 420 nm)

*Gradient 5:* Glucuronidierung von Hexahydro-dimethyl-CUR.

Zeit (min)	0	5	30
Eluent A (%)	65	65	45
Eluent B (%)	35	35	55

Detektion: DAD (280 nm)

*Gradient 6:* Glucuronidierung von E2.

Zeit (min)	0	2	9	16	22
Eluent A (%)	83	83	55	50	0
Eluent B (%)	17	17	45	50	100

Detektion: DAD (280 nm)



*Gradient 7:* Sulfatierung von 4-Methylumbelliferon; Glucuronidierung von TFMU.

Zeit (min)	0	6	7	24
Eluent A (%)	85	85	70	35
Eluent B (%)	15	15	30	65

Detektion: DAD (320 nm, 325 nm)

*Gradient 8:* Sulfatierung von Hexahydro-CUR.

Zeit (min)	0	6	7	17	32	40
Eluent A (%)	85	85	70	65	55	40
Eluent B (%)	15	15	30	35	45	60

Detektion: DAD (280 nm)

Die Nachweisgrenzen bei der Detektion mittels DAD bei der jeweiligen optimalen Wellenlänge betragen 1 pmol für die Curcuminoide, 3 pmol für die Tetrahydro-Curcuminoide, 5 pmol für die Hexahydro- und Octahydro-Curcuminoide und 0,5 pmol für Dimethyl-CUR. Als Bestimmungsgrenze wurde die dreifache Nachweisgrenze festgelegt.

### 6.2.1.3 HPLC/ESI/MS/MS

#### HPLC-System

Analytisches Hochdruckgradientensystem der Serie HP 1100 mit Degasser, quarternärer Pumpe, Säulentermostat, Autosampler und DAD; die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte mit der Software HP ChemStation (Agilent Technologies).

Vorsäule:	SecurityGuard C18 (ODS), 4,0 × 3,0 mm i.d. (Phenomenex)
Reversed Phase-Säule:	Synergy Hydro, 250 × 4,6 mm i.d., 4 µm Partikelgröße (Phenomenex)
Säulentermostat:	25°C
Flußrate:	1 ml/min
Eluent A:	entionisiertes Wasser mit 0,05% Essigsäure
Eluent B:	Acetonitril mit 0,05% Essigsäure

Detektion: DAD (250 nm, 280 nm, 370 nm, 420 nm)

## Massenspektrometer

Ionenfalle MSD Trap SL als Massenanalysator (Agilent Technologies)

Ionisation:	Electrospray-Ionisation (ESI) im negativen Modus
Trocknungsgasfluß:	10 l/min N <sub>2</sub>
Versprüherdruck:	60 psi
Trocknungsgastemperatur:	200°C
Kapillarspannung:	4500 V
Kapillarstromstärke:	18,3 nA
Massenbereich:	m/z 60-1000

Nach der Trennung der Curcuminoid-Glucuronide und ihrer Muttersubstanzen auf der HPLC-Säule, wurde der Eluent gesplittet und ein Teil nach Ionisierung mittels MS und MS/MS analysiert. MS<sup>n</sup>-Experimente wurden im AutoMS(n)-Modus durchgeführt. Die erste Aufnahme erfolgte im Full MS Scan-Modus. Danach wurden ein oder zwei Vorläufer-Ionen aus der Messung des Full Scans ausgewählt, isoliert und in der Ionenfalle selektiv fragmentiert.

### 6.2.1.4 NMR

NMR-Spektrometer DRX 500 (Bruker)

Je 20 mg CUR bzw. Iso-CUR wurden in 1 ml Aceton-d<sub>6</sub> gelöst. Die Aufnahme der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren erfolgte bei 500 MHz, die der <sup>13</sup>C-NMR-Spektren bei 125 MHz. Als interner Standard (ISTD) diente das deuterierte Lösungsmittel. Die Zuordnung der Signale zu den Atomen wurde durch zweidimensionale COSY-Experimente bestätigt.

## 6.2.2 Darstellung von Curcuminoid-Derivaten

### 6.2.2.1 Chemische Synthese

Die Synthese der natürlich vorkommenden Curcuminoide CUR und Bisdemethoxy-CUR sowie der artifiziellen Derivate Iso-CUR (1,7-Bis(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion), Dimethyl-CUR (1,7-Bis(3,4-Methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion) und Dimethyl-bisdemethoxy-CUR (1,7-Bis(4-Methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion), erfolgte nach der Methode von Pabon [1964]. 2,5 ml Acetylaceton (25 mmol) wurden mit 1,25 g Borsäureanhydrid (17 mmol) eine halbe Stunde lang gerührt bis sich eine zähflüssige Paste bildete, zu welcher 10 ml über NaSO<sub>4</sub> getrocknetes Ethylacetat zugegeben wurden. Dieses Gemisch wurde zu einer Lösung aus 50 mmol des entsprechend substituierten Benzaldehydes (7,6 g Vanillin für CUR, 6,1 g 4-Hydroxy-Benzaldehyd für Bisdemethoxy-CUR,

8,3 g 3,4-Dimethoxy-Benzaldehyd für Dimethyl-CUR, 7,6 g Isovanillin für Iso-CUR, 6,8 g 4-Dimethoxy-Benzaldehyd für Dimethyl-bisdemethoxy-CUR) und 26,2 ml Tributylborat (100 mmol) in 15 ml trockenem Ethylacetat hinzugefügt. Nach zehnmütigem Rühren wurden 0,5 ml *n*-Butylamin (5 mmol) über einen Zeitraum von 10 min zugetropft und für weitere 4 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde ohne Rühren über Nacht stehengelassen. Anschließend wurden 37,5 ml 0,6 N wässrige 60°C heiße HCl zugegeben und 1 h zur Hydrolyse des Reaktionsproduktes gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit entionisiertem Wasser säurefrei gewaschen, über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Syntheseprodukt wurde aus Methanol bei 4°C rekristallisiert, durch Filtration abgetrennt und mehrmals mit kaltem Methanol und entionisiertem Wasser gewaschen, um Spuren nicht-reagierter Aldehyde zu entfernen. Das Produkt wurde im Exsikator über Kieselgel getrocknet. Aus den Feststoffen wurden Stammlösungen mit definierter Konzentration hergestellt, die in den Metabolismusuntersuchungen eingesetzt wurden.

### 6.2.2.2 Katalytische Hydrierung

Als Ausgangssubstanzen wurden Tetrahydro-CUR, Bisdemethoxy-CUR, Dimethyl-CUR und Iso-CUR eingesetzt. Die Hydrierung zu den entsprechenden Hexahydro-Produkten wurde nach der Methode von Uehara et al. [1987] durchgeführt. Eine Lösung von 20 mg des jeweiligen Curcuminoids in 20 ml Methanol wurde mit 10 mg eines Pd-Katalysators (5% Pd auf Aktivkohle) versetzt und unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei Raumtemperatur für 8 h, bzw. 5 h bei Einsatz von Tetrahydro-CUR, gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat *in vacuo* verdampft. Hexahydro-CUR, Hexahydro-bisdemethoxy-CUR und Hexahydro-iso-CUR stellten farblose Produkte mit ölartiger Konsistenz dar, wohingegen Hexahydro-dimethyl-CUR einen farblosen Feststoff repräsentierte. Da bei der katalytischen Hydrierung geringfügige Mengen an Octahydro-Produkten nicht vermieden werden konnten, wurde die Reinheit der Hexahydro-Produkte mittels HPLC-Analyse mit UV-Detektion bei 280 nm über das Peakflächen-Verhältnis des Hexahydro- und Octahydro-Produktes bestimmt, wobei für beide Derivate die identische Absorption angenommen wurde. Alle Hexahydro-Produkte wurden mit mind. 95%iger Reinheit hergestellt. Die chemische Struktur der synthetischen Hexahydro-Produkte wurde mittels GC/MS-Analyse nach Trimethylsilylierung bestätigt (Kap. 6.2.1.1). Es wurden Stammlösungen mit definierter Konzentration von Hexahydro-CUR, Hexahydro-bisdemethoxy-CUR, Hexahydro-dimethyl-CUR und Hexahydro-iso-CUR hergestellt und für die Untersuchung des Metabolismus verwendet.

### 6.2.2.3 Enzymatische Reduktion

Durch enzymatische Reduktion mit Cytosol wurde Tetrahydro-demethoxy-CUR und Hexahydro-demethoxy-CUR aus Demethoxy-CUR sowie Tetrahydro-bisdemethoxy-CUR aus Bisdemethoxy-CUR dargestellt. Die Inkubationen zur Gewinnung der Tetrahydro-Produkte wurden in einem Endvolumen von 1 ml, die 100  $\mu$ M Demethoxy-CUR bzw. Bisdemethoxy-CUR in DMSO (Endkonzentration 2%), 10 mg/ml cytosolisches Protein aus Rattenleber und 10 mM NADH in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 enthielten, durchgeführt. Die Inkubationen zur Darstellung von Hexahydro-demethoxy-CUR fanden in einem Endvolumen von 0,5 ml statt und enthielten 100  $\mu$ M Demethoxy-CUR in DMSO (Endkonzentration 1%), 4 mg/ml cytosolisches Protein aus humaner Leber und 10 mM NADH in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4. Nach einer Vorinkubation für 5 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet und das Gemisch für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit 3  $\times$  0,5 ml Ethylacetat abgestoppt. Die vereinigten Extrakte wurden an der Evaporatorzentrifuge bis zur Trockne verdampft, der Rückstand in 50  $\mu$ l Methanol aufgenommen und mittels HPLC/DAD analysiert. Die mutmaßlichen Produkt-Peaks wurden aufgefangen, mit Ethylacetat extrahiert und nach Derivatisierung die Struktur mittels GC/MS (Kap. 6.2.1.1) bestätigt.

### 6.2.2.4 Chemische Reduktion

Octahydro-CUR und Octahydro-bisdemethoxy-CUR wurden aus einer 100  $\mu$ M Hexahydro-CUR- bzw. 50  $\mu$ M Hexahydro-bisdemethoxy-CUR-Lösung dargestellt, während Octahydro-demethoxy-CUR aus einer durch enzymatische Reduktion gewonnenen methanolischen Hexahydro-demethoxy-CUR-Lösung (Kap. 6.2.2.3) hergestellt wurde. Die Reaktion wurde in 0,2 ml Methanol durchgeführt und durch Zugabe einer ca. zehnfachen äquimolaren Menge Natriumborhydrid gestartet. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur bis zum Erliegen der Gasentwicklung stengelassen und anschließend mit wässriger 1 M HCl neutralisiert. Das Produkt wurde mit 3  $\times$  0,5 ml Ethylacetat extrahiert, der Extrakt unter Vakuum zur Trockne eingeengt und in 25  $\mu$ l Methanol aufgenommen. Die Analyse mittels HPLC bei 280 nm und GC/MS nach Trimethylsilylierung (Kap. 6.2.1.1) wies zwei Produkte mit identischen UV/Vis-Spektren sowie Massenspektren auf, die in Einklang mit der Struktur von Octahydro-CUR bzw. Octahydro-bisdemethoxy-CUR waren. Die beiden Octahydro-Produkte stellen jeweils Diastereomere dar, die auf den zwei chiralen C-Atomen beruhen, welche die beiden aliphatischen OH-Gruppen tragen.

### 6.2.2.5 Charakterisierung der Syntheseprodukte

Zur Charakterisierung der synthetisierten Substanzen wurden verschiedene physiko-chemische Eigenschaften bestimmt.

**UV/Vis-Spektrum.** Die Substanz wurde in Alkohol (Methanol oder Ethanol) gelöst und das UV/Vis-Spektrum im Wellenlängenbereich von 200-600 nm gegen Methanol bzw. Ethanol als Blindwert aufgenommen bzw. im HPLC-Eluent mittels DAD erfasst.

**Ermittlung des Extinktionskoeffizienten.** Von den Feststoffen wurde eine Lösung in Alkohol (Methanol oder Ethanol) im Konzentrationsbereich von 2,5-30  $\mu\text{M}$  für Substanzen mit konjugiertem Doppelbindungssystem (CUR, Bisdemethoxy-CUR, Iso-CUR und Dimethyl-CUR) und 50-250  $\mu\text{M}$  für Hexahydro-dimethyl-CUR hergestellt und die Extinktion photometrisch am jeweiligen Absorptionsmaximum gegen Methanol bzw. Ethanol als Blindwert gemessen. Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten erfolgte über das Lambert-Beer'sche Gesetz. Für Hexahydro-CUR war in der Literatur [Uehara et al., 1987] ein Extinktionskoeffizient angegeben, der nach Überprüfung übernommen wurde. Der Extinktionskoeffizient von Hexahydro-bisdemethoxy-CUR wurde im Vergleich mit Hexahydro-CUR theoretisch abgeschätzt.

**Bestimmung des Schmelzpunktes bei Feststoffen.** Einige Körnchen der Substanz wurden in ein Schmelzpunktbestimmungsröhrchen überführt und dieses in Silikonöl erhitzt. Der Übergang vom Aggregatzustand fest nach flüssig wurde visuell erfasst.

Falls Literaturdaten vorhanden waren, erfolgte eine Prüfung dieser auf Übereinstimmung mit eigenen Daten.

## 6.2.3 Präparation und Charakterisierung von Zellfraktionen

### 6.2.3.1 Präparation aus Lebergewebe

Die Isolierung von Mikrosomen und Cytosol wurde aus Leber unbehandelter männlicher Sprague-Dawley-Ratten (200-300 g Körpergewicht), aus Leber Aroclor-behandelter männlicher Wistar-Ratten (300-350 g Körpergewicht) und aus der Leber eines männlichen Spenders in Anlehnung an Lake [1987] vorgenommen. Die Rattenleber wurde frisch nach der Entnahme verwendet. Die humane Leber war bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und wurde für die Präparation aufgetaut. Das Gewebe wurde in eisgekühltem Mic-I-Puffer gewogen, mit einer Schere grob zerkleinert und mit der dreifachen Menge (W/V) Mic-I-Puffer unter Eiskühlung im BRAUN-Potter bei ca. 500 rpm homogenisiert. Durch Zentrifugation des Homogenats bei  $9000 \times g$  (15 min,

4°C) wurden grobe Zellbestandteile (nicht aufgebrochene Zellen, Zellkerne, Mitochondrien etc.) abgetrennt. Ein Teil des Überstands (sog. S9-Fraktion) wurde ggf. aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Die S9-Fraktion wurde bei  $105000 \times g$  für 60 min bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Mikrosomen-Pellet wurde vorsichtig unter Zurücklassen eines glasigen Glykogen-Rückstandes aufgeschlämmt. Die Suspension wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 60 min bei  $105000 \times g$  und 4°C zentrifugiert, der Überstand (Cytosol) abdekantiert und gemischt. Das Pellet (Mikrosomen) wurde in Mic-II-Puffer (0,75 ml/g Leber) aufgenommen und homogenisiert. Die Zellfraktionen wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### 6.2.3.2 Präparation aus Darmgewebe

Für die Präparation intestinaler Mikrosomen und S9-Fraktion wurde der komplette Dünndarm (Duodenum, Jejunum, Ileum) unbehandelter männlicher Sprague-Dawley-Ratten (200-300 g Körpergewicht) bzw. ein Jejunum-Abschnitt aus Schweinedünndarm verwendet. Die Gewinnung der Darmmukosa erfolgte in Anlehnung an Yang et al. [1992]. Die frisch entnommenen Därme wurden entleert, mit eisgekühlter 0,9%iger Kochsalzlösung gespült, längs mit einer Schere geöffnet und nochmals vorsichtig mit gekühlter Kochsalzlösung gereinigt. Das Gewebe wurde gewogen und die Mukosa vorsichtig mit einem Objektträger auf einer ebenen Korkunterlage abgeschabt. Die Mukosa wurde 1:1 (W/V) in eiskaltem Mic-I-Puffer aufgenommen und unter Eiskühlung im BRAUN-Potter bei ca. 500 rpm homogenisiert. Die S9-Fraktion wurde durch Zentrifugation des Homogenats bei  $9000 \times g$  für 15 min bei 4°C als Überstand erhalten. Der Überstand wurde aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Zur Herstellung der Mikrosomen wurde der S9-Überstand zusätzlich bei  $105000 \times g$  für 60 min bei 4°C zentrifugiert. Das Mikrosomen-Pellet wurde in Mic-II-Puffer (0,1 ml/g Darm) aufgenommen und homogenisiert. Die Mikrosomensuspension wurde aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 6.2.3.3 Präparation aus Niere

Die Mikrosomen-Präparation wurde aus den Nieren unbehandelter männlicher Sprague-Dawley-Ratten (200-300 g Körpergewicht) gemäß der Präparation aus Leber, wie in Kapitel 6.2.3.1 beschrieben, durchgeführt. Aufgrund des niedrigen Glykogengehalts von Nieren entfällt die letzte Ultrazentrifugation.

#### 6.2.3.4 Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung der Zellfraktionen wurde nach der Methode von Bradford [1976] durchgeführt, die auf dem Prinzip beruht, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 nach Bindung an Proteine im sauren Milieu eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm aufweist. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wird die Extinktionsänderung bei 595 nm gemessen.

Reagenz: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 5 ml Ethanol lösen, 10 ml ortho-Phosphorsäure (85%) zugeben und mit entionisiertem Wasser auf 100 ml auffüllen und filtrieren

Eine geeignete Verdünnung der Proteinprobe wurde in 100  $\mu\text{l}$  entionisiertem Wasser hergestellt und mit 1 ml Reagenzlösung durchmischt. Die photometrische Messung erfolgte nach 5 min bei Raumtemperatur bei 595 nm gegen den Reagenzienblindwert. Die externe Kalibrierung erfolgte zwischen 1-150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protein mit BSA als Standard. Die Standardlösungen und die Proben wurden jeweils als Dreifachbestimmung ausgeführt.

#### 6.2.3.5 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts

Der CYP-Gehalt der Lebermikrosomen wurde in Anlehnung an Omura und Sato [1964] anhand des Kohlenmonoxid-Differenzspektrums nach Dithionit-Reduktion bestimmt. Die Bestimmung beruht darauf, dass die Bindung von Kohlenmonoxid an das zweiwertige Eisen der prosthetischen Gruppe der Cytochrome eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 420 nm nach 450 nm bewirkt, die photometrisch verfolgt werden kann.

100  $\mu\text{l}$  Mikrosomensuspension wurden mit 2,0 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 verdünnt und jeweils 850  $\mu\text{l}$  dieser Lösung in zwei Halb-Mikro-Küvetten überführt, die für 5 min im Photometer bei Raumtemperatur äquilibriert wurden. Nach Aufnahme der Nulllinie zwischen 400-500 nm wurden beide Lösungen mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt und in die Meßküvette zusätzlich 40 s lang Kohlenmonoxid eingeleitet und erneut ein Differenzspektrum zwischen 400-500 nm aufgenommen.

Die Berechnung des Gesamt-Cytochrom-Gehalts erfolgte gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes mit einem molaren Extinktionskoeffizient von  $\varepsilon = 91 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

## 6.2.4 Stabilitätsuntersuchungen

### 6.2.4.1 Untersuchungen in Kalium-Phosphat-Puffer

Die Untersuchungen zur Stabilität verschiedener Curcuminoide und ihrer Glucuronide sowie von Ketoprofen und Ketoprofen-Acylglucuroniden wurden in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 mit 30  $\mu$ M Substanz (CUR, Bisdemethoxy-CUR, Iso-CUR, Hexahydro-CUR, Ketoprofen und zugehörige Glucuronide) durchgeführt.

#### *Muttersubstanzen*

Nach Vorinkubation von 470  $\mu$ l Phosphat-Puffer bei 37°C im Thermomixer wurden 30  $\mu$ l einer 0,5 mM Aglykon-Lösung in DMSO zugegeben, gemischt und ein Aliquot (20  $\mu$ l) sofort oder nach Inkubation bei 37°C für 1 h, 2 h, 3 h und 24 h mittels HPLC/DAD analysiert.

#### *Glucuronide*

Es wurden konzentrierte Glucuronid-Stammlösungen in DMSO mit definierter Konzentration verwendet die, wie unter 6.2.8.2 beschrieben, hergestellt wurden. Das benötigte Volumen an Glucuronid-Stammlösung für eine Endkonzentration von 30  $\mu$ M im Puffer und einem Endvolumen von 0,5 ml wurde berechnet. Das komplementäre Volumen Phosphat-Puffer wurde bei 37°C vortemperiert, das berechnete Volumen Glucuronid-Stammlösung in DMSO zugegeben und die Glucuronide ohne oder nach Inkubation für 1 h, 2 h, 3 h und 24 h mittels HPLC/DAD analysiert.

Die Stabilitätsuntersuchungen wurden für jede Muttersubstanz und jedes Glucuronid als Doppelbestimmungen ausgeführt. Die Quantifizierung der Muttersubstanzen und Glucuronide erfolgte über die Peakflächen und wurde relativ zur Substanzmenge ohne Inkubation berechnet.

### 6.2.4.2 Untersuchungen in Kulturmedium

Die Stabilitätsuntersuchungen wurden in DMEM/F12-Kulturmedium, das (i) kein FKS, (ii) 5% FKS, (iii) kein FKS, aber Ishikawa-Zellen und (iv) 5% FKS und Ishikawa-Zellen enthielt, mit verschiedenen Curcuminoid-Derivaten (CUR, Demethoxy-CUR, Bisdemethoxy-CUR, Iso-CUR, Tetrahydro-CUR, Hexahydro-CUR) durchgeführt.

#### *Inkubationen ohne Zellen*

Bei Inkubation der Substanzen (20  $\mu$ M) in Kulturmedium ohne Zellen, wurde 3,5,3',5'-



Tetramethyl-bisphenol A (TMBPA) (10  $\mu$ l 5 mM TMBPA in DMSO pro ml Medium) als ISTD vor der Inkubation zugefügt und gemischt (DMSO Endkonzentration 2%). Ein 0,5 ml-Aliquot des Mediums wurde ohne Inkubation mit 1 ml Ethylacetat extrahiert, der Extrakt an der Evaporatorzentrifuge bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in 50  $\mu$ l Methanol aufgenommen und mittels HPLC/DAD analysiert. Das restliche Medium wurde für 1 h, 2 h, 4 h und 21 h mit der Substanz bei 37°C im Thermomixer inkubiert und zu jedem Zeitpunkt ein 0,5 ml-Aliquot, wie beschrieben, extrahiert und analysiert. Die Quantifizierung erfolgte über das Peakflächen-Verhältnis von Testsubstanz zu ISTD.

### ***Inkubationen mit Zellen***

Für die Inkubationen mit Zellen wurden  $8 \times 10^5$  oder  $1 \times 10^6$  Ishikawa-Zellen ausgestreut und mit DMEM/F12-Medium mit 10% FKS für 2 Tage kultiviert. Am 3. Tag (ca.  $1,9\text{-}2,4 \times 10^6$  Zellen) wurde das Medium durch DMEM/F12-Medium ohne bzw. mit 5% FKS, das jeweils 20  $\mu$ M Substanz (DMSO Endkonzentration 1%) enthielt, ersetzt. Ein 0,5 ml-Aliquot dieses Mediums wurde ohne Inkubation oder nach Inkubation für 1 h, 2 h, 4 h und 21 h bei 37°C mit den Zellen, wie oben für die Inkubation ohne Zellen beschrieben, extrahiert und mittels HPLC/DAD analysiert. In Anwesenheit von Zellen war die Zugabe des ISTD erst nach Inkubation separat zu den einzelnen Aliquots möglich und führte aufgrund des sehr geringen Pipettier Volumens (1-2  $\mu$ l) zu nicht reproduzierbaren Schwankungen, wodurch eine Auswertung über den ISTD nicht geeignet war. Deshalb wurde in den Inkubationen mit Zellen über die Peakflächen quantifiziert.

Die Stabilitätsuntersuchungen wurden für jede Substanz und jede Zusammensetzung des Mediums als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Substanzmenge der inkubierten Ansätze wurde relativ zur Substanzmenge ohne Inkubation berechnet.

#### **6.2.4.3 Einfluß von Mikrosomen**

In Anlehnung an die Umsetzungen mit Supersomen (Kap. 6.2.7.5) bzw. gewebe- und spezies-spezifischen Mikrosomen (Kap. 6.2.7.6) wurden weitere Untersuchungen zur Stabilität der drei Curcuminoide CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR und des synthetischen Derivats Dimethyl-CUR in 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 durchgeführt. Das Testsystem I enthielt ausschließlich die Substanz in Tris-Puffer ohne Zusätze. Im Testsystem II, welches weitgehend die Bedingungen der mikrosomalen Umsetzungen imitierte, waren zusätzlich 0,25 mg/ml mikrosomales Protein aus männlicher Rattenleber und 10 mM Magnesiumchlorid im Tris-Puffer enthalten. Die Substratkonzentrationen betragen 20  $\mu$ M (DMSO Endkonzentration 2%). Die Lösungen wurden sofort nach dem Ansetzen mittels HPLC/DAD analysiert. Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte über eine externe Kalibrierung (s. Anhang A.2.2,

Tab. 19) und wurde relativ zur eingesetzten Substanzmenge berechnet.

#### 6.2.4.4 Einfluß von pH-Wert und Pufferzusätzen

##### ***Effekt von pH-Wert und Komplexbildner EGTA***

30  $\mu\text{M}$  CUR wurde in folgenden Lösungen bei 37°C für 60 min im UV/Vis-Photometer inkubiert:

- (1) 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4
- (2) 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,4
- (3) 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 + 1 mM EGTA
- (4) 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,4 + 1 mM EGTA
- (5) Methanol

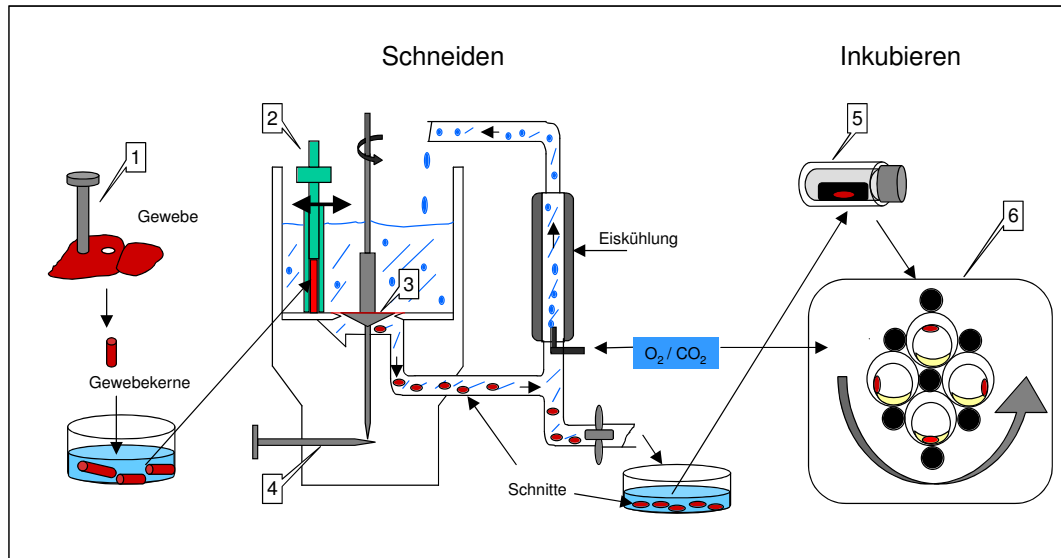
Die Extinktion von CUR wurde bei 420 nm gegen Luft über einen Zeitraum von 60 min in Intervallen von 5 min photometrisch bestimmt. Die methanolische CUR-Lösung diente als Vergleich, da CUR in Methanol stabil ist.

##### ***Effekt von MTP***

Nach Vortemperieren von 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 in Ab- oder Anwesenheit von 0,2 mg/ml MTP für 15 min im Photometer bei 37°C, wurde CUR zugegeben (Endkonzentration in der Küvette 30  $\mu\text{M}$ ) und gemischt. Das UV/Vis-Spektrum wurde im Bereich von 350-550 nm zu den Zeitpunkten 0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 60 min und 120 min gegen Luft aufgenommen.

### 6.2.5 In vitro-Studien mit Präzisions-Gewebeschnitten

Die Präparation und Inkubation von Präzisions-Gewebeschnitten wurde mit dem VITRON Tissue Slicer-System durchgeführt und ist in Abbildung 40 schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 40:** VITRON Tissue Slicer-System. [1] Hohlzylinder zum Ausstanzen von Gewebekegeln; [2] zylindrischer Schneidearm; [3] rotierendes Rasiermesser; [4] Mikrometerschraube; [5] Szintillationsgläsern mit Leberschnitt auf Edelmetallnetz; [6] DOC-Rotationsinkubator.

#### 6.2.5.1 Präparation von Leberschnitten

Die Leber von männlichen oder weiblichen unbehandelten Sprague-Dawley-Ratten wurde, nach dem Töten durch Genickbruch, entnommen und sofort in eisgekühltem Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 (Schneide-Puffer) gelegt. Gewebekegel mit einem Durchmesser von 8 mm wurden mit einem geschärften Hohlzylinder unter ständigem Drehen und mäßigem Druck auf einer Korkunterlage aus den Leberlappen ausgestanzt (Abb. 40, [1]). Die Gewebekegel wurden sofort wieder in den Schneide-Puffer gelegt und dort bis zum Schneiden belassen. Der gesamte Schneide-Prozess wurde in eisgekühltem und mit Sauerstoff (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begastem Krebs-Henseleit-Puffer pH 7,4 durchgeführt. Die Gewebekegel wurden in einen zylindrischen Schneidearm (Abb. 40, [2]) eingebracht und mechanisch durch langsames Bewegen des Schneidehalters über ein rotierendes Rasiermesser (Abb. 40, [3]) in Scheiben von 200 µm Dicke und 13-25 mg Nassgewicht geschnitten. Die Einstellung der Schnittstärke erfolgte mittels einer Mikrometerschraube (Abb. 40, [4]).

### 6.2.5.2 Inkubation von Leberschnitten

Für das kommerzielle Curcuminoid-Gemisch (75% CUR, 18% Demethoxy-CUR, 7% Bis-demethoxy-CUR) sowie für jedes der drei Curcuminoide wurden mindestens zwei unabhängige Experimente für jedes Geschlecht mit Schnitten verschiedener Tiere durchgeführt. Für die reduktiven Metaboliten Tetrahydro-CUR und Hexahydro-CUR, sowie die synthetischen CUR-Verbindungen Dimethyl-CUR und Iso-CUR, wurden zwei unabhängige Versuche mit Schnitten einer männlichen und einer weiblichen Ratte durchgeführt. In jedem Experiment wurden pro Testsubstanz drei Schnitte separat inkubiert.

Die Inkubation erfolgte nach der Methode von Fisher et al. [1990]. Nach Entnahme der Schnitte mit dem Puffer am Auslasshahn der Scheideeinheit wurde jeweils ein einzelner Schnitt auf einem sterilen Edelstahl-Netz in einem Hohlzylinder aus Teflon platziert und dieser horizontal in ein steriles 20 ml-Szintillationsgläschen, welches 1,7 ml Waymouth's Medium supplementiert mit 10% FKS und 50 µg/ml Gentamicin enthielt, eingebracht (Abb. 40, [5]). Die Gläschen wurden mit Plastikdeckeln in deren Mitte sich ein 2 mm großes Loch befand verschlossen, um den Gasaustausch mit der Umgebung zu gewährleisten. Die Schnitte wurden in einem Rotationsinkubator (9 rpm) bei 37°C unter einer Atmosphäre von 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dieses sog. DOC-System gewährleistet, dass sich die beiden Schnittoberflächen während der gesamten Kultivierung abwechselnd im Medium und in der Gasphase befinden (Abb. 40, [6]). Nach einer zweistündigen Vorinkubation wurden die Hohlzylinder mit den Schnitten in neue Gläschen, die frisches Kulturmedium und die Testsubstanzen in DMSO (Endkonzentration 1%) gelöst enthielten, überführt. Die Substanz-Endkonzentrationen waren 50 µM, 100 µM bzw. 200 µM. Zwei Arten von Kontroll-Kulturen wurden mitgeführt: Eine mit Substrat aber ohne Leberschnitt (Substanzkontrolle) und die andere mit Leberschnitt und DMSO anstelle der Testsubstanz (Leerwert). Die Schnitte wurden für 2 h, 4 h, 6 h oder 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Medien von drei Schnitten aus jedem Experiment vereinigt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Analyse gelagert.

### 6.2.5.3 Enzymatische Hydrolyse und Extraktion

Zu den aufgetauten vereinigten Medien wurden vor der Aufarbeitung 10 µl einer 5 mM TMBPA-Lösung in DMSO als ISTD pro ml Medium gegeben. Zwei verschiedene enzymatische Hydrolysemethoden wurden durchgeführt.

**Methode I:** Für die Untersuchung auf unkonjugierte Metabolite (Fraktion IA) wurde ein 0,5 ml-Aliquot des Mediums mit jeweils 3 × 0,5 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden unter Vakuum an der Evaporatorzentrifuge verdampft, der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen und ein 10-20 µl-Aliquot mittels HPLC/DAD analysiert. Für die Bestimmung der Summe aus unkonjugierten und konjugierten Metaboliten (Fraktion IB)

wurde ein weiteres 0,5 ml-Aliquot des Mediums mit 0,2 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0 gemischt und mit 10  $\mu$ l eines Gemisches aus  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* im Thermomixer bei 37°C für 16 h inkubiert. Danach erfolgte die Extraktion mit Ethylacetat und die HPLC/DAD-Analyse wie oben beschrieben. Die Menge an Konjugaten wurde als die Differenz zwischen den Fraktionen IB und IA berechnet.

**Methode II:** Diese Hydrolysemethode ermöglichte es durch separate Behandlung des Mediums mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase die Art der Konjugate aufzuklären. Für die Analyse unkonjugierter Metabolite (Fraktion IIA) wurden 0,2 ml Medium mit 0,2 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0 ohne Enzym vor der Extraktion mit Ethylacetat versetzt. Zur Hydrolyse der Glucuronide wurde ein weiteres 0,2 ml-Aliquot des Mediums mit 0,2 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0 gemischt und mit 5000 Fishman U der  $\beta$ -Glucuronidase Typ B-1 aus Rinderleber vor der Extraktion mit Ethylacetat inkubiert (Fraktion IIB). Zur Untersuchung der Sulfate wurden 0,2 ml Medium mit 0,2 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,1 und 0,1 U der Sulfatase Typ VI aus *Acetobacter aerogenes* inkubiert und extrahiert (Fraktion IIC). Für die Erfassung aller Metabolite (Fraktion IID), wie z.B. unkonjugierten Produkten, Glucuroniden und Sulfaten, wurde ein 0,2 ml-Aliquot des Mediums mit 5000 Fishman U der  $\beta$ -Glucuronidase Typ B-1 und 0,1 U der Sulfatase Typ VI in 0,2 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0 inkubiert. Alle enzymatischen Hydrolysen erfolgten bei 37°C für 2 h, gefolgt von der Extraktion mit Ethylacetat und der HPLC/DAD-Analyse wie oben für Methode I beschrieben. Die Differenz zwischen Fraktion IIB und IIA ergab die Menge an Glucuroniden und die Differenz zwischen Fraktion IIC und IIA die Menge an Sulfaten. Die Summe aus unkonjugierten Metaboliten, Glucuroniden und Sulfaten, die aus diesen Berechnungen erhalten wurden, stimmte gut mit Fraktion IID überein, welche zusätzlich zum Vergleich mit Fraktion IB aus Methode I herangezogen wurde.

Die Auswertung der natürlichen und synthetischen Curcuminoide erfolgte bei einer Wellenlänge von 420 nm, die der reduktiven Metaboliten und des ISTD bei 280 nm. Die Peaks wurden durch Vergleich ihrer HPLC-Retentionszeiten und Absorptionsspektren mit den synthetischen Referenzsubstanzen sowie durch Cochromatographie mit diesen identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte über das Verhältnis der Peakflächen (Testsubstanz zu ISTD), wobei für die Curcuminoide und ihre reduktiven Metabolite unterschiedliche Extinktionskoeffizienten berücksichtigt wurden (Tab. 3). Da sich die Absorption von Hexahydro-CUR und Hexahydro-bisdemethoxy-CUR nach Reduktion mit Natriumborhydrid zu Octahydro-CUR und Octahydro-bisdemethoxy-CUR nicht änderte, wurden für die Quantifizierung der Octahydro-Curcuminoide die Extinktionskoeffizienten der Hexahydro-Produkte angenommen. Die Peakflächen der beiden Octahydro-Diastereomere wurden addiert.

Die Wiederfindungen der Substanzen in den Inkubationen mit und ohne Leberschnitt wurden

bezüglich der eingesetzten Substanzmenge ohne Inkubation und nach sofortiger Extraktion des Mediums berechnet. In den Substanzinkubationen mit Leberschnitt repräsentiert die Wiederfindung die Summe aus Muttersubstanz plus Metabolite (unkonjugiert und konjugiert).

## 6.2.6 In vitro-Assays mit Zellfraktionen: Phase I-Reaktionen

### 6.2.6.1 Oxidative Umsetzungen

Die mikrosomalen Inkubationen zur Untersuchung des oxidativen *in vitro*-Metabolismus der Curcuminoiden wurden in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit Lebermikrosomen von männlichen unbehandelten Sprague-Dawley-Ratten oder mit unbehandelten sowie mit Aroclor 1254-behandelten Wistar-Ratten durchgeführt. Die Inkubationen enthielten 0,5-1,0 mg/ml mikrosomales Protein, Substrat (50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M Curcuminoid-Gemisch bestehend aus 75% CUR, 18% Demethoxy-CUR und 7% Bisdemethoxy-CUR, 50  $\mu$ M Hexahydro-CUR) in DMSO (Endkonzentration 1%) und ein NADPH-generierendes System. Das NADPH-generierende System wurde jeweils unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt und setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	Volumen bzw.	Endkonz.
	Einwaage	im Ansatz
Isocitrat-Dehydrogenase (20 U/ml)	500 $\mu$ l	0,9 U
Isocitrat (2,33 M)	90 $\mu$ l	9,4 mM
NADP <sup>+</sup>	25 mg	1,21 mM
Magnesiumchlorid (1 M)	100 $\mu$ l	4,3 mM
Kalium-Phosphat-Puffer (0,1 M) pH 7,4	100 $\mu$ l	—

Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 37°C wurden 70  $\mu$ l NADPH-generierendes System zugegeben und das Gemisch für 40 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation wurde durch Extraktion mit 3  $\times$  0,5 ml Ethylacetat abgestoppt und die vereinigten Extrakte an der Evaporatorzentrifuge zur Trockne eingengt, der Rückstand in 50  $\mu$ l Methanol gelöst und ein Aliquot zur HPLC/DAD-Analyse eingesetzt.

Alle Inkubationen wurden mindestens als Doppelbestimmungen ausgeführt. Als Negativkontrollen dienten Inkubationen ohne NADPH-generierendes System oder mit hitzeinaktivierten Mikrosomen. Um die Aktivität der Mikrosomen zu überprüfen, wurden zusätzlich Kontroll-Inkubationen mit 100  $\mu$ M Testosteron durchgeführt und wie bei Pfeiffer und Metzler [2004] beschrieben analysiert.

### 6.2.6.2 Reduktive Umsetzungen

Der reduktive Curcuminoid-Metabolismus wurde mit Rattenlebercytosol, humanem Lebercytosol und mit cytosolischer Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber und NADH als Kosubstrat untersucht. Die Inkubationen wurden in einem Endvolumen von 0,5 ml durchgeführt und setzten sich aus dem Substrat (100  $\mu$ M Curcuminoid-Gemisch bestehend aus 75% CUR, 18% Demethoxy-CUR und 7% Bisdemethoxy-CUR, 100  $\mu$ M Hexahydro-CUR, 100  $\mu$ M Tetrahydro-CUR, 50  $\mu$ M CUR, 50  $\mu$ M Iso-CUR) in DMSO (Endkonzentration 1%), 1 mg/ml cytosolisches Protein oder 5 U Alkoholdehydrogenase und 10 mM NADH in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 zusammen. Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet und 1 h bzw. 2 h bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit 3  $\times$  0,5 ml Ethylacetat gestoppt, die vereinigten Extrakte unter reduziertem Druck in der Evaporatorzentrifuge verdampft, der Rückstand in 50  $\mu$ l Methanol aufgenommen und ein Aliquot mittels HPLC/DAD analysiert.

Die Inkubationen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt. In Kontroll-Inkubationen wurde das Substrat mit nativem Cytosol, aber ohne NADH bzw. mit NADH, aber ohne Alkoholdehydrogenase, eingesetzt.

### 6.2.6.3 Umsetzungen mit intestinaler S9-Fraktion

Der oxidative und reduktive CUR-Metabolismus wurde *in vitro* mit S9-Fraktion (enthält mikrosomales und cytosolisches Protein) untersucht, die wie unter 6.2.3.2 beschrieben, aus dem Dünndarm männlicher Sprague-Dawley-Ratten präpariert wurde. Die Reaktionen fanden in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 mit 50  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M CUR in DMSO (Endkonzentration 1%) und 10 mM Magnesiumchlorid in einem Gesamtvolumen von 1 ml statt. Jeder Reaktionsansatz enthielt 1 mg/ml Gesamtprotein und (i) ein NADPH-generierendes System, wie unter 6.2.6.1 beschrieben, für die Monooxygenierung oder (ii) 10 mM NADH für die Reduktion. Nach 5 min Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Kosubstrat-Zugabe gestartet und die Inkubation 1 h bei 37°C fortgesetzt. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit 3  $\times$  0,5 ml Ethylacetat gestoppt, die vereinigten Extrakte an der Evaporatorzentrifuge zur Trockne eingengt, der Rückstand in 50  $\mu$ l Methanol aufgenommen und ein Aliquot zur HPLC/DAD-Analyse verwendet.

Alle Inkubationen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Kontroll-Inkubationen fanden mit S9-Fraktion in Abwesenheit von NADPH-generierendem System bzw. NADH statt. Parallel zu den Versuchen mit S9-Fraktion aus Rattendarm wurden analoge Umsetzungen mit S9-Fraktion aus männlicher Rattenleber durchgeführt.

## 6.2.7 In vitro-Assays mit Zellfraktionen: Phase II-Reaktionen

### 6.2.7.1 Konventioneller Glucuronidierungsassay

Die ersten Glucuronidierungsreaktionen fanden mit hepatischen Mikrosomen von Ratte und Mensch in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 statt. Die Versuchsbedingungen wurden unter dem Gesichtspunkt gewählt eine hohe Produktbildung zu gewährleisten. Die Reaktionsansätze enthielten 100  $\mu$ M Substrat (CUR, Demethoxy-CUR, Bisdemethoxy-CUR, Hexahydro-CUR, Tetrahydro-CUR) in DMSO (Endkonzentration 1%), 1-3 mg/ml mikrosomales Protein, 4 mM UDPGA und 10 mM Magnesiumchlorid. Nach einer Vorinkubation für 5 min bei 37°C im Thermomixer wurde die Reaktion durch Zugabe von UDPGA gestartet und der Ansatz für 40 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das mikrosomale Protein durch Zugabe von 25  $\mu$ l 20%iger wässriger TCA ausgefällt und die Lösung mit 25  $\mu$ l 1 M wässriger NaOH neutralisiert. Die Aufarbeitung vor der HPLC/DAD-Analyse wurde auf zwei unterschiedliche Weisen vorgenommen:

(i) Extraktion mit 3  $\times$  0,5 ml Ethylacetat. Die Ethylacetatreste wurden unter einem N<sub>2</sub>-Strom von der wässrigen Phase entfernt, die ausgefällten Proteine abzentrifugiert und der Überstand zur HPLC/DAD-Analyse eingesetzt. Die vereinigten Extrakte wurden an der Evaporatorzentrifuge bis zur Trockne eingengt, der Rückstand in 50  $\mu$ l Methanol aufgenommen und ebenfalls mittels HPLC/DAD analysiert.

(ii) Abtrennung der Proteine durch Zentrifugation (3 min bei ca. 1000  $\times$  g) und HPLC/DAD-Analyse des Überstandes.

Die Identifizierung der Glucuronide fand durch Hydrolyse mit einem  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase-Gemisch aus *Helix pomatia* statt (**Methode I**). Dazu wurde der restliche wässrige Glucuronid-Überstand mit 0,2 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0 gemischt und mit 10  $\mu$ l des  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase-Gemisches im Thermomixer bei 37°C für 16 h inkubiert. Danach erfolgte die Extraktion mit Ethylacetat und die HPLC/DAD-Analyse wie oben beschrieben.

Als Positivkontrolle diente die Glucuronidierung von 4-Methylumbelliferon, da das 4-Methylumbelliferon-Glucuronid als Referenzsubstanz zur Verfügung stand. Negativkontrollen wurden in Abwesenheit von UDPGA durchgeführt.

### 6.2.7.2 Kombierter Reduktions- und Glucuronidierungsassay

Zur Erfassung von Glucuroniden der reduktiven CUR-Metaboliten wurde die Reduktion und Glucuronidierung von CUR simultan in einem kombinierten Reaktionsansatz mit Cytosol und Mikrosomen aus Rattenleber bzw. Humanleber untersucht. Dabei wurden die Versuchsbedingungen der Einzelreaktionen (Kap. 6.2.6.2 und 6.2.7.1) modifiziert. Alle Inkubationen



wurden in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt. Der kombinierte Ansatz enthielt 100  $\mu$ M CUR in DMSO (Endkonzentration 1%), 1 mg/ml cytosolisches Protein, 1 mg/ml mikrosomales Protein, 10 mM NADH, 4 mM UDPGA und 10 mM Magnesiumchlorid. Nach Vorinkubation für 5 min bei 37°C wurden die Kofaktoren zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 25  $\mu$ l 20%iger TCA die Reaktion abgebrochen, mit 25  $\mu$ l 1 M wässriger NaOH neutralisiert und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (3 min bei ca. 1000  $\times$  g) entfernt. Der Überstand wurde direkt oder nach enzymatischer Hydrolyse der Konjugate mittels HPLC/DAD analysiert. Für die Hydrolyse wurde ein 0,2 ml-Aliquot des Überstandes eingesetzt. Die Spaltung wurde mit einem  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase-Gemisch aus *Helix pomatia* in 0,2 ml Acetat-Puffer pH 5,0, wie für Methode I unter 6.2.7.1 beschrieben, durchgeführt.

Es wurden drei verschiedene Kontrollen mit Cytosol und Mikrosomen, aber in Abwesenheit von (i) UDPGA (reduktiver Metabolismus), (ii) NADH (Glucuronidierung) und (iii) beiden Kofaktoren (Leerwert), mitgeführt.

### 6.2.7.3 Glucuronidierungen mit intestinaler S9-Fraktion

Die *in vitro*-Glucuronidierung von CUR wurde mit S9-Fraktion (enthält mikrosomales und cytosolisches Protein) aus dem Dünndarm männlicher Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Die Inkubationen wurden in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 mit 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M CUR bzw. 20  $\mu$ M Hexahydro-CUR in DMSO (Endkonzentration 1%), 2 mg/ml Gesamtprotein, 4 mM UDPGA und 10 mM Magnesiumchlorid in einem Endvolumen von 0,5 ml durchgeführt. Nach Vorinkubation für 5 min bei 37°C wurde UDPGA zugegeben und für 40 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 25  $\mu$ l 20%iger TCA die Reaktion abgebrochen, mit 25  $\mu$ l 1 M wässriger NaOH neutralisiert und die präzipitierten Proteine durch Zentrifugation (3 min bei ca. 1000  $\times$  g) entfernt. Der Überstand wurde direkt und nach enzymatischer Hydrolyse der Glucuronide in einem Aliquot des Überstandes, mit einem  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase-Gemisch aus *Helix pomatia* in 0,2 ml Acetat-Puffer pH 5,0, wie für Methode I in Kapitel 6.2.7.1 beschrieben, mittels HPLC/DAD analysiert.

Die Negativkontrollen enthielten S9-Fraktion aber kein UDPGA. Vergleichend wurden analoge Umsetzungen mit S9-Fraktion aus männlicher Rattenleber parallel durchgeführt.

### 6.2.7.4 Modifizierter Glucuronidierungsassay

Da die etablierte Fällung der mikrosomalen Proteine mit TCA den Nachweis der Curcuminoiden und ihrer Glucuronide störte und eine Quantifizierung nicht ermöglichte, war eine Modifizierung und Optimierung des ursprünglichen Glucuronidierungsassays

(Kap. 6.2.7.1) notwendig. Die Inkubationen wurden in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer, der das Substrat (20-100  $\mu\text{M}$  CUR, Demethoxy-CUR, Bisdemethoxy-CUR, Dimethyl-CUR, Dimethyl-bisdemethoxy-CUR, Iso-CUR, Hexahydro-CUR, Hexahydro-bisdemethoxy-CUR, Hexahydro-dimethyl-CUR, Hexahydro-iso-CUR, Tetrahydro-CUR) in DMSO (Endkonzentration 2%), 0,1-1,0 mg/ml mikrosomales Protein, 20 mM UDPGA, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Alamethicin, 10 mM Saccharinsäure-1,4-lacton und 10 mM Magnesiumchlorid enthielt, in einem Endvolumen von 0,2 ml durchgeführt. Durch Einsatz des Porenbildners Alamethicin konnten die Proteinkonzentrationen reduziert werden. Saccharinsäure-1,4-lacton wirkt als  $\beta$ -Glucuronidase-Inhibitor. Die Lösungsmittelkonzentration wurde auf 2% erhöht, um eine bessere Löslichkeit der Curcuminoiden zu gewährleisten. Es erfolgte eine Vorinkubation der Mikrosomen mit Alamethicin für 15 min auf Eis. Danach wurden die übrigen Komponenten zugegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass das Substrat (Instabilität) zuletzt hinzugefügt wurde. Die Inkubationszeiten betragen bis zu 60 min. Die HPLC/DAD-Analyse erfolgte je nach Fragestellung (i) nach Zentrifugation (3 min bei ca. 1000  $\times$  g) des Ansatzes aus dem wässrigen Überstand oder (ii) in Anlehnung an Matern et al. [1994] nach Extraktion der Curcuminoid-Glucuronide aus saurer Lösung. Für die saure Extraktion der Glucuronide wurden 0,2 ml 0,7 M Glycin-HCl-Puffer pH 1,2 zum Inkubationsansatz gegeben und gemischt (pH 1,8) und dann mit 3  $\times$  0,5 ml Ethylacetat extrahiert. Die Glucuronide wurden durch Einengen der vereinigten Extrakte unter Vakuum bis zur Trockne und Aufnahme des Rückstandes in Methanol angereichert.

Die Identifizierung der Glucuronide erfolgte anhand der HPLC-Retentionszeit und des UV/Vis-Spektrums sowie durch Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase Typ B-1 aus Rinderleber (**Methode II**). Ein Aliquot des wässrigen Glucuronid-Überstandes wurde mit 0,2 ml 0,15 M Acetat-Puffer pH 5,0 gemischt und mit 5000 Fishman U der  $\beta$ -Glucuronidase vor der Extraktion mit Ethylacetat für 2 h inkubiert und anschließend mittels HPLC/DAD analysiert.

### 6.2.7.5 Umsetzungen mit rekombinanten humanen UGTs

Der Assay wurde mit kommerziell erhältlichen Supersomen (Gentest) durchgeführt. Supersomen stellen mikrosomale Fraktionen aus Sf9-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) dar, die durch Infektion mit einem Baculovirus-Stamm, der die cDNA eines humanen UGT-Isoenzym tragt, transfiziert wurden. Eingesetzt wurden die humanen Isoenzyme UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10 und UGT2B7. Die einzelnen Isoenzym-Fractionen wurden vor Verwendung in geeignete Aliquots aufgeteilt, um zu häufige Auftau-Einfrier-Zyklen zu vermeiden und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Glucuronidierung wurde in 50 mM Tris-Puffer pH 7,5, der 0,05-1,0 mg/ml mikrosomales Protein, 2 mM UDPGA, 20  $\mu\text{M}$  Substrat (CUR, Demethoxy-CUR, Bisdemethoxy-CUR, Hexahydro-CUR, Hexahydro-bisdemethoxy-CUR, Dimethyl-CUR), 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Alamethicin und 10 mM Magnesiumchlorid enthielt, in einem Endvolumen von 0,2 ml durchgeführt. Die

Substrate waren in DMSO gelöst, das mit einer Endkonzentration von 2% eingesetzt wurde, um ein vollständiges Lösen der Curcuminoide zu gewährleisten. Die Mikrosomen wurden mit dem Porenbildner Alamethicin 10 min auf Eis vorinkubiert. Die restlichen Komponenten mit Ausnahme des Substrates (Instabilität) wurden bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet. Die Inkubationen fanden bei 37°C im Thermomixer unter leichtem Schütteln bis zu 2 h mit linearer Produktbildung statt. Die Reaktion wurde durch Eiskühlung abgestoppt und ein Aliquot der wässrigen Lösung sofort zur HPLC/DAD-Analyse eingesetzt. Die Analyse der Hexahydro-Verbindungen erfolgte nach Abtrennung der Proteine durch Zentrifugation (3 min bei ca.  $1000 \times g$ ).

Alle Inkubationen wurden als Dreifachbestimmungen ausgeführt. Als Positivkontrollen dienten TFMU und E2 sowie ggf. Propofol. TFMU stellt für fast alle Isoenzyme ein gutes Substrat dar [Baranczewski et al., 2004], während E2 ein spezifisches Substrat für UGT1A1 unter Bildung des 3-HO-Glucuronids ist [Fisher et al., 2000b; Senafi et al., 1994] und Propofol ein spezifisches Substrat von UGT1A9 repräsentiert [King et al., 2000]. Die Negativkontrolle enthielt alle Komponenten und wurde mit einer mikrosomalen Fraktion aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen ohne rekombinantes UGT-Isoenzym (UGT Control) durchgeführt.

Aufgrund der hohen Nachweisgrenze von E2 bei UV-Detektion erfolgte die HPLC/DAD-Analyse von E2 nach Aufkonzentrierung durch Extraktion mit  $3 \times 0,5$  ml Ethylacetat aus saurer Lösung nach Zugabe von 0,2 ml 0,7 M Glycin-HCl-Puffer pH 1,2. Das Lösungsmittel wurde an der Evaporatorzentrifuge verdampft und der Rückstand in Methanol aufgenommen.

Die Identifizierung der Glucuronide erfolgte anhand der HPLC-Retentionszeit und des UV/Vis-Spektrums sowie durch die Hydrolysemethode II (Kap. 6.2.7.4) mit  $\beta$ -Glucuronidase Typ B-1 in einem Aliquot der wässrigen Glucuronid-Lösung. Das 3-HO-Glucuronid von E2 stand zusätzlich als Referenzsubstanz zur Verfügung.

Die Glucuronidausbeute und die spezifische katalytische Aktivität wurden auf der Grundlage des erhaltenen HPLC-Chromatogramms über das Verhältnis der Peakflächen von Muttersubstanz und zugehörigem(n) Glucuronid(en) berechnet. Dabei wurde für die Glucuronide der Extinktionskoeffizient der Muttersubstanz angenommen. Eine Ausnahme stellte das 3-HO-Glucuronid von E2 dar, das über eine eigene externe Kalibriergerade (s. Anhang A.2.2, Tab. 19) ausgewertet wurde, da sich der Extinktionskoeffizient von Glucuronid und Muttersubstanz unterscheidet.

Die Wiederfindungen der drei Curcuminoide CUR, Demethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR sowie von synthetischem Dimethyl-CUR wurden über die externe Kalibrierung der Muttersubstanzen (s. Anhang A.2.2, Tab. 19), als Summe aus Muttersubstanz plus Glucuronid(e), bezüglich der eingesetzten Substanzmenge berechnet.

#### 6.2.7.6 Umsetzungen mit gewebe- und speziesspezifischen Mikrosomen

Die Glucuronidierungen wurden mit Mikrosomen aus Lebergewebe von Mensch und Ratte sowie aus Darmgewebe von Mensch, Ratte und Schwein durchgeführt, die wie unter 6.2.3.1 bzw. 6.2.3.2 beschrieben, präpariert wurden. Die verwendeten humanen intestinalen Mikrosomen wurden kommerziell erworben (Gentest). Es handelte sich um einen Mikrosomen-Pool aus dem Duodenum und Jejunum von fünf Spendern (männlich und weiblich, Kaukasier und Afro-Amerikaner). Die Umsetzungen wurden analog zu den Glucuronidierungen mit rekombinanten humanen UGTs in Kapitel 6.2.7.5 durchgeführt und ausgewertet. Abweichend von diesem Assay enthielten die Ansätze zusätzlich 10 mM Saccharinsäure-1,4-lacton als  $\beta$ -Glucuronidase-Inhibitor. Die verwendeten Proteinkonzentrationen lagen im Bereich von 0,05-0,5 mg/ml mikrosomalem Protein. Als Negativkontrollen dienten die vollständigen Ansätze mit nativen Mikrosomen, aber in Abwesenheit von UDPGA.

#### 6.2.7.7 Inhibitionsassay

Da Propofol als spezifisches Substrat für UGT1A9 bekannt ist [King et al., 2000] und der Verdacht bestand, dass dieses Isoenzym für die phenolische CUR-Glucuronidierung verantwortlich ist, wurde der Effekt zunehmender Propofol-Konzentrationen (0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 200  $\mu$ M) auf die Glucuronidierung von CUR (100  $\mu$ M) untersucht. Die Inkubationen wurden bei 37°C für 15 min in Anwesenheit von 1 mg/ml mikrosomalem Protein aus humaner Leber, 2 mM UDPGA, 25  $\mu$ g/ml Alamethicin, 10 mM Saccharinsäure-1,4-lacton und 10 mM Magnesiumchlorid in 50 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit einem Endvolumen von 0,2 ml durchgeführt. In den vollständigen Ansätzen waren beide Substrate enthalten, wobei die Propofol-Konzentration variabel war. In den Kontroll-Inkubationen war kein Propofol enthalten. Die DMSO-Endkonzentration im Ansatz betrug 2%. Die Reaktion wurde durch Eiskühlung terminiert, die Proteine abzentrifugiert (3 min bei ca. 1000  $\times$  g) und die CUR-Glucuronide in einem Aliquot des Überstandes mittels HPLC/DAD analysiert.

Alle Inkubationen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt. Die Berechnung erfolgte für das phenolische und aliphatische CUR-Glucuronid separat. Die Inhibition wurde aus der Menge des in Anwesenheit von Propofol gebildeten CUR-Glucuronids, bezüglich der vorhandenen CUR-Glucuronid-Menge nach Inkubation von CUR ohne Propofol, über die Peakflächen berechnet.

#### 6.2.7.8 Kinetische Untersuchungen

Die Untersuchungen zur Kinetik der aliphatischen CUR-Glucuronidierung wurden mit humanen Lebermikrosomen und mit rekombinantem humanem UGT1A8 (Supersomen) durchgeführt. Die CUR-Konzentrationen lagen im Bereich von 0,1-50  $\mu$ M bei Verwendung von

humanen Lebermikrosomen und 5-50  $\mu\text{M}$  bei Einsatz von UGT1A8. Die Glucuronidierung und Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeiten (spezifische Glucuronidierungsaktivitäten) fand für jede CUR-Konzentration, wie in Kapitel 6.2.7.5 bzw. 6.2.7.6 beschrieben, statt. Die Kurvenanpassung und Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms OriginPro 6.0 (OriginLab Corporation) durch nichtlineare Regressionsanalyse. Es wurde die Michaelis-Menten-Gleichung unter Verwendung der spezifischen Aktivitäten bei 0,1-50  $\mu\text{M}$  bzw. 5-50  $\mu\text{M}$  CUR angewendet:

$$\frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

wobei  $K_m$  die Michaelis-Menten-Konstante,  $V_{max}$  die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und  $S$  die Substratkonzentration darstellt. Die Glucuronidierungsreaktionen wurden für jede CUR-Konzentration und für jede mikrosomale Fraktion mindestens als Doppelbestimmungen ausgeführt.

#### 6.2.7.9 Sulfatierungsassay

Die Sulfatierungen mit Rattenlebercytosol fanden in Anlehnung an Asai und Miyazawa [2000] statt. Die Inkubationen wurden in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,4 durchgeführt und enthielten das Substrat (40  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  CUR, 100  $\mu\text{M}$  Hexahydro-CUR) in DMSO (Endkonzentration 2%), 1 mg/ml cytosolisches Protein, 0,4 mM 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) und 10 mM Magnesiumchlorid. Der Reaktionsansatz wurde 3 min bei 37°C vorinkubiert, die Reaktion durch Zugabe von PAPS gestartet und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Eiskühlung abgestoppt und der Ansatz zentrifugiert (3 min bei ca. 1000  $\times$  g). Der Überstand wurde direkt und nach enzymatischer Hydrolyse der Sulfate mittels HPLC/DAD analysiert. Für die Hydrolyse wurde ein Aliquot des Überstandes mit 0,1 U Sulfatase Typ IV aus *Acetobacter aerogenes* in 0,2 ml Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,1 gemischt, für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 3  $\times$  0,5 ml Ethylacetat extrahiert und analysiert.

Alle Inkubationen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt. Negativkontrollen wurden in Abwesenheit von PAPS durchgeführt. Die Sulfotransferase-Aktivität des Cytosols wurde durch Umsetzung von 100  $\mu\text{M}$  4-Methylumbelliferon sichergestellt, da das 4-Methylumbelliferon-Sulfat als Referenzsubstanz vorhanden war.

## 6.2.8 Allgemeine Methoden für Glucuronide

### 6.2.8.1 Extraktion von Glucuroniden

Zur Untersuchung auf Extrahierbarkeit der Glucuronide von CUR, Demethoxy-CUR, Bisdemethoxy-CUR, Dimethyl-CUR, Iso-CUR, Hexahydro-CUR, Hexahydro-iso-CUR, Tetrahydro-CUR und Ketoprofen aus saurer Lösung wurden die Glucuronide im modifizierten Glucuronidierungsassay (Kap. 6.2.7.4) unter Bedingungen, die möglichst hohe Glucuronid-ausbeuten lieferten, hergestellt. Die Substrate wurden mit Endkonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  (DMSO Endkonzentration 2%) eingesetzt.

Nach der Reaktion wurde mit 0,2 ml 0,7 M Glycin-HCl-Puffer pH 1,2 angesäuert und mit  $2 \times 0,4$  ml Ethylacetat extrahiert. Vom empfindlicheren wässrigen Extraktionsrückstand wurde das restliche Ethylacetat unter einem  $\text{N}_2$ -Strom entfernt (ca. 1 min), die Proteine bei 4°C abzentrifugiert (10 min, 20800 rcf) und anschließend 30  $\mu\text{l}$  des Überstandes mittels HPLC/DAD analysiert. Die Extrakte wurden währenddessen auf Eis gelagert, an der Evaporatorzentrifuge zur Trockne eingengt, mit Methanol aufgenommen und anschließend ein Aliquot zur HPLC/DAD-Analyse eingesetzt.

Die Glucuronid-Menge im Extrakt und im wässrigen Extraktionsrückstand wurde über die Peakflächen der Glucuronide anhand der externen Kalibrierung für die Muttersubstanzen (s. Anhang A.2.2, Tab. 19), unter der Annahme, dass sich die Extinktionskoeffizienten von Muttersubstanz und Glucuronid nicht unterscheiden, quantifiziert.

### 6.2.8.2 Anreicherung von Glucuroniden

Zur Anreicherung von Curcuminoid- und Ketoprofen-Glucuroniden wurden die Muttersubstanzen in mehreren 0,2 ml Parallelansätzen im modifizierten Glucuronidierungsassay (Kap. 6.2.7.4), unter Bedingungen, die eine nahezu vollständige Umsetzung lieferten, eingesetzt. Die Konzentration der Muttersubstanzen (CUR, Demethoxy-CUR, Bisdemethoxy-CUR, Dimethyl-CUR, Iso-CUR, Hexahydro-CUR, Hexahydro-iso-CUR, Ketoprofen) betrug jeweils 100  $\mu\text{M}$  (DMSO Endkonzentration 2%). Es wurden hepatische Mikrosomen männlicher Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Proteinkonzentrationen lagen im Bereich von 2,0-6,5 mg/ml mikrosomalem Protein und die Inkubationszeiten betragen max. 90 min. Für alle Substrate außer Dimethyl-CUR lagen die Umsätze zwischen 80% und 100%. Der max. Umsatz für Dimethyl-CUR betrug 40%.

Nach der Reaktion wurde mit 0,2 ml 0,7 M Glycin-HCl-Puffer pH 1,2 angesäuert und mit  $2 \times 0,4$  ml Ethylacetat extrahiert. Die Extrakte der Parallelansätze eines Substrates wurden vereinigt, das Ethylacetat an der Evaporatorzentrifuge entfernt und der Glucuronid-Rückstand in DMSO (25  $\mu\text{l}$ ) aufgenommen. Aus den so erhaltenen konzentrierten Glucuronid-

Stammlösungen (mM-Bereich) wurde für die Konzentrationsbestimmung mittels HPLC/DAD eine 1:25-Verdünnung in Methanol hergestellt. Die Ermittlung der Glucuronid-Konzentration erfolgte über die externe Kalibrierung der Muttersubstanzen (s. Anhang A.2.2, Tab. 19), unter der Annahme, dass sich die Extinktionskoeffizienten von Aglykon und Glucuronid nicht unterscheiden.

Die so hergestellten konzentrierten Glucuronid-Lösungen in DMSO wurden im Mikrotubuli-Polymerisationsassay (Kap. 6.2.10) eingesetzt.

### 6.2.9 Präparation von mikrotubulären Proteinen aus Rinderhirn

Die Präparation der MTP erfolgte aus frischem Rinderhirn durch zwei Polymerisations-Depolymerisationszyklen in Anlehnung an Shelanski et al. [1973]. Das frisch entnommene Rinderhirn wurde auf Eis transportiert, Hirnhäute und Blutgefäße mit einer Pinzette unter Eiskühlung entfernt und das Hirn anschließend mit eiskaltem REA-Puffer gewaschen. Kleinhirn und unbrauchbare Hirnbestandteile wurden entfernt und das Gewebe in eiskaltem REA-Puffer gewogen. Das Hirn wurde mit der Schere in eiskaltem REA-4 M-Puffer (0,75 ml/g Hirn) zerkleinert und anschließend mit einem Stabmixer unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde bei  $6500 \times g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min) zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand bei  $100000 \times g$  für 60 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Zugabe einer 50 mM GTP-Lösung in REA-Puffer (Endkonzentration 1 mM) bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 min im Wasserbad zur Polymerisation gebracht. Die Suspension wurde für 60 min bei  $100000 \times g$  und  $30^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in eiskaltem REA-Puffer ( $\frac{1}{4}$  Volumen des Überstandes der ersten Ultrazentrifugation) suspendiert, durch sanftes Pottern homogenisiert und auf Eis für 30 min zur Depolymerisation gebracht. Dieser Polymerisations-Depolymerisationszyklus wurde ein weiteres Mal wiederholt, wobei der Überstand zur Polymerisation im gleichen Volumen REA-8 M-Puffer suspendiert wurde. Nach Beendigung der zweiten Depolymerisation wurde ein letztes Mal bei  $100000 \times g$  für 60 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der präparierten MTP erfolgte photometrisch. 450  $\mu\text{l}$  REA-Puffer wurden in einer Quarzküvette vorgelegt, mit 50  $\mu\text{l}$  MTP-Suspension versetzt und die Extinktion bei 276 nm gegen Luft gemessen. Die Ermittlung der MTP-Konzentration erfolgte über das Lambert-Beer'sche Gesetz mit einem Extinktionskoeffizient von  $\varepsilon = 120 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

### 6.2.10 Mikrotubuli-Polymerisationsassay

Der Mikrotubuli-Polymerisationsassay wurde in Anlehnung an Gaskin [1982] unter zellfreien Bedingungen *in vitro* durchgeführt. Er dient dazu, festzustellen, ob Substanzen die Poly-

merisation von MTP zu Mikrotubuli beeinflussen können. Diese Polymerisation ist mit einer Trübung verbunden, die bei 350 nm photometrisch erfasst werden kann. Die Extinktionszunahme ist der Menge an gebildeten Mikrotubuli direkt proportional.

Die Polymerisation der Mikrotubuli wurde mit frisch aufgetauten MTP aus Rinderhirn durchgeführt, die wie in Kapitel 6.2.9 beschrieben, präpariert wurden. Es wurden MTP-Chargen verschiedener Präparationen verwendet. Die Messung fand in REA-Puffer, der 10  $\mu\text{M}$  MTP enthielt, in einem Endvolumen von 0,5 ml statt. Da sechs Ansätze parallel gemessen wurden, wurden die MTP in einem entsprechend großen Volumen REA-Puffer suspendiert und jeweils 480  $\mu\text{l}$  in den sechs Küvetten vorgelegt. Vor Zugabe der Testsubstanzen wurde die Absorption bei 276 nm bestimmt, um zu gewährleisten, dass sich in jeder Küvette annähernd die gleiche MTP-Menge befand.

Die Testsubstanzen (CUR, Demethoxy-CUR, Bisdemethoxy-CUR, Iso-CUR, Dimethyl-CUR, Hexahydro-CUR, Vanillin, Ferulasäure, Ketoprofen, Colchicin) wurden in freier Form und als Glucuronide in DMSO (Endkonzentration 2%) eingesetzt. Die verwendeten Glucuronid-Lösungen wurden, wie unter 6.2.8.2 beschrieben, hergestellt. Die Endkonzentrationen der Curcuminoiden und des Ketoprofens lagen im Bereich von 40-100  $\mu\text{M}$ , die der Glucuronide zwischen 9 und 80  $\mu\text{M}$ . Die Endkonzentrationen der beiden CUR-Abbauprodukte Vanillin und Ferulasäure betragen 200  $\mu\text{M}$ , die von Colchicin 2  $\mu\text{M}$ .

Nach Zugabe der Testsubstanzen wurden diese 20 min bei Raumtemperatur mit den MTP inkubiert, um eine Reaktion zu ermöglichen. Nach dieser Vorinkubation wurde die Polymerisation durch Zugabe von in REA-Puffer gelöstem GTP (Endkonzentration 0,5 mM) gestartet und die Trübungszunahme bei 350 nm über 30 min in 5 min-Intervallen bei 35°C gemessen. Anschließend erfolgte die Depolymerisation bei 4°C für 30 min. Es wurde ein zweiter und dritter Polymerisations-Depolymerisationszyklus ohne zusätzliche GTP-Zugabe abgeschlossen, um zwischen normaler Mikrotubuli-Bildung und Aggregation zu unterscheiden.

Die Kontroll-Inkubationen enthielten DMSO anstelle der Testsubstanz. Beim Einsatz von Curcuminoid-Derivaten mit intaktem konjugiertem Doppelbindungssystem musste aufgrund der Eigenabsorption eine zusätzliche Kontrolle, welche die Testsubstanz, aber kein GTP enthielt, durchgeführt werden. Als Positivkontrollen für die Hemmung der Polymerisation dienten Colchicin sowie die Acylglucuronide des NSAID Ketoprofen.

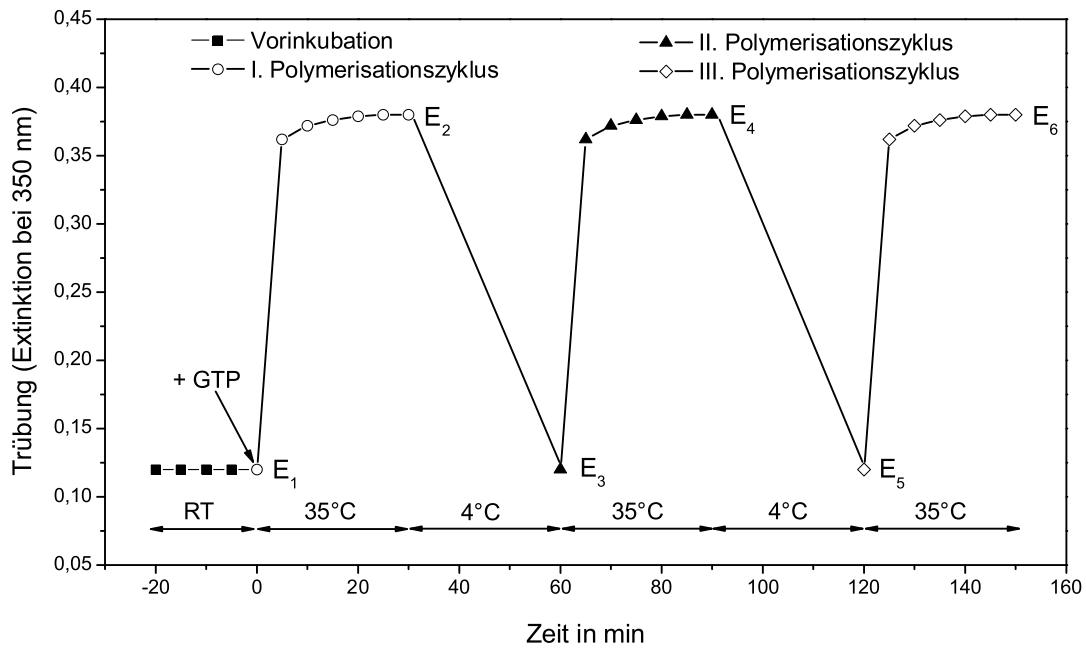
Abbildung 41 repräsentiert einen üblichen Polymerisationsverlauf auf dessen Grundlage die Auswertung erfolgte. Die Berechnung wurde anhand des zweiten und dritten Polymerisationszyklus vorgenommen, da teilweise während der Vorinkubation eine Extinktionszunahme beobachtet wurde, wodurch die erste Polymerisation ungeeignet war. Die Auswertung des zweiten und dritten Polymerisationszyklus wurde wie folgt vorgenommen:

II. Polymerisationszyklus:  $\Delta E_{II} = E_4 - E_3$

III. Polymerisationszyklus:  $\Delta E_{III} = E_6 - E_5$



Die Extinktionswerte  $E_3$  und  $E_5$  jeder Testsubstanz wurden auf null normiert und die Hemmung relativ zur DMSO-Kontrolle, die als Referenz diente (100% Polymerisation), berechnet. Die Extinktionswerte der absorbierenden Curcuminoid-Derivate wurden um die Eigenabsorption berichtigt. Die Inhibition der Polymerisation wurde aus der Hemmung der zweiten und dritten Polymerisation durch Mittelwertbildung berechnet.



**Abbildung 41:** Graphische Auftragung des MTP-Polymerisationsverlaufs. Dargestellt sind drei Polymerisationszyklen (30 min, 35°C) und zwei Depolymerisationszyklen (30 min, 4°C). RT, Raumtemperatur.

## 7 Literatur

- Abe, Y., Hashimoto, S. und Horie, T., 1999. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res*, 39(1), 41–47.
- Adams, J. B., Phillips, N. S. und Young, C. E., 1989. Formation of glucuronides of estradiol-17 $\beta$  by human mammary cancer cells. *J Steroid Biochem*, 33(5), 1023–1025.
- Aggarwal, B. B., Kumar, A. und Bharti, A. C., 2003. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 23(1A), 636–398.
- Akira, K., Uchijima, T. und Hashimoto, T., 2002. Rapid internal acyl migration and protein binding of synthetic probenecid glucuronides. *Chem Res Toxicol*, 15(6), 765–772.
- Ammon, H. P. und Wahl, M. A., 1991. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med*, 57(1), 1–7.
- Amos, L. A. und Baker, T. S., 1979. The three-dimensional structure of tubulin protofilaments. *Nature*, 279(5714), 607–612.
- Andreini, J. P., Prigge, W. F., Ma, C. und Gebbard, R. L., 1994. Vesicles and mixed micelles in hypothyroid rat bile before and after thyroid hormone treatment: evidence for a vesicle transport system for biliary cholesterol secretion. *J Lipid Res*, 35(8), 1405–1412.
- Andreu, J. und Timasheff, S., 1982. Conformational states of tubulin liganded to colchicine, tropolone methylether, and podophyllotoxin. *Biochemistry*, 21, 6465–6467.
- Anto, R. J., Mukhopadhyay, A., Denning, K. und Aggarwal, B. B., 2002. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl. *Carcinogenesis*, 23(1), 143–150.
- Araujo, C. A. und Leon, L. L., 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(5), 723–728.
- Arbiser, J. L., Klauber, N., Rohan, R., van Leeuwen, R., Huang, M. T., Fisher, C., Flynn, E. und Byers, H. R., 1998. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med*, 4(6), 376–383.
- Asai, A. und Miyazawa, T., 2000. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci*, 67(23), 2785–2793.
- Asai, A. und Miyazawa, T., 2001. Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue. *J Nutr*, 131(11), 2932–2935.
- Babu, P. S. und Srinivasan, K., 1995. Influence of dietary curcumin and cholesterol on the progression of experimentally induced diabetes in albino rat. *Mol Cell Biochem*, 152(1), 13–21.
- Babu, P. S. und Srinivasan, K., 1997. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 166(1-2), 169–175.
- Back, D. J. und Rogers, S. M., 1987. Review: first-pass metabolism by the gastrointestinal mucosa. *Aliment Pharmacol Ther*, 1(5), 339–357.
- Bai, L., Lin, C., Nguyen, N., Liu, T.-Y. und Hamel, E., 1989. Identification of the cysteine residue of  $\beta$ -tubulin alkylated by the antimetabolic agent 2,4-dichlorobenzyl thiocyanate, facilitated by separation of the protein subunits of tubulin by hydrophobic column chromatography. *Biochemistry*, 28, 5606–5612.
- Bailey, M. J. und Dickinson, R. G., 1996. Chemical and immunochemical comparison of protein adduct formation of four carboxylate drugs in rat liver and plasma. *Chem Res Toxicol*, 9(3), 659–666.

- Bailey, M. J. und Dickinson, R. G., 2003. Acyl glucuronide reactivity in perspective: biological consequences. *Chem Biol Interact*, 145(2), 117–137.
- Bailey, M. J., Worrall, S., de Jersey, J. und Dickinson, R. G., 1998. Zomepirac acyl glucuronide covalently modifies tubulin in vitro and in vivo and inhibits its assembly in an in vitro system. *Chem Biol Interact*, 115(2), 153–166.
- Baranczewski, P., Kallin, A., Andersson, A., Hagigi, S., Aberg, M., Postlind, H. und Mankowitz, L., 2004. Development of an assay using 4-trifluoromethylumbelliferyl as a marker substrate for assessment of drug-drug interactions to multiple isoforms of UDP-glucuronosyltransferases. *Assay Drug Dev Technol*, 2(4), 345–352.
- Barik, A., Priyadarsini, K. I. und Mohan, H., 2003. Photophysical studies on binding of curcumin to bovine serum albumins. *Photochem Photobiol*, 77(6), 597–603.
- Barthelemy, S., Vergnes, L., Moynier, M., Guyot, D., Labidalle, S. und Bahraoui, E., 1998. Curcumin and curcumin derivatives inhibit Tat-mediated transactivation of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Res Virol*, 149(1), 43–52.
- Basu, N. K., Ciotti, M., Hwang, M. S., Kole, L., Mitra, P. S., Cho, J. W. und Owens, I. S., 2004a. Differential and special properties of the major human UGT1-encoded gastrointestinal UDP-glucuronosyltransferases enhance potential to control chemical uptake. *J Biol Chem*, 279(2), 1429–1441.
- Basu, N. K., Kole, L., Kubota, S. und Owens, I. S., 2004b. Human UDP-glucuronosyltransferases show atypical metabolism of mycophenolic acid and inhibition by curcumin. *Drug Metab Dispos*, 32(7), 768–773.
- Basu, N. K., Kole, L. und Owens, I. S., 2003. Evidence for phosphorylation requirement for human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 303(1), 98–104.
- Basu, N. K., Kovarova, M., Garza, A., Kubota, S., Saha, T., Mitra, P. S., Banerjee, R., Rivera, J. und Owens, I. S., 2005. Phosphorylation of a UDP-glucuronosyltransferase regulates substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(18), 6285–6290.
- Basu, N. K., Kubota, S., Meselhy, M. R., Ciotti, M., Chowdhury, B., Hartori, M. und Owens, I. S., 2004c. Gastrointestinally distributed UDP-glucuronosyltransferase 1A10, which metabolizes estrogens and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, depends upon phosphorylation. *J Biol Chem*, 279(27), 28 320–28 329.
- Bechinger, B., 1997. Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J Membr Biol*, 156(3), 197–211.
- Began, G., Sudharshan, E. und Appu Rao, A. G., 1998. Inhibition of lipoxygenase 1 by phosphatidylcholine micelles-bound curcumin. *Lipids*, 33(12), 1223–1228.
- Belakavadi, M. und Salimath, B. P., 2005. Mechanism of inhibition of ascites tumor growth in mice by curcumin is mediated by NF- $\kappa$ B and caspase activated DNase. *Mol Cell Biochem*, 273(1-2), 57–67.
- Benet, L. Z., Spahn-Langguth, H., Iwakawa, S., Volland, C., Mizuma, T., Mayer, S., Mutschler, E. und Lin, E. T., 1993. Predictability of the covalent binding of acidic drugs in man. *Life Sci*, 53(8), PL141–146.
- Bissel, D. M., 1986. Heme catabolism and bilirubin formation. In Ostrow, J. D. (Hg.), *Bile Pigments and Jaundice*, pp. 133–156. Dekker, New York.
- Bisswanger, H., 2002. *Enzyme kinetics. Principles and Methods*. Wiley-VCH, Weinheim, 3. Auflage.

- Boelsterli, U. A., 2002. Xenobiotic acyl glucuronides and acyl CoA thioesters as protein-reactive metabolites with the potential to cause idiosyncratic drug reactions. *Curr Drug Metab*, 3(4), 439–450.
- Boelsterli, U. A., Zimmerman, H. J. und Kretz-Rommel, A., 1995. Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: molecular mechanisms and pathology. *Crit Rev Toxicol*, 25(3), 207–235.
- Bolze, S., 2004. In vitro screening assay of the reactivity of acyl glucuronides. In Yan, Z. und Caldwell, G. W. (Hg.), *Methods in Pharmacology and Toxicology. Optimizing in Drug Discovery: In Vitro Methods*, pp. 385–405. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Bolze, S., Bromet, N., Gay-Feutry, C., Massiere, F., Boulieu, R. und Hulot, T., 2002. Development of an in vitro screening model for the biosynthesis of acyl glucuronide metabolites and the assessment of their reactivity toward human serum albumin. *Drug Metab Dispos*, 30(4), 404–413.
- Bosma, P. J., Seppen, J., Goldhoorn, B., Bakker, C., Oude Elferink, R. P., Chowdhury, J. R., Chowdhury, N. R. und Jansen, P. L., 1994. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. *J Biol Chem*, 269(27), 17 960–17 964.
- Bougie, D., Johnson, S. T., Weitekamp, L. A. und Aster, R. H., 1997. Sensitivity to a metabolite of diclofenac as a cause of acute immune hemolytic anemia. *Blood*, 90(1), 407–413.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248–254.
- van Breemen, R. B. und Fenselau, C., 1985. Acylation of albumin by 1-O-acyl glucuronides. *Drug Metab Dispos*, 13(3), 318–320.
- Brennan, P. und O’Neill, L. A., 1998. Inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B by direct modification in whole cells - mechanism of action of nordihydroguaiaritic acid, curcumin and thiol modifiers. *Biochem Pharmacol*, 55(7), 965–973.
- Brierley, C. H. und Burchell, B., 1993. Human UDP-glucuronosyl transferases: chemical defence, jaundice and gene therapy. *Bioessays*, 15(11), 749–754.
- Brouet, I. und Ohshima, H., 1995. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent, inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 206(2), 533–540.
- Bruni, S. und Chang, T. M., 1999. Kinetic studies of hepatocyte UDP-glucuronosyltransferase: evidence of an allosteric enzyme. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 27(4), 343–356.
- Burchell, B. und Coughtrie, M. W. H., 1992. UDP-Glucuronosyltransferases. In Karlow, W. (Hg.), *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*, pp. 195–225. Pergamon Press Inc., New York.
- Burchell, B., Nebert, D. W., Nelson, D. R., Bock, K. W., Iyanagi, T., Jansen, P. L., Lancet, D., Mulder, G. J., Chowdhury, J. R., Siest, G. und et al., 1991. The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell Biol*, 10(7), 487–494.
- Burchell, B., Soars, M., Monaghan, G., Cassidy, A., Smith, D. und Ethell, B., 2000. Drug-mediated toxicity caused by genetic deficiency of UDP-glucuronosyltransferases. *Toxicol Lett*, 112-113, 333–340.
- Bush, J. A., Cheung Jr., K. J. und Li, G., 2001. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res*, 271(2), 305–314.

- Cannell, G. R., Bailey, M. J. und Dickinson, R. G., 2002. Inhibition of tubulin assembly and covalent binding to microtubular protein by valproic acid glucuronide in vitro. *Life Sci*, 71(22), 2633–2643.
- Castillo, M. und Smith, P. C., 1995. Disposition and reactivity of ibuprofen and ibufenac acyl glucuronides in vivo in the rhesus monkey and in vitro with human serum albumin. *Drug Metab Dispos*, 23(5), 566–572.
- Chainani-Wu, N., 2003. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med*, 9(1), 161–168.
- Chan, M. M., 1995. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochem Pharmacol*, 49(11), 1551–1556.
- Chan, M. M., Huang, H. I., Fenton, M. R. und Fong, D., 1998. In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem Pharmacol*, 55(12), 1955–1962.
- Chen, H., Zhang, Z. S., Zhang, Y. L. und Zhou, D. Y., 1999. Curcumin inhibits cell proliferation by interfering with the cell cycle and inducing apoptosis in colon carcinoma cells. *Anticancer Res*, 19(5A), 3675–3680.
- Chen, H. W. und Huang, H. C., 1998. Effect of curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 124(6), 1029–1040.
- Chen, J., Lin, H. und Hu, M., 2003. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(3), 1228–1235.
- Chen, J., Wang, S., Jia, X., Bajimaya, S., Lin, H., Tam, V. H. und Hu, M., 2005a. Disposition of flavonoids via recycling: comparison of intestinal versus hepatic disposition. *Drug Metab Dispos*, 33(12), 1777–1784.
- Chen, J., Wanming, D., Zhang, D., Liu, Q. und Kang, J., 2005b. Water-soluble antioxidants improve the antioxidant and anticancer activity of low concentrations of curcumin in human leukemia cells. *Pharmazie*, 60(1), 57–61.
- Chen, Y. R. und Tan, T. H., 1998. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene*, 17(2), 173–178.
- Cheng, A. L., Hsu, C. H., Lin, J. K., Hsu, M. M., Ho, Y. F., Shen, T. S., Ko, J. Y., Lin, J. T., Lin, B. R., Ming-Shiang, W., Yu, H. S., Jee, S. H., Chen, G. S., Chen, T. M., Chen, C. A., Lai, M. K., Pu, Y. S., Pan, M. H., Wang, Y. J., Tsai, C. C. und Hsieh, C. Y., 2001. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*, 21(4B), 2895–2900.
- Cheng, Z., Radominska-Pandya, A. und Tephly, T. R., 1999. Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab Dispos*, 27(10), 1165–1170.
- Ciolino, H. P., Daschner, P. J., Wang, T. T. und Yeh, G. C., 1998. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 56(2), 197–206.
- Ciotti, M., Marrone, A., Potter, C. und Owens, I. S., 1997. Genetic polymorphism in the human UGT1A6 (planar phenol) UDP-glucuronosyltransferase: pharmacological implications. *Pharmacogenetics*, 7(6), 485–495.
- Coffman, B. L., King, C. D., Rios, G. R. und Tephly, T. R., 1998. The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). *Drug Metab Dispos*, 26(1), 73–77.

- Conney, A. H., Lou, Y. R., Xie, J. G., Osawa, T., Newmark, H. L., Liu, Y., Chang, R. L. und Huang, M. T., 1997. Some perspectives on dietary inhibition of carcinogenesis: studies with curcumin and tea. *Proc Soc Exp Biol Med*, 216(2), 234–245.
- Cooper, T. H., Clark, J. G. und Guzinski, J. A., 1994. Analysis of curcuminoids by high-performance liquid chromatography. *ACS Symp Ser (Food Phytochemicals for Cancer Prevention II)*, 547, 231–236.
- Court, M. H., Duan, S. X., von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., Patten, C. J., Miners, J. O. und Mackenzie, P. I., 2001. Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*, 299(3), 998–1006.
- Crawford, J. M. und Gollan, J. L., 1988. Hepatocyte cotransport of taurocholate and bilirubin glucuronides: role of microtubules. *Am J Physiol*, 255(1 Pt 1), G121–131.
- Czernik, P. J., Little, J. M., Barone, G. W., Raufman, J. P. und Radomska-Pandya, A., 2000. Glucuronidation of estrogens and retinoic acid and expression of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 in human intestinal mucosa. *Drug Metab Dispos*, 28(10), 1210–1216.
- Dahl, T. A., McGowan, W. M., Shand, M. A. und Srinivasan, V. S., 1989. Photokilling of bacteria by the natural dye curcumin. *Arch Microbiol*, 151(2), 183–185.
- Deodhar, S. D., Sethi, R. und Srimal, R. C., 1980. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res*, 71, 632–634.
- Deters, M., Siegers, C., Muhl, P. und Hansel, W., 1999. Choleric effects of curcuminoids on an acute cyclosporin-induced cholestasis in the rat. *Planta Med*, 65(7), 610–613.
- Dickinson, D. A., Iles, K. E., Zhang, H., Blank, V. und Forman, H. J., 2003. Curcumin alters EpRE and AP-1 binding complexes and elevates glutamate-cysteine ligase gene expression. *Faseb J*, 17(3), 473–475.
- Dickinson, R. G. und King, A. R., 1993. Studies on the reactivity of acyl glucuronides - V. Glucuronide-derived covalent binding of diflunisal to bladder tissue of rats and its modulation by urinary pH and  $\beta$ -glucuronidase. *Biochem Pharmacol*, 46(7), 1175–1182.
- Dinkova-Kostova, A. T. und Talalay, P., 1999. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*, 20(5), 911–914.
- Doherty, M. M. und Pang, K. S., 1997. First-pass effect: significance of the intestine for absorption and metabolism. *Drug Chem Toxicol*, 20(4), 329–344.
- Donatus, I. A., Vermeulen, S. und Vermeulen, N. P. E., 1990. Cytotoxic and cytoprotective activities of curcumin: effects on paracetamol-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and glutathione depletion in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, 39(12), 1869–1875.
- Dorai, T., Cao, Y. C., Dorai, B., Buttyan, R. und Katz, A. E., 2001. Therapeutic potential of curcumin in human prostate cancer. III. Curcumin inhibits proliferation, induces apoptosis, and inhibits angiogenesis of LNCaP prostate cancer cells in vivo. *Prostate*, 47(4), 293–303.
- Dubois, N., Lopicque, F., Maurice, M. H., Pritchard, M., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J., Abiteboul, M., Siest, G. und Netter, P., 1993. In vitro irreversible binding of ketoprofen glucuronide to plasma proteins. *Drug Metab Dispos*, 21(4), 617–623.
- Dutton, G. J., 1980. *Glucuronidation of Drugs and Other Compounds*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ebner, T. und Burchell, B., 1993. Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family. *Drug Metab Dispos*, 21(1), 50–55.

- van Erk, M. J., Teuling, E., Staal, Y. C., Huybers, S., Van Bladeren, P. J., Aarts, J. M. und Van Ommen, B., 2004. Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. *J Carcinog*, 3(1), 8.
- Ethell, B. T., Beaumont, K., Rance, D. J. und Burchell, B., 2001. Use of cloned and expressed human UDP-glucuronosyltransferases for the assessment of human drug conjugation and identification of potential drug interactions. *Drug Metab Dispos*, 29(1), 48–53.
- Fenselau, C., 1994. Acyl glucuronides as chemically reactive intermediates. In Kauffman, F. C. (Hg.), *Conjugation-deconjugation reactions in drug metabolism and toxicity*, pp. 367–389. Springer Verlag, Heidelberg.
- Firozi, P. F., Aboobaker, V. S. und Bhattacharya, R. K., 1996. Action of curcumin on the cytochrome P450-system catalyzing the activation of aflatoxin B1. *Chem Biol Interact*, 100(1), 41–51.
- Fisher, M. B., Campanale, K., Ackermann, B. L., VandenBranden, M. und Wrighton, S. A., 2000a. In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin. *Drug Metab Dispos*, 28(5), 560–566.
- Fisher, M. B., Paine, M. F., Strelevitz, T. J. und Wrighton, S. A., 2001. The role of hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferases in human drug metabolism. *Drug Metab Rev*, 33(3-4), 273–297.
- Fisher, M. B., VandenBranden, M., Findlay, K., Burchell, B., Thummel, K. E., Hall, S. D. und Wrighton, S. A., 2000b. Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics*, 10(8), 727–739.
- Fisher, R., Smith, P. F., Sipes, I. G., Gandolfi, A. J., Krumdieck, C. L. und Brendel, K., 1990. Toxicity of chlorobenzenes in cultured rat liver slices. *In vitro Toxicol*, 3, 181–194.
- Frautschy, S. A., Hu, W., Kim, P., Miller, S. A., Chu, T., Harris-White, M. E. und Cole, G. M., 2001. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of A $\beta$ -induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol Aging*, 22(6), 993–1005.
- Galijatovic, A., Walle, U. K. und Walle, T., 2000. Induction of UDP-glucuronosyltransferase by the flavonoids chrysin and quercetin in Caco-2 cells. *Pharm Res*, 17(1), 21–26.
- Gall, W. E., Zawada, G., Mojarrabi, B., Tephly, T. R., Green, M. D., Coffman, B. L., Mackenzie, P. I. und Radominska-Pandya, A., 1999. Differential glucuronidation of bile acids, androgens and estrogens by human UGT1A3 and 2B7. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 70(1-3), 101–108.
- Garcea, G., Berry, D. P., Jones, D. J., Singh, R., Dennison, A. R., Farmer, P. B., Sharma, R. A., Steward, W. P. und Gescher, A. J., 2005. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(1), 120–125.
- Garcea, G., Jones, D. J., Singh, R., Dennison, A. R., Farmer, P. B., Sharma, R. A., Steward, W. P., Gescher, A. J. und Berry, D. P., 2004. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer*, 90(5), 1011–1015.
- Gaskin, F., 1982. Techniques for the study of microtubule assembly in vitro. *Methods Enzymol*, 85 Pt B, 433–439.
- Gebhardt, R., Hengstler, J. G., Müller, D., Glöckner, R., Buenning, P., Laube, B., Schmelzer, E., Ullrich, M., Utesch, D., Hewitt, N., Ringel, M., Hilz, B. R., Bader, A., Langsch, A., Koose, T., Burger, H. J., Maas, J. und Oesch, F., 2003. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev*, 35(2-3), 145–213.

- Gescher, A. J., Sharma, R. A. und Steward, W. P., 2001. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. *Lancet Oncol*, 2(6), 371–379.
- Gomes de, D., Alegrio, L. V., Leon, L. L. und de Lima, M. E., 2002. Total synthesis and anti-leishmanial activity of some curcumin analogues. *Arzneim Forsch/Drug Res*, 52(9), 695–698.
- Gong, Q. L., Hedner, T., Hedner, J., Bjorkman, R. und Nordberg, G., 1991. Antinociceptive and ventilatory effects of the morphine metabolites: morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide. *Eur J Pharmacol*, 193(1), 47–56.
- Govindarajan, V. S., 1980. Turmeric - chemistry, technology, and quality. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 12(3), 199–301.
- Green, M. D., King, C. D., Mojarrabi, B., Mackenzie, P. I. und Tephly, T. R., 1998. Glucuronidation of amines and other xenobiotics catalyzed by expressed human UDP-glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metab Dispos*, 26(6), 507–512.
- Grube, E., Götze, W., Rao, G. S., Rao, M. L. und Breuer, H., 1971. Steroid glucuronyltransferases. I. Morphological and biochemical investigations on the oestradiol-17 $\beta$ -3-glucuronyltransferase in subcellular fractions of the pig intestine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 352(9), 1215–1222.
- Götze, W., Grube, E., Rao, G. S., Rao, M. L. und Breuer, H., 1971. Steroid glucuronyltransferases. II. Solubilization, purification and kinetic properties of oestradiol-17 $\beta$ -3-glucuronyltransferase from the microsomal fraction of pig intestine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 352(9), 1223–1230.
- Guillemette, C., 2003. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J*, 3(3), 136–158.
- Hall, D., Ybazeta, G., Destro-Bisol, G., Petzl-Erler, M. L. und Di Rienzo, A., 1999a. Variability at the uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 promoter in human populations and primates. *Pharmacogenetics*, 9(5), 591–599.
- Hall, S. D., Thummel, K. E., Watkins, P. B., Lown, K. S., Benet, L. Z., Paine, M. F., Mayo, R. R., Turgeon, D. K., Bailey, D. G., Fontana, R. J. und Wrighton, S. A., 1999b. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab Dispos*, 27(2), 161–166.
- Hanif, R., Qiao, L., Shiff, S. J. und Rigas, B., 1997. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med*, 130(6), 576–584.
- Hargus, S. J., Amouzedeh, H. R., Pumford, N. R., Myers, T. G., McCoy, S. C. und Pohl, L. R., 1994. Metabolic activation and immunochemical localization of liver protein adducts of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac. *Chem Res Toxicol*, 7(4), 575–582.
- Holder, G. M., Plummer, J. L. und Ryan, A. J., 1978. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica*, 8(12), 761–768.
- Holy, J. M., 2002. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. *Mutat Res*, 518(1), 71–84.
- Houston, J. B. und Kenworthy, K. E., 2000. In vitro - in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metab Dispos*, 28(3), 246–254.
- Huang, M. T., Lysz, T., Ferraro, T., Abidi, T. F., Laskin, J. D. und Conney, A. H., 1991a. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res*, 51(3), 813–819.



- Huang, M. T., Ma, W., Lu, Y. P., Chang, R. L., Fisher, C., Manchand, P. S., Newmark, H. L. und Conney, A. H., 1995. Effects of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion. *Carcinogenesis*, 16(10), 2493–2497.
- Huang, M. T., Ma, W., Yen, P., Xie, J. G., Han, J., Frenkel, K., Grunberger, D. und Conney, A. H., 1997. Inhibitory effects of topical application of low doses of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and oxidized DNA bases in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 18(1), 83–88.
- Huang, T. S., Lee, S. C. und Lin, J. K., 1991b. Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(12), 5292–5296.
- Hussain, M. S. und Chandrasekhara, N., 1992. Effect on curcumin on cholesterol gall-stone induction in mice. *Indian J Med Res*, 96, 288–291.
- Hyneck, M. L., Smith, P. C., Munafo, A., McDonagh, A. F. und Benet, L. Z., 1988. Disposition and irreversible plasma protein binding of tolmetin in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 44(1), 107–114.
- Ikegawa, S., Murao, N., Nagata, M., Ohba, S. und Goto, J., 1999. Covalent binding of bile acid acyl glucuronides with protein. *Anal Sci*, 15, 213–215.
- Ikushiro, S., Emi, Y. und Iyanagi, T., 1997. Protein-protein interactions between UDP-glucuronosyltransferase isozymes in rat hepatic microsomes. *Biochemistry*, 36(23), 7154–7161.
- Inano, H., Onoda, M., Inafuku, N., Kubota, M., Kamada, Y., Osawa, T., Kobayashi, H. und Wakabayashi, K., 1999. Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma-rays. *Carcinogenesis*, 20(6), 1011–1018.
- Inano, H., Onoda, M., Inafuku, N., Kubota, M., Kamada, Y., Osawa, T., Kobayashi, H. und Wakabayashi, K., 2000. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, 21(10), 1835–1841.
- Iqbal, M., Sharma, S. D., Okazaki, Y., Fujisawa, M. und Okada, S., 2003. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol*, 92(1), 33–38.
- Ireson, C., Orr, S., Jones, D. J., Verschoyle, R., Lim, C. K., Luo, J. L., Howells, L., Plummer, S., Jukes, R., Williams, M., Steward, W. P. und Gescher, A., 2001. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production. *Cancer Res*, 61(3), 1058–1064.
- Ireson, C. R., Jones, D. J., Orr, S., Coughtrie, M. W., Boocock, D. J., Williams, M. L., Farmer, P. B., Steward, W. P. und Gescher, A. J., 2002. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(1), 105–111.
- Jana, N. R., Dikshit, P., Goswami, A. und Nukina, N., 2004. Inhibition of proteasomal function by curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway. *J Biol Chem*, 279(12), 11 680–11 685.
- Jaruga, E., Salvioli, S., Dobrucki, J., Chrul, S., Bandorowicz-Pikula, J., Sikora, E., Franceschi, C., Cossarizza, A. und Bartosz, G., 1998a. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. *FEBS Lett*, 433(3), 287–293.
- Jaruga, E., Sokal, A., Chrul, S. und Bartosz, G., 1998b. Apoptosis-independent alterations in membrane dynamics induced by curcumin. *Exp Cell Res*, 245(2), 303–312.

- Jedlitschky, G., Cassidy, A. J., Sales, M., Pratt, N. und Burchell, B., 1999. Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem J*, 340 (Pt 3), 837–843.
- Jiang, M. C., Lin, J. K. und Chen, S. S., 1996a. Inhibition of HIV-1 Tat-mediated transactivation by quinacrine and chloroquine. *Biochem Biophys Res Commun*, 226(1), 1–7.
- Jiang, M. C., Yang-Yen, H. F., Yen, J. J. und Lin, J. K., 1996b. Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr Cancer*, 26(1), 111–120.
- Jin, C., Miners, J. O., Lillywhite, K. J. und Mackenzie, P. I., 1993. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and expression of a human liver uridine diphosphate-glucuronosyltransferase glucuronidating carboxylic acid-containing drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 264(1), 475–479.
- Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A. und Sartor, R. B., 1999. Curcumin blocks cytokine-mediated NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I- $\kappa$ B kinase activity. *J Immunol*, 163(6), 3474–3483.
- Joe, B., Vijaykumar, M. und Lokesh, B. R., 2004. Biological properties of curcumin - cellular and molecular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44(2), 97–111.
- Jordan, W. C. und Drew, C. R., 1996. Curcumin - a natural herb with anti-HIV activity. *J Natl Med Assoc*, 88(6), 333.
- Jovanovic, S. V., Boone, C. W., Steenken, S., Trinoga, M. und Kaskey, R. B., 2001. How curcumin works preferentially with water soluble antioxidants. *J Am Chem Soc*, 123(13), 3064–3068.
- Jovanovic, S. V., Steenken, S., Boone, C. W. und Simic, M. G., 1999. H-Atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J Am Chem Soc*, 121(41), 9677–9681.
- Kakar, S. S. und Roy, D., 1994. Curcumin inhibits TPA induced expression of c-fos, c-jun and c-myc proto-oncogenes messenger RNAs in mouse skin. *Cancer Lett*, 87(1), 85–89.
- Kaminsky, L. S. und Zhang, Q. Y., 2003. The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug Metab Dispos*, 31(12), 1520–1525.
- Kang, B. Y., Song, Y. J., Kim, K. M., Choe, Y. K., Hwang, S. Y. und Kim, T. S., 1999. Curcumin inhibits Th1 cytokine profile in CD4+ T cells by suppressing interleukin-12 production in macrophages. *Br J Pharmacol*, 128(2), 380–384.
- Kang, G., Kong, P. J., Yuh, Y. J., Lim, S. Y., Yim, S. V., Chun, W. und Kim, S. S., 2004. Curcumin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression by inhibiting activator protein 1 and nuclear factor  $\kappa$ B bindings in BV2 microglial cells. *J Pharmacol Sci*, 94(3), 325–328.
- Karlsen, J., Mostad, A. und Tønnesen, H. H., 1988. Structural studies of curcuminoids. VI. Crystal structure of 1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione hydrate. *Acta Chem Scand*, B 42, 23–27.
- Kawamori, T., Lubet, R., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Kaskey, R. B., Rao, C. V. und Reddy, B. S., 1999. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res*, 59(3), 597–601.
- Kessler, F. K., Kessler, M. R., Auyeung, D. J. und Ritter, J. K., 2002. Glucuronidation of acetaminophen catalyzed by multiple rat phenol UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*, 30(3), 324–330.
- Khurana, A. und Ho, C.-T., 1988. High performance liquid chromatographic analysis of curcuminoids and their photo-oxidative decomposition compounds in *Curcuma longa* L. *J Liq Chromatogr*, 11(11), 2295–2304.

- King, A. R. und Dickinson, R. G., 1993. Studies on the reactivity of acyl glucuronides - IV. Covalent binding of diflunisal to tissues of the rat. *Biochem Pharmacol*, 45(5), 1043–1047.
- King, C., Tang, W., Ngui, J., Tephly, T. und Braun, M., 2001. Characterization of rat and human UDP-glucuronosyltransferases responsible for the in vitro glucuronidation of diclofenac. *Toxicol Sci*, 61(1), 49–53.
- King, C. D., Green, M. D., Rios, G. R., Coffman, B. L., Owens, I. S., Bishop, W. P. und Tephly, T. R., 1996. The glucuronidation of exogenous and endogenous compounds by stably expressed rat and human UDP-glucuronosyltransferase 1.1. *Arch Biochem Biophys*, 332(1), 92–100.
- King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D. und Tephly, T. R., 2000. UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab*, 1(2), 143–161.
- Korutla, L., Cheung, J. Y., Mendelsohn, J. und Kumar, R., 1995. Inhibition of ligand-induced activation of epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation by curcumin. *Carcinogenesis*, 16(8), 1741–1745.
- Korutla, L. und Kumar, R., 1994. Inhibitory effect of curcumin on epidermal growth factor receptor kinase activity in A431 cells. *Biochim Biophys Acta*, 1224(3), 597–600.
- Krauhs, E., Little, M., Kempf, T., Hofer-Warbinek, R., Ade, W. und Ponstingl, H., 1981. Complete amino acid sequence of  $\beta$ -tubulin from porcine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(7), 4156–4160.
- Kretz-Rommel, A. und Boelsterli, U. A., 1993. Diclofenac covalent protein binding is dependent on acyl glucuronide formation and is inversely related to P450-mediated acute cell injury in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 120(1), 155–161.
- Kretz-Rommel, A. und Boelsterli, U. A., 1994. Mechanism of covalent adduct formation of diclofenac to rat hepatic microsomal proteins. Retention of the glucuronic acid moiety in the adduct. *Drug Metab Dispos*, 22(6), 956–961.
- Kuehl, G. E., Lampe, J. W., Potter, J. D. und Bigler, J., 2005. Glucuronidation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: identifying the enzymes responsible in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 33(7), 1027–1035.
- Kumar, S., Samuel, K., Subramanian, R., Braun, M. P., Stearns, R. A., Chiu, S. H., Evans, D. C. und Baillie, T. A., 2002. Extrapolation of diclofenac clearance from in vitro microsomal metabolism data: role of acyl glucuronidation and sequential oxidative metabolism of the acyl glucuronide. *J Pharmacol Exp Ther*, 303(3), 969–978.
- Kunchandy, E. und Rao, M. N. A., 1990. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int J Pharm*, 58(3), 237–240.
- Kuo, M. L., Huang, T. S. und Lin, J. K., 1996. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*, 1317(2), 95–100.
- Kurkela, M., Garcia-Horsman, J. A., Luukkanen, L., Morsky, S., Taskinen, J., Baumann, M., Kostainen, R., Hirvonen, J. und Finel, M., 2003. Expression and characterization of recombinant human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs). UGT1A9 is more resistant to detergent inhibition than other UGTs and was purified as an active dimeric enzyme. *J Biol Chem*, 278(6), 3536–3544.
- Lake, B. G., 1987. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In Snell, K. und Mulloch, B. (Hg.), *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*, pp. 183–215. IRL Press, Oxford.
- Lazard, D., Zupko, K., Poria, Y., Nef, P., Lazarovits, J., Horn, S., Khen, M. und Lancet, D., 1991. Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature*, 349(6312), 790–793.

- Leu, T. H. und Maa, M. C., 2002. The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2(3), 357–370.
- Li, C. J., Zhang, L. J., Dezube, B. J., Crumpacker, C. S. und Pardee, A. B., 1993. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(5), 1839–1842.
- Li, N., Chen, X., Liao, J., Yang, G., Wang, S., Josephson, Y., Han, C., Chen, J., Huang, M. T. und Yang, C. S., 2002. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. *Carcinogenesis*, 23(8), 1307–1313.
- Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S. A. und Cole, G. M., 2001. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci*, 21(21), 8370–8377.
- Lin, J. H., Chiba, M. und Baillie, T. A., 1999. Is the role of the small intestine in first-pass metabolism overemphasized? *Pharmacol Rev*, 51(2), 135–158.
- Lin, J. K. und Lin-Shiau, S. Y., 2001. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 25(2), 59–66.
- Lin, J. K., Pan, M. H. und Lin-Shiau, S. Y., 2000. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *Biofactors*, 13(1-4), 153–158.
- Little, J. M., Lehman, P. A., Nowell, S., Samokyszyn, V. und Radomska, A., 1997. Glucuronidation of all-trans-retinoic acid and 5,6-epoxy-all-trans-retinoic acid. Activation of rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity by alamethicin. *Drug Metab Dispos*, 25(1), 5–11.
- Little, J. M., Lester, R., Kuipers, F., Vonk, R., Mackenzie, P. I., Drake, R. R., Frame, L. und Radomska-Pandya, A., 1999. Variability of human hepatic UDP-glucuronosyltransferase activity. *Acta Biochim Pol*, 46(2), 351–363.
- Little, M. und Luduena, R., 1985. Structural differences between brain  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-tubulins: implications for microtubule assembly and colchicine binding. *EMBO J*, 4, 51–56.
- Liu, J. und Mori, A., 1993. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacology*, 32(7), 659–669.
- Liu, J. Y., Lin, S. J. und Lin, J. K., 1993. Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells. *Carcinogenesis*, 14(5), 857–861.
- van der Logt, E. M., Roelofs, H. M., Nagengast, F. M. und Peters, W. H., 2003. Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. *Carcinogenesis*, 24(10), 1651–1656.
- Lu, Y. P., Chang, R. L., Lou, Y. R., Huang, M. T., Newmark, H. L., Reuhl, K. R. und Conney, A. H., 1994. Effect of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and ultraviolet B light-induced expression of c-Jun and c-Fos in JB6 cells and in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 15(10), 2363–2370.
- Lutomski, J., Kedzia, B. und Debska, W., 1974. Effect of an alcohol extract and of active ingredients from *Curcuma longa* on bacteria and fungi [author's transl]. *Planta Med*, 26(1), 9–19.
- Mackenzie, P. I., Walter Bock, K., Burchell, B., Guillemette, C., Ikushiro, S. I., Iyanagi, T., Miners, J. O., Owens, I. S. und Nebert, D. W., 2005. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics*, 15(10), 677–685.

- Mandelkow, E. M., Rapp, R. und Mandelkow, E., 1986a. Microtubule structure studied by quick freezing: cryo-electron microscopy and freeze fracture. *J Microsc*, 141 (Pt 3), 361–373.
- Mandelkow, E. M., Schultheiss, R., Rapp, R., Muller, M. und Mandelkow, E., 1986b. On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam, and handedness. *J Cell Biol*, 102(3), 1067–1073.
- Mano, Y., Usui, T. und Kamimura, H., 2004. Effects of  $\beta$ -estradiol and propofol on the 4-methylumbelliferone glucuronidation in recombinant human UGT isozymes 1A1, 1A8 and 1A9. *Biopharm Drug Dispos*, 25(8), 339–344.
- Martin-Cordero, C., Lopez-Lazaro, M., Galvez, M. und Ayuso, M. J., 2003. Curcumin as a DNA topoisomerase II poison. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 18(6), 505–509.
- Masuda, T., Hidaka, K., Shinohara, A., Maekawa, T., Takeda, Y. und Yamaguchi, H., 1999. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: analysis of radical reaction products from curcumin. *J Agric Food Chem*, 47(1), 71–77.
- Masuda, T., Maekawa, T., Hidaka, K., Bando, H., Takeda, Y. und Yamaguchi, H., 2001. Chemical studies on antioxidant mechanism of curcumin: analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. *J Agric Food Chem*, 49(5), 2539–2547.
- Matern, H., Heinemann, H. und Matern, S., 1994. Radioassay of UDP-glucuronosyltransferase activities toward endogenous substrates using labeled UDP-glucuronic acid and an organic solvent extraction procedure. *Anal Biochem*, 219, 182–188.
- Matern, S., Matern, H., Farthmann, E. H. und Gerok, W., 1984. Hepatic and extrahepatic glucuronidation of bile acids in man. Characterization of bile acid uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase in hepatic, renal, and intestinal microsomes. *J Clin Invest*, 74(2), 402–410.
- Matthes, H. W. D., Luu, B. und Ourisson, G., 1980. Cytotoxic components of *Zingiber zerumbet*, *Curcuma zedoaria* and *C. domestica*. *Phytochemistry*, 19, 2643–2650.
- Mazumder, A., Neamati, N., Sunder, S., Schulz, J., Pertz, H., Eich, E. und Pommier, Y., 1997. Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *J Med Chem*, 40(19), 3057–3063.
- McCaughan, G. W., Wickson, J. E., Creswick, P. F. und Gorrell, M. D., 1990. Identification of the bile canalicular cell surface molecule GP110 as the ectopeptidase dipeptidyl peptidase IV: an analysis by tissue distribution, purification and N-terminal amino acid sequence. *Hepatology*, 11(4), 534–544.
- McGurk, K. A., Brierley, C. H. und Burchell, B., 1998. Drug glucuronidation by human renal UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem Pharmacol*, 55(7), 1005–1012.
- Meech, R. und Mackenzie, P. I., 1997. UDP-glucuronosyltransferase, the role of the amino terminus in dimerization. *J Biol Chem*, 272(43), 26 913–26 917.
- Meyers, M., Slikker, W., Pascoe, G. und Vore, M., 1980. Characterization of cholestasis induced by estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 214(1), 87–93.
- Meyers, M., Slikker, W. und Vore, M., 1981. Steroid D-ring glucuronides: characterization of a new class of cholestatic agents in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 218(1), 63–73.
- Miners, J. O., Lillywhite, K. J., Matthews, A. P., Jones, M. E. und Birkett, D. J., 1988. Kinetic and inhibitor studies of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 37(4), 665–671.
- Miners, J. O. und Mackenzie, P. I., 1991. Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther*, 51(3), 347–369.

- Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J. M., Diaz-Alperi, J. und Ramirez, A., 2002. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Arch Gerontol Geriatr*, 34, 37–46.
- Mojarrabi, B. und Mackenzie, P. I., 1998. Characterization of two UDP glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon. *Biochem Biophys Res Commun*, 247(3), 704–709.
- Monaghan, G., Ryan, M., Seddon, R., Hume, R. und Burchell, B., 1996. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet*, 347(9001), 578–581.
- Mori, H., Niwa, K., Zheng, Q., Yamada, Y., Sakata, K. und Yoshimi, N., 2001. Cell proliferation in cancer prevention; effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on an in vitro model in human colorectal cells. *Mutat Res*, 480-481, 201–207.
- Mulder, G. J., 1992. Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 32, 25–49.
- Munzel, P. A., Schmohl, S., Heel, H., Kalberer, K., Bock-Hennig, B. S. und Bock, K. W., 1999. Induction of human UDP glucuronosyltransferases (UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7) by t-butylhydroquinone and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos*, 27(5), 569–573.
- Naidu, K. A. und Thippeswamy, N. B., 2002. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spices. *Mol Cell Biochem*, 229(1-2), 19–23.
- Naito, M., Wu, X., Nomura, H., Kodama, M., Kato, Y. und Osawa, T., 2002. The protective effects of tetrahydrocurcumin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *J Atheroscler Thromb*, 9(5), 243–250.
- Nakatani, N., 2000. Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors*, 13, 141–146.
- Natarajan, C. und Bright, J. J., 2002. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol*, 168(12), 6506–6513.
- Neet, K. E., 1995. Cooperativity in enzyme function: equilibrium and kinetic aspects. *Methods Enzymol*, 249, 519–567.
- Nguyen, N. und Tukey, R. H., 1997. Baculovirus-directed expression of rabbit UDP-glucuronosyltransferases in *Spodoptera frugiperda* cells. *Drug Metab Dispos*, 25(6), 745–749.
- Nijhoff, W. A., Groen, G. M. und Peters, W. H. M., 1993. Induction of rat hepatic and intestinal glutathione S-transferases and glutathione by dietary naturally occurring anticarcinogens. *Int J Oncol*, 3(6), 1131–1139.
- Oelberg, D. G., Chari, M. V., Little, J. M., Adcock, E. W. und Lester, R., 1984. Lithocholate glucuronide is a cholestatic agent. *J Clin Invest*, 73(6), 1507–1514.
- Oetari, S., Sudibyo, M., Commandeur, J. N., Samhoedi, R. und Vermeulen, N. P., 1996. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-transferase activities in rat liver. *Biochem Pharmacol*, 51(1), 39–45.
- Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Tanaka, T., Toyokuni, S., Uchida, K. und Osawa, T., 2001. Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. *J Nutr*, 131(8), 2090–2095.
- Omura, T. und Sato, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 239, 2370–2378.

- Osawa, T., Sugiyama, Y., Inayoshi, M. und Kawakishi, S., 1995. Antioxidative activity of tetrahydrocurcuminoids. *Biosci Biotechnol Biochem*, 59(9), 1609–1612.
- Pabon, H. J. J., 1964. A synthesis of curcumin and related compounds. *Recl Trav Chim Pays-Bas*, 83, 379–386.
- Pan, M. H., Chang, W. L., Lin-Shiau, S. Y., Ho, C. T. und Lin, J. K., 2001. Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytochrome c release and activation of caspases in human leukemia HL-60 cells. *J Agric Food Chem*, 49(3), 1464–1474.
- Pan, M. H., Huang, T. M. und Lin, J. K., 1999. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos*, 27(4), 486–494.
- Pan, M. H., Lin-Shiau, S. Y. und Lin, J. K., 2000. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of I $\kappa$ B kinase and NF $\kappa$ B activation in macrophages. *Biochem Pharmacol*, 60(11), 1665–1676.
- Park, B. K., Coleman, J. W. und Kitteringham, N. R., 1987. Drug disposition and drug hypersensitivity. *Biochem Pharmacol*, 36(5), 581–590.
- Park, S. Y. und Kim, D. S., 2002. Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from  $\beta$ -amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J Nat Prod*, 65(9), 1227–1231.
- Parkin, K. L., 2003. Putting kinetic principles into practice. In Marangoni, A. G. (Hg.), *Enzym kinetics. A modern approach*, pp. 174–192. Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Patro, B. S., Rele, S., Chintalwar, G. J., Chattopadhyay, S., Adhikari, S. und Mukherjee, T., 2002. Protective activities of some phenolic 1,3-diketones against lipid peroxidation: possible involvement of the 1,3-diketone moiety. *Chembiochem*, 3(4), 364–370.
- Paul, D., Standifer, K. M., Inturrisi, C. E. und Pasternak, G. W., 1989. Pharmacological characterization of morphine-6 $\beta$ -glucuronide, a very potent morphine metabolite. *J Pharmacol Exp Ther*, 251(2), 477–483.
- Pedersen, U., Rasmussen, P. B. und Lawesson, S.-O., 1985. Synthesis of naturally occurring curcuminoids and related compounds. *Liebigs Ann Chem*, 8, 1557–1569.
- Peters, W. H., Jansen, P. L. und Nauta, H., 1984. The molecular weights of UDP-glucuronyltransferase determined with radiation-inactivation analysis. A molecular model of bilirubin UDP-glucuronyltransferase. *J Biol Chem*, 259(19), 11 701–11 705.
- Pfeiffer, E., Höhle, S., Solyom, A. M. und Metzler, M., 2003. Studies on the stability of turmeric constituents. *J Food Eng*, 56, 257–259.
- Pfeiffer, E. und Metzler, M., 2004. Effect of bisphenol A on drug metabolising enzymes in rat hepatic microsomes and precision-cut rat liver slices. *Arch Toxicol*, 78(7), 369–377.
- Piper, J. T., Singhal, S. S., Salameh, M. S., Torman, R. T., Awasthi, Y. C. und Awasthi, S., 1998. Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: the effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 30(4), 445–456.
- Platel, K. und Srinivasan, K., 1996. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. *Int J Food Sci Nutr*, 47(1), 55–59.
- Plummer, S. M., Holloway, K. A., Manson, M. M., Munks, R. J., Kaptein, A., Farrow, S. und Howells, L., 1999. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF- $\kappa$ B activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene*, 18(44), 6013–6020.

- Presle, N., Lapicque, F., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J. und Netter, P., 1996. Stereoselective irreversible binding of ketoprofen glucuronides to albumin. Characterization of the site and the mechanism. *Drug Metab Dispos*, 24(10), 1050–1057.
- Price, L. C. und Buescher, R. W., 1997. Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids. *J Food Sci*, 62(2), 267–269.
- Pulla Reddy, A. C., Sudharshan, E., Appu Rao, A. G. und Lokesh, B. R., 1999. Interaction of curcumin with human serum albumin - a spectroscopic study. *Lipids*, 34(10), 1025–1029.
- Pumford, N. R., Myers, T. G., Davila, J. C., Hight, R. J. und Pohl, L. R., 1993. Immunochemical detection of liver protein adducts of the nonsteroidal antiinflammatory drug diclofenac. *Chem Res Toxicol*, 6(2), 147–150.
- Qiu, Y., Burlingame, A. L. und Benet, L. Z., 1998. Mechanisms for covalent binding of benoxaprofen glucuronide to human serum albumin. Studies By tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, 26(3), 246–256.
- Radomska-Pandya, A., Czernik, P. J., Little, J. M., Battaglia, E. und Mackenzie, P. I., 1999. Structural and functional studies of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Rev*, 31(4), 817–899.
- Rao, C. V., Kawamori, T., Hamid, R. und Reddy, B. S., 1999. Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci by an inducible nitric oxide synthase-selective inhibitor. *Carcinogenesis*, 20(4), 641–644.
- Rao, C. V., Rivenson, A., Simi, B. und Reddy, B. S., 1995. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res*, 55(2), 259–266.
- Rao, D. S., Sekhara, N. C., Satyanarayana, M. N. und Srinivasan, M., 1970. Effect of curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. *J Nutr*, 100(11), 1307–1315.
- Ravindranath, V. und Chandrasekhara, N., 1980. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicology*, 16(3), 259–265.
- Ravindranath, V. und Chandrasekhara, N., 1981. In vitro studies on the intestinal absorption of curcumin in rats. *Toxicology*, 20(2-3), 251–257.
- Ravindranath, V. und Chandrasekhara, N., 1982. Metabolism of curcumin - studies with [<sup>3</sup>H]curcumin. *Toxicology*, 22(4), 337–344.
- Reddy, A. C. und Lokesh, B. R., 1992. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem*, 111(1-2), 117–124.
- Reddy, S. und Aggarwal, B. B., 1994. Curcumin is a non-competitive and selective inhibitor of phosphorylase kinase. *FEBS Lett*, 341(1), 19–22.
- Ritter, J. K., 2000. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact*, 129(1-2), 171–193.
- Ritter, J. K., Kessler, F. K., Thompson, M. T., Grove, A. D., Auyeung, D. J. und Fisher, R. A., 1999. Expression and inducibility of the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 in liver and cultured primary hepatocytes: evidence for both genetic and environmental influences. *Hepatology*, 30(2), 476–484.
- Robinson, T. P., Ehlers, T., Hubbard, I. R., Bai, X., Arbiser, J. L., Goldsmith, D. J. und Bowen, J. P., 2003. Design, synthesis, and biological evaluation of angiogenesis inhibitors: aromatic enone and dienone analogues of curcumin. *Bioorg Med Chem Lett*, 13(1), 115–117.
- Rondini, L., Peyrat-Maillard, M. N., Marsset-Baglieri, A. und Berset, C., 2002. Sulfated ferulic acid is the main in vivo metabolite found after short-term ingestion of free ferulic acid in rats. *J Agric Food Chem*, 50(10), 3037–3041.



- Roth, H. J. und Miller, B., 1964a. Color reaction between boric acid and curcumin. I. Boronic acid-curcumin complexes. *Arch Pharm*, 297(10), 617–623.
- Roth, H. J. und Miller, B., 1964b. Color reactions between boric acid and curcumin. II. Structure of rosocyanin and rubrocurcumin. *Arch Pharm*, 297(11), 660–673.
- Roughley, P. J. und Whiting, D. A., 1973. Experiments in the biosynthesis of curcumin. *J Chem Soc*, 20(2), 2379–2388.
- Ruelius, H. W., Kirkman, S. K., Young, E. M. und Janssen, F. W., 1986. Reactions of oxaprozin-1-O-acyl glucuronide in solutions of human plasma and albumin. *Adv Exp Med Biol*, 197, 431–441.
- Ruffin, M. T., Normolle, D. P., Heath, D. D., Bailey, J. M., Murray, S. I., Boggs, M. E., Crowell, J. A., Rock, C. L. und Brenner, D. E., 2003. Dose escalation of curcumin in healthy adults. *Cancer Epidem Biomar Prevent*, 12 (Part 2 Suppl. S), 1324S.
- Sabordo, L., Sallustio, B. C., Evans, A. M. und Nation, R. L., 2000. Hepatic disposition of the acyl glucuronide 1-O-gemfibrozil- $\beta$ -D-glucuronide: effects of clofibrac acid, acetaminophen, and acetaminophen glucuronide. *J Pharmacol Exp Ther*, 295(1), 44–50.
- Said, M., Noort, D., Magdalou, J., Ziegler, J. C., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Mulder, G. J. und Siest, G., 1992. Selective and potent inhibition of different hepatic UDP-glucuronosyltransferase activities by  $\omega,\omega,\omega$ -triphenylalcohols and UDP derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*, 187(1), 140–145.
- Sakaguchi, K., Green, M., Stock, N., Reger, T. S., Zunic, J. und King, C., 2004. Glucuronidation of carboxylic acid containing compounds by UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Arch Biochem Biophys*, 424(2), 219–225.
- Sallustio, B. C., Sabordo, L., Evans, A. M. und Nation, R. L., 2000. Hepatic disposition of electrophilic acyl glucuronide conjugates. *Curr Drug Metab*, 1(2), 163–180.
- Saltarelli, D. und Pantaloni, D., 1982. Polymerization of the tubulin-colchicine complex and guanosine 5'-triphosphate hydrolysis. *Biochemistry*, 21, 2996–3006.
- Scartezzini, P. und Speroni, E., 2000. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharmacol*, 71(1-2), 23–43.
- Seitz, S., Kretz-Rommel, A., Oude Elferink, R. P. und Boelsterli, U. A., 1998. Selective protein adduct formation of diclofenac glucuronide is critically dependent on the rat canalicular conjugate export pump (Mrp2). *Chem Res Toxicol*, 11(5), 513–519.
- Senafi, S. B., Clarke, D. J. und Burchell, B., 1994. Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. *Biochem J*, 303 (Pt 1), 233–240.
- Shao, Z. M., Shen, Z. Z., Liu, C. H., Sartippour, M. R., Go, V. L., Heber, D. und Nguyen, M., 2002. Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer*, 98(2), 234–240.
- Sharma, A., Gautam, S. und Jadhav, S. S., 2000. Spice extracts as dose-modifying factors in radiation inactivation of bacteria. *J Agric Food Chem*, 48(4), 1340–1344.
- Sharma, O. P., 1976. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem Pharmacol*, 25(15), 1811–1812.
- Sharma, R. A., Euden, S. A., Platton, S. L., Cooke, D. N., Shafayat, A., Hewitt, H. R., Marczylo, T. H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S. M., Pirmohamed, M., Gescher, A. J. und Steward, W. P., 2004. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res*, 10(20), 6847–6854.

- Sharma, R. A., Gescher, A. J. und Steward, W. P., 2005. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer*, 41(13), 1955–1968.
- Sharma, R. A., Ireson, C. R., Verschoyle, R. D., Hill, K. A., Williams, M. L., Leuratti, C., Manson, M. M., Marnett, L. J., Steward, W. P. und Gescher, A., 2001a. Effects of dietary curcumin on glutathione S-transferase and malondialdehyde-DNA adducts in rat liver and colon mucosa: relationship with drug levels. *Clin Cancer Res*, 7(5), 1452–1458.
- Sharma, R. A., McLelland, H. R., Hill, K. A., Ireson, C. R., Euden, S. A., Manson, M. M., Pirmohamed, M., Marnett, L. J., Gescher, A. J. und Steward, W. P., 2001b. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 7(7), 1894–1900.
- Shelanski, M., Gaskin, F. und Cantor, C., 1973. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 70, 765–768.
- Shishodia, S., Amin, H. M., Lai, R. und Aggarwal, B. B., 2005. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- $\kappa$ B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol*, 70(5), 700–713.
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R. und Srinivas, P. S., 1998. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med*, 64(4), 353–356.
- Shukla, Y., Arora, A. und Taneja, P., 2002. Antimutagenic potential of curcumin on chromosomal aberrations in Wistar rats. *Mutat Res*, 515, 197–202.
- Singh, S. und Aggarwal, B. B., 1995. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]. *J Biol Chem*, 270(42), 24 995–25 000.
- Singh, S. V., Hu, X., Srivastava, S. K., Singh, M., Xia, H., Orchard, J. L. und Zaren, H. A., 1998. Mechanism of inhibition of benzo[a]pyrene-induced forestomach cancer in mice by dietary curcumin. *Carcinogenesis*, 19(8), 1357–1360.
- Skrzypczak-Jankun, E., McCabe, N. P., Selman, S. H. und Jankun, J., 2000. Curcumin inhibits lipoxygenase by binding to its central cavity: theoretical and X-ray evidence. *Int J Mol Med*, 6(5), 521–526.
- Skrzypczak-Jankun, E., Zhou, K., McCabe, N. P., Selman, S. H. und Jankun, J., 2003. Structure of curcumin in complex with lipoxygenase and its significance in cancer. *Int J Mol Med*, 12(1), 17–24.
- Smith, P. C., Benet, L. Z. und McDonagh, A. F., 1990. Covalent binding of zomepirac glucuronide to proteins: evidence for a Schiff base mechanism. *Drug Metab Dispos*, 18(5), 639–644.
- Soars, M. G., Burchell, B. und Riley, R. J., 2002. In vitro analysis of human drug glucuronidation and prediction of in vivo metabolic clearance. *J Pharmacol Exp Ther*, 301(1), 382–390.
- Soars, M. G., Riley, R. J., Findlay, K. A., Coffey, M. J. und Burchell, B., 2001. Evidence for significant differences in microsomal drug glucuronidation by canine and human liver and kidney. *Drug Metab Dispos*, 29(2), 121–126.
- Soars, M. G., Ring, B. J. und Wrighton, S. A., 2003. The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*, 31(6), 762–767.
- Soni, K. B. und Kuttan, R., 1992. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. *Indian J Physiol Pharmacol*, 36(4), 273–275.
- Sorenson, J. R. J., 2002. Cu, Fe, Mn, and Zn chelates offer a medicinal chemistry approach to overcoming radiation injury. *Cur Med Chem*, 9, 639–662.

- Soudamini, K. K., Unnikrishnan, M. C., Soni, K. B. und Kuttan, R., 1992. Inhibition of lipid peroxidation and cholesterol levels in mice by curcumin. *Indian J Physiol Pharmacol*, 36(4), 239–243.
- Spahn-Langguth, H. und Benet, L. Z., 1992. Acyl glucuronides revisited: is the glucuronidation process a toxification as well as a detoxification mechanism? *Drug Metab Rev*, 24(1), 5–47.
- Sreejayan und Rao, M. N. A., 1994. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol*, 46(12), 1013–1016.
- Srinivasan, M., 1972. Effect of curcumin on blood sugar as seen in a diabetic subject. *Indian J Med Sci*, 26(4), 269–270.
- Stone, A. N., Mackenzie, P. I., Galetin, A., Houston, J. B. und Miners, J. O., 2003. Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab Dispos*, 31(9), 1086–1089.
- Strassburg, C. P., Kneip, S., Topp, J., Obermayer-Straub, P., Barut, A., Tukey, R. H. und Manns, M. P., 2000. Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem*, 275(46), 36164–36171.
- Strassburg, C. P., Manns, M. P. und Tukey, R. H., 1998a. Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem*, 273(15), 8719–8726.
- Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P. und Tukey, R. H., 1998b. Polymorphic expression of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A gene locus in human gastric epithelium. *Mol Pharmacol*, 54(4), 647–654.
- Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P. und Tukey, R. H., 1999. UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology*, 116(1), 149–160.
- Sugiyama, Y., Kawakishi, S. und Osawa, T., 1996. Involvement of the  $\beta$ -diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochem Pharmacol*, 52(4), 519–525.
- Sui, Z., Salto, R., Li, J., Craik, C. und Ortiz de Montellano, P. R., 1993. Inhibition of the HIV-1 and HIV-2 proteases by curcumin and curcumin boron complexes. *Bioorg Med Chem*, 1(6), 415–422.
- Suleman, F. G., Abid, A., Gradinaru, D., Daval, J. L., Magdalou, J. und Minn, A., 1998. Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch Biochem Biophys*, 358(1), 63–67.
- Susan, M. und Rao, M. N., 1992. Induction of glutathione S-transferase activity by curcumin in mice. *Arzneim Forsch/Drug Res*, 42(7), 962–964.
- Sutherland, L., Ebner, T. und Burchell, B., 1993. The expression of UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 family in human liver and kidney and in response to drugs. *Biochem Pharmacol*, 45(2), 295–301.
- Tephly, T. R. und Burchell, B., 1990. UDP-glucuronosyltransferases: a family of detoxifying enzymes. *Trends Pharmacol Sci*, 11(7), 276–279.
- Terrier, N., Benoit, E., Senay, C., Lopicque, F., Radominska-Pandya, A., Magdalou, J. und Fournel-Gigleux, S., 1999. Human and rat liver UDP-glucuronosyltransferases are targets of ketoprofen acylglucuronide. *Mol Pharmacol*, 56(1), 226–234.
- Thaloor, D., Singh, A. K., Sidhu, G. S., Prasad, P. V., Kleinman, H. K. und Maheshwari, R. K., 1998. Inhibition of angiogenic differentiation of human umbilical vein endothelial cells by curcumin. *Cell Growth Differ*, 9(4), 305–312.

- Thapliyal, R., Deshpande, S. S. und Maru, G. B., 2002. Mechanism(s) of turmeric-mediated protective effects against benzo(a)pyrene-derived DNA adducts. *Cancer Lett*, 175(1), 79–88.
- Thapliyal, R. und Maru, G. B., 2001. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol*, 39(6), 541–547.
- Tønnesen, H. H., 1992. Chemistry of curcumin and curcuminoids. *ACS Symp Ser (Phenolic Compd. Food Their Eff. Health I)*, 506, 143–153.
- Tønnesen, H. H., Arrieta, A. F. und Lerner, D., 1995. Studies on curcumin and curcuminoids: Part XXIV. Characterization of the spectroscopic properties of the naturally occurring curcuminoids and selected derivatives. *Pharmazie*, 50(10), 689–693.
- Tønnesen, H. H. und Karlsen, J., 1983. High-performance liquid chromatography of curcumin and related compounds. *J Chromatogr*, 259, 367–371.
- Tønnesen, H. H. und Karlsen, J., 1985a. Studies on curcumin and curcuminoids. V. Alkaline degradation of curcumin. *Z Lebensm Unters Forsch*, 180(2), 132–134.
- Tønnesen, H. H. und Karlsen, J., 1985b. Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z Lebensm Unters Forsch*, 180(5), 402–404.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J. und van Henegouwen, G. B., 1986. Studies on curcumin and curcuminoids. VIII. Photochemical stability of curcumin. *Z Lebensm Unters Forsch*, 183(2), 116–122.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J. und Mostad, A., 1982. Structural studies of curcuminoids. I. The crystal structure of curcumin. *Acta Chem Scand*, B 36, 475–479.
- Tønnesen, H. H., Karlsen, J., Mostad, A., Pedersen, U., Rasmussen, P. B. und Lawesson, S.-O., 1983. Structural studies of curcuminoids. II. Crystal structure of 1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione-methanol complex. *Acta Chem Scand*, B 37, 179–185.
- Tukey, R. H. und Strassburg, C. P., 2000. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 581–616.
- Turgeon, D., Carrier, J. S., Levesque, E., Hum, D. W. und Belanger, A., 2001. Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members. *Endocrinology*, 142(2), 778–787.
- Uchaipichat, V., Mackenzie, P. I., Guo, X. H., Gardner-Stephen, D., Galetin, A., Houston, J. B. und Miners, J. O., 2004. Human UDP-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *Drug Metab Dispos*, 32(4), 413–423.
- Uehara, S., Yasuda, I., Akiyama, K., Morita, H., Takeya, K. und Itokawa, H., 1987. Diarylheptanoids from the rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza* and *Alpinia officinarum*. *Chem Pharm Bull*, 35(8), 3298–3304.
- Umland, F. und Pottkamp, F., 1968. Investigations on 1:1 chelates of curcumin with boric acid and phenylboric acid. *Fresenius' Z Anal Chem*, 241(3), 223–234.
- Unterhalt, B., 1980. Turmeric and its application in mustard. *Z Lebensm Unters Forsch*, 170(6), 425–428.
- Verma, S. P., Salamone, E. und Goldin, B., 1997. Curcumin and genistein, plant natural products, show synergistic inhibitory effects on the growth of human breast cancer MCF-7 cells induced by estrogenic pesticides. *Biochem Biophys Res Commun*, 233(3), 692–696.

- Vietri, M., Pietrabissa, A., Mosca, F., Spisni, R. und Pacifici, G. M., 2003. Curcumin is a potent inhibitor of phenol sulfotransferase (SULT1A1) in human liver and extrahepatic tissues. *Xenobiotica*, 33(4), 357–363.
- Vore, M., Hadd, H. und Slikker, W., J., 1983. Ethynylestradiol-17 $\beta$  D-ring glucuronide conjugates are potent cholestatic agents in the rat. *Life Sci*, 32(26), 2989–2993.
- Wahlström, B. und Blennow, G., 1978. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 43(2), 86–92.
- Wallin, M., Fridén, B. und Billger, M., 1988. Studies of the interaction of chemicals with microtubule assembly in vitro can be used as an assay for detection of cytotoxic chemicals and possible inducers of aneuploidy. *Mutat Res*, 201, 303–311.
- Wang, M. und Dickinson, R. G., 1998. Disposition and covalent binding of diflunisal and diflunisal acyl glucuronide in the isolated perfused rat liver. *Drug Metab Dispos*, 26(2), 98–104.
- Wang, Y. J., Pan, M. H., Cheng, A. L., Lin, L. I., Ho, Y. S., Hsieh, C. Y. und Lin, J. K., 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal*, 15(12), 1867–1876.
- Weiss, J. N., 1997. The Hill equation revisited: uses and misuses. *Faseb J*, 11(11), 835–841.
- Wieland, E., Shipkova, M., Schellhaas, U., Schütz, E., Niedmann, P. D., Armstrong, V. W. und Oellerich, M., 2000. Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? *Clin Biochem*, 33(2), 107–113.
- Williams, J. A., Ring, B. J., Cantrell, V. E., Campanale, K., Jones, D. R., Hall, S. D. und Wrighton, S. A., 2002. Differential modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)-catalyzed estradiol-3-glucuronidation by the addition of UGT1A1 substrates and other compounds to human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 30(11), 1266–1273.
- Wooster, R., Ebner, T., Sutherland, L., Clarke, D. und Burchell, B., 1993. Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. *Toxicology*, 82(1-3), 119–129.
- Worrall, S. und Dickinson, R. G., 1995. Rat serum albumin modified by diflunisal acyl glucuronide is immunogenic in rats. *Life Sci*, 56(22), 1921–1930.
- Wright, J., 2002. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. *J Mol Struct (Theochem)*, 591, 207–217.
- Yan, C., Jamaluddin, M. S., Aggarwal, B., Myers, J. und Boyd, D. D., 2005. Gene expression profiling identifies activating transcription factor 3 as a novel contributor to the proapoptotic effect of curcumin. *Mol Cancer Ther*, 4(2), 233–241.
- Yang, S. K., Hsieh, Y. Y., Chang, W. C. und Huang, J. D., 1992. Enantioselectivity of microsomal and cytosolic esterases in rat intestinal mucosa. *Drug Metab Dispos*, 20(5), 719–725.
- Yasni, S., Imaizumi, K., Nakamura, M., Aimoto, J. und Sugano, M., 1993. Effects of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. and curcuminoids on the level of serum and liver lipids, serum apolipoprotein A-I and lipogenic enzymes in rats. *Food Chem Toxicol*, 31(3), 213–218.
- Zhang, F., Altorki, N. K., Mestre, J. R., Subbaramaiah, K. und Dannenberg, A. J., 1999. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis*, 20(3), 445–451.
- Zia-Amirhosseini, P., Spahn-Langguth, H. und Benet, L. Z., 1994. Bioactivation by glucuronide-conjugate formation. *Adv Pharmacol*, 27, 385–397.

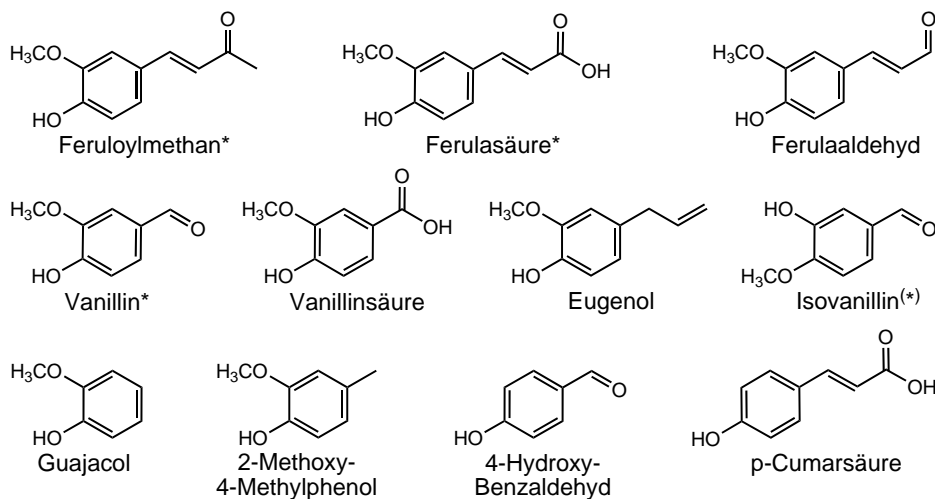
## *Literatur*

---

- Zsila, F., Bikadi, Z. und Simonyi, M., 2003a. Molecular basis of the Cotton effects induced by the binding of curcumin to human serum albumin. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14, 2433–2444.
- Zsila, F., Bikadi, Z. und Simonyi, M., 2003b. Unique, pH-dependent biphasic band shape of the visible circular dichroism of curcumin-serum albumin complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 301(3), 776–782.

## A Anhang

### A.1 Analytische Daten zu Produkten des Curcuminoid-Zerfalls



**Abbildung 42:** Chemische Strukturen potentieller Produkte aus dem Zerfall von Curcuminoiden. \* mittels HPLC/DAD- und GC/MS-Analyse identifiziert; (\*) mittels HPLC/DAD-Analyse tendentiell identifiziert.

#### A.1.1 HPLC/DAD

**Tabelle 16:** Chromatographische und spektroskopische Eigenschaften von potentiellen Curcuminoid-Abbauprodukten. Die UV/Vis-Spektren wurden im HPLC-Eluent aufgenommen. HPLC-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.2 (Gradient 1). \* mittels HPLC/DAD- und GC/MS-Analyse identifiziert; (\*) mittels HPLC/DAD-Analyse tendentiell identifiziert.

Substanz	HPLC $t_R$ in min	DAD $\lambda_{max}$ in nm
Vanillinsäure	5,1	296, 262
p-Cumarsäure	6,4	313
Ferulasäure*	6,6	325, 299
Isovanillin(*)	6,9	314, 280
4-Hydroxy-Benzaldehyd	7,0	286
Vanillin*	7,2	312, 280
Ferulaaldehyd	9,0	342, 306
Feruloylmethan*	9,3	330
Guajacol	10,2	277
2-Methoxy-4-Methylphenol	13,7	283
Eugenol	19,5	283

## A.1.2 GC/MS

**Tabelle 17:** Chromatographische und massenspektrometrische Eigenschaften von CUR-Zerfallsprodukten in Form ihrer Trimethylsilylether bei Analyse mittels GC/MS. GC/MS-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.1.

Substanz	GC $t_R$ in min	Fragmentierung nach Trimethylsilylierung m/z (relative Intensität)
Vanillin	15,4	224 ( $M^+$ , 20), 209 (66), 194 (100), 165 (7), 73 (3)
Ferulasäure	23,3	338 ( $M^+$ , 63), 323 (100), 308 (75), 293 (78), 279 (36), 264 (14), 249 (79), 219 (25), 192 (16), 179 (27), 145 (16), 73 (31)
Feruloylmethan	21,2	264 ( $M^+$ , 53), 249 (60), 234 (100), 219 (62), 191 (13), 175 (15), 145 (26), 117 (12), 73 (28)

## A.2 Curcuminoid und Curcuminoid-Glucuronide

### A.2.1 UV/Vis-Spektren

**Tabelle 18:** Absorptionsmaxima von Curcuminoid-Derivaten und zugehörigen Glucuroniden. Die Aufnahme der UV/Vis-Spektren erfolgte im HPLC-Eluent. A, dominantes lipophiles Glucuronid; B, polares Glucuronid.

Curcuminoid	Absorptionsmaxima in nm	
	Muttersubstanz	Glucuronid
CUR	428, 266	A: 423, 263; B: 418
Demethoxy-CUR	424, 251	A: 419, 248; B: 410
Bisdemethoxy-CUR	419, 249	A: 415, 248; B: 405
Iso-CUR	423, 262	A: 420, 257
Dimethyl-CUR	424, 265	411, 270
Hexahydro-CUR	282	281
Hexahydro-bisdemethoxy-CUR	279	277
Hexahydro-dimethyl-CUR	281	281

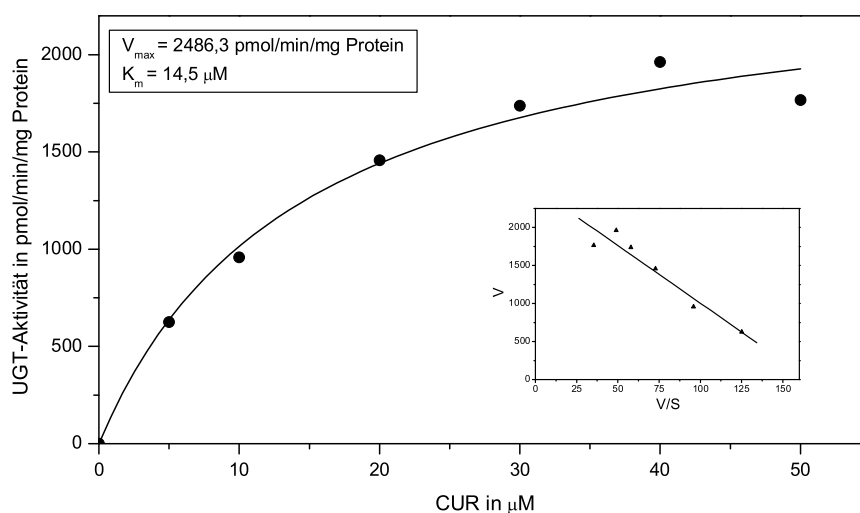


### A.2.2 Externe Kalibrierungen

**Tabelle 19:** Parameter zu den externen Kalibrierungen für verschiedene Curcuminoid-Derivate sowie das 3-HO-Glucuronid von E2 bei UV/Vis-Detektion mittels DAD. Die Kurvenanpassung und Berechnung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms OriginPro 6.0 durch lineare Regressionsanalyse. \* Das 3-HO-Glucuronid von E2 wurde separat kalibriert, da sich die Extinktionskoeffizienten von Glucuronid und Muttersubstanz unterscheiden. A, integrierte Peakfläche; n, injizierte Stoffmenge.

Substanz	Wellenlänge in nm	Kalibrierbereich in nmol	Geradengleichung	R <sup>2</sup>
CUR	420	0,0025 – 2,0	A = 2620,264 n – 6,588	0,99984
Demethoxy-CUR	420	0,1 – 1,5	A = 2756,620 n – 17,161	0,99997
Bisdemethoxy-CUR	420	0,05 – 1,5	A = 2696,848 n – 11,206	0,99952
Hexahydro-CUR	280	0,1 – 4,0	A = 304,037 n – 1,875	0,99976
Hexahydro-bisdemethoxy-CUR	280	0,1 – 2,0	A = 217,944 n + 0,291	0,99997
Dimethyl-CUR	420	0,01 – 0,5	A = 2703,590 n + 3,472	0,99974
3-HO-Glucuronid von E2*	280	0,1 – 1,0	A = 44,659 n – 0,496	0,99859

### A.2.3 Kinetik UGT1A8



**Abbildung 43:** Kinetisches Profil der Glucuronidierung von CUR mit humanem rekombinantem UGT1A8. Die Kurvenanpassung erfolgte nach der Michaelis-Menten-Gleichung. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus zwei unabhängigen Bestimmungen. Insert: Eadie-Hofstee-Plot. V, Reaktionsgeschwindigkeit in pmol/min/mg Protein; S, Substratkonzentration in µM.

### A.3 GC/MS: Fragmentierungsmuster

#### A.3.1 Metaboliten natürlicher Curcuminoide

**Tabelle 20:** Chromatographische und massenspektrometrische Eigenschaften von thermostabilen Curcuminoid-Metaboliten in Form ihrer Trimethylsilylether bei Analyse mittels GC/MS. GC/MS-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.1. n.n., nicht nachweisbar.

Substanz	GC $t_R$ in min	Fragmentierung nach Trimethylsilylierung m/z (relative Intensität)
Tetrahydro-CUR	23,4	588 ( $M^+$ , 0,4), 573 (10), 365 (15), 323 (5), 223 (5), 209 (100), 193 (8), 179 (13), 73 (19)
Hexahydro-CUR	21,5	590 ( $M^+$ , 2), 500 (18), 291 (19), 278 (9), 263 (4), 251 (6), 249 (9), 235 (17), 209 (100), 195 (9), 193 (7), 192 (6), 179 (18), 73 (24)
Octahydro-CUR	20,6; 21,3	664 ( $M^+$ , 0,1), 574 (15), 484 (23), 324 (19), 275 (18), 262 (98), 247 (23), 235 (29), 232 (11), 222 (10), 209 (100), 205 (8), 195 (11), 193 (7), 192 (13), 179 (27), 73 (53)
Tetrahydro-demethoxy-CUR	21,3	558 ( $M^+$ , n.n.), 543 (28), 365 (21), 335 (18), 323 (6), 223 (5), 219 (4), 209 (100), 193 (13), 192 (15), 179 (62), 73 (37)
Hexahydro-demethoxy-CUR	20,5	560 ( $M^+$ , 5), 470 (43), 291 (15), 278 (8), 263 (11), 261 (8), 249 (34), 248 (7), 235 (44), 219 (19), 209 (84), 205 (12), 195 (10), 193 (14), 192 (11), 179 (100), 73 (57)
Octahydro-demethoxy-CUR	20,0; 20,3	634 ( $M^+$ , 0,1), 544 (10), 454 (23), 386 (5), 324 (14), 294 (5), 275 (11), 262 (100), 258 (8), 247 (17), 235 (15), 232 (27), 222 (16), 209 (44), 205 (15), 192 (10), 179 (60), 73 (44)
Tetrahydro-bisdemethoxy-CUR	19,5	528 ( $M^+$ , 0,4), 513 (14), 335 (61), 293 (9), 219 (4), 192 (10), 179 (100), 73 (30)
Hexahydro-bisdemethoxy-CUR	19,2	530 ( $M^+$ , 0,01), 440 (19), 261 (18), 249 (9), 248 (43), 219 (13), 205 (11), 193 (4), 192 (15), 179 (100), 73 (51)
Octahydro-bisdemethoxy-CUR	18,4; 19,0	604 ( $M^+$ , n.n.), 514 (16), 424 (25), 356 (11), 294 (11), 258 (11), 232 (100), 205 (28), 192 (158), 179 (83), 73 (52)

### A.3.2 Metaboliten synthetischer Curcuminoide

**Tabelle 21:** Chromatographische und massenspektrometrische Eigenschaften von thermostabilen Metaboliten synthetischer CUR-Derivate in Form ihrer Trimethylsilylether bei Analyse mittels GC/MS. GC/MS-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.1. <sup>a</sup> durch katalytische Hydrierung hergestellt; <sup>b</sup> Metabolit bei Inkubation mit Zellen; <sup>c</sup> Nebenprodukt der katalytischen Hydrierung; n.n., nicht nachweisbar.

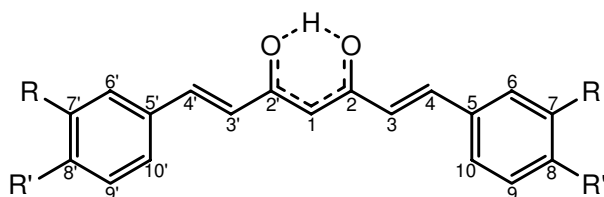
Substanz	GC $t_R$ in min	Fragmentierung nach Trimethylsilylierung m/z (relative Intensität)
Hexahydro-iso-CUR <sup>a</sup>	21,3	590 (M <sup>+</sup> , 0,6), 500 (13), 291 (13), 278 (6), 263 (2), 251 (8), 249 (6), 235 (18), 209 (100), 195 (9), 193 (8), 192 (10), 179 (26), 73 (11)
Octahydro-iso-CUR <sup>b</sup>	20,5	664 (M <sup>+</sup> , n.n.), 574 (9), 484 (20), 324 (10), 275 (14), 262 (53), 247 (15), 235 (17), 232 (6), 222 (8), 209 (100), 205 (6), 195 (13), 193 (8), 192 (10), 179 (31), 73 (24)
Hexahydro-dimethyl-CUR <sup>a</sup>	21,3	474 (M <sup>+</sup> , 6), 384 (26), 233 (27), 220 (9), 193 (10), 191 (19), 177 (18), 164 (9), 151 (100), 121 (3), 107 (6), 73 (4)
Octahydro-dimethyl-CUR <sup>c</sup>	19,5	548 (M <sup>+</sup> , n.n.), 458 (22), 368 (100), 217 (24), 189 (16), 177 (18), 174 (12), 151 (11), 147 (36), 134 (23), 121 (29), 107 (24), 73 (38)

### A.4 HPLC/ESI/MS/MS: Fragmentierungsmuster

**Tabelle 22:** Chromatographische und massenspektrometrische Eigenschaften von Curcuminoid-Glucuroniden bei Analyse mittels LC/MS und LC/MS/MS. HPLC- und MS-Bedingungen siehe Kapitel 6.2.1.2 und 6.2.1.3. A, dominantes lipophiles Glucuronid; B, polares Glucuronid.

Glucuronid	HPLC/DAD $t_R$ in min	LC/MS [M-H] <sup>-</sup>	LC/MS/MS-Fragmentierung m/z (relative Intensität)
CUR A	18,8	543	451 (12), 393 (25), 367 (100), 353 (13), 217 (39), 175 (80)
CUR B	8,8	543	367 (100), 217 (86)
Bisdemethoxy-CUR A	16,4	483	363 (68), 307 (100), 257 (7), 175 (64)
Bisdemethoxy-CUR B	8,3	483	363 (33), 307 (77), 215 (21), 175 (100)
Dimethyl-CUR	15,3	571	571 (7), 395 (100), 175 (6)
Hexahydro-CUR	16,4	549	549 (19), 531 (100), 513 (12), 373 (13), 359 (23), 175 (29)
Hexahydro-bisdemethoxy-CUR	8,7; 9,7	489	489 (9), 471 (36), 339 (18), 313 (21), 295 (10), 175 (100)
Hexahydro-dimethyl-CUR	17,3	577	392 (5), 193 (100), 175 (6)

## A.5 NMR-Spektren



	R	R'
CUR	OCH <sub>3</sub>	OH
Iso-CUR	OH	OCH <sub>3</sub>

### A.5.1 CUR

<sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, Aceton-d <sub>6</sub> )		
δ (ppm)	J (Hz)	Kohlenstoff
3.94 (6H, <i>s</i> )		-OCH <sub>3</sub>
6.00 (1H, <i>s</i> )		C-1, C-1'
6.73 (2H, <i>d</i> )	16	C-3, C-3'
6.91 (2H, <i>d</i> )	8	C-9, C-9'
7.21 (2H, <i>dd</i> )	8, 2	C-10, C-10'
7.36 (2H, <i>d</i> )	2	C-6, C-6'
7.62 (2H, <i>d</i> )	16	C-4, C-4'
8.21 (2H, <i>brs</i> )		

<sup>13</sup> C-NMR (125 MHz, Aceton-d <sub>6</sub> )	
δ (ppm)	Kohlenstoff
55.4	-OCH <sub>3</sub>
100.8	C-1, C-1'
110.7	C-6, C-6'
115.3	C-9, C-9'
121.4	C-3, C-3'
123.3	C-10, C-10'
127.5	C-5, C-5'
140.5	C-4, C-4'
147.9	C-7, C-7'
149.0	C-8, C-8'
183.7	C-2, C-2'

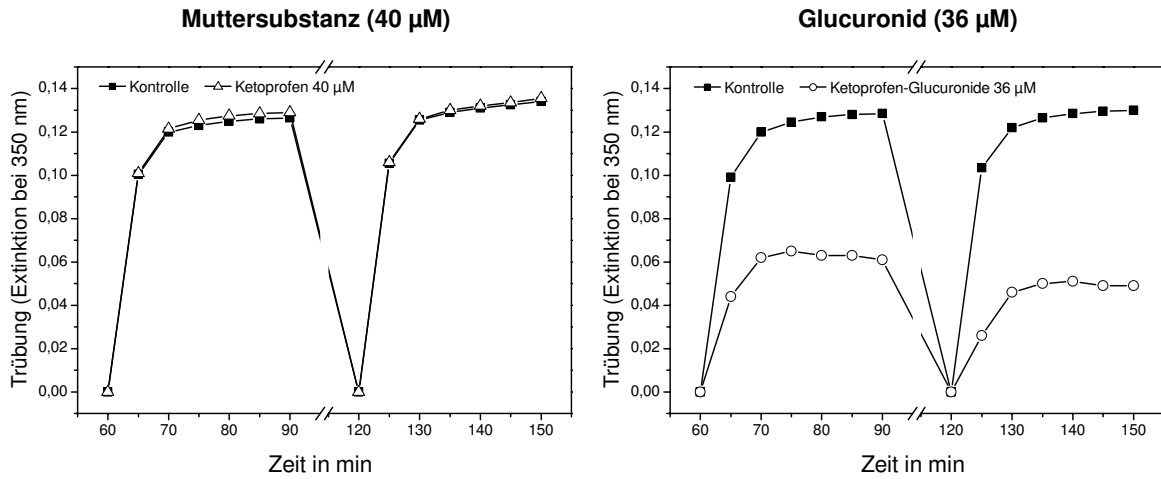
### A.5.2 Iso-CUR

<sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, Aceton-d <sub>6</sub> )		
δ (ppm)	J (Hz)	Kohlenstoff
3.92 (6H, <i>s</i> )		-OCH <sub>3</sub>
6.05 (1H, <i>s</i> )		C-1, C-1'
6.71 (2H, <i>d</i> )	16	C-3, C-3'
7.03 (2H, <i>d</i> )	8	C-9, C-9'
7.17 (2H, <i>dd</i> )	8, 2	C-10, C-10'
7.23 (2H, <i>d</i> )	2	C-6, C-6'
7.60 (2H, <i>d</i> )	16	C-4, C-4'
7.85 (2H, <i>brs</i> )		

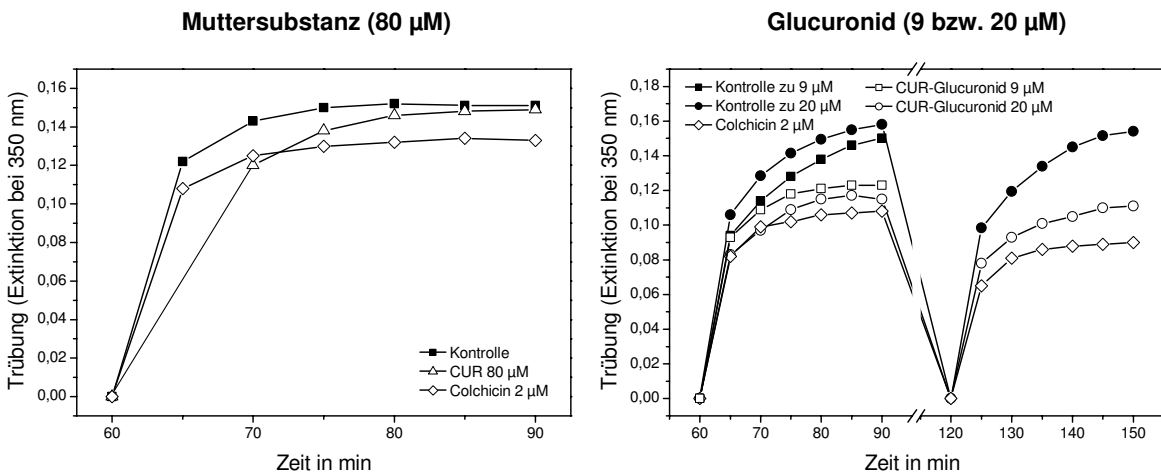
<sup>13</sup> C-NMR (125 MHz, Aceton-d <sub>6</sub> )	
δ (ppm)	Kohlenstoff
55.4	-OCH <sub>3</sub>
101.1	C-1, C-1'
111.5	C-6, C-6'
113.5	C-9, C-9'
121.6	C-3, C-3'
122.0	C-10, C-10'
128.4	C-5, C-5'
140.3	C-4, C-4'
147.0	C-7, C-7'
149.7	C-8, C-8'
183.6	C-2, C-2'

## A.6 Polymerisationskurven

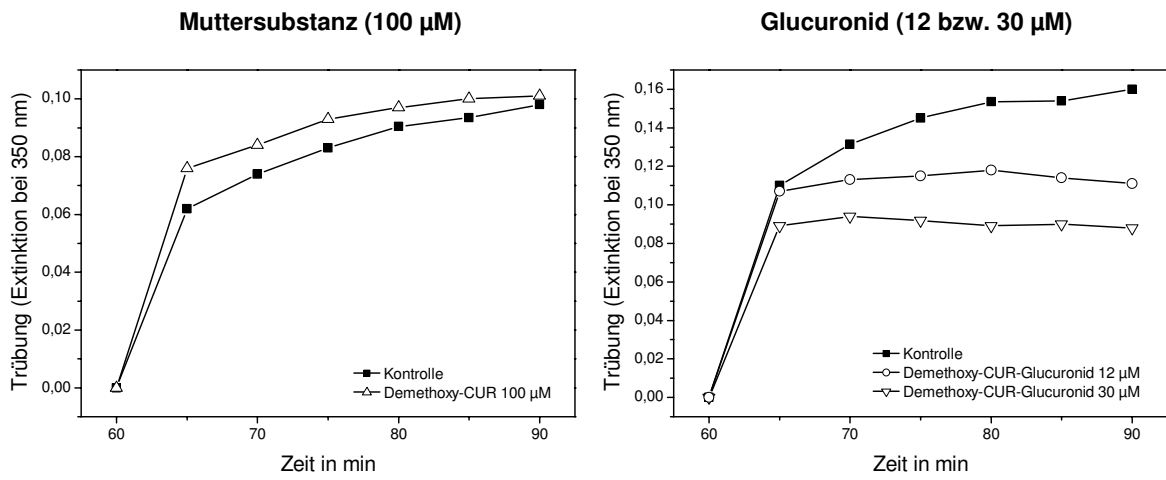
### A.6.1 Ketoprofen und Ketoprofen-Acylglucuronide



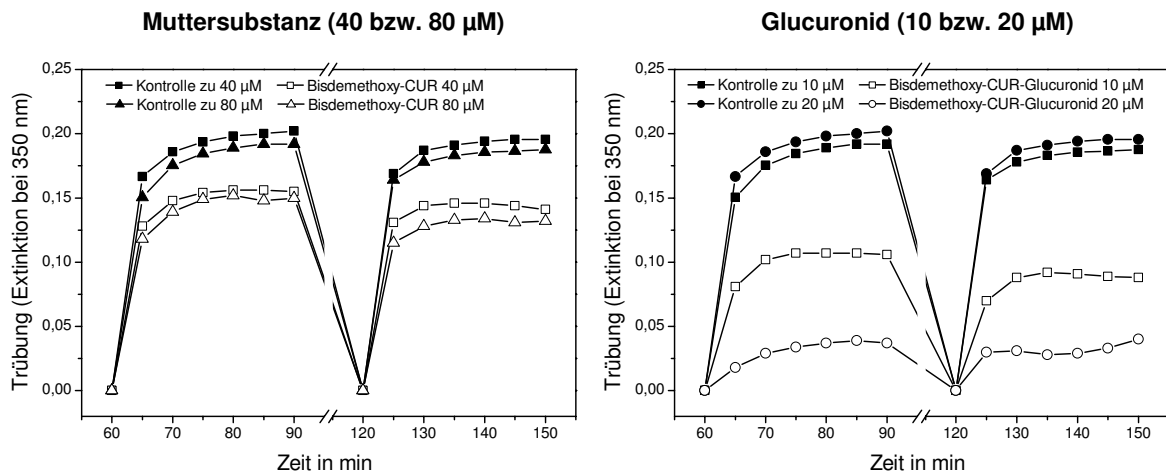
### A.6.2 CUR und CUR-Glucuronid



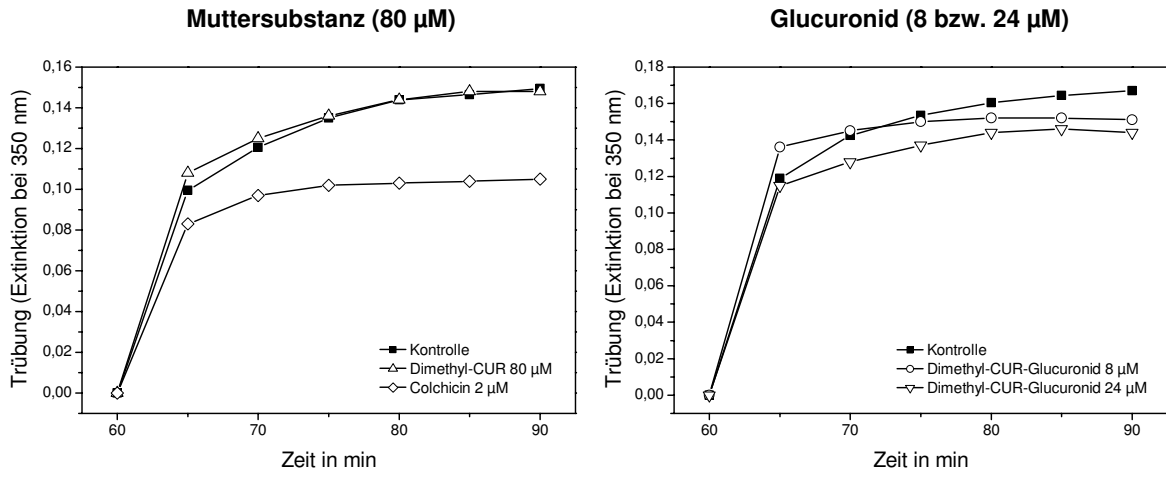
### A.6.3 Demethoxy-CUR und Demethoxy-CUR-Glucuronid



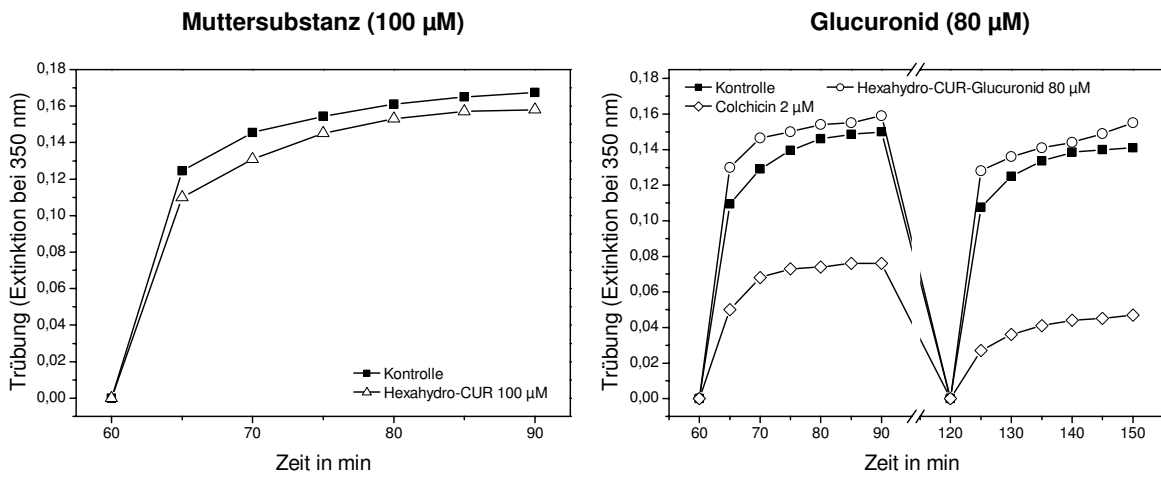
### A.6.4 Bisdemethoxy-CUR und Bisdemethoxy-CUR-Glucuronid



A.6.5 Dimethyl-CUR und Dimethyl-CUR-Glucuronid



A.6.6 Hexahydro-CUR und Hexahydro-CUR-Glucuronid







## B Publikationen

### Publikationen in Fachzeitschriften

S. I. Hoehle, E. Pfeiffer, A. M. Sólyom, M. Metzler. Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *J Agric Food Chem* 54(3): 756-764, 2006.

S. I. Hoehle, J. S. Kratschmann, E. Pfeiffer, M. Metzler. Studies on the stability of curcuminoids in physiological matrices. *Lebensmittelchemie* 2: 39, 2006.

E. Pfeiffer, C. R. Treiling, S. I. Hoehle, M. Metzler. Isoflavones modulate the glucuronidation of estradiol in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 26(12): 2172-2178, 2005.

S. I. Hoehle, E. Pfeiffer, A. M. Sólyom, B. N. Timmermann, M. Metzler. In vitro Glucuronidierung von Curcuminoiden mit mikrosomalen UDP-Glucuronyltransferasen. *Lebensmittelchemie* 1: 16, 2005.

E. Pfeiffer, H. L. Esch, S. Höhle, A. M. Sólyom, B. N. Timmermann, M. Metzler. In vitro studies on the estrogenic activity and the metabolism of curcumin. In: G. Eisenbrand (Hg.), *Functional Food: Safty Aspects*, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senate Commission on Food Safty, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, pp. 325-329, 2004.

E. Pfeiffer, S. Höhle, A. M. Sólyom, M. Metzler. Studies on the stability of turmeric constituents. *J Food Eng* 56: 257-259, 2003.

S. I. Höhle, E. Pfeiffer, M. Metzler. Metabolismus von Curcuminoiden in Mikrosomen und Präzisions-Gewebeschnitten. *Lebensmittelchemie* 57: 3, 2003.

### Beiträge auf Kongressen und Fachtagungen

E. Pfeiffer, S. G. Walch, A. Riess, S. I. Hoehle, A. M. Sólyom, M. Metzler. Curcumin glucuronide inhibits cell-free microtubule assembly. 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology USA, San Diego, USA, March 5-9, 2006. *The Toxicologist* 90: 139, 2006.

E. Pfeiffer, A. Riess, S. I. Hoehle, S. G. Walch, A. M. Sólyom, M. Metzler. Curcuminoids form reactive glucuronides that inhibit cell-free microtubule assembly. *Biological Reactive Intermediates VII: BRIs and Human Health and Disease*, Tucson, AZ, USA, January 4-7, 2006. *Abstract Book*, p. 55.

S. I. Hoehle, J. S. Kratschmann, E. Pfeiffer, M. Metzler. Studies on the stability of curcuminoids in physiological matrices. *EURO FOOD CHEM XIII/Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Hamburg, Germany, 19.-23. September 2005. *Abstract Book*, p. 68.

A. M. Sólyom, E. Pfeiffer, S. I. Hoehle, M. Metzler. LC/MS analysis of glucuronides of curcuminoids and their reductive metabolites. 119<sup>th</sup> AOAC Annual Meeting, Orlando, USA, September 11-15, 2005.

S. I. Hoehle, E. Pfeiffer, A. M. Sólyom, B. N. Timmermann, M. Metzler. Glucuronidation of curcuminoids catalyzed by multiple human UDP-glucuronosyltransferases. European ISSX Meeting at the Pharmaceutical Sciences Fair & Exhibition, Nice, France, June 12-17, 2005. *Drug Metab Rev* 37 (Suppl. 1): 46, 2005.

S. I. Hoehle, E. Pfeiffer, A. M. Sólyom, B. N. Timmermann, M. Metzler. Glucuronidation of curcuminoids catalyzed by multiple human UDP-glucuronosyltransferases. Gordon Research Conference on Natural Products, Tilton, USA, July 24-29, 2005.

S. I. Höhle, E. Pfeiffer, A. M. Sólyom, B. N. Timmermann, M. Metzler. In vitro Glucuronidierung von Curcuminoiden mit mikrosomalen UDP-Glucuronyltransferasen. 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, Germany, 13.-15. September 2004. Abstract Book, p. 184.

S. I. Hoehle, E. Pfeiffer, M. Metzler. In vitro metabolism of curcumin. 8<sup>th</sup> Karlsruhe Nutrition Congress: Phytoestrogenes: Benefits and Risks for Human Health, Karlsruhe, Germany, October 12-14, 2003. Abstract Book, p. 65.

S. I. Hoehle, E. Pfeiffer, A. M. Sólyom, B. N. Timmermann, M. Metzler. In vitro studies on the biotransformation of curcuminoids. 8<sup>th</sup> European ISSX Meeting, Dijon, France, April 27-May 1, 2003. *Drug Metab Rev* 35 (Suppl. 1): 106, 2003.

E. Pfeiffer, S. I. Höhle, A. M. Sólyom, B. N. Timmermann, M. Metzler. Stable and unstable glucuronides in curcumin metabolism. 42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology, Salt Lake City, USA, March 9-13, 2003. *Toxicological Sciences* 72 (Suppl.1): 313, 2003.

S. Höhle, E. Pfeiffer, M. Metzler. Metabolismus von Curcuminoiden in Mikrosomen und Präzisions-Gewebeschnitten. 31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt, Germany, 9.-11. September 2002. Abstract Book, p. 84.

E. Pfeiffer, H. L. Esch, S. Höhle, A. M. Sólyom, B. N. Timmermann, M. Metzler. In vitro studies on the estrogenic activity and metabolism of curcumin. Symposium of the Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senate Commission on Food Safety, on "Functional Food: Safety Aspects", Karlsruhe, Germany, May 05-07, 2002. Abstract Book, Abstract No. 11.

E. Pfeiffer, H. L. Esch, S. Höhle, A. M. Sólyom, B. N. Timmermann, M. Metzler. Chemical stability of curcuminoids and their estrogenic activity in Ishikawa cells. 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Society of Toxicology, Nashville, USA, March 17-21, 2002. *Toxicological Sciences* 66 (1-S): 30, 2002.

## C Danksagung

Danken möchte ich allen, die auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Dr. M. Metzler für die Überlassung des interessanten Themas, die allzeit freundliche Unterstützung meiner Arbeit sowie seine Diskussionsbereitschaft,
- im Besonderen Erika Pfeiffer für die wohlwollende Unterstützung durch Rat und Tat sowie die zahlreichen Anregungen und die wertvollen Diskussionen (DANKE!),
- Anikó Sólyom für die Bereitstellung der aufgereinigten Curcuminoide sowie die Aufnahme der LC/MS/MS-Spektren,
- Stefan Kranz für die Unterstützung bei der Präparation der Gewebeschnitte sowie für seine Geduld und Hilfe bei Computerproblemen,
- Doris Honig und Dr. Renate Loske für die unermüdliche Instandhaltung des GC/MS und die zahlreichen Einspritzungen,
- dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Podlech für die Durchführung der NMR-Messungen,
- Stephan Walch und Alexander Riess für ihre wertvolle und zuverlässige Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten,
- Julia Kratschmann für die Arbeiten zur Stabilität und die damit verbundene Betreuung der Zellkulturen im Rahmen ihrer Diplomarbeit sowie ihre Hilfe im Umgang mit L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X,
- Franziska Heuschmid für ihren Beitrag zum oxidativen Metabolismus von Hexahydrocurcumin während ihrer Diplomarbeit,
- Silke Gerstner für das Korrekturlesen dieser Arbeit,
- allen Mitdoktoranden und Mitarbeitern für das überaus angenehme Arbeitsklima, die tolle Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt

- Tilo insbesondere für die allumfassende und uneingeschränkte Hilfeleistung bei allen computertechnischen Angelegenheiten, sowie für seine Geduld, sein Verständnis und seinen Beistand während jeder Phase dieser Arbeit,
- und vor allem meinen Eltern für ihre Hilfe und Unterstützung in jeder Hinsicht, die ständige Aufmunterung sowie das Lesen dieser Arbeit.



## Lebenslauf

**Name** Simone Höhle  
**Geburtsdatum** 08. Mai 1977  
**Geburtsort** Geislingen an der Steige  
**Staatsangehörigkeit** deutsch

### Schulbildung

08/1983 - 07/1987 Tegelberg-Grundschule Geislingen  
08/1987 - 06/1993 Schubart-Realschule Geislingen  
Abschluss: Mittlere Reife  
08/1993 - 06/1996 Wirtschaftsgymnasium Geislingen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung

10/1996 - 12/2001 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH)  
09/1999 Erster Abschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker  
06/2001 - 12/2001 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. M. Metzler am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Karlsruhe (TH)  
Thema: Metabolismus von Curcuminoiden in Mikrosomen und Gewebeschnitten  
Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin / Zweiter Abschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker  
  
**seit 03/2002** Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. M. Metzler

