

Studien zur extrahepatischen Reduktion verschiedener *N*-hydroxylierter Verbindungen



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Sabine Mau

Kiel 2002

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

Prof. Dr. W. Blaschek

Tag der mündlichen Prüfung:

4., 15. und 16.07.2002

Zum Druck genehmigt:

17.07.2002

Prof. Dr. T. Bauer

(Dekan)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$A_{229\text{ nm}}$	Absorption bei 229 nm
Abb.	Abbildung
BA	Benzamidin
BAO	Benzamidoxim
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
β -ME	β -Mercaptoethanol
CYP	Cytochrom P450
Cyt.	Cytochrom
denat.	denaturiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erythr.	Erythrozyten
FMN	Flavinmononukleotid
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
Fp	NADPH-Cytochrom P450 Reduktase
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten Konstante
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
ND	Nicht detektierbar
n.d.	Nicht durchgeführt
o.	ohne Zusatz von
P450	Cytochrom P450

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PBS	Phosphate-buffered saline
r^2	Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline mit Tween
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V_{\max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
1 EINFÜHRUNG	1
1.1 BIOTRANSFORMATION	1
1.1.1 DEFINITION UND BEDEUTUNG	1
1.1.2 BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN	6
1.1.3 BIOTRANSFORMATION STICKSTOFFHALTIGER FUNKTIONELLER GRUPPEN	8
1.2 BEDEUTUNG DES CYTOCHROM P450-ENZYSYSTEMS	10
1.2.1 GRUNDLAGEN UND VORKOMMEN	10
1.2.2 REAKTIONEN UND MECHANISMEN	17
1.3 EINSATZ VON AMIDINEN UND AMIDOXIMEN	18
1.3.1 THERAPEUTISCHE BEDEUTUNG	18
1.3.2 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN	24
1.4 EXTRAHEPATISCHE BIOTRANSFORMATION	27
2 GEWINNUNG MIKROSOMALER FRAKTIONEN AUS VERSCHIEDENEN ORGANEN	34
2.1 EINLEITUNG	34
2.1.1 BEDEUTUNG DER ORGANVERTEILUNG	34
2.1.2 UNTERSCHIEDE UND GEMEINSAMKEITEN DER UNTERSUCHTEN ORGANE	37
2.1.3 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN	42
2.1.4 ZIELSETZUNG	45
2.2 METHODEN	46
2.2.1 GEWINNUNG DER ENZYMPRÄPARATIONEN	46
2.2.1.1. Materialien und Geräte	46
2.2.1.2. Schweinelebermikrosomen	47
2.2.1.3. Schweinenierenmikrosomen	48
2.2.1.4. Schweinehirnmikrosomen	49
2.2.1.5. Schweinelungenmikrosomen	49
2.2.1.6. Schweinedarmmikrosomen	50
2.2.1.7. Humane Lebermikrosomen	50

2.2.1.8.	Humane Nierenmikrosomen	51
2.2.1.9.	Humane Darmmikrosomen	52
2.2.2	ANALYTISCHE METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER MIKROSOMEN	52
2.2.2.1.	Materialien und Geräte	52
2.2.2.2.	Proteinbestimmung	52
2.2.2.3.	Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung	53
2.3	ERGEBNISSE	55
2.3.1	PROTEINBESTIMMUNG	55
2.3.2	CYTOCHROM P450-GEHALTSBESTIMMUNG	56
2.4	DISKUSSION	57
3	REDUKTION VERSCHIEDENER N-HYDROXYLIERTER VERBINDUNGEN DURCH MIKROSOMALE FRAKTIONEN UNTERSCHIEDLICHER ORGANE	63
3.1	EINLEITUNG	63
3.1.1	BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN	63
3.1.2	ZIELSETZUNG	69
3.2	METHODEN	70
3.2.1	REDUKTION VON BENZAMIDOXIM	70
3.2.1.1.	Materialien und Geräte	70
3.2.1.2.	Inkubationsbedingungen	70
3.2.1.3.	HPLC	71
3.2.2	REDUKTION VON GUANOXABENZ	75
3.2.2.1.	Materialien und Geräte	75
3.2.2.2.	Inkubationsbedingungen	75
3.2.2.3.	HPLC	76
3.2.3	REDUKTION VON RO 48-3656	80
3.2.3.1.	Materialien und Geräte	80
3.2.3.2.	Inkubationsbedingungen	80
3.2.3.3.	HPLC	81
3.3	ERGEBNISSE	84
3.3.1	REDUKTION VON BENZAMIDOXIM DURCH MIKROSOMALE FRAKTIONEN VERSCHIEDENER ORGANE	84
3.3.1.1.	Charakterisierung	84

3.3.1.2. Kinetik	98
3.3.2 REDUKTION VON GUANOXABENZ DURCH MIKROSOMALE FRAKTIONEN VERSCHIEDENER ORGANE	100
3.3.2.1. Charakterisierung	100
3.3.2.2. Kinetik	114
3.3.3 REDUKTION VON RO 48-3656 DURCH MIKROSOMALE FRAKTIONEN VERSCHIEDENER ORGANE	116
3.3.3.1. Charakterisierung	116
3.3.3.2. Kinetik	126
3.4 DISKUSSION	128
4 CHARAKTERISIERUNG DES N-REDUKTIVEN MIKROSOMALEN ENZYSYSTEMS VERSCHIEDENER ORGANE	137
4.1 EINLEITUNG	137
4.1.1 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN	137
4.1.2 ZIELSETZUNG	142
4.2 METHODEN	143
4.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE	143
4.2.2 CYTOCHROM B ₅ -GEHALTSBESTIMMUNG	144
4.2.3 NADH-CYTOCHROM B ₅ REDUKTASE-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	145
4.2.4 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	146
4.2.5 INKUBATION MIT EINEM ANTIKÖRPER GEGEN DIE <i>BENZAMIDOXIM-REDUKTASE</i>	152
4.2.5.1. Inkubationsbedingungen	152
4.2.5.2. HPLC-Analytik	152
4.3 ERGEBNISSE	155
4.3.1 CYTOCHROM B ₅ -GEHALTSBESTIMMUNG	155
4.3.2 NADH CYTOCHROM B ₅ REDUKTASE-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	156
4.3.3 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	157
4.3.4 INKUBATION MIT EINEM ANTIKÖRPER GEGEN DIE <i>BENZAMIDOXIM-REDUKTASE</i>	159
4.4 DISKUSSION	161
5 REDUKTION VON BENZAMIDOXIM DURCH BLUT UND BLUTBESTANDTEILE	168

5.1	EINLEITUNG	168
5.1.1	BISHERIGE UNTERSUCHUNGE	168
5.1.2	ZIELSETZUNG	171
5.2	METHODEN	172
5.2.1	GEWINNUNG DER VERSCHIEDENEN UNTERSUCHTEN PRÄPARATIONEN	172
5.2.1.1.	Materialien und Geräte	172
5.2.1.2.	Porcines Vollblut	173
5.2.1.3.	Porcines Plasma	173
5.2.1.4.	Porcine Erythrozyten	173
5.2.1.5.	Aufgeschlossene porcine Erythrozyten	174
5.2.1.6.	Erythrozytenmembran	174
5.2.1.7.	Humane Erythrozyten	175
5.2.1.8.	Humanes Hämoglobin	175
5.2.2	UMSETZUNG MIT BENZAMIDOXIM	176
5.2.2.1.	Materialien und Geräte	176
5.2.2.2.	Inkubationsbedingungen	176
5.2.2.3.	HPLC	176
5.2.3	BESTIMMUNG DER AUSBEUTE DURCH ZELLZÄHLUNG	177
5.3	ERGEBNISSE	179
5.3.1	PORCINES VOLLBLUT	179
5.3.2	PORCINES PLASMA	180
5.3.3	PORCINE ERYTHROZYTEN	181
5.3.4	AUFGESCHLOSSENE PORCINE ERYTHROZYTEN	187
5.3.5	PORCINE ERYTHROZYTENMEMBRAN	188
5.3.6	HUMANE ERYTHROZYTEN	190
5.3.7	HUMANES HÄMOGLOBIN	193
5.3.8	BESTIMMUNG DER AUSBEUTE DURCH ZELLZÄHLUNG	194
5.4	DISKUSSION	197
6	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	206
7	LITERATURVERZEICHNIS	210

1 EINFÜHRUNG

1.1 BIOTRANSFORMATION

1.1.1 Definition und Bedeutung

Alle Lebewesen sind täglich durch die Umwelt, die Nahrung und sonstige auf sie einwirkende Einflüsse einer Fülle von Fremdstoffen ausgesetzt. Diese Fremdstoffe können körperfremde Stoffe aller Art sein, sodass darin auch Chemikalien, Medikamente oder Nahrungsbestandteile mit eingeschlossen sind. Wenn sie keine physiologischen Verbindungen darstellen und nicht der intermediären Stoffwechselverwertung unterliegen, bezeichnet man sie auch als Xenobiotika [Testa, 1995]. Unter Biotransformation, häufig auch als Fremdstoffmetabolismus bezeichnet, fasst man die im Organismus ablaufenden Umwandlungen dieser Fremdstoffe zusammen. Ablaufen kann sie sowohl in der Leber, dem Hauptmetabolisierungsorgan des Körpers, als auch in anderen Organen wie beispielsweise in Niere, Lunge, Darm, Haut und Milz [Mutschler, 1996].

Xenobiotika können sowohl hydrophilen als auch lipophilen Charakter besitzen. Die hydrophilen Fremdstoffe werden vom Körper kaum resorbiert, da die zu passierenden Phospholipidmembranen lipophil sind und ein Durchtreten für derartige Stoffe meist nur durch Carrier ermöglicht wird, die es aber für Xenobiotika nicht gibt. Bei ähnlichen Strukturen oder Strukturelementen von Xenobiotika können jedoch Carrier für körpereigene Stoffe genutzt werden. Dagegen können die lipophilen Verbindungen sehr gut Membranen passieren und resorbiert werden. Mit Zunahme der Lipophilie steigt somit die Resorption von Xenobiotika, sodass sie sich nach Aufnahme hoher Konzentrationen im Fettgewebe anreichern und dadurch zu Störungen im Stoffwechsel führen können. Zudem können sie bei toxischen oder kanzerogenen Eigenschaften zu entsprechenden Schäden führen.

Die Biotransformation ermöglicht dem Körper, solche lipophilen Xenobiotika schneller zu eliminieren, indem sie sie mit Hilfe von Enzymen in meist hydrophilere und damit besser ausscheidbare Verbindungen umwandelt. Die am Fremdstoffwechsel beteiligten Enzyme und Enzymsysteme besitzen dabei keine Substratspezifität, sodass sie eine Vielzahl von unterschiedlichen Verbindungen umzusetzen vermögen. Man unterscheidet bei diesen Enzymen auf der einen Seite die strukturgebundenen und auf der anderen Seite die ungebundenen Enzyme. Die strukturgebundenen Enzyme, wie beispielsweise die Monooxygenasen und die Glucuronyltransferasen, treten an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und in den Mitochondrien auf, während die strukturungebundenen Enzyme als lösliche Enzyme z.B. im Cytosol vorkommen. Beispiele dafür sind Esterasen, Amidasen oder Sulfotransferasen.

Biotransformationsvorgänge lassen sich in zwei Phasen unterteilen, wobei die erste Phase bei schon gegebenen strukturellen Voraussetzungen für Phase 2-Reaktionen überflüssig sein kann. In der Phase 1 finden verändernde Reaktionen wie Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse statt, die zu einer Funktionalisierung der Xenobiotika führen, d.h. dass sich neue funktionelle Gruppen wie z.B. Alkohole, Thiole, Amine und Carbonsäuren ergeben. An diesen Gruppen können in einer Phase 2-Reaktion Konjugationen mit Glucuronsäure, Schwefelsäure, Glutathion oder Aminosäuren erfolgen. Phase 2-Reaktionen stellen also aufbauende Reaktionen dar. Daneben ablaufende Methylierungen und Acetylierungen nehmen eine Mittelstellung zwischen Phase 1 und Phase 2 ein. In Abbildung 1-1 sind diese Vorgänge in einem vereinfachten Schema zusammengefasst worden.

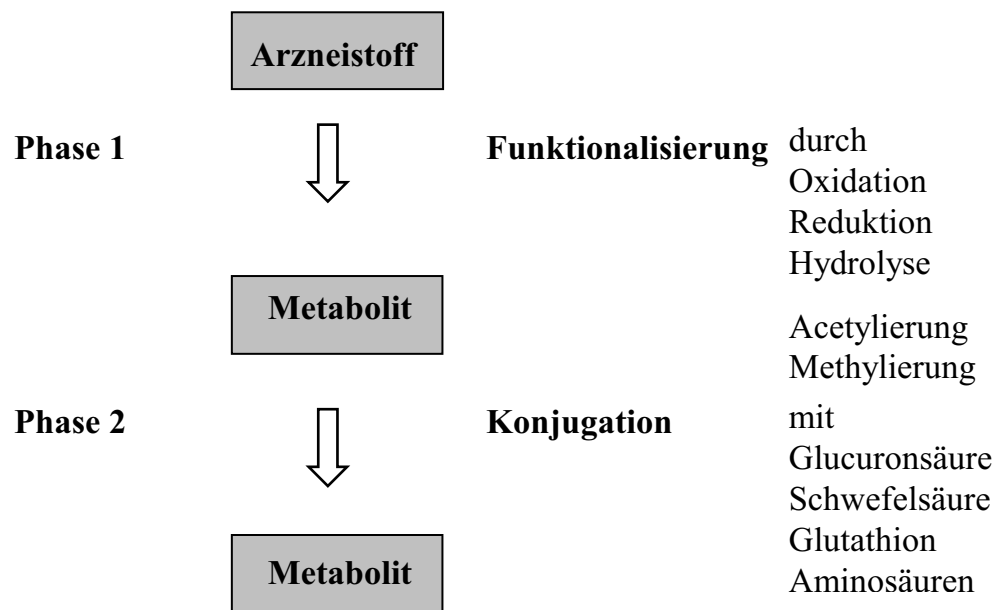


Abb. 1-1: Mögliche Biotransformationsvorgänge im menschlichen Körper.

Das ER kommt mit Ausnahme der Erythrozyten und Thrombozyten in allen tierischen und pflanzlichen Zellen vor. Die Membranen bieten zahlreichen Enzymen eine Matrix, sodass daran viele wichtige biochemische Reaktionen ablaufen [Reinhard, 1990]. Besonders in der Leber findet man eine Reihe wichtiger Stoffwechsellenzyme an die Membranen des ER gebunden, die eine bedeutende Rolle für die Biotransformation von körpereigenen und körperfremden Substanzen, und damit auch von Arzneistoffen spielen können [Reinhard, 1990]. Die an Phase 1-Biotransformationsvorgängen beteiligten und im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Enzyme sind die Cytochrom P450 Monooxygenasen (EC 1.14.14.1) [Guengerich, 1987], die Epoxidhydrolase (EC 4.2.1.63) [Bonse und Metzler, 1978], die flavinhaltige Monooxygenase (EC 1.14.13.8) [Ziegler, 1988] und die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (EC 1.6.2.4) [Nebert und Gonzalez, 1987]. Als im Cytoplasma befindliche Enzyme sind die Aldehyddehydrogenase (EC 1.2.1.3), die Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1), die Xanthinoxidase (EC 1.2.3.2) sowie verschiedene Esterasen und Monoaminoxidasen [Bonse und Metzler, 1978] zu nennen.

Auch einige Konjugationsenzyme der Phase 2 finden sich im ER wie die UDP-Glucuronyltransferasen (EC 2.4.1.17) [Ruckpaul und Bernhardt, 1984] und verschiedene Methyltransferasen (EC 2.1.1.X), wohingegen einige Methyltransferasen, *N*-Acetyltransferasen (EC 2.3.1.X), Sulfottransferasen (EC 2.8.2.X) und Glutathiontransferasen (EC 2.5.1.18) im Cytosol lokalisiert sind [Bonse und Metzler, 1978].

Durch die Metabolisierung kann sich sowohl die Pharmakokinetik als auch die Pharmakodynamik eines Arzneistoffes stark verändern. Die Pharmakokinetik beschreibt den zeitlichen Konzentrationsverlauf eines Pharmakons im Organismus und ergibt sich aus der Reaktion des Individuums auf den Arzneistoff, also aus Faktoren wie der Resorption, der Verteilung und der Elimination. Hingegen beschreibt die Pharmakodynamik den Effekt, den der Arzneistoff im Körper bewirkt, also die pharmakologische und toxikologische Wirkung. Da die Enzyme nicht unterscheiden können, ob eine Substanz für den Körper nützlich oder schädlich ist, werden alle Verbindungen soweit es ihre Lipophilie erfordert der Biotransformation zugeführt [Forth *et al.*, 1998]. In den meisten Fällen dient der Metabolismus der Entgiftung von Xenobiotika und produziert hydrophilere, weniger toxische Verbindungen aus den Ausgangsverbindungen.

Arzneistoffe können durch Biotransformationsvorgänge sowohl in unwirksame Verbindungen als auch in toxische Metaboliten überführt werden. Im ersten Fall spricht man von einer Bioinaktivierung und im zweiten Fall von einer Biotoxifizierung. Durch eine solche Biotoxifizierung, die auch als Giftung bezeichnet wird, können zytotoxische, kanzerogene, mutagene oder teratogene Metaboliten entstehen [Park *et al.*, 1995].

Eine veränderte Wirksamkeit von oral verabreichten Arzneistoffen stellt man auch durch den sogenannten First-pass-Effekt fest. Nach der Resorption über den Gastrointestinaltrakt werden diese über die Blutbahn und die Pfortader zunächst in die Leber transportiert. Dort unterliegt die Substanz mitunter bereits den ersten Biotransformationsreaktionen, die dazu führen können, dass ein erheblicher Anteil metabolisiert wird bevor er eine Wirkung im Körper gezeigt hat [Mutschler, 1996].

Es können auch unwirksame Verbindungen durch Metabolisierungsreaktionen in wirksame Arzneistoffe überführt werden. Beschrieben wurde dieses Prinzip der metabolischen Aktivierung erstmals von Tréfouel *et al.* [1935]. Das Prinzip der Bioaktivierung nutzt man therapeutisch bei den sogenannten Prodrugs. Man verabreicht inaktive Vorstufen eines Arzneistoffes, die erst im Körper durch enzymatische oder chemische Reaktionen zur eigentlichen Wirkform umgewandelt werden. Einige Gründe für die Verwendung solcher Prodrugs mit entsprechenden Arzneistoff-Beispielen sind in Tabelle 1-1 aufgeführt.

Zusammengefaßt kann man mit Hilfe von Prodrugs pharmakokinetische, pharmakodynamische und auch toxikologische Eigenschaften von Arzneistoffen verbessern, sodass unter anderem die Applikation einfacher wird, geringere Dosen benötigt werden, die Patienten-Compliance verbessert wird und die Nebenwirkungen und toxischen Effekte reduziert werden können. Mit Hilfe dieses Prodrug-Prinzips werden daher viele Arzneistoffe verabreicht, die ansonsten Problemfälle darstellen würden [Clement, 1993]. Dabei können die Kenntnisse über im Körper ablaufende Biotransformationsvorgänge genutzt werden, um den eigentlichen Wirkstoff durch den Organismus selbst freisetzen zu lassen.

Der Fremdstoffmetabolismus wird jedoch in Quantität und Qualität in jedem Organismus von einer Reihe von Faktoren beeinflusst, die man bei einer Prodrug-Entwicklung berücksichtigen muss. Neben genetisch bedingten Unterschieden wie Geschlecht und Art spielen auch Alter, Ernährung, Krankheiten, Enzyminduktion und Enzymhemmung eine entscheidende Rolle [Forth *et al.*, 1998]. Auf die Enzyminduktion und -inhibition soll in Kapitel 1.2 näher eingegangen werden.

Tab. 1-1: Gründe für den Einsatz von Prodrugs mit Arzneimittelbeispielen nach Mutschler [1996]. BHS, Blut-Hirn-Schranke.

Grund	Prodrug	Wirkform
Bitterer Geschmack	Chloramphenicolpalmitat	Chloramphenicol
Schlechter Geschmack	Erythromycinethylsuccinat	Erythromycin
Schlechte Wasserlöslichkeit	Methylprednisolonhemisuccinat	Methylprednisolon
Schlechte Resorption	Enalapril	Enalaprilat
Überwindet nicht BHS	Levodopa	Dopamin
Zu kurze Wirkung	Fluphenazindecanoat	Fluphenazin
Schlechte Wirkungsselektivität	Omeprazol	Omeprazolsulfenamid
Toxizität	Azathioprin	Mercaptopurin

1.1.2 Biotransformationsstudien

Da fremdstoffmetabolisierende Enzyme Arzneistoffe und ihre Wirkung im Körper stark verändern können, werden vom Arzneimittelgesetz strenge Richtlinien aufgelegt, nach denen neue Arzneistoffe vor ihrer Zulassung zu prüfen sind. Diese Prüfungen umfassen unter anderem auch Biotransformationsstudien, in denen die Wirkung des Arzneistoffes selbst, aber auch die seiner möglichen entstehenden Metaboliten durchleuchtet werden müssen. Hierbei geht es neben pharmakokinetischen und

pharmakologischen Aspekten auch um die toxikologische Wirkung der jeweiligen Substanz.

Diese vom Gesetz geforderten Biotransformationsstudien beinhalten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien. Gab man früher noch den *in vivo* Studien den Vorrang, so versucht man sie heute im Zuge des Tierschutzes so gering wie möglich zu halten und Alternativmethoden einzusetzen. Der klare Vorteil der *in vivo* Untersuchungen ist die Einbeziehung aller im Organismus ablaufender Einflüsse auf den Arzneistoffmetabolismus. Demgegenüber stehen als Nachteile, dass sich primär gebildete Metaboliten durch weitere Umwandlungen dem Nachweis aus Blut, Plasma und Urin entziehen können und Speziesunterschiede zu berücksichtigen sind. Diese Differenzen erschweren die Übertragung von Tierversuchen auf den Menschen. Des Weiteren kann man bei Tieren erprobte Dosierungen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen. Zum Beispiel zeigen Katzen auf morphinähnliche Analgetika Erregungserscheinungen, während Hunde und Menschen eine zentraldepressive Wirkung erfahren [Frey, 1996]. Der Hund zeigt gegenüber Sulfanilamid, einer Substanz, die der Mensch ohne Probleme verstoffwechseln kann, eine starke Empfindlichkeit bis hin zur Toxizität, weil er die Substanz nicht acetylieren und anschließend ausscheiden kann [Frey, 1996]. Sogar innerhalb einer Art existieren Unterschiede im Arzneimittel-Stoffwechsel. Bei den Hunden stellt der Beagle eine Sonderposition dar, da er über einen viel schnelleren Stoffwechsel als alle anderen Vertreter seiner Art verfügt [Frey, 1996]. Über den Grund dieses Phänomens wird noch diskutiert, wobei sich die Vermutungen auf eine genetische Ursache oder eine stärkere Expression von Cytochrom P450 Enzymen konzentrieren.

Nicht zu vergessen ist natürlich der ethische Aspekt, weshalb man *in vivo* Tierversuche unbedingt auf ein unerlässliches Maß beschränken sollte. Als Alternative gibt es eine Reihe von *in vitro* Untersuchungsmöglichkeiten, die die *in vivo* Studien ersetzen können. Ein Nachteil dieser *in vitro* Ansätze ist die Entfernung von der komplexen *in vivo* Situation. Sie eignen sich aber sehr gut für die Aufklärung enzymatischer Grundlagen oder die Erforschung einzelner Biotransformationsreaktionen. Ein großer Vorteil von *in vitro* Studien besteht darin, dass Folge- oder Konkurrenzreaktionen, die

den Nachweis *in vivo* erschweren oder sogar verhindern können, hierbei minimiert oder sogar ausgeschlossen werden, sodass alle entstehenden Metaboliten auch nachgewiesen werden können. Zu den *in vitro* Modellen zählen isolierte perfundierte Organe, Organdünnschnitte („liver slices“), Zellsysteme wie Hepatozyten, Lungen- oder Blutzellen, Zellfraktionen wie Mikrosomen oder Mitochondrien, rekonstituierte Enzymsysteme mit gereinigten oder rekombinanten Enzymen oder das Studium mit Hühnerembryonen.

Zurzeit werden viele Untersuchungen entweder mit isolierten Enzymen, bei denen die Gefahr einer Verunreinigung mit anderen Enzymen mit ähnlichen Eigenschaften besteht, oder mit Zellfraktionen, die meist eine große Anzahl von Enzymen beinhalten, durchgeführt. Die bereits erwähnten Mikrosomen, die zu den Zellfraktionen zählen, präsentieren eine Fraktion aus zusammengeballten Membranbestandteilen des ER mit den membranständigen Enzymen. Mikrosomen erhält man durch differentielle Ultrazentrifugation von Homogenisaten eines Organs, vorwiegend der Leber, wonach sie einen Durchmesser von ca. 100 nm [Lohr *et al.*, 1998] aufweisen.

1.1.3 Biotransformation stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen

Viele Arzneistoffe enthalten Stickstoff in Form der unterschiedlichsten funktionellen Gruppen. Ellinger [1920] gelang erstmalig ein Nachweis der Biotransformation am Stickstoffatom anhand der Oxidation des Acetanilids zu seinem Metaboliten *N*-Acetylphenylhydroxylamin. In den folgenden Jahrzehnten wurden zahlreiche weitere oxidative Metabolisierungen von aliphatischen [Coutts und Beckett, 1977] und aromatischen Aminen zu ihren Hydroxylaminen [Kiese, 1959] und von tertiären Aminen zu *N*-Oxiden beschrieben [Damani, 1982].

Clement [1983] konnte erstmals die Biotransformation stark basischer funktioneller Gruppen an Amidinfunktionen zeigen. Des Weiteren konnte neben der *N*-Oxygenierung von Amidinen zu Amidoximen [Clement, 1983; Clement und

Zimmermann, 1987] auch die von Isothioharnstoffen zu *N*-Hydroxyisothioharnstoffen [Clement und Wissel, 1991], von Guanidinen zu *N*-Hydroxyguanidinen [Clement *et al.*, 1993a] und auch von Amidinohydrazonen zu *N*-Hydroxyamidinohydrazonen [Clement *et al.*, 1994; Clement und Demesmaeker, 1997] gezeigt werden.

Im Allgemeinen werden solche Oxidationsreaktionen an stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen meistens durch eine der beiden Monooxygenasen Cytochrom P450 [Testa, 1995] oder die flavinhaltige Monooxygenase (FMO) [Ziegler und Mitchell, 1972] katalysiert. Beide Monooxygenasen sind membrangebunden und daher in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums oder auch in den Mitochondrien lokalisiert [Testa, 1995].

Des Weiteren können neben oxidativen auch reduktive Biotransformationsreaktionen am Stickstoff ablaufen, wobei diese allerdings weniger intensiv als die Oxidationen studiert worden sind. An diesen reduktiven Metabolisierungen sind eine Vielzahl von Enzymen beteiligt, die wiederum im ER, in den Mitochondrien und auch im Cytoplasma lokalisiert sein können [Testa, 1995; Bonse und Metzler, 1978]. Daneben können auch die Darmbakterien der Darmflora passierende Xenobiotika reduzieren [Hewick, 1982; Forth *et al.*, 1998].

Die im Organismus ablaufenden reduktiven Biotransformationsvorgänge benötigen meistens einen Elektronendonator wie NADH, NADPH, FAD oder FMN und bestimmte Sauerstoffbedingungen. Viele Reduktionen an stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen konnten nur *in vitro* unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden, wodurch sich die Frage nach der *in vivo* Relevanz stellt. Die meisten Organe werden über den Blutkreislauf ausreichend mit Sauerstoff versorgt, und besonders in der Leber als recht gut durchblutetem Organ wird sich kaum ein anaerobes Milieu ergeben.

Eine gute Zusammenfassung der einzelnen Reduktionen und ihrer entsprechenden Mechanismen findet sich bei Testa [1995].

1.2 BEDEUTUNG DES CYTOCHROM P450-ENZYSYSTEMS

1.2.1 Grundlagen und Vorkommen

Schon 1783 wurde mit dem Pepsin, einem proteinabbauenden Enzym des Magensaftes, eines der ersten Enzyme entdeckt. Selbstverständlich hatte man damals noch keine Vorstellung vom chemischen Aufbau und der Bedeutung von Enzymen [Baldwin, 1968]. Die Bezeichnung „Enzym“, was wörtlich übersetzt „in der Hefe“ heißt, wurde 1897 von den deutschen Chemiker-Brüdern Buchner geprägt, als sie die Entdeckung machten, dass Rohrzucker durch eine aus lebenden Hefezellen gewonnene Substanz zu gären begann. Diese zuckerfermentierende Substanz wurde von ihnen Enzym genannt [Baldwin, 1968].

Im Laufe der Jahrzehnte hat man inzwischen durch zahlreiche Studien mehr als 1000 verschiedene Enzyme bestimmen und charakterisieren können, wobei bei sehr vielen die Aminosäuresequenz und teilweise sogar die räumliche Struktur bekannt sind [Karlson *et al.*, 1994]. Zu den wohl am intensivsten untersuchten Enzymen gehört das Cytochrom P450 Enzymsystem [Ruckpaul, 1993]. Cytochrom P450 Enzyme sind Hämoproteine, die in fast allen lebenden Organismen zu finden sind wie z.B. in Bakterien, Hefen, Pflanzen und Tieren – lediglich in Würmern konnten sie noch nicht entdeckt werden [Testa, 1995]. Bei Säugetieren gibt es in fast allen Organen und Geweben P450 Enzyme, wobei die Enzyme entweder am ER gebunden oder in den Mitochondrien vorliegen, sodass sie in fast allen Membranen und Zellen lokalisiert sind [Testa, 1995]. Es gibt auch lösliche Cytochrom P450 Enzyme im Cytosol, die in niederen Organismen entdeckt worden sind [Testa, 1995].

Die Cytochrom P450 Enzyme sind Monooxygenasen, d.h. sie fügen einzelne Sauerstoffatome in verschiedene Substrate ein. Dabei wird aus molekularem Sauerstoff ein Sauerstoffatom in das jeweilige Substrat eingebaut und ein Sauerstoffatom zu Wasser reduziert [Ortiz de Montellano, 1982]. Unter bestimmten Voraussetzungen

kann Cytochrom P450 aber auch die in Abbildung 1-2 skizzierte Funktion einer Oxidase oder Peroxidase zeigen [Guengerich, 1991].

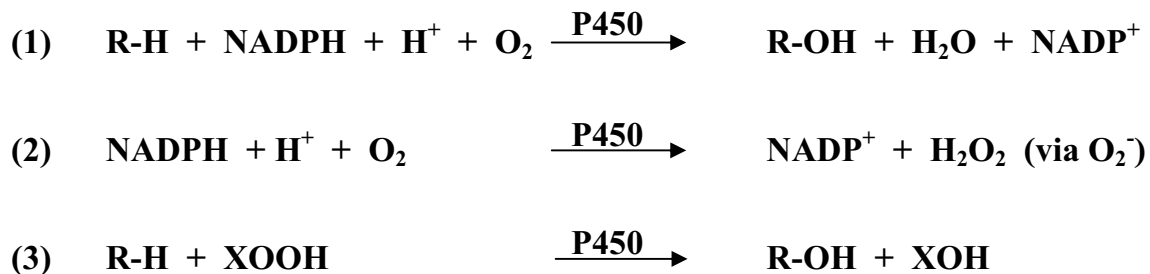
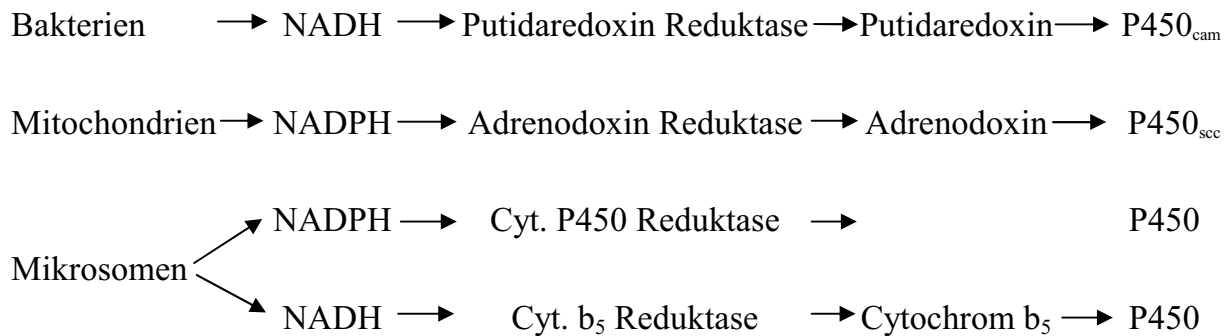


Abb. 1-2: Mögliche durch Cytochrom P450 katalysierte Reaktionen nach Ortiz de Montellano [1982] und Guengerich [1991]. Cytochrom P450 Enzyme können als (1) Monooxygenase, (2) Oxidase sowie als (3) Peroxidase fungieren. R, Substrat.

Da Cytochrom P450 Enzyme nur Ein-Elektronenakzeptoren darstellen, die Cosubstrate NADH und NADPH aber zwei Elektronen liefern, wird die Hilfe eines weiteren Enzyms als Übermittler benötigt, das die Elektronen sequentiell überträgt. Im Regelfall wird diese Funktion von der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase, einem Flavoprotein, das je ein Molekül FAD und FMN als prosthetische Gruppe enthält, übernommen [Testa, 1995]. Es ist aber auch möglich, dass im Falle einer Bereitstellung über NADH beide Elektronen [Ingelman-Sundberg und Johansson, 1984; Yamazaki *et al.*, 1996] oder nur ein Elektron über die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und Cytochrom b_5 übertragen werden [Hildebrandt und Estabrook, 1971]. Die folgende Tabelle 1-2 gibt eine Übersicht über die Elektronenübertragungswege in verschiedenen Cytochrom P450 Systemen.

Tab. 1-2: Elektronenübertragungswege in verschiedenen P450 Systemen [Lewis, 1996]. Cyt., Cytochrom.



Cytochrom P450 Enzyme bestehen aus einem Apoprotein und einem Häm-Rest als prosthetische Gruppe. Bei dem Häm-Rest handelt es sich um ein Porphyrin-Ringsystem (Eisen-Protoporphyrin IX) mit Eisen als Zentralatom, an dem der mit dem Elektronentransfer verbundene Valenzwechsel stattfindet. Diesen Porphyrin-Rest findet man nicht nur bei Cytochrom P450 Enzymen sondern auch bei Hämoglobin, Myoglobin, Katalase und vielen Peroxidasen [Testa, 1995]. Die Struktur der prosthetischen Häm-Gruppe ist in Abbildung 1-3 dargestellt.

Das Eisen besitzt als Liganden in waagerechter Ebene vier Stickstoffatome aus Pyrrol-Ringen und axial zwei weitere Liganden. Der fünfte Ligand X ist eine Thiolat-Gruppe eines Cysteins am Carboxylende des Proteins und der sechste Ligand Y kann variieren und z.B. durch Sauerstoff, Kohlenmonoxid, Stickstoffmonoxid oder ein Wassermolekül belegt sein [Testa, 1995]. Die prosthetische Gruppe ist durch hydrophobe Wechselwirkungen sowie die koordinative Bindung des Schwefelliganden der Cystein-Seitenkette mit dem Apoprotein verbunden. Dieser an der fünften Koordinationsstelle des Eisens bindende Schwefelligand ist für die katalytischen und spektralphotometrischen Eigenschaften verantwortlich. Das bei 450 nm auftretende Absorptionsmaximum des P450-Fe(II)-CO-Komplexes, das auch zur quantitativen

Bestimmung von Cytochrom P450-haltigen Enzympräparationen verwendet werden kann, gab dem Enzymsystem seinen Namen [Forth *et al.*, 1998].

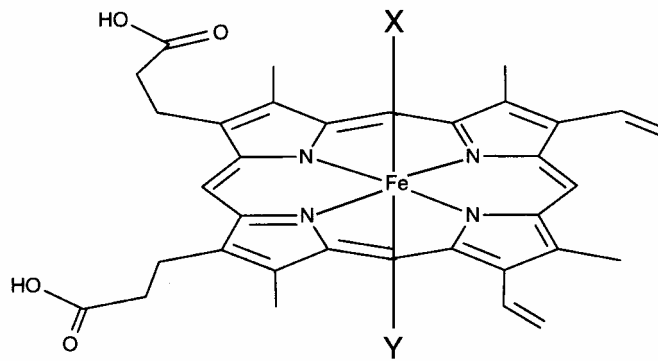


Abb. 1-3: Eisen-Protoporphyrin IX, prosthetische Gruppe des Cytochrom P450.

Während das Porphyringerüst bei allen Cytochrom P450 Enzymen identisch ist, variiert der Proteinanteil bei den verschiedenen Isoenzymen und ist für die unterschiedlichen Eigenschaften wie z.B. die Substrat- und Produktspezifität, das Molekulargewicht, das von 45-60 kDa differieren kann, und die Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren verantwortlich [Testa, 1995]. Die katalytische Aktivität eines Isoenzymen kann sich bereits durch die Variation einer einzigen von insgesamt etwa 500 Aminosäuren verändern. Dies wurde an der „Coumarin-7-Hydroxylase“ gezeigt, die durch eine differierende Aminosäure zur „Testosteron-15 α -Hydroxylase“ wurde [Lindberg und Negishi, 1989].

Im Allgemeinen besitzen Cytochrom P450 Isoenzyme jedoch keine hohe Substratspezifität. Besonders ausgeprägt findet man dieses Phänomen in der Leber, wo sich dadurch der Vorteil ergibt, dass auch Xenobiotika, zu denen die Leber vorher keinen Kontakt hatte, metabolisiert und ausgeschieden werden können [Bonse und Metzler, 1978].

Die an das ER gebundenen Cytochrom P450 Enzyme sind durch hydrophobe Segmente in der Phospholipiddoppelmembran verankert, wobei die großen hydrophilen Bereiche vom Cytosol frei zugänglich bleiben, an denen die katalytischen Reaktionen ablaufen können. Das Cytochrom P450 liegt membrandeckend auf dem ER, wobei das Häm-Gerüst parallel zur Membranoberseite und die Substratbindungsstelle unterhalb des Häm und zur Membran hin lokalisiert ist [Testa, 1995].

Im Laufe der Evolution hat sich dieses Enzymsystem derart weiterentwickelt, dass eine aus zahlreichen verschiedenen Familien und Unterfamilien bestehende Superfamilie entstanden ist [Forth *et al.*, 1998]. Zur Unterscheidung der einzelnen P450 Enzyme schreibt die Nomenklatur die genaue Kennzeichnung der Enzyme vor. Familien werden durch arabische Ziffern gekennzeichnet, Unterfamilien durch Großbuchstaben und die einzelnen Isoenzyme wiederum durch eine arabische Ziffer, z.B. CYP1A2 (1 = Familie, A = Unterfamilie, 2 = Isoenzym). Enzyme einer Familie besitzen eine mindestens 40 %ige Homologie und einer Unterfamilie eine mindestens 59 %ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz [Nelson *et al.*, 1996]. Zurzeit werden 30 Familien unterschieden, von denen 10 bei Säugetieren vorkommen [Forth *et al.*, 1998]. Diese Familien beinhalten wiederum 18 Unterfamilien, wobei 16 von ihnen im humanen Genom erfasst wurden [Nebert *et al.*, 1991]. In Tabelle 1-3 findet man eine Übersicht über die vier hauptsächlich am Arzneistoffmetabolismus beteiligten Familien einschließlich der von ihnen umgesetzten Substrate.

Cytochrom P450 Enzyme können in ihrer Expression sehr stark variieren, da sie von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, zu denen auch Enzyminduktion und Enzyminhibition gehören. Eine Enzyminduktion liegt vor, wenn Xenobiotika eine vermehrte Bildung von an der Biotransformation beteiligten Enzymen verursachen. Als Folge ist die absolute Aktivität und dadurch die Biotransformationsrate erhöht, was nicht nur die induzierenden sondern auch andere Arzneistoffe betrifft [Mutschler, 1996]. Von allen Substanzen, die von dem entsprechenden Enzym abgebaut werden, verkürzt sich dadurch die Plasmahalbwertszeit und damit die Wirkdauer.

Es gibt aber auch zahlreiche Arzneistoffe, die über eine Enzyminhibition Biotransformationsprozesse hemmen können, sodass eine Wirkungsverlängerung und –steigerung anderer Substanzen resultieren kann. Eine solche Inhibition kann durch eine Minderung der Synthese, durch einen verstärkten Abbau von Enzymen oder durch die Konkurrenz zweier oder mehrerer Pharmaka um die Bindungsstelle eines Enzyms erfolgen [Mutschler, 1996]. Einige Beispiele bekannter Cytochrom P450-Inhibitoren und –Induktoren sind ebenfalls in Tabelle 1-3 aufgeführt.

Des Weiteren ist bei den Isoenzymen CYP 2D6 und CYP 2C19 das Auftreten eines genetischen Polymorphismus bekannt [Park *et al.*, 1995]. Polymorphismus bezeichnet das Phänomen, dass ein oder mehrere Isoenzyme interindividuell sehr stark variieren können, was von einer verstärkten Expression bis zu einem absoluten Fehlen eines Isoenzym führen kann. Schätzungsweise 40 % des Arzneistoffmetabolismus, der durch Cytochrom P450 katalysiert wird, wird durch polymorphe Enzyme durchgeführt, sodass folglich sowohl viel höhere als auch völlig fehlende Wirkstoffspiegel resultieren könne [Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999].

Tab. 1-3: Übersicht über die wichtigsten humanen Cytochrom P450 Familien modifiziert nach Park *et al.* [1995]. PAK, Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe.

Familie	Unterfamilie	Isoenzym	Substrate	Induktoren	Inhibitoren
CYP 1	CYP 1A	CYP 1A1	Benzo[a]pyren	PAK	Furafyllin
		CYP 1A2	Coffein		Enoxan
CYP 2	CYP 2A	CYP 2A6	Cumarin		
		CYP 2A7			
	CYP 2B	CYP 2B6	Cyclophosphamid	Phenobarbital	
		CYP 2B7			
	CYP 2C	CYP 2C8	Tolbutamid	Rifampicin	Sulfaphenazol
		CYP 2C9	S-Warfarin		
		CYP 2C18	Mephenytoin		
	CYP 2C19				
	CYP 2D	CYP 2D6	Metoprolol		Chinidin
	CYP 2E	CYP2E1	Ethanol	Ethanol	
CYP 3	CYP 3A	CYP 3A3	Nifedipin	Rifampicin	Ketoconazol
		CYP 3A4	Cyclosporin	Phenytoin	Makrolide
		CYP 3A5	Testosteron	Carbamazepin	
CYP 4	CYP 4B	CYP 4B1	Testosteron	Clofibrat	

1.2.2 Reaktionen und Mechanismen

Der Mechanismus einer durch das Cytochrom P450 Enzymsystem katalysierten oxidativen Substratumwandlung ist in Abbildung 1-4 wiedergegeben. Zunächst wird das Substrat an eine Substratbindungsstelle in der hydrophoben Tasche in der Nähe des aktiven Zentrums an das Apoprotein gebunden (1). Dabei wechselt Fe (III) vom *low spin* in den *high spin* Zustand, wodurch der Ligand in der sechste Koordinationsstelle des Hämeisens verdrängt wird.

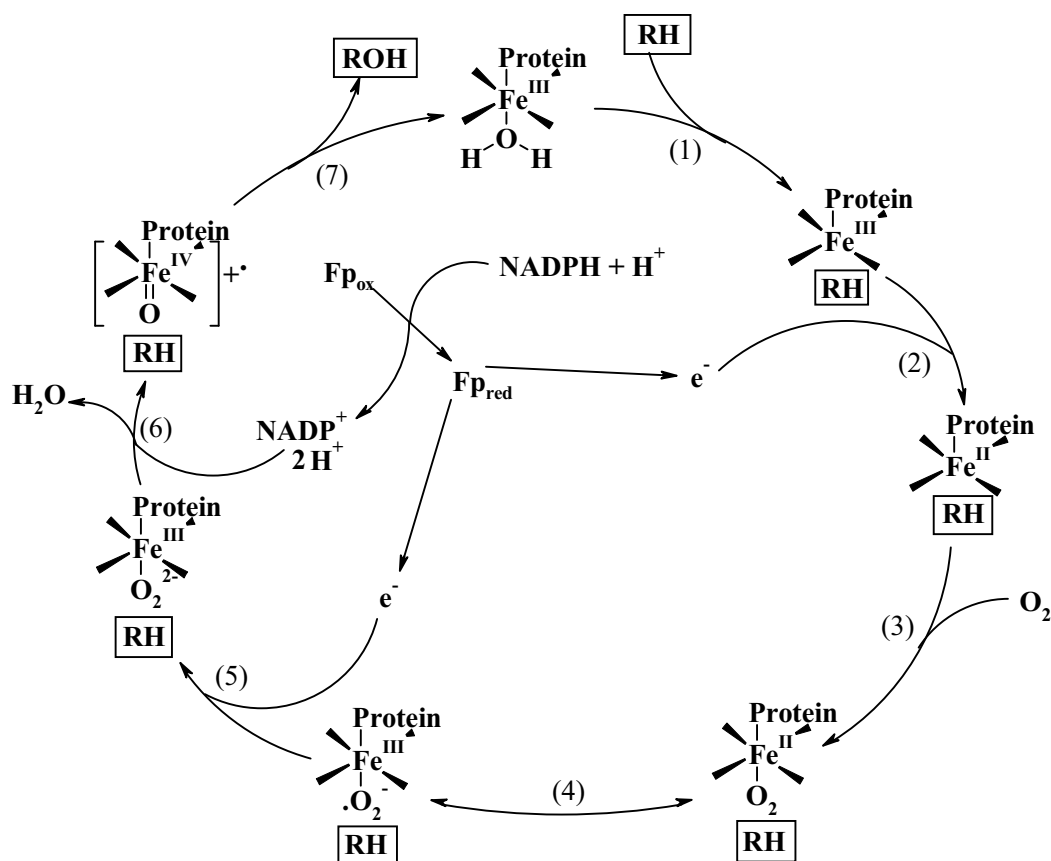


Abb. 1-4: Katalytischer Zyklus der oxidativen Substratumsetzung durch Cytochrom P450 modifiziert nach Coon *et al.* [1992]. Fe, Hämeisen im katalytischen Zentrum; RH, Substrat; ROH, Produkt; Fp, NADPH-Cytochrom P450 Reduktase. Weitere Erläuterungen sind im Text aufgeführt.

Der *high spin* Zustand bedingt daneben ein höheres Redoxpotential, sodass sich das Enzym schneller reduzieren lässt als im *low spin* Zustand. Nun folgt der erste Reduktionsschritt (2), in dem ein Elektron vom NADPH (bzw. NADH) über die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase übermittelt wird. Dabei wird das Fe (III) zu Fe (II) reduziert. Das zweiwertige Eisen ist im dritten Schritt (3) in der Lage, molekularen Sauerstoff anzulagern, da dieser eine hohe Affinität zum reduzierten Cytochrom P450 besitzt. Der Sauerstoff kann in diesem Zustand auch ein Elektron vom zentralen Eisenatom übernehmen (4), sodass dieses wieder dreiwertig vorliegt. Im Anschluss erfolgt der zweite Reduktionsschritt, bei dem wieder ein Elektron von der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase aufgenommen wird (5). Durch zwei Protonen des oxidierten Flavoproteins (NADP^+) kommt es zur Spaltung des Sauerstoffs, worauf Wasser abgespalten wird (6) und ein sehr reaktiver Oxokomplex entsteht. Dieser überträgt das reaktive Sauerstoffatom auf das Substrat. Im letzten Schritt (7) wird das hydroxylierte Substrat abgespalten und das Cytochrom P450 Enzymsystem steht erneut für einen neuen katalytischen Zyklus zur Verfügung. Die genaue Struktur des reaktiven Oxokomplexes ist noch umstritten, von den meisten Autoren wird heute eine Oxo-ferryl-porphyrin $^{\pi}$ -Kationen-Radikalstruktur als die sauerstoffübertragende Form angesehen [Ruckpaul, 1993].

1.3 EINSATZ VON AMIDINEN UND AMIDOXIMEN

1.3.1 Therapeutische Bedeutung

Zahlreiche im Handel oder noch in klinischer Erprobung befindliche Arzneistoffe besitzen Amidinfunktionen. Eine Einteilung dieser Strukturen kann aufgrund ihrer Basizität erfolgen, die auf der einen Seite die stark basischen Amidine wie die Modellsubstanz Benzamidin mit einem pK_a -Wert von 11,6 [Albert *et al.*, 1948] ergibt,

und auf der anderen Seite die schwächer basischen Amidine, bei denen der pK_a -Wert durch Einbindung in aromatische Systeme oder das Tragen aromatischer Reste herabgesetzt wird. Trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten werden die Amidine therapeutisch in sehr unterschiedlichen Indikationsgebieten eingesetzt.

Dabei kann die Amidinstruktur in ein Ringsystem eingebunden sein, wie z.B. in einen Imidazol-Ring wie beim Antimykotikum Clotrimazol oder in Pyrimidin- bzw. Pyrazin-Ringstrukturen wie bei den Diuretika Triamteren und Amilorid oder auch als vinyloge Struktur vorliegen, wie z.B. bei den Antimalariamitteln Chloroquin und Primaquin oder dem Cholinergikum Tacrin.

Daneben können Amidinstrukturen auch in nichtaromatischen Ringsystemen auftreten, wie beim α -Antagonisten Tolazolin, der eine solche in einem Imidazolidin-Ring aufweist. Einige Arzneistoffe besitzen die Amidinfunktion außerhalb des aromatischen Ringsystems. Dabei kann man zwischen zwei Varianten unterscheiden, nämlich den unsubstituierten wie z.B. den beiden trypanozid und leishmanizid wirkenden Diamidinen Diminazen und Pentamidin und den substituierten Vertretern wie dem H_2 -Rezeptor-Antagonisten Mifentidin, dem Anthelmentikum Pyrantel und dem Benzodiazepin Chlordiazepoxid.

Auch im Bereich der Thrombininhibitoren bzw. Thrombozytenaggregationsinhibitoren werden stark basische Amidine eingesetzt [[Wagner et al., 1984](#)].

Neuere Entwicklungen zielen auf den Einsatz von Amidoximen als Prodrugs für Amidine. Aufgrund ihrer starken Basizität können Probleme bei der oralen Resorption von Amidinen auftreten, da sie unter physiologischen Bedingungen meist protoniert vorliegen und in dieser Form nur sehr schlecht über den Gastrointestinaltrakt resorbiert werden können. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Resorptionsrate besteht in der Hydroxylierung der Amidinfunktion, wodurch Amidoxime entstehen. Diese zeichnen sich durch eine geringere Basizität aus, sodass sie unter physiologischen Bedingungen nicht protoniert sondern als freie Base vorliegen. Beispielsweise besitzt Benzamidoxim einen pK_a -Wert von 4,82 gegenüber dem pK_a -Wert von Benzamidin von 11,6 [[Albert et al., 1948](#)]. Daher lässt sich durch Einsatz der entsprechenden Amidoxime die orale

Bioverfügbarkeit von Amidinen erhöhen. Entwickelt wurde das Prodrug-Prinzip für Pentamidin [Clement et al., 1992], einer Substanz, die neben Cotrimoxazol als Mittel der Wahl bei der Behandlung von durch *Pneumocystis carinii* hervorgerufener Lungenentzündung besonders bei AIDS-Patienten eingesetzt wird. Entwickelt wurde es ursprünglich als Trypanosomenmittel.

Pentamidin kann als Pentamidin-Diisethionat (Pentacarinat[®]) inhalativ oder intravenös, aber aufgrund seiner hohen Basizität nicht oral angewendet werden. Das Monoamidoxim und das Diamidoxim des Pentamidins sind dagegen schwächer basisch, sodass die orale Resorption steigt, jedoch sind beide Verbindungen zu polar, um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [Rieckert, 1999]. Durch eine zusätzliche Veresterung des Diamidoxims konnte mit dem nun vorliegenden Pentoximester (siehe Abb. 1-5) ein gut resorbierbares und wirksames Prodrug geschaffen werden [Clement, 1993]. Voraussetzung war die *in vivo* Esterspaltung und Reduktion, da nur das Pentamidin selbst eine Wirkung zeigte.

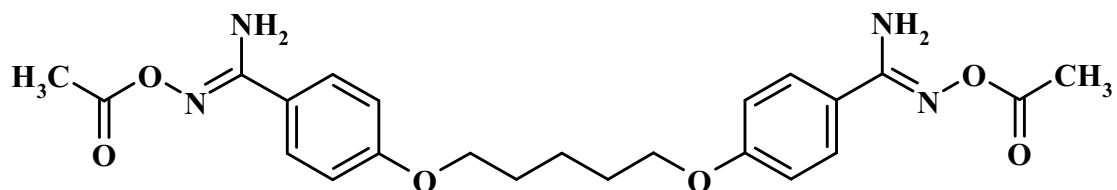


Abb. 1-5: Pentoximester = 1,5-Bis(4'-acetoxamidinophenoxy)pentan.

Inzwischen ist das Prodrug-Prinzip aber auch auf andere Wirkstoffe übertragen worden. So wird es bei Thrombininhibitoren und Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten angewandt, die zur Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Ereignisse eingesetzt werden. Diese GPIIb/IIIa-Rezeptoren sind auf den Thrombozyten in großer Anzahl lokalisiert und werden als Reaktion auf ein Gefäßtrauma aktiviert, worauf sie Brücken zwischen den Thrombozyten ausbilden, sodass daraus letztendlich

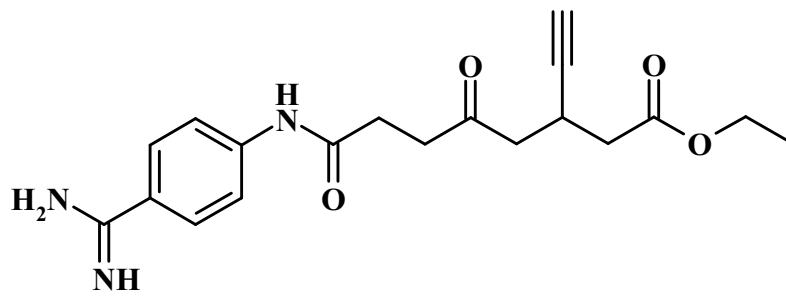
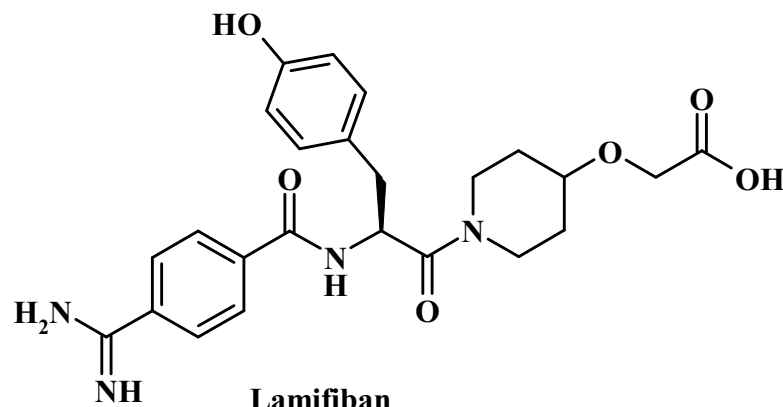
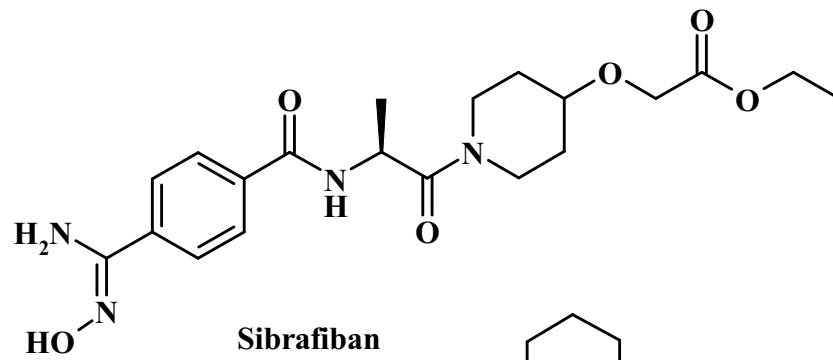
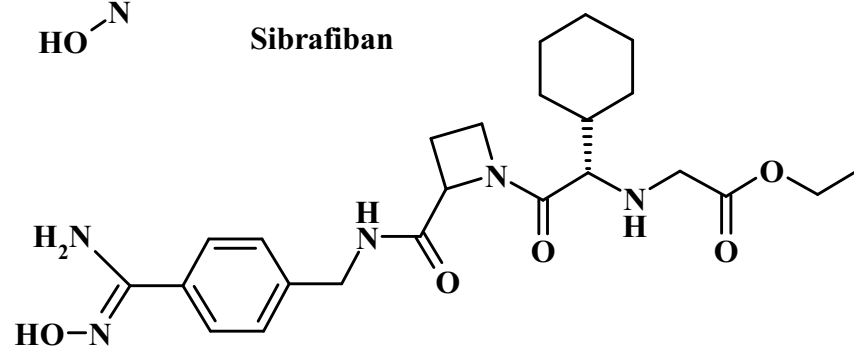
ein Thrombus entstehen kann. Waren die ersten Vertreter der GPIIb/IIIa-Rezeptoren Antagonisten wie Abciximab (Reopro[®]), Tirofiban (Aggrastat[®]) [Haas, 1999] und Eptifibatid (Integrilin[®]) nur parenteral zu verabreichen, so hat man inzwischen auch oral verfügbare Substanzen entwickeln können wie Xemilofiban und Orbofiban. Xemilofiban hat jedoch in den Phase III-Studien wegen seiner unzureichenden Wirkdauer (EXCITE-Studie) versagt, und auch Orbofiban stellte sich in der OPUS-Studie als zu kurz wirksam heraus [Kereiakes *et al.*, 1998].

Durch Hydroxylierung der Amidinfunktion der GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten zum Amidoxim kann bei vorher nicht oder nur unzureichend oral verfügbaren Vertretern die Resorption und damit die Bioverfügbarkeit erhöht werden. Studien mit dem injizierbaren Fibrinogen-Rezeptor Antagonisten Lamifiban zeigten eine deutlich erhöhte orale Bioverfügbarkeit des entsprechenden Amidoxims [Weller *et al.*, 1996]. Geringfügige strukturelle Veränderungen führten zu einem Amidoxim mit zusätzlicher Veresterung der Säurefunktion, dem Sibrafiban (Ro 48-3657). Hiermit hatte man ein Doppel-Prodrug geschaffen, das *in vivo* über Esterspaltung zum Amidoxim Ro 48-3656 und über eine anschließende Dehydroxylierung zum wirksamen Amidin Ro 44-3888 umgewandelt werden konnte. Letztendlich hatte man mit Sibrafiban die orale Verfügbarkeit im Vergleich zur Wirkform Ro 44-3888 um das 20fache erhöhen können, wodurch sich eine relative orale Bioverfügbarkeit der Wirkform von 25-33 % ergab [Weller *et al.*, 1996; Brickl *et al.*, 1997; Wittke *et al.*, 1999]. Besonders hervorzuheben sind die sehr gute Verträglichkeit der Amidoxime, gleichbleibende pharmakokinetische Eigenschaften und das Fehlen von interindividuellen Schwankungen in der Reduktion [Wittke *et al.*, 1999]. In der kürzlich durchgeführten SYMPHONY-Studie zeigte Sibrafiban bei zweimal täglicher oraler Verabreichung jedoch trotz der guten Prognosen keine signifikanten Vorteile zur üblichen Therapie mit Acetylsalicylsäure [Newby, 2000]. Es ist von daher zu vermuten, dass die oralen GPIIb/IIIa-Rezeptoren-Antagonisten nicht weiterentwickelt werden.

Ganz anders sieht die Situation bei den oralen Thrombininhibitoren aus [Hauptmann, 2002], bei denen für die Wirkung essentielle Amidinfunktionen gleichermaßen durch Amidoxime ersetzt worden sind und somit ebenfalls das Prodrug-

Konzept Amidoxime anstelle von Amidinen übertragen worden ist [Lopian und Clement, 2001]. Kurz vor der Zulassung steht Ximelagatran, das Prodrug von Melagatran. Auch hier zeigte sich keine Toxizität, erhöhte Bioverfügbarkeit und keine individuellen Schwankungen bei dieser Bioverfügbarkeit [Gustafsson *et al.*, 2001]. Die folgende Übersicht (Abb. 1-6) zeigt einige im Text erwähnte Amidine bzw. Amidoxime.

Während bei den verschiedenen Sibrafiban- und Ximelagatran-Metaboliten nur die Endmetaboliten pharmakologische Wirkungen im Körper zeigen, gibt es auch Prodrugs, bei denen sowohl die *N*-hydroxylierte Form als auch die Ausgangsverbindung eine Wirkung im Organismus haben könnten. Ein Beispiel dafür sind das Amidinohydrazon (Aminoguanidin) Guanoxabenz und das *N*-dehydroxylierte Derivat Guanabenz [Richter *et al.*, 1993]. Beide Substanzen sind antihypertensiv wirksame zentrale α_2 -Adrenozeptoragonisten, die beide auch zur Blutdrucksenkung zugelassen wurden, da sie eine vergleichbare pharmakologische Aktivität aufwiesen [Doxey und Hersom, 1980]. Es wurden jedoch Überlegungen angestellt, ob Guanoxabenz nicht eher ein Prodrug von Guanabenz darstellt, da letzteres eine deutlich höhere Affinität zu den α_2 -Reptoren bei Ratten aufwies [Fluck *et al.*, 1983] und Guanoxabenz enzymatisch zum Amidinohydrazon reduziert werden kann [Demesmaeker, 1996]. Die Strukturformeln dieser beiden Verbindungen sind in Kapitel 1.3.2 aufgeführt.

**Xenilofiban****Lamifiban****Sibrafiban****Ximelagatran****Abb. 1-6: Übersicht über einige im Text erwähnte Amidine bzw. Amidoxime.**

1.3.2 Bisherige Untersuchungen

Wie schon in vorherigen Kapiteln (siehe 1.1.3 und 1.3.1) angesprochen, sind bereits einige Untersuchungen mit Amidinen und Amidoximen durchgeführt worden. Es wurden neben der *N*-Hydroxylierung von Amidinen zu Amidoximen auch die von ähnlichen basischen Stickstofffunktionen wie Guanidinen und Amidinohydrazonen zu ihren *N*-hydroxylierten Derivaten erforscht [Clement, 1998]. Außerdem konnte die *N*-Dehydroxylierung von verschiedenen *N*-hydroxylierten funktionellen Gruppen in diversen Spezies bewiesen werden [Clement *et al.*, 1988a; 1996; 1997]. Weiterführende Studien mit humanen und Schweinemikrosomen sowie den daraus gereinigten Enzymen klärten die Beteiligung der entsprechenden Enzyme auf [Lomb, 1995; Demesmaeker, 1996; Möller, 1997; Behrens, 1999; Rieckert, 1999; Karhan, 2002]. Neben den *in vitro*-Studien konnte von Clement *et al.* [1993b] die *in vivo*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin nachgewiesen werden. In weiteren *in vivo*-Studien ließ sich die Reduktion des Diamidoxims und des Monoamidoxims vom Pentamidin in Ratten zeigen [Clement *et al.*, 1992], in *in vitro*-Studien auch für Kaninchen- und humane Mikrosomen [Clement und Jung, 1994].

Anhand der in den oben aufgeführten Studien gemachten Beobachtungen konnte für Benzamidin im Kaninchen eine durch Cytochrom P450C3 katalysierte *N*-Hydroxylierung zu Benzamidoxim [Clement *et al.*, 1993b] und eine ebenfalls durch ein Cytochrom P450 Isoenzym katalysierte *N*-Dehydroxylierung bestätigt werden. Diese Reduktion wurde beim Schwein durch ein Isoenzym der Unterfamilie 2D und beim Menschen durch CYP2A6 katalysiert [Lomb, 1995; Behrens, 1999; Rieckert, 1999]. Die beiden Reaktionen sind in Abbildung 1-7 dargestellt.

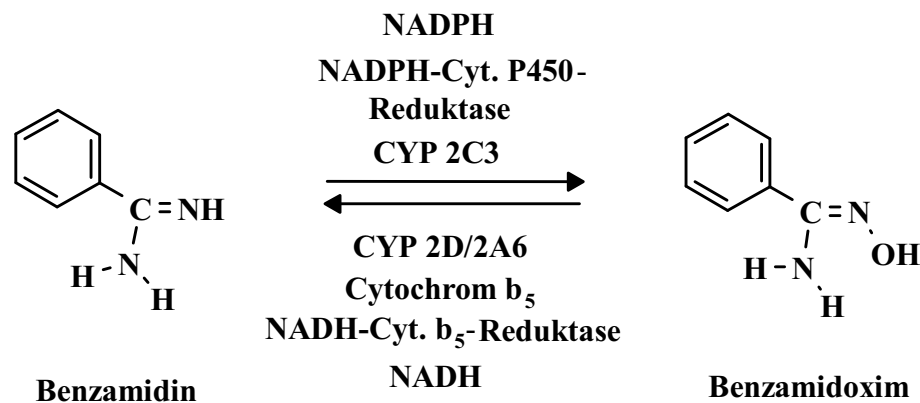


Abb. 1-7: N-Hydroxylierung von Benzamidin und N-Dehydroxylierung von Benzamidoxim durch Cytochrom P450 [Clement *et al.*, 1993b; Lomb, 1995; Behrens, 1999; Rieckert, 1999].

Für Guanoxabenz und Guanabenz konnten ebenfalls die erforderlichen Enzyme für die N-Hydroxylierung und die N-Dehydroxylierung festgestellt werden. Demesmaeker [1996] konnte die Katalyse der N-Hydroxylierung durch CYP1A2 verschiedener Spezies belegen, und Karhan [2002] die Reduktion durch humanes CYP2A6, während beim Schwein wiederum CYP2D involviert war [Lomb, 1995]. In Abbildung 1-8 sind die beiden Reaktionen beschrieben. Wie bereits bei der Oxidation und Reduktion von Benzamidoxim und Benzamidin sind auch hier verschiedene Elektronenüberträger beteiligt.

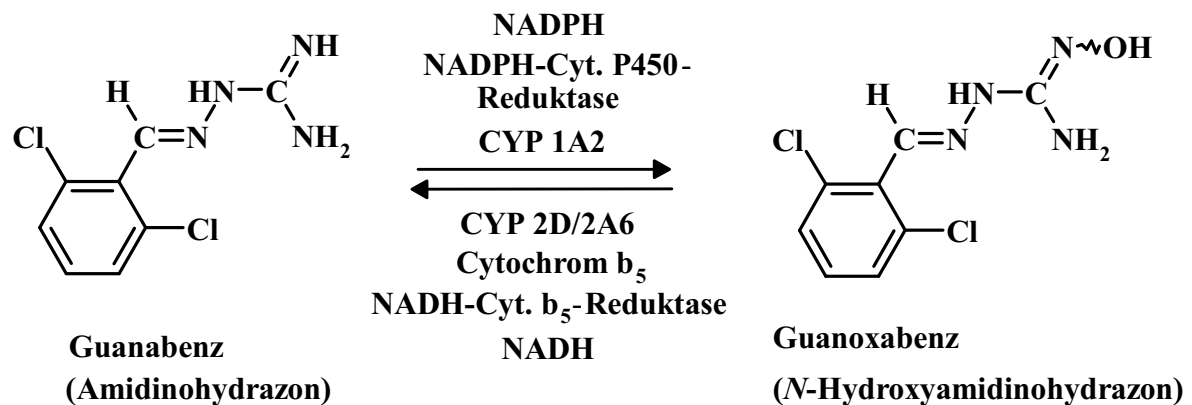


Abb. 1-8: N-Hydroxylierung von Guanabenz und N-Dehydroxylierung von Guanoxabenz durch Cytochrom P450 [Lomb, 1995; Demesmaeker, 1996; Karhan, 2002].

Daneben konnte auch für die N-Hydroxylierung von Debrisoquin eine Beteiligung von Cytochrom P4502C3 [Clement *et al.*, 1993a] und für die N-Dehydroxylierung die Katalyse durch ein Cytochrom P450 Isoenzym der Unterfamilie 2D belegt werden [Lomb, 1995].

In weiteren Studien konnten auch die entsprechenden Reaktionen beim Pentamidin geklärt werden. Die N-Hydroxylierung des Diamidins und Monoamidoxims vom Pentamidin erfolgt durch die Katalyse von CYP2C3 beim Kaninchen und verschiedenen Isoenzymen beim Menschen [Clement und Jung, 1994; Siebe, 1998], während die N-Dehydroxylierung beim Menschen durch CYP2A6 katalysiert wird [Rieckert, 1999]. In allen hier erwähnten Studien sind entweder Zellfraktionen aus der Leber oder aus ihr gereinigte Enzyme der jeweiligen Spezies eingesetzt worden, sodass noch keine Daten zu extrahepatischen Umsetzungen von Amidinen oder Amidoximen vorlagen.

1.4 EXTRAHEPATISCHE BIOTRANSFORMATION

Da Menschen und Tiere dem Einfluss von Xenobiotika und Umweltschadstoffen ausgesetzt sind, müssen sie diese durch Metabolismus entgiften und ausscheiden. Im Allgemeinen werden die verschiedenen Substanzen durch Biotransformation detoxifiziert, indem sie zu hydrophilen Metaboliten umformuliert werden, die als solche wieder ausgeschieden werden können. Ohne Zweifel ist die Leber das Organ, in dem der Hauptteil der *in vivo* ablaufenden Metabolisierungen stattfindet. Zu erkennen ist dies an am häufigsten in der Leber auftretenden Schäden und Ablagerungen, die durch Einwirkung von Umwelteinflüssen oder toxikologisch bedenklichen Stoffen hervorgerufen werden. Trotzdem darf die Bedeutung des extrahepatischen Metabolismus nicht unterschätzt werden [Forth *et al.*, 1998]. Dieser wird immer häufiger zum Ziel der Forschung, nicht nur wegen der Bedeutung als Zielorgan für pharmakologische Ansätze sondern auch bezüglich der Toxizität, die im Zielorgan ausgelöst werden kann [Kawajiri und Fuji-Kuriyama, 1991]. Es ist also wichtig, mehr über die Fähigkeiten der einzelnen Organe und Gewebe, Xenobiotika zu metabolisieren, durch gezielte Studien zu erfahren. Auch die dabei ablaufenden Mechanismen, die sich von denen, die in der Leber stattfinden und bereits gründlich erforscht sind, eventuell gravierend unterscheiden können, sind von großer Bedeutung.

Im Gegensatz zu den Hepatozyten findet man in extrahepatischen Organen die Phase 1-Enzyme meist nur in bestimmten Zelltypen, die nur einen geringen Prozentsatz des Gesamtorgans ausmachen, wie z.B. in den Clara- und Typ-II-Zellen der Lunge oder dem S₃-Segment im proximalen Tubulus der Niere [Forth *et al.*, 1998]. Die Phase 2-Enzyme sind dagegen extrahepatisch weit verbreitet und können auch dort ähnlich hohe Aktivitäten wie in der Leber zeigen. Besonderes Augenmerk sollte bei der Betrachtung der extrahepatischen Biotransformation auf Organe und Gewebe gerichtet werden, die besonders hohen Konzentrationen an potentiell toxischen Verbindungen ausgeliefert sind, wie den Atmungsapparat, die Niere und den Verdauungstrakt, über

die Fremdstoffe aufgenommen oder abgegeben werden können, und die besonders empfindlichen Bereiche wie z.B. das Gehirn.

Der Gehalt an P450 Enzymen in der Lunge ist von großer Bedeutung, weil dieses Organ eine Eintrittsmöglichkeit in den Körper für viele Chemikalien und Karzinogene bieten kann. Zudem verursachen viele toxische oder karzinogene Substanzen Lungenschäden, ganz gleich, wie sie in den Körper gelangt sind. Um also die Entstehung und Entwicklung von beispielsweise Lungenkrebs zu verstehen, ist es nötig, die Verteilung von Enzymen, die Substanzen zu Karzinogenen aktivieren können, sowohl im betroffenen Organ wie hier in der Lunge als auch in stark metabolisierenden Organen wie der Leber zu kennen. Die Erforschung des pulmonalen P450 Gehalts gestaltet sich relativ schwierig, da im Vergleich zur Leber nur eine geringe Menge exprimiert wird. Die Kaninchenlunge ist im Gegensatz zur humanen relativ gut untersucht und ihr P450 Gehalt, der im Vergleich zu anderen Spezies eine vergleichbar hohe Konzentration aufweist, durch verschiedenste Studien bekannt [Imaoka und Funae, 1990]. Die bezüglich des P450 Gehalts am besten untersuchte Art ist aber sicherlich die Ratte, bei der in der Lunge die Isoenzyme CYP1A2, 2B1, 2A3 und 3A nachgewiesen werden konnten, wobei auch die Präsenz von CYP2F vermutet wird [Imaoka und Funae, 1990; Shimada *et al.*, 1992]. Die verschiedenen P450 Isoenzyme CYP1A1, 2A6, 2C, 2E1 und 3A wurden bisher in der humanen Lunge gefunden, wobei sicherlich CYP1A1 die größte Bedeutung zukommt [Shimada *et al.*, 1996]. Dieses Isoenzym ist für die Bioaktivierung von Prokarzinogenen verantwortlich, die dann als Karzinogene zur Entstehung von Lungenkrebs führen können.

Die Niere spielt für den Körper eine entscheidende Rolle als Ausscheidungsorgan. Fremdstoffe sowie endogene Verbindungen gelangen über die Blutbahn in die feinen Kapillaren der Bowmannschen Kapsel, die Kontakt zu den Nephronen haben, von denen die menschliche Niere etwa 1 bis 1,2 Millionen besitzt [Thews *et al.*, 1999]. Dort findet neben der Harnbildung die glomeruläre Filtration statt, bei der nur Teilchen

mit einem kleineren Molekülradius als 4,5 nm durchgelassen werden. Zudem laufen hier auch aktive Resorptions- und Sekretionsprozesse ab. Es ist aber auch bekannt, dass der Niere eine nicht unwesentliche Bedeutung in der Biotransformation zukommt, da sich in ihr zahlreiche Enzyme finden, die vielleicht auch für den Fremdstoffwechsel relevant sein könnten. Es konnten in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Arten wie Kaninchen, Ratte und Mensch die Isoenzyme CYP1A1, 1A2, 2, 3A3, 3A4, 3A5, 4A1, 4A2 (Ratte), 4A3, 4A5/ 4A6/ 4A7 (Kaninchen) und 4A11 nachgewiesen werden [Schuetz *et al.*, 1992; Haehner *et al.*, 1996; Lohr *et al.*, 1998]. Es gibt jedoch zahlreiche Differenzen zwischen den verschiedenen Spezies. So findet man CYP2B1 und CYP2B2 zwar bei Kaninchen und Hamstern, nicht jedoch bei Mäusen und Ratten [Lock und Reed, 1998]. In der Maus hat man stattdessen P450 Enzyme der Unterfamilie 2A nachweisen können [Koskela *et al.*, 1999]. Es gibt aber auch innerhalb der einzelnen Arten Unterschiede im P450 Muster. So beobachtet man bei Ratten bei männlichen und weiblichen Tieren unterschiedliche Ausprägungen von Isoenzymen, z.B. besitzt das Männchen neben einer ausgeprägteren Stoffwechselaktivität einen deutlich höheren Gehalt an CYP2E1 [Lock und Reed, 1998]. CYP2E1 ist ein Isoenzym, das dagegen in der humanen Niere nach Amet *et al.* [1997] nicht exprimiert wird.

Einige Isoenzyme werden in der Niere sogar in höheren Konzentrationen nachgewiesen als in der Leber. Beispielsweise wird bei der P450 Unterfamilie 3A in der Niere zu 75 % das Isoenzym 3A5 ausgebildet und in der Leber zu 75 % 3A4 [Haehner *et al.*, 1996]. Zwei wichtige Enzyme des Vitamin D₃-Stoffwechsels hat man ebenfalls in der Niere detektieren können, die 25-Hydroxyvitamin D₃ 1- α -Hydroxylase und die Vitamin D₃ 25-Hydroxylase [Bergman und Postlind, 1990; Axén, 1995]. In anschließenden Studien haben Axén *et al.* [1992; 1998] beide Enzyme auch in der Leber nachweisen können, wobei besonders die 1- α -Hydroxylase-Aktivität in der Niere dominiert. Der allgemeine P450 Gehalt in der humanen Niere wird von ihm mit 0,042 nmol / mg Protein beschrieben. Auch das Vorkommen von P450 in der Niere von Schwein und Minischwein wird in der Literatur angeführt [Imaoka *et al.*, 1990; Lock und Reed, 1998]. Generell sind die P450 Enzyme in der Niere mit der höchsten

Konzentration im Cortex (Nierenrinde) lokalisiert, wobei man auch mittlere Anteile in der inneren Medulla (inneres Nierenmark) und geringe Anteile in der äußeren Medulla (äußeres Nierenmark) nachweisen konnte [Lohr *et al.*, 1998].

Der Darm spielt als Hauptresorptionsort für sämtliche oral aufgenommenen Substanzen ebenfalls eine entscheidende Rolle bezüglich des extrahepatischen Metabolismus. Ihn müssen sämtliche Nahrungsbestandteile und Xenobiotika passieren, bevor sie bzw. während sie resorbiert werden. Im humanen Darm [Prueksaritanont *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999] und im Schweinedarm [Nissen *et al.*, 1998] wird die Präsenz verschiedener P450 Isoenzyme beschrieben, wobei in letzterem das Auftreten von Isoenzymen der Unterfamilien 2C und 3A nachgewiesen wurde. Im Vergleich zum Schwein ist der humane Darm bereits intensiver untersucht worden, sodass man hier neben Isoenzymen der Unterfamilien 2C (2C9, 2C19) und 3A (3A3, 3A4) [Kolars *et al.*, 1994; Obach *et al.*, 2001] auch 1A1, 1A2 und 2D6 gefunden hat [Prueksaritanont *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999]. Sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte wird CYP3A als das im Darm dominierende P450 Enzym beschrieben, das z.B. für den Metabolismus von Ethoxycumarin oder Loperamid verantwortlich ist [Watkins, 1992]. Gerade das von Zhang *et al.* [1999] beschriebene beträchtliche Vorkommen von CYP3A4 kann dazu führen, dass Arzneistoffe, die oral appliziert wurden, bereits an dieser Stelle metabolisiert und ausgeschieden werden, sodass sie die Leber kaum oder nicht mehr passieren. Lu *et al.* [1998] berichtet beispielsweise vom Metabolismus von Cimetidin im Darm. So kann der extrahepatische Metabolismus das Phänomen erklären, dass die *in vivo* zu beobachtende Clearance ($Cl_{\text{int in vivo}}$) meistens größer als die aus *in vitro* Daten ermittelte intrinsische hepatische Clearance ($Cl_{\text{int in vitro}}$) ist [Iwatsubo *et al.*, 1997].

Auch Darmbakterien können einen gewissen Anteil zur Biotransformation beisteuern. Aufgrund der vorherrschenden anaeroben Bedingungen sind dies besonders Reduktionen, aber es wird auch von Konjugatsspaltungen durch β -Glucuronidasen und Sulfatasen berichtet [Forth *et al.*, 1998].

Das Gehirn ist gegenüber toxischen Verbindungen aufgrund der stark limitierten Regenerationsfähigkeit der Neuronen sehr empfindlich, wodurch hier auftretende Einwirkungen zu schwerwiegenden und teilweise irreparablen Schädigungen und Komplikationen führen können. Zum Schutz gegen ungehinderten Stoffaustausch zwischen Blut und Hirngewebe existiert die sogenannte Blut-Hirn-Schranke. Diese Barriere bildet sich dadurch, dass die Kapillaren im kritischen Bereich von Endothelzellen ummantelt sind, die wiederum von *tight junctions* zusammengehalten werden, sodass sich eine lückenlose Schicht ergibt [Forth *et al.*, 1998].

Trotz dieser schützenden Barriere können einige Xenobiotika, die einen entsprechend lipophilen Charakter besitzen, durch die Epithelzellen diffundieren und neuronale Zellen erreichen. So können Schadstoffe oder auch Wirkstoffe zu toxikologisch signifikanten Veränderungen im Hirnbereich führen. Der Organismus besitzt aber auch die Möglichkeit, Substanzen, die durch ihren lipophilen Charakter durch die Blut-Hirn-Schranke gelangt sind, durch Metabolismus zu verändern. Das kann eine Verringerung der Toxizität, aber auch der Wirksamkeit eines Arzneistoffes bedeuten. Für solche chemischen Veränderungen benötigt das Gehirn bestimmte Enzyme, die zu solchen Reaktionen fähig sind, sowie die entsprechenden essentiellen Cofaktoren. Wie in anderen extrahepatischen Geweben wird diese Metabolisierung von Xenobiotika im Gehirn vornehmlich durch Cytochrom P450 Enzyme oder flavinhaltige Monooxygenasen (FMO) durchgeführt. Da aber die Konzentrationen solcher Enzyme im Vergleich zu anderen Organen im Gehirn gering sind, erweist sich die quantitative Messung von Cytochrom P450 als schwierig. Der prozentuale Gehalt an P450 im Rattenhirn beträgt etwa 2,5-4 % des spezifischen Cytochrom P450 Gehalts der Leber, beim Menschen liegt der Anteil in ähnlicher Größenordnung [Gherzi-Egea *et al.*, 1993]. Das entspricht bei der Ratte ungefähr 25-40 pmol/mg Protein [Ravindranath und Boyd, 1995] und beim Menschen 30-170 pmol/mg Protein [Bhamre, *et al.*, 1992; Ravindranath, *et al.*, 1995] für die gesamte Hirnmasse. In den im Hirnbereich lokalisierten Mitochondrien findet man etwa neunmal höhere P450 Werte als in den Hirnmikrosomen [Gherzi-Egea, *et al.*, 1993]. Man hat auch deutliche Schwankungen innerhalb der einzelnen Hirnregionen beobachtet [Bhamre, *et al.*, 1992]. So findet man

beispielsweise im Stammhirn oder im Cerebellum höhere Konzentrationen an P450, sodass in diesen Bereichen sehr wohl ein Metabolismus von Xenobiotika möglich scheint. Diese Bereiche dürften eine bedeutende Rolle in der pharmakologischen Aktivierung von Arzneistoffen oder auch der Biotransformation von Umweltgiften, die das Nervensystem angreifen könnten, spielen [Ravindranath, *et al.*, 1989].

Des Weiteren wurden von Strömstedt *et al.* [1993] im Rattenhirn auch Enzyme gefunden wie z.B. die 3 β -Adiolhydroxylase, die neben dem Hirn auch in der Prostata vorkommt, jedoch weder in Leber noch in Niere nachweisbar waren.

Eine Übersicht über die bei verschiedenen Spezies in unterschiedlichen Organen nachgewiesenen P450 Enzym Gehälter gibt die Tabelle 1-4. Anhand dieser Tabelle und der im Text aufgeführten Fakten wird die mögliche Relevanz des extrahepatischen Metabolismus verdeutlicht. In allen aufgeführten Organen sind Enzyme beschrieben worden, bei denen neben dem Metabolismus von endogenen Substanzen auch der von Xenobiotika denkbar wäre. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass neben der Leber auch in anderen Organen ein nicht unbedeutender Anteil am Fremdstoffmetabolismus abläuft.

Tab. 1-4: Cytochrom P450 Gehalt in verschiedenen Organen unterschiedlicher Spezies. Alle Gehaltsangaben sind in nmol/mg mikrosomales Protein angegeben;

¹, nach Amet et al.[1997]; ², nach Bhamre *et al.* [1992]; ³, nach Ghersi-Egea *et al.* [1987]; ⁴, nach Imaoka und Funae [1990]; ⁵, nach Iwatsubo *et al.* [1997]; ⁶, nach Lohr *et al.* [1998]; ⁷, nach Park *et al.* [1995]; ⁸, nach Ravindranath *et al.* [1995]; ⁹, nach Rosenberg [1991]; ¹⁰, nach Shimada *et al.* [1992]; ¹¹, nach Shimada *et al.* [1996]; ¹², nach Vainio und Hietanen [1980]; ¹³, nach Zhang *et al.* [1999]; -, Keine Daten verfügbar.

	Tierart				
	Ratte	Maus	Kaninchen	Meer- schweinchen	Mensch
Leber	0,83 ⁹ 0,22-0,92 ¹²	0,39-1,10 ¹²	0,81-1,70 ¹²	0,43-1,45 ¹²	0,32 ⁵ 0,26-1,02 ¹²
Niere	0,07-0,14 ⁶ 0,05-0,21 ¹²	0,40 ¹²	0,1-0,18 ⁶ 0,14-0,36 ¹²	0,13 ⁶ 0,32 ¹²	0,042 ¹ 0,03 ¹²
Lunge	0,023 ⁴ 0,035 ¹²	-	0,27-0,38 ¹²	0,07 ¹²	0,01 ^{10,11}
Dünndarm	0,09 ⁹ 0,02-0,13 ¹²	0,04 ¹²	0,07-0,43 ¹²	0,18 ¹²	0,06-0,18 ¹³
Hirn	0,1 ² 0,06 ³	0,04 ²	-	-	0,03-0,17 ² 0,05-0,1 ⁷ 0,03-0,12 ⁸

2 GEWINNUNG MIKROSOMALER FRAKTIONEN AUS VERSCHIEDENEN ORGANEN

2.1 EINLEITUNG

2.1.1 Bedeutung der Organverteilung

Metabolismvorgänge, d.h. die Umwandlung von Xenobiotika in hydrophilere Verbindungen, die leichter vom Körper ausgeschieden werden können, finden sowohl in der Leber als auch in anderen Organen statt [Mutschler, 1996]. Ohne Zweifel ist die Leber das Organ, in dem der Großteil der *in vivo* ablaufenden Metabolisierungen stattfindet, aber auch in anderen Organen findet man entsprechende Aktivitäten. Seit man diese Entdeckung gemacht hat wird dem extrahepatischen Metabolismus zunehmend mehr Bedeutung beigemessen, und er wird immer häufiger zum Ziel verschiedener Forschungsarbeiten [Krishna und Klotz, 1994; Guengerich, 1995; Pelkonen und Raunio, 1997]. Aufgrund der pharmakologischen Bedeutung und der im Zielorgan auslösbaren Toxizität ist es wichtig, mehr über die Fähigkeiten der einzelnen Organe und Gewebe, Xenobiotika und auch endogene Substanzen zu metabolisieren, durch gezielte Studien zu erfahren.

Gerade für die Arzneimitteltherapie ist die Organverteilung von Enzymen von großer Relevanz. Nach der Resorption kann ein Arzneistoff zum Teil schon bei der ersten Leberpassage umgewandelt werden oder sich zuerst über die Blutbahn verteilen, um anschließend in den entsprechenden Organen durch dort vorhandene Enzyme metabolisiert zu werden. Selbstverständlich kann bei beiden Alternativen zwischenzeitlich auch eine Speicherung stattfinden, wodurch Wirkung und Ausscheidung verlängert werden können. Diese möglichen Wege sind in Abbildung 2-1 skizziert.

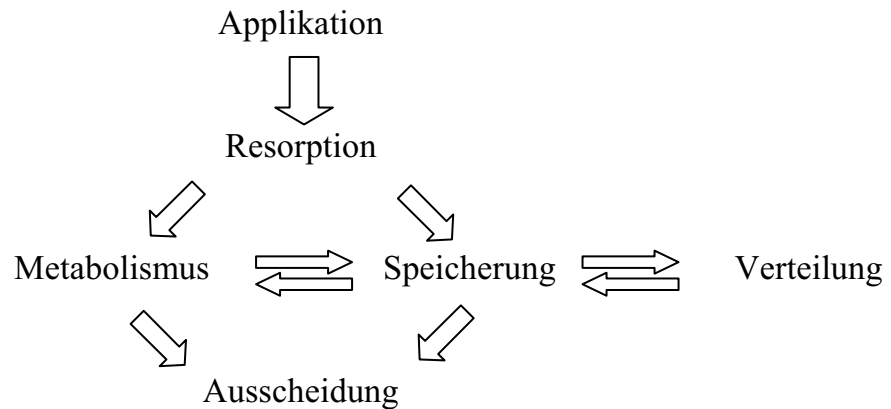


Abb. 2-1: Mögliche Wege eines Arzneistoffes im Körper von der Applikation zur Ausscheidung.

Entscheidend für die Wirksamkeit eines Arzneistoffes ist dabei, ob die applizierte Substanz die Wirkform ist, oder ob ein Prodrug verabreicht wurde, welches im Organismus erst zur eigentlichen Wirkform umgewandelt werden muß. Im ersten Fall würde ein stark ausgeprägter Metabolismus zur Minimierung der Wirksubstanz und damit auch des erwünschten Effektes führen, sodass eine Bioinaktivierung stattfindet. Im zweiten Fall würde die Wirkform überall dort gebildet werden, wo sich die entsprechenden Enzyme befinden, sodass die Wirkung eines Arzneistoffes mit der Organverteilung eines Enzyms korreliert werden könnte (Bioaktivierung).

Das Vorkommen eines aktivierenden Enzyms kann aber auch zu unerwünschten Effekten führen, die dann in Organen auftreten, in denen man eigentlich keine Wirkung beabsichtigt. Zudem kann die Konzentration eines Wirkstoffes im eigentlichen Zielorgan dadurch reduziert werden, dass andere Organe die gleichen für eine Aktivierung benötigten Enzyme besitzen und den Arzneistoff derart metabolisieren, dass er im anderen Organ verbleibt und dort seine Wirkung zeigt.

Eine verminderte Resorption und Bioverfügbarkeit kann auch dadurch entstehen, dass Enzyme im Gastrointestinaltrakt vorkommen, die passierende Xenobiotika durch Biotransformation zu hydrophileren Verbindungen metabolisieren, so dass diese vom Körper nicht mehr aufgenommen werden können und ausgeschieden werden. In

diesem Fall wäre die Anwesenheit solcher Enzyme unter pharmakologischen Aspekten von Nachteil. Wenn man sich allerdings die toxikologische Relevanz vor Augen führt, erscheint eine solche Biotransformation von enormem Vorteil, da sich der Körper so vor der Resorption potentiell toxischer oder kanzerogener Schadstoffe zu schützen vermag. Eine Expression von Enzymen im Gehirn, die Prodrugs in einer Bioaktivierung zum eigentlichen Wirkstoff metabolisieren, könnte interessante Ansätze bezüglich einer Wirkung hinter der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen.

Die Cytochrom P450 Enzymfamilie ist beispielsweise für sehr viele solcher Biotransformationsvorgänge sowohl von körpereigenen Substanzen als auch von Xenobiotika verantwortlich. Die höchsten Konzentrationen treten in der Leber, dem Organ, in dem der Hauptteil aller Metabolismusvorgänge abläuft, auf, aber auch in anderen Organen und Geweben lassen sich teilweise recht ansehnliche Vorkommen nachweisen (siehe hierzu Kapitel 1.4, S. 28 ff.). Generell findet man die P450 Enzyme in allen Säugetieren, wo sie in fast allen bisher untersuchten Organen und Geweben nachgewiesen wurden [Testa, 1995], und auch in anderen Tierarten wie beispielsweise in Amphibien treten sie in verschiedenen Organen auf [Schuetz *et al.*, 1992].

Dabei gibt es zwischen den verschiedenen Spezies und auch innerhalb einer Spezies relativ große Schwankungen in Qualität und Quantität der verschiedenen P450 Isoenzyme. Sie können selbst bei verschiedenen Individuen einer Art unterschiedlich stark ausgeprägt sein, da die Expression der einzelnen Isoenzyme durch endogene und exogene Faktoren beeinflusst werden kann. Beispiele dafür sind in Kapitel 1.2 aufgeführt. Die Literatur beschreibt das Vorkommen von Cytochrom P450 in allen zu untersuchenden Organen [Guengerich, 1995], aber es wird auch berichtet, dass Gehalt und Aktivität im Laufe von Aufarbeitung und Gewinnung verloren gehen können [Ravindranath und Anandatheerthavarada, 1990; Pearce *et al.*, 1996].

2.1.2 Unterschiede und Gemeinsamkeiten der untersuchten Organe

Die in dieser Arbeit untersuchten Organe stammten entweder aus dem Hausschwein (*sus scrofa domestica*) oder aus dem Menschen. Die gegenwärtig in Deutschland gehaltenen Schweinerassen entstammen vornehmlich von dem mitteleuropäischen Wildschwein (*sus scrofa scrofa*) und dem asiatischen Bindenschwein (*sus scrofa vittatus*) ab. Zur Zeit sind insgesamt etwa 90 verschiedene Rassen bekannt. Die Züchter haben die Rassen den gängigen Ernährungsgewohnheiten und Bedürfnissen angepasst und dem Schwein sogar vier zusätzliche Rippen angezüchtet, so dass es jetzt 16 anstelle wie das Wildschwein 12 Rippen besitzt [Mitteilung des Westfälisch-Lippischen Landwirtschaftsverbandes e.V.].

Neben der Haltung als Fleischlieferant, was sicherlich den Großteil der Nutzung ausmacht, werden Schweine für die Produktion von Arzneistoffen wie z.B. früher für Insulin genutzt, die Schweinehaut für die Ledergewinnung verwendet und die Borsten für die Produktion von Pinseln und Bürsten eingesetzt. Die zum Verzehr geschlachteten Tiere sind entweder Mutterschweine (Sauen), Ferkel oder kastrierte Tiere (Börger). Die männlichen Tiere, die Eber, haben durch die vielen Geschlechtshormone ein nicht besonders gut schmeckendes Fleisch und werden aus diesem Grund nicht gegessen [Mitteilung des Westfälisch-Lippischen Landwirtschaftsverbandes e.V.]. Daher stammen die in dieser Arbeit untersuchten porcinen Organe, die aus einem Schlachtbetrieb erworben wurden, auch nicht von Ebern. Gewebespezifische oder enzymatische Besonderheiten, die sich durch hohe Konzentrationen an männlichen Geschlechtshormonen ergeben könnten, müssen daher bei der Diskussion der Ergebnisse in dieser Arbeit nicht in Betracht gezogen werden. Vom Menschen sind Organe beider Geschlechter gewonnen worden.

Die Leber stellt das zentrale Stoffwechselorgan für den Organismus dar und ist zudem noch für die Bildung und Ausscheidung der Galle verantwortlich. Beim erwachsenen Menschen ist sie in 2 Lappen geteilt und umfasst ein Gewicht von ca. 1,5 kg

[Mutschler, 1996]. Das ausgewachsene Schwein hat je nach Alter und Ernährungsstatus eine Leber von 1-2,5 kg, was ungefähr 1,7 % der Körpermasse entspricht, wobei die porcine Leber in 4 Hauptlappen geteilt ist [Mornet *et al.*, 1989]. Da die zu schlachtenden Tiere meist ausreichend ausgewachsen und gut ernährt sind, ergibt sich bei der Schweineleber eine größere Masse als bei der des Menschen. Hinzu kommt, dass von der humanen Leber immer nur Anteile erhalten und verarbeitet wurden und nie die gesamte Leber, so dass die Differenz zwischen den anfangs für die Mikrosomengewinnung eingesetzten Lebermengen recht groß war.

Die Aufgabe der Niere besteht darin, die Homöostase des Volumens der Körperflüssigkeiten zu erhalten und nichtflüchtige organische Verbindungen und anorganische Salze auszuscheiden. Außerdem nimmt die Niere am Intermediärstoffwechsel von Aminosäuren und Kohlenhydraten aktiv teil und produziert verschiedene Hormone [Karlson *et al.*, 1994].

Vergleicht man die Nieren der beiden untersuchten Spezies Mensch und Schwein miteinander, so ergeben sich sehr ähnliche Mengen und Verhältnisse. Aber auch hier wurden vom Schwein bei jeder Gewinnung ganze Organe verwendet, wohingegen von der humanen Niere stets nur Anteile eingesetzt werden konnten. Die humane Niere ist mit 240-400 g [Thews *et al.*, 1999] für das Nierenpaar größer als die porcine, die eine Masse von 200-280 g [Mornet *et al.*, 1989] umfasst. Auch die Durchblutung der Niere ist beim Menschen mit 1.700 l/24 h [Thews *et al.*, 1999] deutlich höher als beim Schwein mit 1.000 l/24 h [Loeffler, 1994]. Die humanen Nieren werden also innerhalb von 24 h stärker durchblutet als die porcinen, was den Schluss zulassen könnte, dass hier eine größere Aktivität vorliegt und eine stärkere Aufkonzentrierung stattfindet. Tatsächlich beträgt die ausgeschiedene Menge an Harn beim Menschen etwa 1,5-3 l/24 h und beim Schwein dagegen mit 2-6 l/24 h [Loeffler, 1994] das doppelte Volumen. Bei so unterschiedlichen Ausscheidungsmengen können selbstverständlich auch Xenobiotika in den beiden Spezies unterschiedlich schnell ausgeschieden werden, wobei jetzt noch nicht die Differenzen in der Enzymexpression berücksichtigt wurden. Das Nervensystem inklusive des Gehirns dient dem Organismus zur Aufnahme und Verarbeitung von umweltbedingten oder im Körper entstehenden Reizen und der

Koordination und Steuerung der Körperfunktionen. Das humane Gehirn hat ein Gesamtgewicht von 1330 g [Mutschler, 1996]. Das porcine Gehirn ist dagegen mit 140-175 g, entsprechend etwa 0,1 % des Körpergewichtes [Mornet *et al.*, 1989], viel kleiner. Wegen der deutlich geringeren Masse und der beim Schwein geringeren Gehirnleistungen als beim Menschen, lassen sich auch Unterschiede im Stoffwechsel von Xenobiotika vermuten. Beide Spezies besitzen aber zum Schutz des Gehirns die sogenannte Blut-Hirn-Schranke, eine Permeabilitätsbarriere zwischen Blutplasma und Gehirn. Die Hirnkapillaren sind dicht von Gliazellen umgeben, die zusätzlich durch tight junctions miteinander verbunden sind. Zusätzlich findet man hier Transporterproteine, die Material aus dem Gehirn ins Blut befördern können, und Enzyme, die neuroaktive Substanzen metabolisieren können. Es wird vermutet, dass viele Enzyme zwischen Blut und Gehirn lokalisiert sind und so als enzymatische Barriere zum Schutz vor Chemikalien und Arzneistoffen fungieren [Gherzi-Egea *et al.*, 1994]. Diese Blut-Hirn-Schranke baut sich bei allen Säugern in den ersten Lebenswochen auf [Frey, 1996]. Für kleine Moleküle ist eine Passage dieser Barriere durch Poren wie an der Zellmembran möglich. Ansonsten kann sie durch passive Diffusion überwunden werden, wenn die Substanzen lipophil genug sind, oder mittels aktiven carriervermittelten Transportes, wie z.B. für Glucose, Aminosäuren und einige saure Arzneimittel [Frey, 1996].

Die Funktion der Lunge liegt in der Aufnahme von Sauerstoff und der Abgabe von Kohlendioxid. Sowohl Schwein als auch Mensch haben je zwei Lungenflügel, die wiederum durch Einschnitte in Lungenlappen geteilt sind. Die sich ergebende Kontaktfläche zur Außenwelt wird durch die Ausbildung der vielen Lungenbläschen, der Alveolen, beim Menschen auf 80 m² erhöht [Mutschler, 1996]. Beim Schwein ergibt sich bei einer Lungengröße von 1,6-2 kg, einer Masse, die ca. 0,7 % des Gesamtkörpergewichtes entspricht, eine Alveolaroberfläche von etwa 100 m² [Mornet *et al.*, 1989; Loeffler, 1994]. Bei beiden Spezies liegt in der Lunge durch die große Oberfläche und die gute Durchblutung der Alveolen eine sehr gute Resorptionskapazität vor, sodass es dementsprechend zu einem schnellen Wirkungseintritt von eingeatmeten Arzneistoffen kommen kann.

Die Lunge des Schweins unterscheidet sich zudem von der anderer Tierarten durch einen höheren Prozentsatz von 20 % mit Myoepithelien ausgestatteter Kapillaren, besonders in den Herz- und Spitzlappen der Lunge, die wenig mit Gefäßen versorgt sind [Mornet *et al.*, 1989]. Dadurch reagiert das Schwein empfindlicher auf Erreger oder Ursachen von Atemwegserkrankungen oder Schadgase wie beispielsweise Ammoniak.

Der überwiegende Anteil der Resorption oral aufgenommener Stoffe erfolgt im Darm, da er eine große Oberfläche besitzt und die Arzneistoffe während der Darmpassage dort sehr lange verweilen. Die Aufnahme aus dem Darm erfolgt durch Diffusion ungeladener, lipophiler Stoffe oder durch aktiven Transport, wie z.B. bei den Herzglykosiden. Auch Säuren und Basen werden resorbiert, wenn es sich um schwache Säuren bzw. schwache Basen handelt [Frey, 1996]. Zudem wird bei gleichem pKa-Wert die Substanz schneller resorbiert, die lipophiler ist.

Der Darm lässt sich in zwei große Segmente einteilen: den Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum) und den Dickdarm (Caecum, Kolon und Rektum). Der Dünndarm ist für die Verdauung und Resorption von Nahrungsbestandteilen von Bedeutung. Der Dickdarm dient lediglich der Eindickung des Darminhaltes. Beim Menschen ist der Dünndarm etwa 3,75 m lang, wobei sich durch Schleimhautfalten, Zotten und Mikrovilli die Oberfläche 600fach auf 200 m² vergrößert [Thews *et al.*, 1999]. Beim Schwein findet man dagegen mit einer Dünndarmlänge von 18-20 m und einer vergleichbaren Oberflächenvergrößerung eine viel größere Gesamtoberfläche [Mornet *et al.*, 1989]. Der im Darm vorherrschende pH-Wert liegt bei beiden Spezies im leicht sauren bis neutralen Bereich, und wird ab und an von kurzen Säurephasen unterbrochen, die mit den Entleerungen des sauren Mageninhaltes korrelieren [Mornet *et al.*, 1989]. In diesem Punkt unterscheiden sich die beiden Spezies also nicht voneinander. Da der Dünndarm, wie schon aufgeführt, das Hauptorgan für die Resorption oral aufgenommener Nahrungsbestandteile und Xenobiotika darstellt, ist die Oberfläche jedoch für die Aufnahme und Wirksamkeit von Arzneistoffen von großer Relevanz.

Das Schwein wurde aus verschiedenen Gründen als Organlieferant gewählt. Zum einen ist es über den lokalen Schlachthof bzw. private Schlachtbetriebe leicht zugänglich und zum anderen ist es dem Menschen in vielem sehr ähnlich. Durch die größere Verwandtschaft zwischen Schwein und Mensch als beispielsweise zu Ratten, Mäusen oder Kaninchen, lassen sich Schweine auch eher als Modelltiere einsetzen. So eignen sich Ferkel sehr gut als Versuchsmodell für die Kinderheilkunde [Mornet *et al.*, 1989]. Das Verhältnis der Hirnmasse zur Körpermasse ist zum Geburtszeitpunkt optimal und ähnelt der Gehirnentwicklung beim menschlichen Neugeborenen. Vergleichende Studien 24 h nach der Geburt zeigen ähnliche pH-Werte und ähnliche Mineralstoff-Werte bei beiden Spezies. Als weiteren Vorteil bietet das Schwein durch seine Größe und die pro Organ erhaltenen Mengen gute Ausbeuten bei der Mikrosomengewinnung. Eine Schweineleber von 3000 g entspricht etwa 30 Kaninchenlebern, 400 Rattenlebern oder 2000 Mäuselebern [Lustig, 1991].

Diese Ähnlichkeiten beziehen sich aber auch auf den Stoffwechsel und damit auf die Expression und Aktivität von Enzymen [Clement, 1998]. Das Schwein ist wie der Mensch ein Allesfresser, wobei beide für die Verdauung und den Stoffwechsel ähnliche Enzyme benötigen. So zeigen Schwein wie Mensch beim Phase 2-Metabolismus eher eine Konjugation mit Glucuronsäure als mit Sulfaten oder Phosphaten [Mornet *et al.*, 1989]. Auch Anzenbacher *et al.* [1998] schreiben dem Schwein einen dem Menschen ähnlichen Stoffwechsel mit vergleichbarem Metabolismus zu, der aber wegen des aufwendigen Handlings und der hohen Kosten bei Studien mit dem Schwein selten Beachtung findet.

Wenn man die aufgeführten Fakten zusammenfasst, scheint das Schwein für diese Arbeit gut geeignet zu sein. Aufgrund der Übereinstimmungen und Ähnlichkeiten lassen sich eher Vergleiche anstellen und Rückschlüsse von den porcinen Ergebnissen auf humane Organe ziehen, als beispielsweise bei Ratten oder Kaninchen, die meist für Metabolismusstudien verwendet werden.

2.1.3 Bisherige Untersuchungen

Die Reduktion von verschiedenen *N*-hydroxylierten Verbindungen ist bereits in diversen Spezies untersucht worden, wobei die für diese Untersuchungen eingesetzten Mikrosomen bisher immer aus der Leber von Ratte, Kaninchen, Schwein oder Mensch gewonnen worden waren [Clement, 1998]. Andere Organe wurden bezüglich ihrer Reduktionsfähigkeit gegenüber *N*-hydroxylierten Verbindungen noch nicht untersucht. Die Literatur beschreibt Möglichkeiten zur Mikrosomengewinnung aus Organen wie Niere, Gehirn oder Darm [Axén, 1995; Zhang *et al.*, 1999; Ravindranath und Anandatheerthavarada, 1990], wonach die Mikrosomen für die Umsetzung mit anderen Substraten oder zur anschließenden Enzymreinigung verwendet wurden. Da diese Arbeiten aber immer mit einem anderen Ziel durchgeführt wurden, sind die Bedingungen bei der Mikrosomengewinnung meist auf das entsprechende Enzym oder Enzymsystem optimiert, sodass es für unsere Zwecke nicht ohne weiteres übernommen werden kann. Daher wurde als Grundlage die in unserem Arbeitskreis etablierte Lebermikrosomengewinnung genommen, die dann für jedes Organ angepasst und optimiert wurde. Ein entsprechendes Vorgehen wird auch von Lustig [1991] beschrieben, der die Präparation von Schweinelungenmikrosomen zur Gewinnung der FMO auf die der Schweinelebermikrosomen aufbaute.

Erste Anhaltspunkte zur Organverteilung konnten aus einer inzwischen bereits abgeschlossenen Arbeit gewonnen werden, in der die Verteilung eines Arzneistoffes in verschiedenen Organen nach oraler Applikation untersucht wurde [Rieckert, 1999]. Durch diese *in vivo*-Studien mit Ratten zeigte sich bereits das Ausmaß der Resorption und die Verteilung von Pentamidin in den Organen nach oraler Gabe eines Pentamidinesters. Dieser Ester musste im Körper zunächst zwei Esterspaltungen durchlaufen, worauf sich eine Amidoximstruktur ergab. Um zum wirksamen Endprodukt, dem Pentamidin, zu gelangen, musste sich nun noch eine *N*-Reduktion anschließen. Dieser letzte Reaktionsschritt, die *N*-Reduktion vom Amidoxim zum

Amidin, konnte entweder in der Leber ablaufen, worauf der wirksame Metabolit über die Blutbahn zum Organ gelangt ist, oder erst im entsprechenden Organ selbst. Wo diese *N*-Reduktion genau stattfindet, wurde bisher noch nicht untersucht, lediglich in welchen Organen sich der wirksame Metabolit Pentamidin nach einer gewissen Zeit nachweisen läßt [Rieckert, 1999].

In Tabelle 2-1 sieht man die relative Wiederfindung und die relative orale Bioverfügbarkeit in Prozent zusammengefasst, die in dieser Arbeit erhalten wurden [Rieckert, 1999]. In allen in dieser Arbeit betrachteten Organen, mit Ausnahme des Gehirns, in dem eventuell die doch vorliegende Pentamidinkonzentration unter der Nachweisgrenze lag, konnte Pentamidin als Metabolit nachgewiesen werden.

Tab. 2-1: Relative Wiederfindung und relative Bioverfügbarkeit von Pentamidin nach oraler Pentoximestergabe in den untersuchten Rattenorganen [Rieckert, 1999]. SD, Standardabweichung; k.A., keine Angabe.

Organ	Relative Wiederfindung	Relative orale Bioverfügbarkeit
	bezogen auf die Gesamtdosis an applizierten Arzneistoff \pm SD in %	
Leber	$0,41 \pm 0,3$	180 ± 113
Niere	$0,11 \pm 0,04$	$6,6 \pm 2,5$
Lunge	$0,11 \pm 0,1$	$18,5 \pm 5,4$
Hirn	0 ± 0	$23,3 \pm 8,6$
Darm	$2,52 \pm 3,3$	k.A.

Die in der Tabelle 2-1 aufgeführten Organe sind auch die, die in dieser Arbeit genauer untersucht werden sollten. Zu Beginn dieser Arbeit konnte noch keine Aussage darüber gemacht werden, wo die *N*-Reduktion im Körper zusätzlich zur Leber noch abläuft. Das Auftreten in einem Organ muss nicht unbedingt mit einem dort vorhandenen Enzym in Zusammenhang stehen. Man hat aber in den aufgeführten Organen bereits eine Reihe von Enzymen, die teilweise auch als Xenobiotika metabolisierend bekannt sind, entdecken können. Einige Beispiele für solche fremdstoffmetabolisierenden Enzyme in den beschriebenen Organen sind bereits in Kapitel 1.4 mit Literaturangaben aufgeführt. Es stellt sich nun die Frage, ob auch die für unsere Umsetzungen benötigten Enzyme in den entsprechenden Organen vorliegen.

2.1.4 Zielsetzung

Nachdem in diversen Spezies die *N*-Reduktion verschiedenster Verbindungen durch Lebermikrosomen und *in vivo*-Studien belegt wurde, sollten in dieser Arbeit Mikrosomen aus verschiedenen Organen gewonnen und auf ihre Fähigkeit zur Reduktion hin untersucht werden. Die entsprechenden Vorgehensweisen bei der Mikrosomengewinnung sollten in Anlehnung an die Lebermikrosomengewinnung und verfügbare Literaturangaben organspezifisch entwickelt und durchgeführt werden.

Von den dafür gewählten Spezies Schwein und Mensch sollten jeweils Mikrosomen aus den Organen Leber, Niere, Gehirn, Lunge und Darm gewonnen werden. Da Schweineorgane leichter zugänglich sind als humane Organe, sollte mit deren Mikrosomenherstellung angefangen werden, um später die dort gemachten Erfahrungen auf die Gewinnung aus humanen Organen übertragen zu können. Zudem sollten Vergleiche zwischen Mensch und Schwein vorgenommen werden.

Das Schwein wurde aus den bereits erwähnten Gründen (siehe Kapitel 2.1.2) als Organlieferant gewählt. Für den Fall, dass die Gewinnung humaner Organe nicht möglich sein sollte, könnten so eher Rückschlüsse auf den Menschen gezogen werden als dies aus den sonst eher für Metabolismusstudien eingesetzten Nagetieren möglich ist.

2.2 METHODEN

2.2.1 Gewinnung der Enzympräparationen

2.2.1.1. Materialien und Geräte

Schlauchpumpe mit variabler Geschwindigkeit, mit Pumpenköpfen und Schläuchen, *Fa. Millipore, Eschborn*. Fleischwolf, *Fa. CITTI, Kiel*. Durchflußhomogenisator, Eigenbau der *Universität Austin, Texas, USA*. Teflon-Glas-Gewebehomogenisator, *Fa. Braun, Melsungen*. Ultraturrax, *Interkrenn Maschinen, Interkrenn*. Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E mit den Rotorköpfen JA 14 und JA 10 und den dazugehörigen Weithalszentrifugenflaschen, *Fa. Beckman, München*. Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti und 70 ml Polycarbonat Zentrifugengefäße, *Fa. Beckman, München*. Mikroprozessor-pH-mV-Meter pH 537, *Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim*.

K_2HPO_4 war von der *Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz*. KH_2PO_4 , Saccharose, EDTA und alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der *Fa. Merck, Darmstadt*, bezogen. Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel waren von höchster verfügbarer Reinheit. Verwendete Puffer:

Puffer	Zusammensetzung
20 mM Phosphatpuffer mit EDTA	4,8 mM KH_2PO_4 , 15,2 mM K_2HPO_4 , 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7,4
50 mM Phosphatpuffer	12 mM KH_2PO_4 , 38 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,4
20 mM Phosphatpuffer	4,8 mM KH_2PO_4 , 15,2 mM K_2HPO_4 , 250 mM Saccharose, pH 7,4

2.2.1.2. Schweinelebermikrosomen

Die Gewinnung der Schweinelebermikrosomen wurde in Anlehnung an die Beschreibung von Ziegler und Pettit [1966] mit einigen Modifizierungen durchgeführt. Die Schweinelebern konnten vom örtlichen Schlachthof aus der Einzelschlachtung bezogen werden. Die Tiere wurden durch Elektroschock betäubt und wurden durch anschließendes Öffnen der Halsschlagader ausgeblutet. Nach einem Brühbad wurden die Schweine aufgehängt, geöffnet und die Organe konnten entnommen werden. Zwei Schweinelebern wurden schnellstmöglich nach der Entnahme in eisgekühlten 20 mM Phosphatpuffer mit EDTA überführt und zum Labor transportiert. Die im folgenden aufgeführten Reinigungsschritte wurden bei 4°C oder unter Eiskühlung durchgeführt. Zunächst wurden die Lebern mit Hilfe einer Schlauchpumpe mit 50 mM Phosphatpuffer zur Blutentfernung perfundiert. Dazu wurden zwei Schläuche, die mit Pipettenspitzen versehen waren, so tief wie möglich in diverse große Blutgefäße gehalten und mit dem Puffer durchspült, bis eine flächige Braunfärbung und Verhärtung des zuvor dunkelroten Lebergewebes auftrat. Nur gut entfärbte Leberstücke wurden anschließend weiterverarbeitet. Die Lebern wurden so gut wie möglich von Fettgewebe befreit, in kleine Stücke von ca. 1 cm Länge geschnitten, mit dem 20 mM Phosphatpuffer mit EDTA gewaschen und zum weiteren Zerkleinern durch einen elektrischen Fleischwolf gegeben. Die so erhaltene Masse wurde mit dem gleichen Volumen an 20 mM Phosphatpuffer (ohne EDTA) in zwei Durchgängen in einem Durchflußhomogenisator [Ziegler und Pettit, 1966] homogenisiert. Im folgenden wird nur noch dieser EDTA-freie Phosphatpuffer verwendet, da das verarbeitete Material nun blutfrei war und kein EDTA mehr benötigt wurde. Anschließend wurde mit dem Puffer auf das ursprüngliche Volumen vor dem Homogenisieren aufgefüllt und der pH-Wert des Leberhomogenisats mit 10 %iger Kaliumhydroxid-Lösung auf 7,4 eingestellt.

Dieses wurde in der Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E mit dem Rotor JA 10 für 30 min bei 9.000 g zentrifugiert. Die dabei entstandenen Überstände wurden vorsichtig

abdekantiert und die Sedimente verworfen. Die vereinigten Überstände wurden durch Verbandmull kolliert, um die Fettsäuren abzutrennen.

Anschließend wurde der 9.000 g Überstand für 60 min bei 100.000 g in der Ultrazentrifuge (Rotor 45 Ti) zentrifugiert. Der 100.000 g Überstand (=Cytosol) konnte mit Dithiothreitol (*Fa. Biomol, Hamburg*) auf eine Endkonzentration von 0,5 mM versetzt und bei -80°C eingefroren werden. Zuvor mußte der pH-Wert gegebenenfalls mit verdünnter Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt werden. Das resultierende Pellet wurde mit Phosphatpuffer in einem Teflon-Glas-Homogenisator, der in eine handelsübliche Standbohrmaschine eingespannt wurde, resuspendiert und zur Aufreinigung erneut 60 min bei 100.000 g zentrifugiert. Das daraus entstandene mikrosomale Pellet wurde wieder mit Phosphatpuffer resuspendiert, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.3. Schweinenierenmikrosomen

5-9 Schweinenieren wurden frisch vom örtlichen Schlachthof aus der Einzelschlachtung geholt und in eisgekühltem EDTA-haltigen 20 mM Phosphatpuffer transportiert. Die folgenden Reinigungsschritte wurden bei 4°C oder unter Eiskühlung und in Anlehnung an die Gewinnung von Lebermikrosomen (siehe 2.2.1.2) bis auf die folgenden Abweichungen durchgeführt.

Zunächst wurden die Nieren gehäutet und von der bindegewebsartigen Kapsel befreit. Die Nieren wurden nicht perfundiert, da die Gefäße viel kleiner und weniger ausgeprägt waren als bei der Leber, und stattdessen häufiger gewaschen, bis das Waschwasser annähernd farblos war. Verwendet wurden nicht die gesamten Nieren, sondern lediglich Nierenrinde und Nierenmark, wohingegen Fettgewebe und Sammelbecken verworfen wurden. Nach dem Zerkleinern durch einen elektrischen Fleischwolf konnten die Nierenstücke nicht durch den Durchflußhomogenisator gegeben werden, da das Nierengewebe dafür zu fest und zäh war, sondern wurden in einem 50 ml Teflon-Glas-Homogenisator, der in eine Standbohrmaschine eingespannt

wurde, unter hohem Kraftaufwand homogenisiert. Dieses Schweinenierenhomogenisat wurde analog zur Schweineleber weiterverarbeitet und die erhaltenen Mikrosomen bei -80°C eingefroren.

2.2.1.4. Schweinehirnmikrosomen

Die Schweinehirnmikrosomen wurden in Anlehnung an die Gewinnung von Lebermikrosomen (siehe 2.2.1.2) gewonnen. Es ergaben sich lediglich einige Änderungen, die nachfolgend aufgeführt sind.

Etwa 10 Gehirne wurden frisch vom Schlachthof geholt, sofort in eisgekühlten Puffer überführt und zum Labor transportiert. Die Schweinehirne stammten aus der Großschlachtung, d.h. die Schweine sind anstelle des Brühbades durch den Brühltunnel und die Tunnelschleuse, in der sie ca. 30 sec geflämmt und von den Borsten befreit wurden, geschickt worden. Zunächst wurden die Hirnhäute und die Blutgefäße von der Oberfläche der Gehirne entfernt. Anschließend konnte bis auf das Perfundieren analog zur Leber verarbeitet werden. Da das Gewebe sehr weich war, konnte wie bei der Leber der Durchflußhomogenisator zum Homogenisieren eingesetzt werden. Auch das weitere Vorgehen entsprach den Lebermikrosomen.

2.2.1.5. Schweinelungenmikrosomen

Die Gewinnung von Schweinelungenmikrosomen wurde bis auf die aufgeführten Abweichungen analog der Gewinnung von Lebermikrosomen (siehe 2.2.1.2) durchgeführt.

Nach dem Transport wurden den frischen Lungen die Bronchien großzügig entfernt, da diese das weitere Verarbeiten mit Fleischwolf und Homogenisator behindert hätten. Ebenso wurde versucht, Knorpelspannen und -plättchen zu entfernen, damit diese die beim Homogenisieren benötigten Geräte nicht verstopften. Zudem wurden die kleingeschnittenen Lungenstückchen nicht mit Puffer verdünnt, weil sich dieses

Gewebe aufgrund seiner geringen Dichte nicht mit dem Puffer suspendieren ließ. Auf ein Perfundieren wurde verzichtet, da die Lungen sich durch Waschen ausreichend vom Blut befreien ließen. Bei der Verarbeitung mit dem Durchflußhomogenisator mußte dieser nach jedem Durchgang auseinander gebaut und von darin verbliebener Knorpelmasse befreit werden. Die anschließenden Schritte entsprachen den Lebermikrosomen.

2.2.1.6. Schweinedarmmikrosomen

Die Reinigungsschritte und die Gewinnung wurden wie bereits bei den Lebermikrosomen beschrieben durchgeführt (siehe 2.2.1.2). Abweichungen von diesem Verfahren werden im folgenden genau beschrieben.

Der Darm wurde in eisgekühltem Phosphatpuffer bereits genannter Zusammensetzung transportiert, zunächst gewaschen und vom Darminhalt befreit. Nachdem er längs aufgeschnitten worden war, wurde er erneut in Puffer gewaschen und mit sehr scharfen Messern in kleine Stücke geschnitten. Die weitere Verarbeitung entsprach den Lebermikrosomen.

2.2.1.7. Humane Lebermikrosomen

Die verwendeten Leberstücke stammten von Patienten verschiedenen Alters und Geschlechts, die sich aufgrund von Lebertumoren oder Metastasen einer partiellen Hepatektomie unterziehen mussten. Da bei diesen Entnahmen auch immer gesundes Gewebe entfernt wird, wurden freundlicherweise von der Klinik für Allgemeine Chirurgie der Christian-Albrechts-Universität Kiel Stücke von den gesunden Anteilen zur Verfügung gestellt. Die Genehmigung war zuvor von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität und den Patienten eingeholt worden. Die Gewebestücke wurden sofort nach der Entnahme in eisgekühlten saccharosehaltigen 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, überführt und zum

Labor transportiert. Da meist nur sehr kleine Stücke zur Verfügung gestellt werden konnten, wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, bis mehrere Leberstücke vorlagen, die dann gepoolt verarbeitet wurden. Dabei wurden die Leberstücke von Fett befreit, klein geschnitten und in Phosphatpuffer gewaschen. Dann wurden die Stückchen mit dem Teflon-Glas-Homogenisator zu einem gleichmäßigen Homogenisat zerkleinert und ab hier den Schweinelebermikrosomen entsprechend verarbeitet (siehe 2.2.1.2), jedoch in der Hochleistungszentrifuge mit dem kleineren Rotorkopf JA 14 zentrifugiert.

2.2.1.8. Humane Nierenmikrosomen

Die verwendeten Nierengewebe stammten von Patienten verschiedenen Alters und Geschlechts, die sich aufgrund eines Nierentumors eine Niere entfernen lassen mussten. Ein gesunder Anteil des entnommenen Gewebes wurde freundlicherweise von der Klinik für Allgemeine Chirurgie der Christian-Albrechts-Universität Kiel zur Verfügung gestellt. Die Genehmigung war zuvor von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität und den Patienten eingeholt worden. Die Gewebestücke wurden sofort nach der Entnahme in eisgekühlten saccharosehaltigen 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, überführt und zum Labor transportiert. Auch hier lagen meist nur kleine Mengen vor, sodass die Nierenstückchen schockgefroren und bei -80°C eingelagert wurden. Das weitere Vorgehen entsprach den humanen Lebermikrosomen (siehe 2.2.1.7), abgesehen von der Herstellung des Homogenisats. Anstelle des Teflon-Glas-Homogenisators mußte bei der humanen Niere aufgrund deren Zähigkeit mit einem Ultraturrax zerkleinert werden. Dieser Vorgang wurde zügig und unter Eiskühlung durchgeführt, um ein Erwärmen des Homogenisats zu verhindern.

2.2.1.9. Humane Darmmikrosomen

Humane Darmmikrosomen wurden, da humaner Darm nicht über die Klinik für Allgemeine Chirurgie der Christian-Albrechts-Universität Kiel zur Verfügung gestellt werden konnte, von der *Fa. In Vitro Technologies, Inc., Baltimore, Maryland, USA*, bezogen. Diese Mikrosomen waren aus einem Pool von 10 verschiedenen humanen Därfen beiderlei Geschlechts gewonnen worden.

2.2.2 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Mikrosomen

2.2.2.1. Materialien und Geräte

PH-Meter InoLab pH Level 1, *Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim*. Vortexer VF2, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. Schüttelwasserbad GFL, *Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel*. Halbmikroküvetten (Polystyrol), *Fa Sarstedt, Nümbrecht*. Zweistrahlphotometer Uvicon 930, *Fa. Kontron, Neufahrn*. Photodiodenarray-Spektrometer DU[®] 7500, *Fa. Beckman, München*.

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel waren von höchster verfügbarer Reinheit. Alle benötigten Chemikalien wurden von der *Fa. Merck, Darmstadt*, bezogen oder werden an entsprechender Stelle mit Angabe des Herstellers erwähnt.

2.2.2.2. Proteinbestimmung

Alle Proteinbestimmungen wurde nach der BCA-Methode in Anlehnung an die Methode von Smith *et al.* [1985] durchgeführt. Als Arbeitsreagenz diente das BCA-Protein-Assay-Reagenz von der *Fa. Pierce (Rockford, IL, USA)*, bestehend aus Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, 2,2'-Bis(4-hydroxyphenyl)propan-5-sulfonsäure und

Natriumtartrat in 0,1 N Natronlauge gelöst (Reagenz A), sowie 4 %iger Kupfersulfatlösung (Reagenz B). Die Reagenzien wurden im Verhältnis von 50 : 1 nach Vorschrift gemischt und mit den zu vermessenden Proteinproben nach folgendem Schema in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben:

	Proteinprobe	Blindwert
Proteinlösung	x μ l	-
Aqua bidest.	100 – x μ l	100 μ l
BCA-Reagenzmischung	900 μ l	900 μ l

Die Proteinproben wurden 1:100 oder 1:400 mit Aqua bidest. verdünnt, von der dann je nach Probe x μ l in den Ansatz pipettiert wurden.

Zur quantitativen Auswertung wurde parallel eine Kalibrierung anhand der Zugabe von 2, 4, 8, 12 und 16 μ g Rinderserumalbumin (Standardlösung, *Fa. Pierce, Rockford, IL, USA*) durchgeführt. Alle Ansätze wurden 20 min bei 60°C im Schüttelwasserbad inkubiert, kurz in Eiswasser abgestoppt und der sich bildende violette Komplex innerhalb von 3 min gegen den Blindwert bei 562 nm photometrisch vermessen.

2.2.2.3. Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung

Die Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung erfolgte nach dem von Omura und Sato [1964] beschriebenen Verfahren, indem das Differenzspektrum zwischen reduziertem Cytochrom P450 und dem reduzierten Kohlenmonoxid-Komplex bestimmt wurde. Der für diese Bestimmung benötigte 100 mM Phosphatpuffer war nach der Herstellung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt worden. Eine Spatelspitze Natriumdithionit (*Fa. Sigma Chemical Co., Deisenhofen*) wurde zum Ansatz dazu gegeben, um das

Cytochrom P450 in seine reduzierte Form zu überführen. Die Ansätze wurden nach folgendem Schema behandelt und vermessen:

	Probe	Referenz
Enzympräparation	100 µl	-
Phosphatpuffer	1900 µl	2000 µl
Natriumdithionit	Spatelspitze	-

Nach 2 min gegen die Referenz vermessen.

Nach 4 min 60 sec lang Kohlenmonoxid einleiten.

Nach 7 min das zweite Spektrum aufnehmen und das Differenzspektrum bilden.

Nach der Zugabe des Natriumdithionits wurde nach einer zweiminütigen Reaktionszeit die reduzierte Form des Cytochrom P450 über einen Wellenlängenbereich von 400-500 nm gegen die Referenzküvette vermessen. Nach der Sättigung der Probe mit Kohlenmonoxid, welches über 60 sec mit einer Stärke von ca. 5 Blasen / sec als Gas eingeleitet worden war, wurde ein zweites Spektrum bei 400-500 nm aufgenommen. Dieses ergab durch Subtraktion des ersten Spektrums das Differenzspektrum. Aus der Differenz der Absorptionswerte bei 450 nm und 490 nm ließ sich unter Einbeziehung des empirisch ermittelten Absorptionskoeffizienten von $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ der Cytochrom P450-Gehalt berechnen.

2.3 ERGEBNISSE

2.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteingehälter der einzelnen mikrosomalen Präparationen konnten mittels der im Methodenteil erläuterten BCA-Proteinbestimmung ermittelt werden. Wie in Tabelle 2-2 ersichtlich, ergaben sich stark variierende Werte für die unterschiedlichen Mikrosomenarten, die eine Spanne von 5,4 bis 47,02 mg mikrosomales Protein/ml Mikrosomenlösung umfassten. Mit Hilfe der so gewonnenen Proteinkonzentrationen konnten die bei anderen Messungen erhaltenen Werte für die unterschiedlichen mikrosomalen Präparationen miteinander verglichen werden. Für die humanen Darmmikrosomen mußte der Proteingehalt nicht bestimmt werden, da er vom Hersteller bereits mit 20 mg/ml angegeben wurde.

Tab. 2-2: Proteingehalt der verschiedenen mikrosomalen Präparationen (BCA-Proteinbestimmung).

Mikrosomale Präparation	Proteingehalt [mg/ml] ± SD
Schweineniere	44,4 ± 3,8
Schweineleber	47,0 ± 2,1
Schweinegehirn	11,5 ± 0,3
Schweinelunge	15,7 ± 0,6
Schweinedarm	31,4 ± 2,5
Humane Niere	5,4 ± 1,1
Humane Leber	23,8 ± 1,5
Humaner Darm	20,0*

* Herstellerangabe.

2.3.2 Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung

Die Cytochrom P450-Gehaltsbestimmung wurde für die gewonnenen Mikrosomenarten durchgeführt, um einen Hinweis auf das Vorhandensein und die Intaktheit der Cytochrom P450 Enzyme in der jeweiligen Präparation zu erhalten. In den resultierenden Kohlenmonoxid-Differenzspektren zeigten sich die typischen Absorptionsmaxima bei 450 nm und keine oder nur geringfügige Absorptionsbanden bei 420 nm, die bei Vorhandensein von denaturierten Cytochrom P450 Enzymen erkennbar sind. In Tabelle 2-3 sind die aus den Differenzspektren berechneten Cytochrom P450-Gehälter aufgeführt.

Tab. 2-3: Cytochrom P450-Gehalt der verschiedenen mikrosomalen Präparationen (Bestimmung nach Omura und Sato [1964]).

Mikrosomale Präparation	Cytochrom P450 [nmol/mg] ± SD
Schweineniere	0,22 ± 0,04
Schweineleber	0,44 ± 0,01
Schweinegehirn	ND
Schweinelunge	ND
Schweinedarm	0,05 ± 0
Humane Niere	0,04 ± 0,01
Humane Leber	0,63 ± 0,01
Humaner Darm	n.d.

ND, nicht detektierbar; n.d., nicht durchgeführt.

Obwohl die Literatur über das Vorkommen von P450 in allen hier untersuchten Schweineorganen berichtet [Pelkonen und Raunio, 1997], ließ sich in Schweinegehirn- und Schweinelungenmikrosomen kein P450 nach Omura und Sato [1964] nachweisen. Für die humanen Darmmikrosomen konnte wegen der nur geringen vorliegenden Menge keine P450-Gehaltsbestimmung durchgeführt werden, aber die Expression von P450 Isoenzymen im Darm wird in der Literatur beschrieben [Prueksaritanont *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999].

2.4 DISKUSSION

In vorangegangenen Studien sind bereits Mikrosomen aus den Lebern von verschiedenen Spezies wie u.a. Schwein und Mensch gewonnen und untersucht worden [Clement *et al.*, 1996]. Andere Organe sind aber bisher immer außer acht gelassen worden.

In dieser Arbeit wurden erstmals Mikrosomen aus anderen Organen gewonnen und mit den Lebermikrosomen verglichen. Vom Schwein konnten Leber-, Nieren-, Hirn-, Lungen- und Darmmikrosomen und vom Menschen Leber-, Nieren- und Darmmikrosomen aufgearbeitet und untersucht werden. Da es meistens sehr schwer ist, humanes Material zu bekommen, wobei die dann zugänglichen Mengen häufig sehr gering sind, wurde mit der Gewinnung von porcinen Mikrosomen begonnen. Aufgrund der schweren Zugänglichkeit von humanen Organen, konnten leider auch nicht alle zunächst geplanten erworben und untersucht werden. So konnten weder humane Lungen- noch humane Hirnmikrosomen gewonnen werden.

Alle hier aufgeführten Mikrosomen wurden in vergleichbarer Weise gewonnen und gelagert, sodass sie qualitativ als gleichwertig anzusehen sind. Lediglich die humanen Darmmikrosomen wurden käuflich erworben, da Darmgewebe von der Klinik für Allgemeine Chirurgie der Christian-Albrechts-Universität Kiel nicht zur Verfügung

gestellt werden konnte. Alle Mikrosomen mit Ausnahme der Schweinedarm- und der Schweinelungenmikrosomen wurden gepoolt verarbeitet, um individuellen Schwankungen Rechnung zu tragen.

Der Zusatz von EDTA im anfangs eingesetzten Phosphatpuffer diente der Komplexierung der Calciumionen, um eine Blutgerinnung zu verhindern, und die Saccharose erhöhte die Haltbarkeit der Enzyme während der Verarbeitung und Lagerung [Yasukochi und Masters, 1976].

Bei den Schweineorganen lag immer das gesamte Organ zur Mikrosomengewinnung vor, beim Menschen hingegen nur Fragmente der Organe. Bei der Leber waren dies kleine, gesunde Stückchen, die von einer tumorbefallenen Leber abgeschnitten werden konnten. Obwohl die von uns verwendeten Leberstücke optisch gesund erschienen, kann selbstverständlich auch in diese bereits der Tumor vorgedrungen sein und zu Veränderungen z.B. der Enzymexpression und -aktivität geführt haben. Bei der humanen Niere verhält es sich ähnlich. Auch hier wurden kleine, gesund aussehende Stücke von einer wegen Tumorbefall entnommenen Niere abgeschnitten. Aber auch hier kann trotzdem bereits kanzeröses Gewebe verarbeitet worden sein. Die Ergebnisse sollten daher keinesfalls als absolute Werte gesehen werden. Die humanen Darmmikrosomen sind aus einem Pool von 10 Menschen beiderlei Geschlechts gewonnen worden, über die keine weiteren Aussagen gemacht wurden. Auch hier können eventuelle Erkrankungen oder vielleicht Medikamente, die zu untersuchende Enzyme induziert haben, die Ergebnisse verfälschen. Im Gegensatz zu den humanen Organen stammten die Schweineorgane immer aus gesunden Tieren.

Die erste Untersuchung frisch gewonnener Mikrosomen ist immer die Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Proteinbestimmung ist bei der Gewinnung von Mikrosomen bzw. bei Enzymreinigungen von großer Bedeutung, weil man, um verschiedene Präparationen miteinander vergleichen zu können, die Gehälter an Enzymen oder auch erhaltene Umsetzungsraten immer auf mg Protein bezogen aufführt. So können sehr ähnliche Messwerte nach Einbeziehung des Proteingehaltes sehr unterschiedliche Aktivitäten ergeben. In der Tabelle 2-2 sieht man sehr deutlich, wie stark die

Proteingehälter variieren können. Diese großen Unterschiede ergeben sich im letzten Schritt der Mikrosomengewinnung, bei dem das nach der Zentrifugation resultierende Pellet mit Puffer resuspendiert wird. Je mehr Puffer man dabei einsetzt, umso geringer wird der Proteingehalt. Bei den humanen Präparationen ergeben sich meist sehr kleine Proteingehälter, da die anfangs eingesetzten Mengen sehr gering sind.

Mikrosomen, die eine Mischung aus den verschiedensten Enzymen präsentieren, können auch aufgereinigt und die Enzyme genauer untersucht werden. Sowohl aus dem Schwein als auch aus dem Menschen sind Enzymsysteme, die zu einer *N*-Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen fähig sind, aufgereinigt und charakterisiert worden [Clement *et al.*, 1997; Behrens, 1999; Rieckert, 1999]. Bei beiden Spezies zeigten sich ähnliche Eigenschaften wie bei der bereits von Kadlubar und Ziegler [1974] beschriebenen Hydroxylamin-Reduktase. Die Enzyme waren sauerstoffunempfindlich und hatten im leicht sauren Milieu die höchste Aktivität. Beim Menschen und beim Schwein besteht dieses Enzymsystem aus Cytochrom b₅, NADH-Cytochrom b₅-Reduktase und der sogenannten *Benzamidoxim-Reduktase*, einem Cytochrom P450 Isoenzym.

Da die in dieser Arbeit zu detektierende *N*-Reduktion in der Leber erwiesenermaßen die Anwesenheit von einem Cytochrom P450 Enzym erfordert [Clement *et al.*, 1997], wurde in den verschiedenen Organpräparationen auf den Cytochrom P450 Gehalt geprüft. Die Literatur beschreibt das Vorkommen von P450 in allen eingesetzten Organen [Guengerich, 1995], sodass auch in allen Mikrosomen enzymatische Aktivitäten vermutet wurden. Es stellte sich dabei nur die Frage, ob die jeweilige Enzymkonzentration für eine Detektion ausreicht, und ob diese Aktivitäten auch für die später durchzuführende *N*-Reduktion nutzbar sind. Es ist bekannt, dass verschiedene P450 Isoenzyme auch verschiedene Reaktionen katalysieren. Daher muss die Präsenz von P450 nicht automatisch auch bedeuten, dass die mikrosomale Präparation *N*-hydroxylierte Verbindungen umzusetzen vermag.

Tatsächlich konnte in fast allen gewonnenen Mikrosomen Cytochrom P450 nachgewiesen werden. Lediglich in porcinen Gehirn- und Lungenmikrosomen war

kein P450 detektierbar. Die Literatur beschreibt, dass zu geringe Konzentrationen nicht nach Omura und Sato [1964] nachgewiesen werden können und auf andere Methoden wie immunohistochemische Nachweise oder Aktivitätsmessungen ausgewichen werden muss [Gherzi-Egea *et al.*, 1994; Krishna und Klotz, 1994]. Warner und Gustafsson [1994] konnten den P450 Gehalt von Gehirnmikrosomen erst nach einer weiteren Aufreinigung der Enzyme durch eine Hydrophobe Interaktions-Chromatographie über ihr Kohlenmonoxid-Differenzspektrum nachweisen. Ein solches Vorgehen war jedoch nicht für diese Arbeit vorgesehen. In dieser Arbeit sollten nur die Mikrosomen als ganzes untersucht werden. Die Möglichkeit der Aktivitätsmessung wird im Grunde mit den in Kapitel 3 beschriebenen Reduktionen von verschiedenen *N*-hydroxylierten Verbindungen, die für den Ablauf Cytochrom P450 benötigen, durchgeführt.

In der Literatur findet man nur wenig Angaben über den Cytochrom P450 Gehalt in verschiedenen Organen des Schweins. Ein Vorkommen von P450 in der Niere von Schwein und Minischwein [Imaoka *et al.*, 1990; Lock und Reed, 1998], in der Schweineleber [Anzenbacher *et al.*, 2002] und im Schweinedarm [Nissen *et al.*, 1998] werden in der Literatur beschrieben. Für die Leber von Schwein und Minischwein werden zahlreiche P450 Isoenzyme wie 1A2, 2A6, 2C, 2E1 und 3A aufgeführt, wobei sich besonders beim Minischwein geschlechtsspezifische Differenzen in der Ausprägung zeigen [Skaanild und Friis, 1999; Soucek, 2001]. Bei CYP1A2 und 2E1 zeigen weibliche Minischweine bis zu viermal höhere Konzentrationen, und auch bei CYP2A6 zeigen sie deutlich höhere Werte als die männlichen Artgenossen. Der P450 Gehalt in der Schweineleber wird von Skaanild und Friis [2000] mit etwa 0,5 nmol/mg Protein angegeben, womit der in dieser Arbeit gemessene Gehalt bestätigt wird. Bhamre *et al.* [1992] benennen den P450 Gehalt im Gehirn bei Tieren allgemein mit 4-10 % des Lebergehalts. Demnach müssten im Schweinegehirn ca. 0,035 nmol P450/mg Protein vorliegen.

P450 Gehälter der Lunge finden sich in der Literatur z.B. für die Ratte, in der etwa 0,023 nmol/mg Protein vorliegen [Imaoka und Funae, 1990], aber nicht für die Schweinelunge.

Humane Organe sind dagegen bereits häufiger und gründlicher erforscht worden als porcine Organe. Der P450 Gehalt in der humanen Niere wird in der Literatur mit 0,042 nmol/mg Protein beschrieben [Amet *et al.*, 1997] und ist vergleichbar mit dem gefundenen Wert von 0,04 nmol/mg Protein. Auch für die humane Leber findet man Vergleichswerte in der Literatur. Iwatsubo *et al.* [1997] geben den hepatischen P450 Gehalt mit 0,32 nmol/mg Protein an, was bei einer Durchschnittsgröße von 1,5 kg einem Gesamtgehalt von 7,5 mmol P450 entspricht [Guengerich, 1995]. Der gefundene P450 Gehalt ist mit 0,63 nmol/mg Protein recht hoch, liegt aber im Bereich der bisher gefundenen Schwankungen [Vainio und Hietanen, 1980].

Auch für das humane Gehirn gibt die Literatur einen P450 Gehalt an, der mit 30-170 pmol/mg Protein etwa 0,2-1 % des Lebergehalts ausmachen soll [Bhamre *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1995; Ravindranath *et al.*, 1995]. Dieses Organ konnte leider nicht im Rahmen dieser Arbeit gewonnen und untersucht werden, dürfte aber für anschließende Arbeiten noch von Interesse sein. In der humanen Lunge, ein Organ, das ebenfalls nicht gewonnen werden konnte, ist der P450 Gehalt mit ca. 10 pmol/mg Protein relativ gering [Shimada *et al.*, 1992; 1996], kann aber durch Induktion durch den Einfluß von Schadstoffen oder Nahrungsmittel auf höhere Werte ansteigen.

Im humanen Darm wird ebenfalls die Präsenz verschiedener P450 Isoenzyme beschrieben [Prueksaritanont *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999]. In diesem Organ muss besonders beachtet werden, dass die Ernährung die Aktivität und Expression von P450 Isoenzymen nicht unerheblich beeinflussen kann. So hat man in Studien mit Ratten herausgefunden, dass ballaststoffarm ernährte Ratten einen geringeren P450 Gehalt im Darm aufwiesen als cerealienreich ernährte Artgenossen [Rosenberg, 1991]. Es zeigte sich zudem ein Shift im Isoenzym-Profil, so dass bei den cerealienreich ernährten

Tieren das Isoenzym 1A1 durch Induktion nachweisbar war, während bei den unbehandelten Kontrolltieren nicht einmal immunohistochemisch 1A1 detektiert werden konnte. Interessanterweise war der gleiche Einfluss in der Leber nicht festzustellen.

Die gewonnenen mikrosomalen Funktionen aus verschiedenen Organen von Mensch und Schwein waren Voraussetzung zur Durchführung der Reduktionsstudien, die im folgenden Kapitel beschrieben werden.

3 REDUKTION VERSCHIEDENER *N*-HYDROXYLIERTER VERBINDUNGEN DURCH MIKROSOMALE FRAKTIONEN UNTERSCHIEDLICHER ORGANE

3.1 EINLEITUNG

3.1.1 Bisherige Untersuchungen

Die Reduktion von verschiedenen *N*-hydroxylierten Verbindungen, die sich von stark basischen stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen ableiten, ist bereits in diversen Spezies untersucht worden. In vorangegangenen Studien konnten Clement *et al.* [1988a] und Hauptmann *et al.* [1988] bereits die Reduktion von Amidoximen (*N*-Hydroxyamidinen) zu Amidinen zeigen. Später folgte der Nachweis der analogen Reduktion von *N*-Hydroxyamidinohydrazonen am Beispiel von Guanoxabenz in Kaninchen-, Schweine- und Humanlebermikrosomen [Clement *et al.*, 1994; 1996]. Weiterführende Studien bewiesen die Reduktion von Benzamidoxim auch in Schweinelebermikrosomen [Clement *et al.*, 1997] und in humanen Lebermikrosomen [Lomb, 1995]. Es wurden aber auch andere Verbindungen *in vitro* auf ihre Reduzierbarkeit untersucht wie *N*-Hydroxyisothioharnstoffe [Clement, 1991] und *N*-Hydroxyguanidine [Clement *et al.*, 1993a].

Neben den *in vitro*-Studien wurde auch versucht, die *in vivo*-Reduktion nachzuweisen. Das gelang Clement *et al.* [1993b] sowohl in Kaninchen als auch in Ratten. In beiden Spezies ließ sich das *N*-dehydroxylierte Derivat Benzamidin nach Applikation der *N*-hydroxylierten Verbindung Benzamidoxim im Plasma detektieren. In weiteren *in vivo*-Studien ließ sich die Reduktion am Diamidoxim und Monoamidoxim des Pentamidins in Ratten zeigen [Clement *et al.*, 1992]. Diese Reduktion wurden *in vitro* an den gleichen Derivaten auch für Kaninchen- und humane Mikrosomen bewiesen [Clement und Jung, 1994].

In allen aufgeführten Studien sind immer ausschließlich die Leber bzw. aus ihr gewonnene Mikrosomen untersucht worden. Die Einzelkomponenten dieses reduzierenden Enzymsystems, die bereits in vorherigen Studien aus Schweineleber und humaner Leber aufgereinigt und charakterisiert wurden, sind Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und ein P450 Isoenzym [Clement *et al.*, 1997; Behrens, 1999]. Beim Einsatz dieser drei Bestandteile zeigte sich unter der Zugabe des Cosubstrats NADH im rekonstituierten System eine im Vergleich zu den Mikrosomen sehr stark erhöhte Aktivität.

Erste Hinweise auf ein Vorkommen eines ähnlichen Enzymsystems in anderen Organen gaben die Ergebnisse einer Arbeit, in der die Pentamidinkonzentrationen in verschiedenen Rattenorganen nach oraler Applikation des Amidoximesters untersucht wurden [Rieckert, 1999]. Hier zeigten sich in allen Organen, die auch in dieser Arbeit untersucht werden sollten, gewisse Konzentrationen des *N*-dehydroxylierten Derivates, des Amidins, was durch das Vorhandensein der gleichen oder zumindest ähnlich umsetzender Enzyme begründet sein kann.

Die erste der zu untersuchenden Substanzen, Benzamidoxim, stellt eine Modellsubstanz dar, die sowohl durch Lebermikrosomen als auch im rekonstituierten System verschiedener Spezies, das immer aus Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und einem P450 Isoenzym besteht, zur dehydroxylierten Verbindung Benzamidin reduziert wird [Clement *et al.*, 1988a; 1997]. Diese Reaktion inklusive ihrer HPLC-Analytik kann daher auch als eine Art Aktivitätsassay für dieses Enzymsystem fungieren. Die ablaufende Reduktion ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

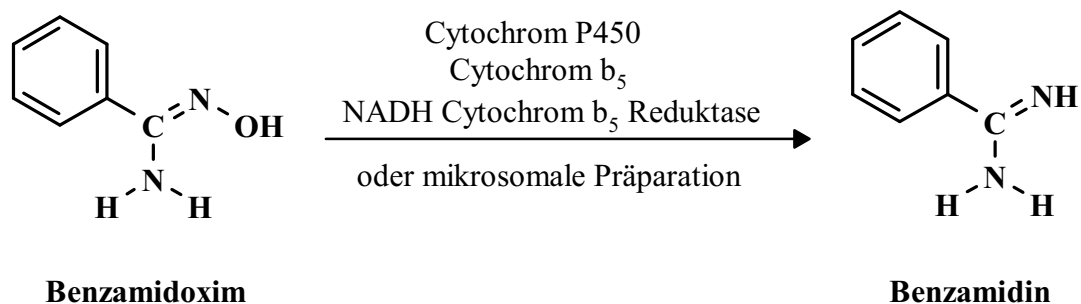


Abb. 3-1: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin (*N*-Hydroxybenzamidin) durch Mikrosomen oder durch die Einzelkomponenten des Enzymsystems [Lomb, 1995].

Die zweite Substanz, Guanoxabenz, ist ebenfalls schon in diversen Studien an unterschiedlichen Spezies untersucht worden. Es zeigte sich bereits in früheren Studien mit Kaninchen-, Schweine- und Humanlebermikrosomen [Clement *et al.*, 1996] eine *N*-Reduktion von Guanoxabenz (*N*-Hydroxyamidinohydrazon) zu Guanabenz (Amidinohydrazon). Guanoxabenz war bis 1992 unter dem Namen Benzérial in Frankreich als Arzneistoff gegen Hypertonie im Handel. Das Amidin Guanabenz ist als Antihypertensivum in verschiedenen Ländern auf dem Markt (Rexitene[®], A, I; Wytensin[®], D, USA). Die mit Guanoxabenz ablaufende Reaktion ist in Abbildung 3-2 skizziert. Auch hier läuft die Reaktion sowohl mit Mikrosomen als auch im rekonstituierten System ab.

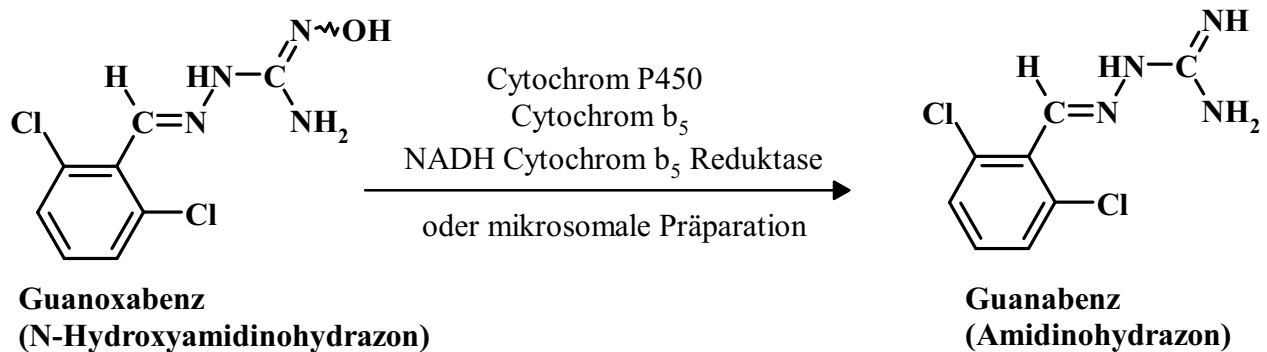


Abb. 3-2: Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch Mikrosomen oder durch die Einzelkomponenten des Enzymsystems [Lomb, 1995].

Die dritte Substanz Ro 48-3656 stellt einen Metaboliten des blutgerinnungshemmenden Arzneistoffes Sibrafiban dar. Sibrafiban ist ein Doppel-Prodrug, das zur Prophylaxe kardiovaskulärer und cerebrovaskulärer thromboembolischer Erkrankungen, wie z.B. instabiler Angina pectoris, Herzinfarkt, ischämischer und arteriosklerotischer Komplikationen, eingesetzt wird [Timm *et al.*, 1997; Mousa *et al.*, 1999].

Die Wirkung des Sibrafibans beruht auf einer Hemmung des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptors, der sich in den Thrombozyten befindet. Dieser Rezeptor vermittelt unter Mitwirkung zahlreicher Rezeptoren und Mediatoren wie Thrombin, Collagen und ADP die eigentliche Plättchenaggregation, die die Thrombenbildung auslöst [Haas, 1999]. Durch solche Thromben verursachte thromboembolische Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache insbesondere in den westlichen Industrieländern dar [Mutschler, 1996]. Daher kommt der Entwicklung von Arzneistoffen, die der Prophylaxe und Therapie solcher Krankheiten dienen, eine außerordentliche Bedeutung zu. Mit Sibrafiban hat man einen Arzneistoff gefunden, der im Gegensatz zu vielen anderen Fibanen oral appliziert werden kann und dabei mit 25-33 % eine recht gute relative orale Bioverfügbarkeit der wirksamen Form aufweist [Weller *et al.*, 1996; Brickl *et al.*, 1997; Wittke *et al.*, 1999].

Im Körper wird nach der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt aus dem Doppel-Prodrug Ro 48-3657 (Sibrafiban, Amidoxim-Carbonsäureester) durch cytosolische Esterasen, die den Ester spalten, der Zwischenmetabolit Ro 48-3656 (Amidoxim-Carbonsäure) gebildet. Aus diesem entsteht durch die Reduktion der wirksame Endmetabolit Ro 44-3888 (Amidin-Carbonsäure). Die Reduktion könnte wiederum vom Cytochrom P450 Enzymsystem durchgeführt werden. Die Substanz Ro 48-3656 (Amidoxim-Carbonsäure) war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht im Arbeitskreis untersucht worden. Abbildung 3-3 zeigt die für den Zwischenmetaboliten Ro 48-3656 (Amidoxim-Carbonsäure) erwartete Reaktion mit mikrosomalen Präparationen und den Einzelkomponenten zum Endmetaboliten Ro 44-3888 (Amidin-Carbonsäure) und alle Wege der Aktivierung des Sibrafibans.

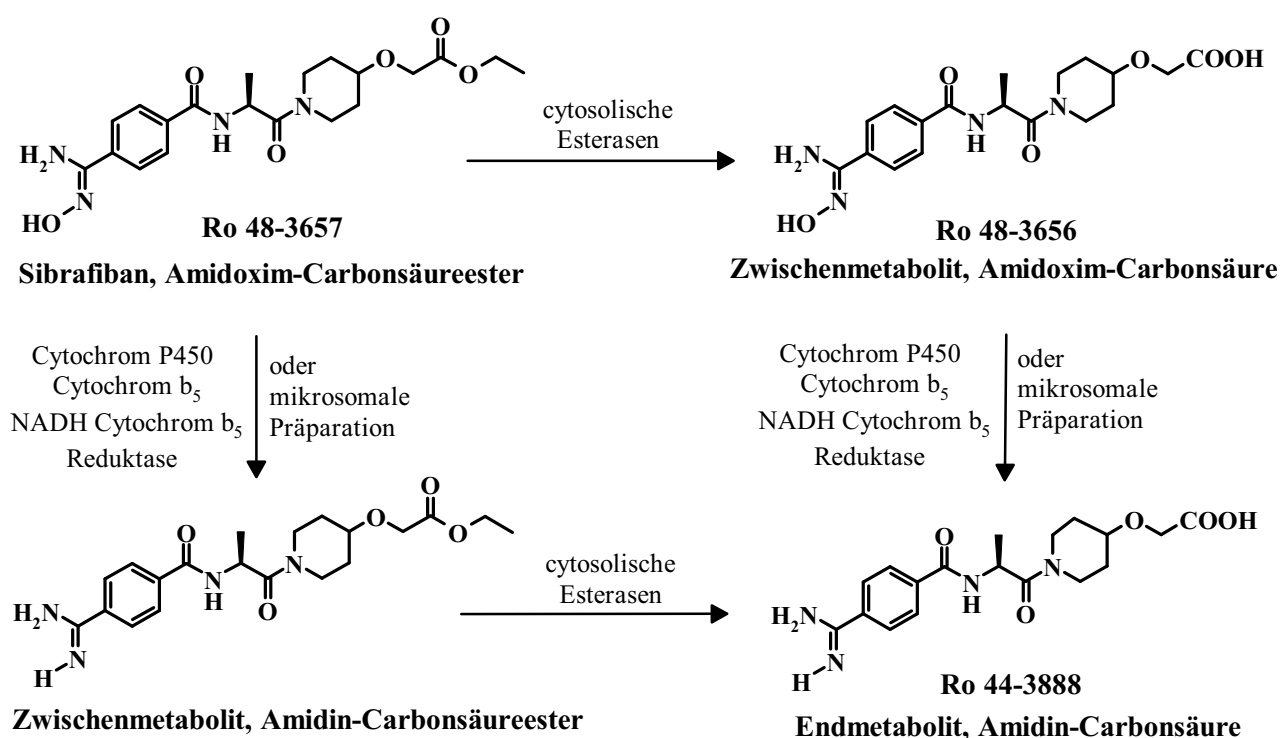


Abb. 3-3: Reduktion von Ro 48-3656 (Amidoxim-Carbonsäure) zu Ro 44-3888 (Amidin-Carbonsäure) durch Mikrosomen oder durch die Einzelkomponenten des Enzymsystems und alle Wege der Aktivierung des Sibrafibans.

Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Substanzen besitzen alle als gemeinsame Struktur eine *N*-hydroxylierte stickstoffhaltige funktionelle Gruppe. Es soll überprüft werden, ob verschiedene Organe in der Lage sind, diese funktionelle Gruppe zu reduzieren und damit, im Falle eines Einsatzes als Prodrug, die Wirkform zu aktivieren.

Im Falle der *N*-Hydroxyamide (Amidoxime) konnte bisher bei zahlreichen *in vivo*- und *in vitro*-Studien mit z.B. Sibrafiban [Cannon *et al.*, 1998; Wittke *et al.*, 1999; Mousa und Forsythe, 2001] und dem Thrombininhibitor Ximelagatran [Gustafsson *et al.*, 2001; Eriksson *et al.*, 2002] kein mutagenes oder somit toxisches Potential entdeckt werden, sodass diese Funktionen ohne Risiko in Prodrugs eingebaut werden können. Die für das unsubstituierte Derivat Benzamidoxim bei einer *in vitro*-Studie gefundene Mutagenität [Clement *et al.*, 1988b] scheint nur auf dieses Derivat zuzutreffen. Bei *N*-Hydroxyamidinohydrazonen besitzt das Guanoxabenz ein mutagenes Potential [Clement *et al.*, 1996], sodass die hier untersuchte Reaktion als Detoxifizierung anzusehen ist.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die hier untersuchte Reduktion sowohl eine Rolle bei der Prodrug-Aktivierung (subst. Benzamidoxime) als auch bei der Entgiftung (Guanoxabenz) besitzt.

3.1.2 Zielsetzung

Aufbauend auf vorangegangene Studien, in denen porcine und humane Lebermikrosomen mit den Substraten Benzamidoxim und Guanoxabenz eine *N*-Reduktion zu den entsprechenden dehydroxylierten Derivaten gezeigt hatten, sollten nun Mikrosomen anderer Organe auf die Anwesenheit eines solchen reduzierenden Enzymsystems untersucht werden. Des Weiteren sollte mit Ro 48-3656, einem Metaboliten des GPIIb/IIIa-Antagonisten Sibrafiban, eine dritte Verbindung eingesetzt werden, die bis dato noch nicht näher untersucht worden war, aber die gleiche funktionelle Gruppe wie Benzamidoxim besaß.

Als Organe wurden die Niere, die als Ausscheidungsorgan eine bedeutende Rolle spielt, das Gehirn, welches unter anderem aufgrund der dort durch Enzymvorkommen auftretenden Nebenwirkungen von Bedeutung sein kann, die Lunge, sowohl als Applikationsort als auch als Ausscheidungsorgan von Relevanz, und der Darm, über den die Arzneistoffe bei peroraler Applikation aufgenommen und vielleicht sogar selbst metabolisiert werden, gewählt.

Falls eine Reduktion der Amidoxime zu den Amidinen auftreten sollte, sollten die eingesetzten Inkubationsbedingungen der Reihe nach durchgetestet und optimiert werden. Diese Optimierung sollte für alle Mikrosomen durchgeführt werden, die eine solche Reduktion zeigen, da in den einzelnen Organen unterschiedliche Optima zu erwarten waren. Weiterhin sollten die kinetischen Parameter der Umsetzungen mit den drei Substraten bestimmt werden. Dieses Vorgehen sollte sowohl für die porcinen als auch für die humanen Mikrosomen erfolgen.

Abschließend sollten die Ergebnisse der verschiedenen Organe miteinander verglichen werden, um die Bedeutung der Organe in Bezug auf ihre Reduktionswirkung und damit ihre Fähigkeit, Xenobiotika zu metabolisieren, herauszuarbeiten. Außerdem sollten die Ergebnisse der Schweinemikrosomen mit den humanen Mikrosomen je Organ verglichen werden.

3.2 METHODEN

3.2.1 Reduktion von Benzamidoxim

3.2.1.1. Materialien und Geräte

Vortexer VF2, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. Schüttelwasserbad GFL 1083, *Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel*. Vibrationsmischer IKA Vibrax VXR, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. Mikroliterzentrifuge EBA 12, *Fa. Hettich, Tuttlingen*. 1,5 ml Reaktionsgefäße, *Fa. Sarstedt, Nümbrecht*. PH-Meter inoLab pH Level 1, *Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim*. Membranfilter Sartolon[®] 0,45µM, *Fa. Sartorius, Göttingen*. Ultraschallbad Sonorex Super, *Fa. Bandelin, Berlin*.

Benzamidoxim wurde aus Benzonitril und Hydroxylamin nach dem von Krüger [1885] beschriebenen Verfahren synthetisiert. Die Substanz lag bereits in ausreichender Menge im Arbeitskreis vor. Benzamidin wurde von der *Fa. Aldrich-Chemie, Steinheim*, bezogen. Natriumoctylsulfonat stammte von der *Fa. Sigma Chemical Co., Deisenhofen*, NADH und NADPH von der *Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz*. Acetonitril wurde von der *Fa. Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland* und alle weiteren nicht extra aufgeführten Chemikalien wurden von der *Fa. Merck, Darmstadt*, bezogen.

Acetonitril und Methanol waren von HPLC-Qualität, die anderen Chemikalien und Lösungsmittel von analytischer Reinheit.

3.2.1.2. Inkubationsbedingungen

Die Inkubation wurde im Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen bei 37°C durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz von 300 µl beinhaltete 100-600 µg

mikrosomales Protein, 0,8-1,5 mM Benzamidoxim und 0,5-1,0 mM NADH in Phosphatpuffer, pH 5,5-7,0. Benzamidoxim und NADH sind vor der Zugabe in Phosphatpuffer gelöst und aus dieser Stammlösung zugegeben worden. Nach einer 3 minütigen Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet und nach 20-40 min durch die Zugabe von 300 µl Methanol beendet. Es wurden Vergleichsansätze ohne Enzymquelle, Cosubstrat oder Substrat oder mit NADPH als Alternative zu NADH inkubiert. Alle Ansätze wurden kurz auf dem Vibrationsmischer geschüttelt, 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und die Überstände mittels HPLC analysiert.

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen waren zuvor für jede mikrosomale Enzympräparation verschiedene Inkubationen durchgeführt worden, bei denen jeweils eine Komponente variiert wurde. Bei der Proteinabhängigkeit wurden Proteinmengen zwischen 0 µg und 700 µg eingesetzt. Die Substratkonzentrationen variierten zwischen 0 µM und 2500 µM. Aus diesen Werten konnten nach entsprechender Umrechnung die kinetischen Parameter K_m , V_{max} und die katalytische Effizienz gewonnen werden. Zur Ermittlung der Zeit wurde die Inkubationsdauer von 0 min bis 100 min variiert. Die Cofaktorkonzentration wurde im Bereich von 0 mM bis 2,0 mM getestet. Für die pH-Abhängigkeit wurden Pufferlösungen mit von 4,0 bis 8,0 variierenden pH-Werten eingesetzt.

3.2.1.3. HPLC

Die HPLC-Analytik erfolgte in Anlehnung an die Methode von Wohlers [1994] unter Verwendung von zwei verschiedenen HPLC-Anlagen, die im folgenden als A und B unterschieden werden. Die Integration, stationäre und mobile Phase sowie die weiteren unten angegebenen Daten waren identisch.

A

HPLC-Pumpe: W 600 Pumpe mit einem W 600 E System Controller, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Detektor: W 486 Tunable Absorbance Detector, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Autosampler: Automatischer Probennehmer W 700 Satellite WISP, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

B

HPLC-Pumpe: W 616 Pumpe mit einem W 600 S System Controller, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Detektor: W 486 Tunable Absorbance Detector, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Autosampler: Automatischer Probennehmer W 717 plus WISP, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Integrator: EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6,7, *Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA*

Stationäre Phase: LiChrospher® RP-Select B (5 µm), iD 5 mm, Länge 125 mm, Kartusche mit ManuCart, Vorsäule RP-Select B (5 µm), 4 x 4mm, *Fa. Merck*

Mobile Phase: 3 mM Octylsulfonat, pH 2,5, eingestellt mit 85 %iger Phosphorsäure / Acetonitril (90/10, V/V)

Detektion: UV 229 nm

Flußrate: 1,0 ml / min

Injektionsvolumen: 10 µl, 2 x je Probe

Retentionszeiten: Benzamidoxim: 18,5 ± 0,2 min

Benzamidin: 22,0 ± 0,6 min

Laufzeit: 30 min

Die Octylsulfonatlösung wurde nach der Zugabe der Phosphorsäure durch Vakuumfiltration (0,45 µm Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

Die Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Benzamidin erfolgte über die bei einer 7- bis 12-Punkt-Kalibrierung erhaltenen Signalflächen. Es wurden Konzentrationen von 1 bis 100 µM in Fließmittel gelöst und vermessen. Die Kalibriergerade verlief bei allen Messungen über den gesamten Konzentrationsbereich linear mit Korrelationskoeffizienten von 0,99_{xy}, wobei x und y bei den verschiedenen Enzympräparationen variierte.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die auch für die Kalibrierung eingesetzten Konzentrationen an Benzamidin den oben beschriebenen Inkubationsansätzen zugegeben, wobei jedoch kein NADH oder NADPH als Cosubstrat zugefügt wurde. Die Ansätze wurden wie die üblichen Inkubationsansätze behandelt und aufbereitet (siehe 3.2.1.2). Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten lagen zwischen 100 und 139 % bei Korrelationskoeffizienten von 0,99_{xy}, wobei x und y auch hier bei den verschiedenen Enzympräparationen variierte. Die Bestimmungsgrenze aus den Inkubationsansätzen lag je nach Mikrosomenquelle bei 1 bis 5 µM.

Abb. 3-4 zeigt beispielhaft die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden von Benzamidin, die durch lineare Regression der bei den Schweinenierenmikrosomen gemessenen Werte erhaltenen wurden.

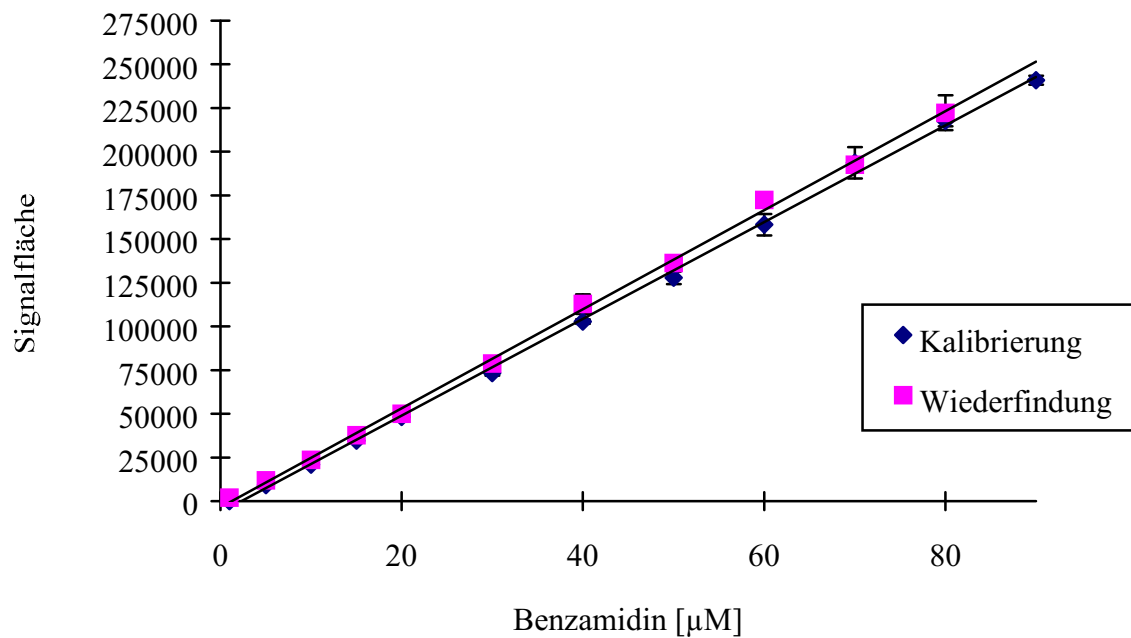


Abb. 3-4: Kalibrier- und Wiederfindungsgerade von Benzamidin aus Biotransformationsansätzen mit Schweinenierenmikrosomen. Aufarbeitung und HPLC-Analytik sind im Methodenteil beschrieben. Pro Konzentration wurden 2 Ansätze inkubiert und doppelt vermessen. Die Kalibriergerade verlief bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,9988 ($N = 48$) über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug 105 % ($r^2 = 0,9986$, $N = 44$).

3.2.2 Reduktion von Guanoxabenz

3.2.2.1. Materialien und Geräte

Vortexer VF2, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. Schüttelwasserbad GFL 1083, *Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel*. Vibrationsmischer IKA Vibrax VXR, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. Mikroliterzentrifuge EBA 12, *Fa. Hettich, Tuttlingen*. 1,5 ml Reaktionsgefäße, *Fa. Sarstedt, Nümbrecht*. PH-Meter inoLab pH Level 1, *Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim*. Membranfilter Sartolon® 0,45µM, *Fa. Sartorius, Göttingen*. Ultraschallbad Sonorex Super, *Fa. Bandelin, Berlin*.

Guanoxabenz wurde freundlicherweise von der *Fa. Laboratoires Houdé, Paris, Frankreich*, und Guanabenz von der *Fa. Wyeth-Pharma GbmH, Münster*, zur Verfügung gestellt. NADH und NADPH stammten von der *Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz*. Methanol, DMSO, Eisessig und alle nicht extra aufgeführten Chemikalien wurden von der *Fa. Merck, Darmstadt*, bezogen.

Methanol war von HPLC-Qualität, die anderen Chemikalien und Lösungsmittel von analytischer Reinheit.

3.2.2.2. Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in einem Schüttelwasserbad in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz von 300 µl beinhaltete 100-600 µg mikrosomales Protein, 1,0-3,0 mM Guanoxabenz und 1,0-1,5 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer, pH 6,3-7,0. Guanoxabenz wurde in DMSO angelöst (max. 2 % Endkonzentration) und ebenso wie NADH in Phosphatpuffer aufgenommen und aus dieser Stammlösung zugegeben. Nach 8 minütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH

gestartet und nach 20-30 min durch die Zugabe von 300 μ l Methanol beendet. Es wurden Vergleichsansätze ohne Enzymquelle, Cosubstrat oder Substrat oder mit NADPH als Alternative zu NADH inkubiert. Die Ansätze wurden für 1 h bei -20°C eingefroren, nach dem Auftauen kurz auf dem Vibrationsmischer geschüttelt, 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und die Überstände anhand HPLC analysiert.

Zur Ermittlung dieser optimalen Inkubationsbedingungen waren zuvor für jede mikrosomale Enzympräparation verschiedene Inkubationen durchgeführt worden, bei denen jeweils eine Komponente variiert wurde. Bei der Proteinabhängigkeit wurden Proteinmengen zwischen 0 μ g und 800 μ g eingesetzt. Die Substratkonzentrationen variierten zwischen 0 μ M und 3000 μ M. Aus diesen Werten konnten nach entsprechender Umrechnung die kinetischen Parameter K_m , V_{max} und die katalytische Effizienz gewonnen werden. Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer wurde die Zeit von 0 min bis 100 min variiert. Die Cofaktorkonzentration wurde zwischen 0 mM und 2,0 mM getestet. Für die pH-Abhängigkeit wurden Pufferlösungen mit von 4,0 bis 8,0 variierenden pH-Werten eingesetzt.

3.2.2.3. HPLC

Die durchgeführte HPLC-Analytik erfolgte in Anlehnung an die von Lomb [1995] beschriebene Methode an zwei verschiedenen HPLC-Anlagen, die im folgenden als A und B unterschieden werden. Die stationäre und mobile Phase sowie die weiteren unten angegebenen Daten waren identisch.

A

HPLC-Pumpe: W 600 Pumpe mit einem W 600 E System Controller, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Detektor: W 486 Tunable Absorbance Detector, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Autosampler: Automatischer Probennehmer W 700 Satellite WISP, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Integrator: EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6,7, *Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA*

B

HPLC-Pumpe: Gradientenpumpe W 510 mit Systemcontroller, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Detektor: W 486 Tunable Absorbance Detector, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Autosampler: Automatischer Probennehmer W 710 B WISP, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Integrator: Maxima®-Software 820, Version 3,30, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Stationäre Phase: LiChrospher® RP-Select B (5 µm), iD 5 mm, Länge 125 mm, Kartusche mit ManuCart, Vorsäule RP-Select B (5 µm), 4 x 4mm, *Fa. Merck*

Mobile Phase: Methanol / Eisessig / Aqua bidest. (30,0/0,5/69,5, V/V/V), pH 4,0, eingestellt mit konz. NH₃

Detektion: UV 272 nm

Flußrate: 1,0 ml / min

Injektionsvolumen: 10 µl, 2 x je Probe

Retentionszeiten: Guanoxabenz: 14,2 ± 0,4 min
Guanabenz: 19,4 ± 0,5 min

Laufzeit: 40 min

Das Fließmittel wurde nach der pH-Wert-Einstellung durch Vakuumfiltration (0,45 μm Membranfilter) von Partikeln befreit und 15 min im Ultraschallbad entgast.

Die Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Guanabenz erfolgte über die bei einer 7- bis 11-Punkt-Kalibrierung erhaltenen Signalflächen. Es wurden Konzentrationen von 1 bis 100 μM in Fließmittel gelöst und vermessen. Die Kalibriergerade verlief bei allen Messungen über den gesamten Konzentrationsbereich linear mit Korrelationskoeffizienten von 0,99 xy , wobei x und y bei den verschiedenen Enzympräparationen variierte.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die auch für die Kalibrierung eingesetzten Konzentrationen an Guanabenz den oben beschriebenen Inkubationsansätzen zugegeben, wobei jedoch kein NADH oder NADPH als Cosubstrat zugefügt wurde. Die Ansätze wurden wie die üblichen Inkubationsansätze behandelt und aufbereitet (siehe 3.2.2.2). Die daraus abgeleiteten Wiederfindungsraten lagen zwischen 99 und 121 % bei Korrelationskoeffizienten von 0,99 xy , wobei x und y auch hier bei den verschiedenen Enzympräparationen variierte. Die Bestimmungsgrenze aus den Inkubationsansätzen lag je nach Mikrosomenquelle bei 2,5 bis 5 μM .

In Abb. 3-5 sind beispielhaft die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden von Guanabenz dargestellt, die durch lineare Regression der bei den Schweinelebermikrosomen gemessenen Werte erhaltenen wurden.

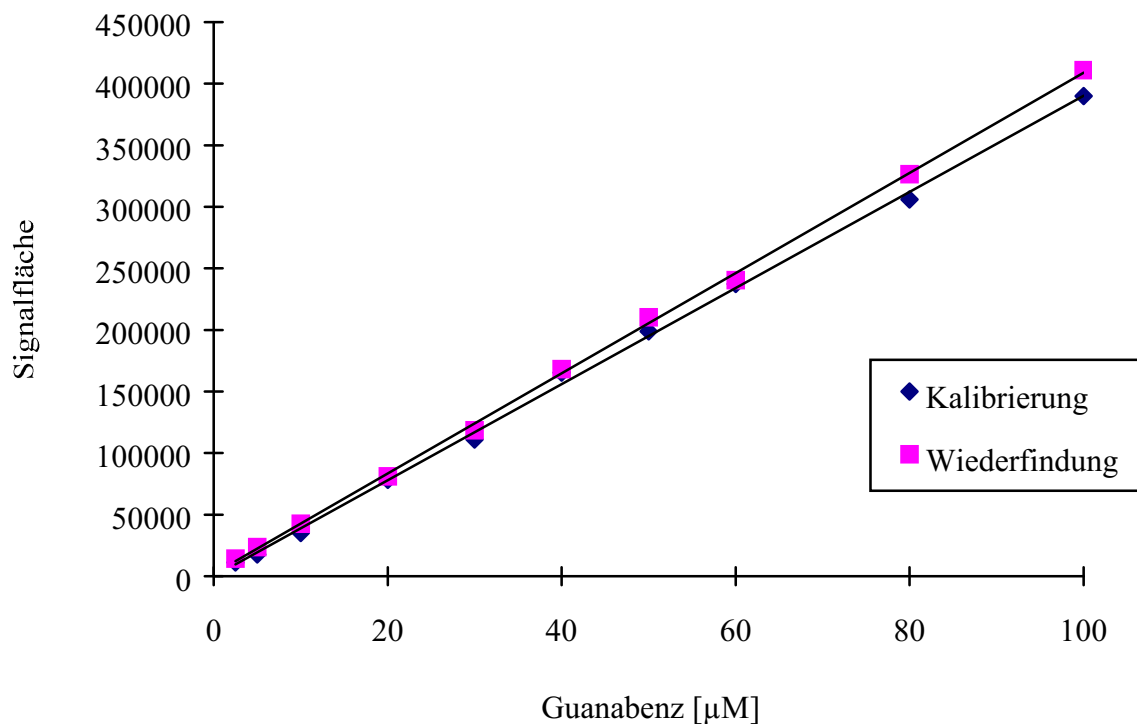


Abb. 3-5: Kalibrier- und Wiederfindungsgerade von Guanabenz aus Biotransformationsansätzen mit Schweinelebermikrosomen. Aufarbeitung und HPLC-Analytik sind im Methodenteil beschrieben. Pro Konzentration wurden 2 Ansätze inkubiert und doppelt vermessen. Die Kalibriergerade verlief bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,9986 ($N = 40$) über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug 107 % ($r^2 = 0,9993$, $N = 40$).

3.2.3 Reduktion von Ro 48-3656

3.2.3.1. Materialien und Geräte

Vortexer VF2, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. Schüttelwasserbad GFL 1083, *Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel*. Vibrationsmischer IKA Vibrax VXR, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. Mikroliterzentrifuge EBA 12, *Fa. Hettich, Tuttlingen*. 1,5 ml Reaktionsgefäße, *Fa. Sarstedt, Nümbrecht*. inoLab pH Level 1, *Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim*. Membranfilter Sartolon[®] 0,45µM, *Fa. Sartorius, Göttingen*. Ultraschallbad Sonorex Super, *Fa. Bandelin, Berlin*.

Die beiden Sibrafiban-Metaboliten Ro 48-3656 und Ro 44-3888 waren freundlicherweise von der *Fa. Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz*, zur Verfügung gestellt worden. Tetramethylammoniumchlorid, NADH und NADPH stammten von der *Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz*. Methanol, Eisessig und alle nicht extra aufgeführten Chemikalien wurden von der *Fa. Merck, Darmstadt*, bezogen.

Methanol war von HPLC-Qualität, die anderen Chemikalien und Lösungsmittel von analytischer Reinheit.

3.2.3.2. Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden bei 37°C im Schüttelwasserbad unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz von 300 µl beinhaltete 600-1000 µg mikrosomales Protein, 2,0 mM Ro 48-3656 und 0,8 mM NADH in Phosphatpuffer, pH 6,3. Ro 48-3656 und NADH wurden vor der Zugabe in Phosphatpuffer gelöst und sind aus dieser Stammlösung zugegeben worden. Nach 3 min Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet und nach 30 min durch die Zugabe von 300 µl Methanol beendet. Zum Vergleich wurden Ansätze ohne Enzymquelle, Cosubstrat oder Substrat oder mit NADPH statt NADH inkubiert. Die Ansätze wurden

für 1 h bei -20°C eingefroren, kurz auf dem Vibrationsmischer geschüttelt, 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und die Überstände per HPLC analysiert.

Zur Ermittlung dieser optimalen Inkubationsbedingungen waren zuvor verschiedene Inkubationen durchgeführt worden, bei denen jeweils eine Komponente variiert wurde. Bei der Proteinabhängigkeit wurden Proteinmengen zwischen 0 µg und 1000 µg eingesetzt. Die Substratkonzentrationen variierten zwischen 0 µM und 2500 µM. Aus diesen Werten konnten nach entsprechender Umrechnung die kinetischen Parameter K_m , V_{max} und die katalytische Effizienz gewonnen werden. Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer wurde die Zeit von 0 min bis 100 min variiert. Die Cofaktorkonzentration wurde zwischen 0 mM und 2,0 mM getestet. Für die pH-Abhängigkeit wurden Pufferlösungen mit von 5,0 bis 8,0 variierenden pH-Werten eingesetzt.

3.2.3.3. HPLC

Die HPLC-Analytik orientierte sich an der von Timm *et al.* [1997] beschriebenen Methode, wurde aber im Fließmittel variiert.

HPLC-Pumpe: W 600 Pumpe mit einem W 600 E System Controller, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Detektor: W 486 Tunable Absorbance Detector, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Autosampler: Automatischer Probennehmer W 700 Satellite WISP, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Integrator: EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6,7, *Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA*

Stationäre Phase:	LiChrospher® RP-Select B (5 µm), iD 5 mm, Länge 250 mm, Kartusche mit ManuCart, Vorsäule RP-Select B (5 µm), 4 x 4 mm, <i>Fa. Merck</i>
Mobile Phase:	100 mM Phosphatpuffer, 10 mM Tetramethylammoniumchlorid (pH 4,5) / Acetonitril (96/4, V/V)
Detektion:	UV 240 nm
Flußrate:	1,0 ml / min
Injektionsvolumen:	10 µl, 2 x je Probe
Retentionszeiten:	Ro 48-3656: 11,4 ± 2,0 min Ro 44-3888: 6,5 ± 1,1 min
Laufzeit:	18 min

Das Fließmittel wurde durch Vakuumfiltration (0,45 µm Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Acetonitril-Zugabe 15 min im Ultraschallbad entgast.

Die Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Ro 44-3888 erfolgte über die bei einer 11-Punkt-Kalibrierung erhaltenen Signalflächen. Es wurden Konzentrationen von 0,5 bis 1000 µM in Phosphatpuffer gelöst und vermessen. Die Kalibriergerade verlief über den gesamten Konzentrationsbereich linear mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9986.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden Konzentrationen von 10 bis 400 µM Ro 44-3888 den oben beschriebenen Inkubationsansätzen zugegeben, wobei jedoch kein NADH oder NADPH als Cosubstrat zugefügt wurde. Die Ansätze wurden wie die üblichen Inkubationsansätze behandelt und aufbereitet (siehe 3.2.3.2). Die daraus abgeleitete Wiederfindungsrate betrug 104 % bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,9941. Die Bestimmungsgrenze aus den Inkubationsansätzen lag bei 1 µM.

In Abb. 3-6 sind die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden von Ro 44-3888 dargestellt, die durch lineare Regression der bei den Schweinenierenmikrosomen gemessenen Werte erhaltenen wurden.

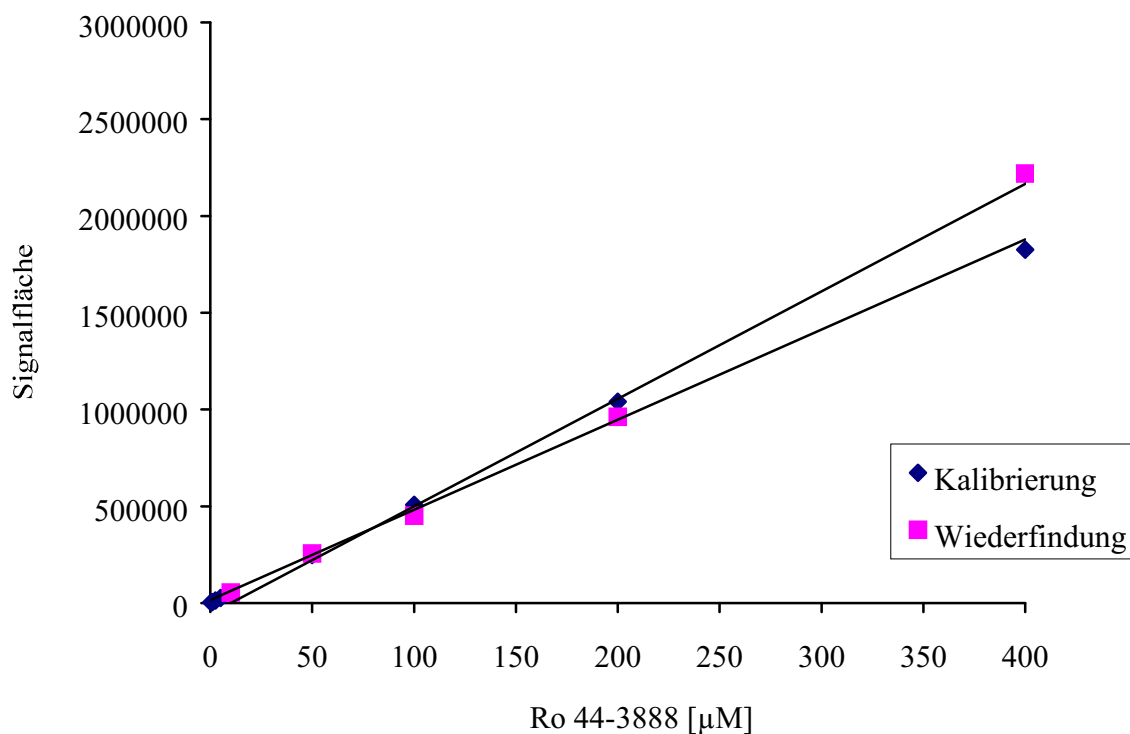


Abb. 3-6: Kalibrier- und Wiederfindungsgerade von Ro 44-3888 aus Biotransformationsansätzen mit Schweinenierenmikrosomen. Aufarbeitung und HPLC-Analytik sind im Methodenteil beschrieben. Pro Konzentration wurden 2 Ansätze inkubiert und doppelt vermessen. Die Kalibriergerade verlief bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,9986 ($N = 44$) über den gesamten Konzentrationsbereich linear. Die Wiederfindungsrate betrug 104 % ($r^2 = 0,9941$, $N = 20$).

3.3 ERGEBNISSE

3.3.1 Reduktion von Benzamidoxim durch mikrosomale Fraktionen verschiedener Organe

3.3.1.1. Charakterisierung

Zunächst mußten die optimalen Inkubationsbedingungen der verschiedenen mikrosomalen Enzympräparationen für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin ermittelt werden. Zur Optimierung der Proteinmenge wurde diese bei ansonsten gleichbleibenden Ansätzen variiert. In Abb. 3-7 sieht man ein typisches Diagramm der Proteinabhängigkeit. Diese Inkubationen wurden für jede einzelne Mikrosomenart durchgeführt, da aufgrund ihrer verschiedenen Herkunft sehr unterschiedliche Werte zu erwarten waren. Für die humanen Darmmikrosomen konnte die Proteinabhängigkeit – wie auch die übrigen noch folgenden Abhängigkeiten – aufgrund der nur begrenzt vorliegenden Menge nicht durchgeführt werden. Für sie wurde in Anlehnung an die anderen Optima eine Proteinkonzentration von 300 µg gewählt.

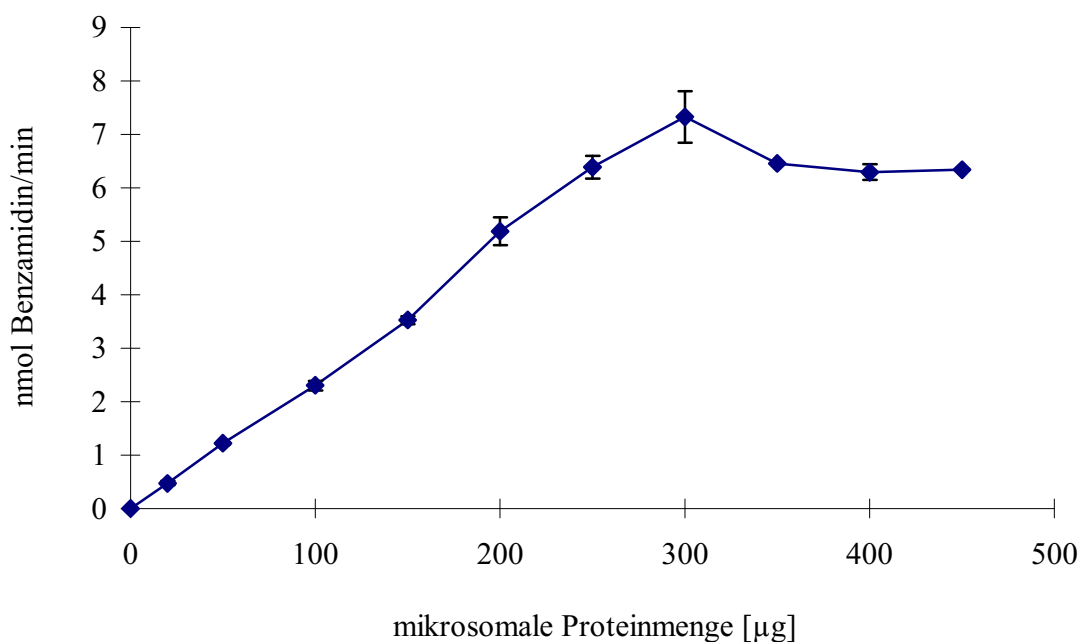


Abb. 3-7: Proteinabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsatzraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Aus den erhaltenen Signalflächen wurden mit Hilfe der Kalibrierung die Umsetzungen in nmol Benzamidin/min berechnet. In Abb. 3-7 sieht man eine im Bereich von 20 bis 300 µg Protein linear verlaufende Umsetzung durch die Schweinenierenmikrosomen, wobei aber eine Proteinmenge von 100 µg bereits ausreichend hohe Umsatzraten für die Detektion erzielte. Diese Menge wurde anschließend für den optimierten Inkubationsansatz eingesetzt. Für die anderen Mikrosomenarten wurde analog vorgegangen und es ergaben sich für die einzelnen Präparationen die in der Tabelle 3-1 zusammengefaßten Proteinmengen.

Tab. 3-1: Optimale Proteinmengen für die Reduktion von Benzamidoxim durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	Proteinmenge [μg]
Schweineniere	100
Schweineleber	200
Schweinehirn	300
Schweinelunge	600
Schweinedarm	600
Humane Niere	300
Humane Leber	200
Humaner Darm	300

Auch die optimalen Substratkonzentrationen mußten ermittelt werden, damit ausreichend Substrat für die Reaktion zur Verfügung steht und dies nicht der limitierende Faktor ist. Es wurden Konzentrationen zwischen 0 μM und 3000 μM Benzamidoxim eingesetzt und Graphen wie den in Abbildung 3-8 dargestellten erhalten.

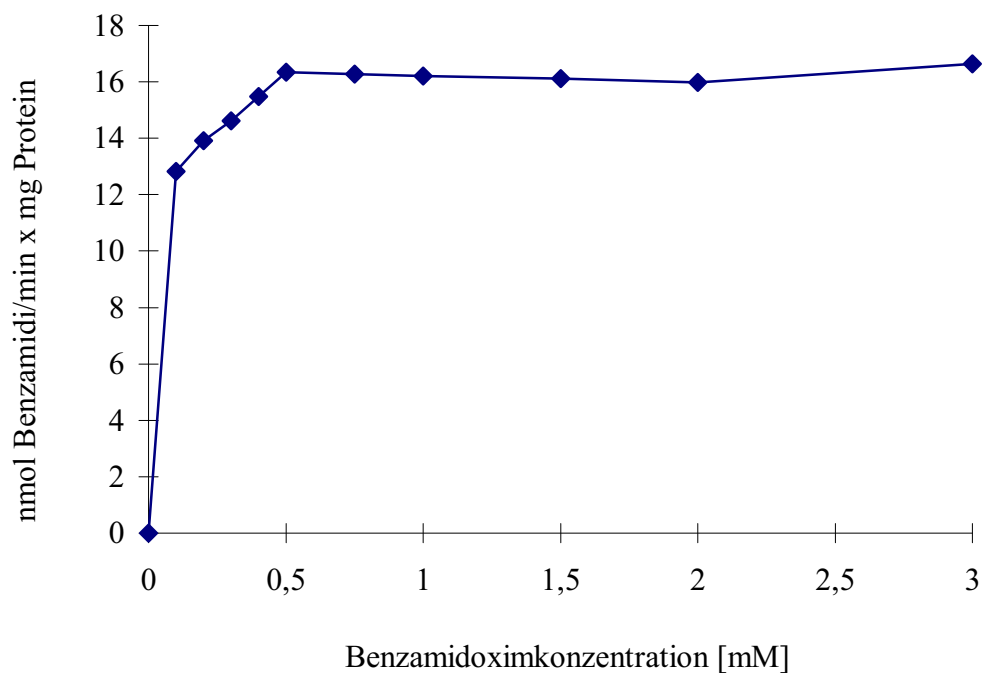


Abb. 3-8: Substratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Die optimale Substratkonzentration war diejenige, bei der bereits eine Sättigung mit Substrat aber keinesfalls eine Hemmung durch zu hohen Überschuß auftrat. Für die Reduktion durch Schweinenierenmikrosomen wurde 1 mM Benzamidoxim gewählt. Analog zu den Schweinenieren, die hier beispielhaft dargestellt sind, wurde bei den anderen Enzympräparationen vorgegangen. Mit den humanen Darmmikrosomen wurde diese Abhängigkeit wegen ihrer geringen Menge nicht getestet, sondern die optimale Substratmenge der porcinen Darmmikrosomen übernommen. Die resultierenden Substratkonzentrationen sind in Tabelle 3-2 zusammengefaßt.

Tab. 3-2: Optimale Substratkonzentrationen für die Reduktion von Benzamidoxim durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	Substratkonzentration [mM]
Schweineniere	0,8
Schweineleber	1,0
Schweinehirn	0,8
Schweinelunge	1,5
Schweinedarm	1,5
Humane Niere	2,5
Humane Leber	0,5
Humaner Darm	1,5

Zur Ermittlung der Inkubationszeit wurde die Inkubationsdauer von 0 min bis 100 min variiert. Wie in Abbildung 3-9 deutlich zu sehen ist, verlief die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen über einen Zeitraum von 0 min bis 80 min nahezu linear. Da nach 20 min bereits eine für eine Auswertung genügende Menge an Benzamidin gebildet worden war, wurde diese Zeit für anschließende Inkubationen gewählt. Für die übrigen Mikrosomenarten – bis auf die humanen Darmmikrosomen - wurden ebensolche Inkubationen durchgeführt, deren als optimal einzusetzende Zeiten in Tabelle 3-3 dargestellt sind. Es ergaben sich dabei Werte zwischen 30 und 40 min, die bei der jeweiligen Enzympräparation immer aus dem linearen Bereich gewählt wurden.

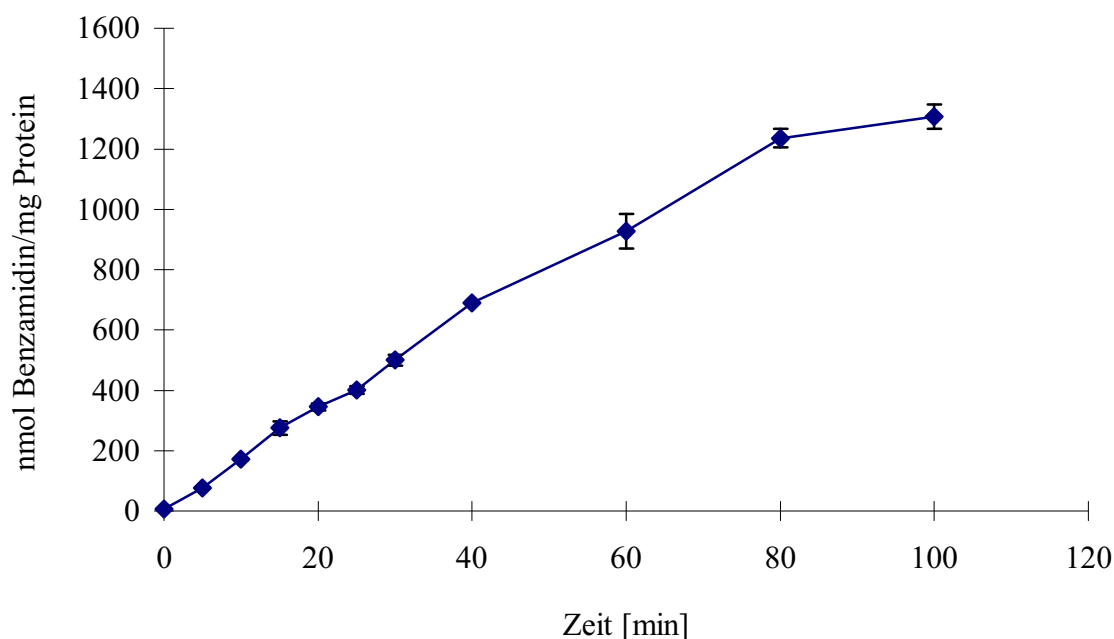


Abb. 3-9: Zeitabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsetzungsdaten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Tab. 3-3: Optimale Inkubationszeiten für die Reduktion von Benzamidoxim durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	Inkubationszeit [min]
Schweineniere	20
Schweineleber	30
Schweinehirn	30
Schweinelunge	30
Schweinedarm	40
Humane Niere	30
Humane Leber	30
Humaner Darm	40

Die optimale Inkubationszeit der humanen Darmmikrosomen orientierte sich an den Schweinedarmmikrosomen, die 40 min benötigten, um eine für eine Auswertung ausreichende Menge an Benzamidin zu bilden, und wurde nicht separat getestet.

Für die Erfassung der optimalen Cosubstratkonzentration für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin wurden NADH-Konzentrationen im Bereich von 0 mM bis 2,0 mM für alle mikrosomalen Präparationen durchgetestet. Für Schweinenierenmikrosomen ergab sich der in Abbildung 3-10 dargestellte Graph.

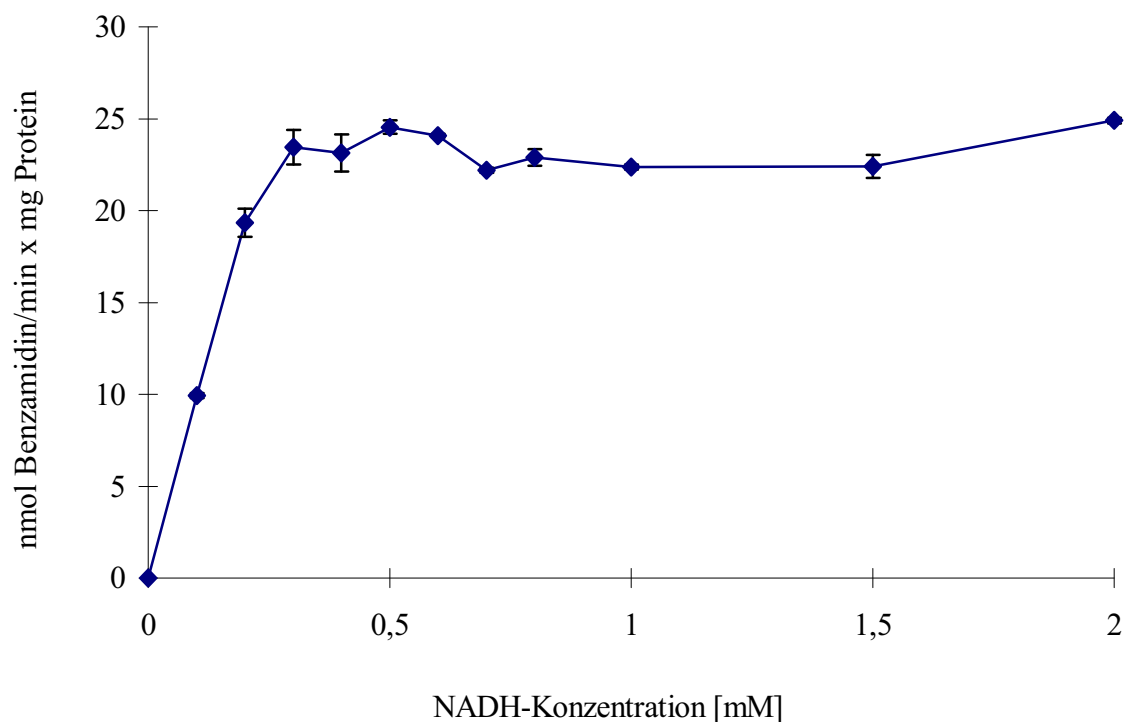


Abb. 3-10: Cosubstratabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsatzraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Wie in der Abbildung deutlich zu sehen, war ab einer Konzentration von 0,5 mM NADH keine Steigerung der Reduktion mehr zu erzielen. Diese Konzentration wurde daher für die Inkubationen mit Schweinenierenmikrosomen gewählt. Die anderen mikrosomalen Präparationen wurden ebenso vermessen und die Ergebnisse aus diesen Inkubationen sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Für die humanen Darmmikrosomen wurde wieder das Optimum von den Schweinedarmmikrosomen übernommen.

Tab. 3-4: Optimale Cosubstratkonzentrationen für die Reduktion von Benzamidoxim durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	NADH-Konzentration [mM]
Schweineniere	0,5
Schweineleber	0,5
Schweinehirn	1,0
Schweinelunge	0,8
Schweinedarm	0,5
Humane Niere	1,0
Humane Leber	1,0
Humaner Darm	0,5

Die pH-Abhängigkeit der einzelnen Mikrosomenarten wurde mit Phosphatpuffern über einen Bereich von pH 4,0 bis 8,0 vermessen. Es sollte der pH-Wert ermittelt werden, bei dem sich für die jeweilige Präparation die besten Umsetzungsraten ergaben. Diese Erkenntnisse waren auch von Bedeutung, um später Aussagen über die reduktive Leistungsfähigkeit der einzelnen Enzympräparationen im Vergleich machen zu können und eventuelle Übereinstimmungen zu entdecken. Die Umsetzungen bei den verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 3-11 beispielhaft für die Schweinenierenmikrosomen dargestellt. Im sauren pH-Bereich von 4,0 war keine Reduktion detektierbar, aber bereits ab pH 4,5 konnte man einen stetigen Anstieg bis pH 6,0 vermessen. Über pH 6,0 sanken die Umsetzungen jedoch wieder, weshalb der pH-Wert von 6,0 als Optimum angesehen und für die weiteren Inkubationen eingesetzt wurde.

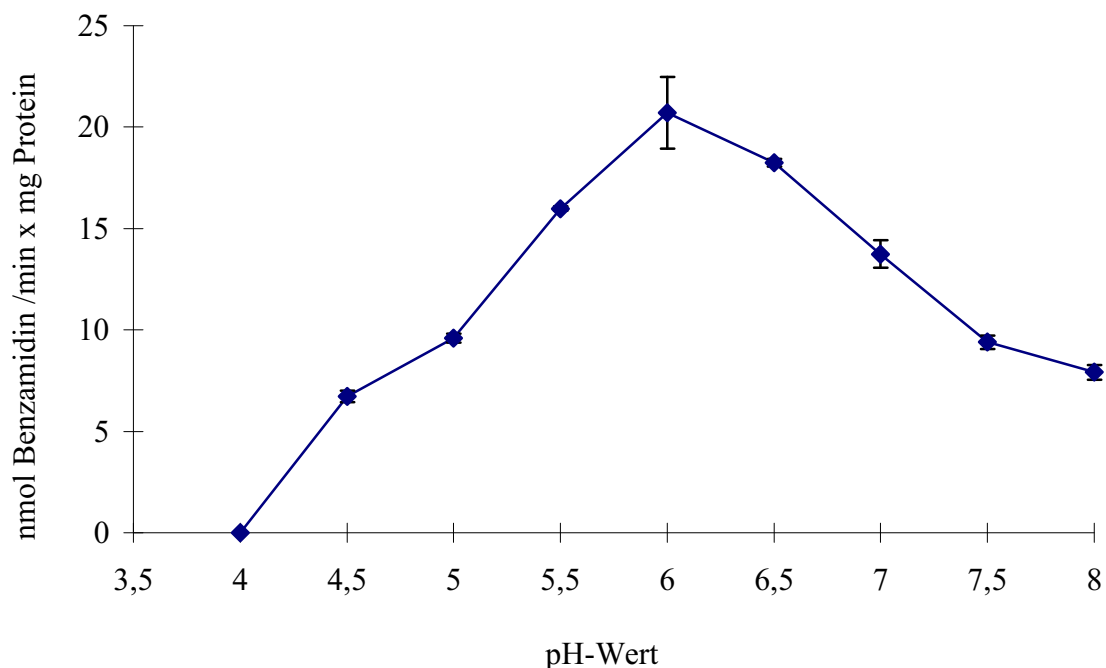


Abb. 3-11: pH-Wertabhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsatzraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Für die anderen mikrosomalen Präparationen wurde die pH-Abhängigkeit auf die gleiche Art und Weise ermittelt. Es ergaben sich leicht variierende Optima, wie man in Tabelle 3-5 sehen kann. Die hier angegebenen Werte wurden jeweils für die Folgeinkubationen mit der entsprechenden Enzympräparation übernommen. Für die humanen Darmmikrosomen wurde auch hier wieder das Optimum der Schweinedarmmikrosomen übernommen, da die physiologisch im Darm vorliegenden pH-Werte bei Schwein und Mensch sehr ähnlich sind, und daher auch ähnliche Optima vermutet werden können.

Tab. 3-5: pH-Wert-Optima für die Reduktion von Benzamidoxim durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	pH-Wert
Schweineniere	6,0
Schweineleber	6,0
Schweinehirn	5,5
Schweinelunge	6,0
Schweinedarm	7,0
Humane Niere	6,0
Humane Leber	6,3
Humaner Darm	7,0

Die Identifizierung der durch die HPLC-Trennung gewonnenen Signalflächen erfolgte anhand von Standardlösungen von Benzamidoxim und Benzamidin, die als Einzelsubstanzen oder als Gemisch eingespritzt und analysiert wurden. Anhand der übereinstimmenden Retentionszeiten mit diesen Standards ließen sich die bei den Inkubationen gebildeten Metaboliten eindeutig identifizieren.

Selbst bei Veränderung des Fließmittels stimmten die Signalflächen mit denen der Standardlösungen überein. In Abb. 3-12 ist ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm zweier Inkubationen mit humanen Nierenmikrosomen wiedergegeben. Man sieht zum Vergleich unter (A) das Chromatogramm einer Inkubation ohne Zusatz des Cosubstrates NADH und unter (B) das eines Komplettansatzes. Nur bei (B) läßt sich bei etwa 14 min Benzamidin detektieren, bei (A) wurde kein Benzamidin gebildet.

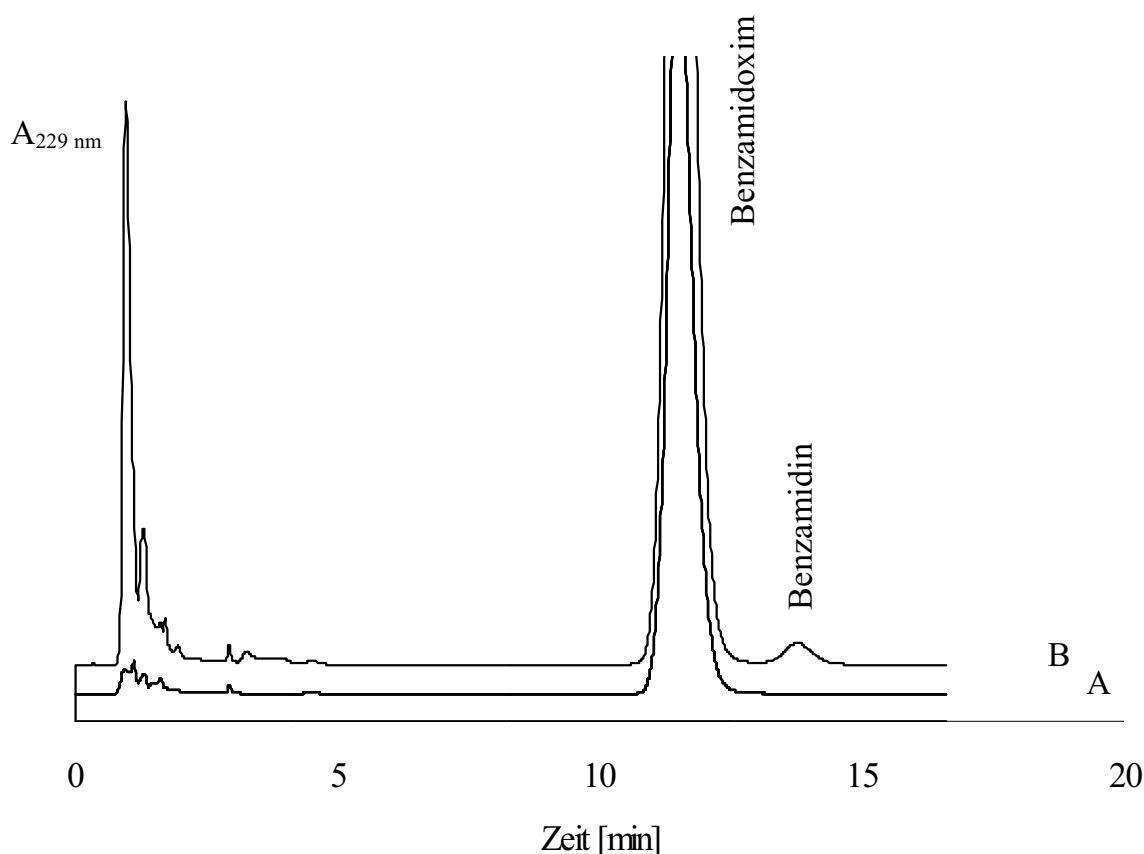


Abb. 3-12: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Eluate der Inkubationen von Benzamidoxim mit humanen Nierenmikrosomen, (A) ohne Cosubstrat, (B) im Komplettansatz mit Cosubstrat. Inkubation und Aufarbeitung erfolgten nach der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methode.

Die in den oben bereits aufgeführten Abhängigkeiten ermittelten optimalen Bedingungen wurden für jede Mikrosomenart in eine abschließende Inkubation eingesetzt, aus der sich die in Tabelle 3-6 für Schweineorgane und Abbildung 3-13 für humane Organe zusammengefaßten Umsetzungsdaten ergaben. Die enzymatische Entstehung von Benzamidin aus dem eingesetzten Substrat Benzamidoxim konnte für jede untersuchte mikrosomale Enzympräparation gezeigt werden, wobei NADH im Vergleich zu NADPH immer das bevorzugte Cosubstrat darstellte. Inkubationsansätze, die kein Cosubstrat, kein Substrat oder kein Protein enthielten, zeigten keine oder deutlich geringere Umsetzungen.

Tab. 3-6: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch verschiedene aus Schweineorganen gewonnene Mikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. SD, Standardabweichung; ND, nicht detektierbar.

Inkubationsansatz	Niere	Leber	Gehirn	Lunge	Darm
nmol Benzamidin/min x mg Protein \pm SD					
komplett	26,1 \pm 2,05	6,2 \pm 0,18	1,3 \pm 0,01	1,5 \pm 0,13	0,2 \pm 0,01
- NADH	0,73 \pm 0,46	ND	ND	ND	0,02 \pm 0,01
- Substrat	0,19 \pm 0,19	ND	ND	ND	ND
- NADH/ + NADPH	11,27 \pm 0,43	2,35 \pm 0,08	0,51 \pm 0,01	0,95 \pm 0,15	0,04 \pm 0,01
nmol Benzamidin/min \pm SD					
- Protein	0,58 \pm 0,23	ND	ND	ND	ND

Alle Werte statistisch signifikant zum Komplettansatz mit $p < 0,001$ (Student's t-Test).

Diese Untersuchungen wurden für Human- und Schweinepräparationen durchgeführt, sind aber nur für die Schweinemikrosomen ausführlich in Tabelle 3-6 dargestellt. Alle Werte dieser Tabelle zeigten statistisch signifikante Unterschiede zum Komplettansatz mit $p < 0,001$ (Student's t-Test). Bei den humanen Präparationen konnten Umsetzungsraten in den Ansätzen ohne Cosubstrat, ohne Substrat oder ohne Protein nicht detektiert werden. Ebenso zeigten sich in Inkubationsansätzen, die zum Zeitpunkt t_0 zum Denaturieren der Proteine mit Methanol abgestoppt worden waren, keine

erkennbaren Umsetzungen. Bei den humanen Lebermikrosomen (2) fehlt das Ergebnis der Umsetzung bei pH 7,4, da diese Inkubation mangels Protein nicht durchgeführt werden konnte.

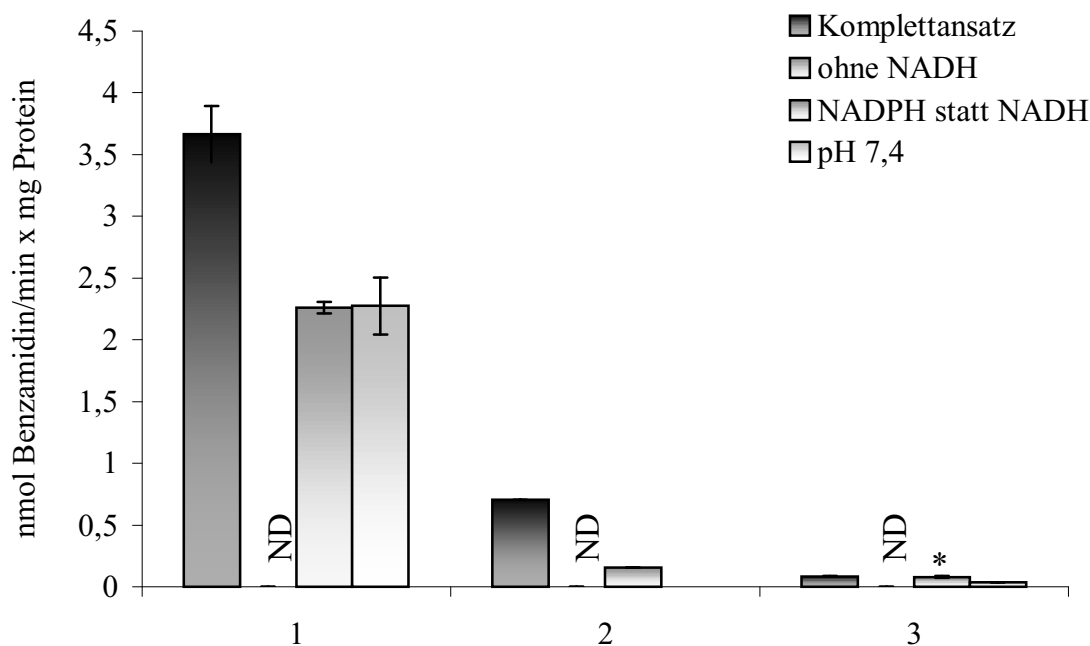


Abb. 3-13: Charakterisierung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch verschiedene humane Mikrosomen. 1, Nierenmikrosomen; 2, Lebermikrosomen; 3, Darmmikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. ND, nicht detektierbar; *, nicht statistisch signifikanter Unterschied zum Komplettersatz mit $p < 0,05$, alle anderen Werte mit $p < 0,005$ (Student's t-Test).

3.3.1.2. Kinetik

Aus einer unter optimierten Bedingungen durchgeführten Inkubation in Abhängigkeit von der Substratkonzentration konnten die Michaelis-Menten-Konstante K_m , die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und die katalytische Effizienz gewonnen werden. Die erzielten Umsetzungsraten mussten dafür nach Lineweaver und Burk doppelt reziprok aufgetragen werden, und nach Extrapolation konnten die kinetischen Parameter ermittelt werden. Für die humanen Nierenmikrosomen ergab sich die in Abbildung 3-14 dargestellte Graphik.

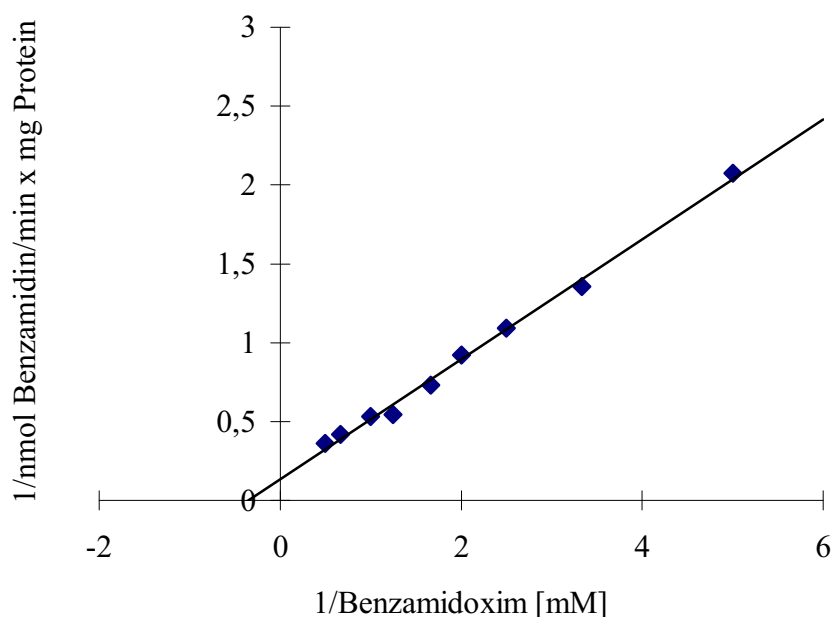


Abb. 3-14: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch humane Nierenmikrosomen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Darstellung nach Lineweaver-Burk). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Die Reduktion zeigte unter optimierten Bedingungen eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 7,4 nmol Benzamidin/min x mg Protein bei einer Michaelis-Menten-Konstante von 2,8 mM. Die erhaltenen Werte für die verschiedenen Enzympräparationen zuzüglich der daraus berechneten katalytischen Effizienz sind in Tabelle 3-7 zusammengefaßt.

Tab. 3-7: Michaelis-Menten-Konstanten K_m , maximale Reaktionsgeschwindigkeiten V_{max} und katalytische Effizienzen der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	K_m	V_{max}	katalyt. Effizienz
	[mM]	[nmol/min x mg]	[min ⁻¹ /mg Protein ⁻¹]
Schweineniere	0,033	166	5,03 x 10 ⁻³
Schweineleber	0,06	5,3	8,83 x 10 ⁻⁵
Schweinehirn	0,049	18,1	3,69 x 10 ⁻⁴
Schweinelunge	0,23	1,7	7,39 x 10 ⁻⁶
Schweinedarm	0,1	0,1	1,0 x 10 ⁻⁶
Humane Niere	2,8	7,4	2,64 x 10 ⁻⁶
Humane Leber	289,6	454,5	1,56 x 10 ⁻⁶

3.3.2 Reduktion von Guanoxabenz durch mikrosomale Fraktionen verschiedener Organe

3.3.2.1. Charakterisierung

Bevor die Umsetzungsraten für die Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch die verschiedenen mikrosomalen Enzympräparationen bestimmt werden konnten, mussten zunächst die optimalen Inkubationsbedingungen für diese Reduktion ermittelt werden. Analog zu den Inkubationen mit Benzamidoxim wurden für die humanen Darmmikrosomen aus den schon erwähnten Gründen immer die Optima der porcinen Darmmikrosomen übernommen, bei der Proteinabhängigkeit nur die Hälfte des ermittelten Wertes.

Für die Ermittlung der für diese Reaktion benötigten Proteinmengen wurden bei ansonsten gleichbleibenden Ansätzen Proteinmengen zwischen 0 µg und 800 µg eingesetzt. In Abb. 3-15 sieht man ein typisches Diagramm der Proteinabhängigkeit. Diese Inkubationen wurden wie bereits beim Substrat Benzamidoxim für jede einzelne Mikrosomenart durchgeführt. Es mußte jeweils die Proteinkonzentration gefunden werden, bei der eine ausreichend hohe Menge an Protein vorlag, sodass die erhaltenen Signalflächen ausgewertet werden konnten, die Reaktion aber noch im linearen Bereich verlief. Aus den Signalflächen wurden mit Hilfe der Kalibrierung die Umsetzungen in nmol Guanabenz/min berechnet. In Abb. 3-15 sieht man eine im Bereich von 20 bis 400 µg Protein annähernd linear verlaufende Umsetzung durch die Schweinenierenmikrosomen. Da bei 200 µg bereits genügend Guanabenz für eine Auswertung gebildet wurde, wurde diese Proteinmenge für den optimierten Inkubationsansatz eingesetzt.

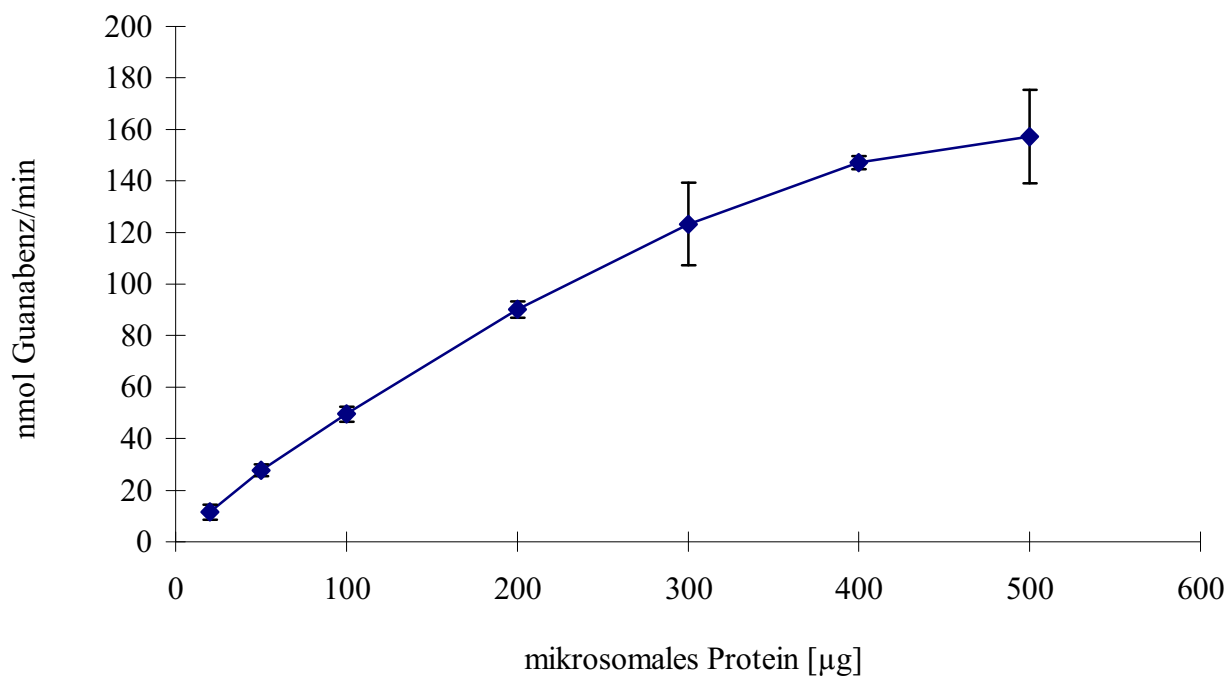


Abb. 3-15: Proteinabhängigkeit der Reduktion von Guinoxabenz zu Guanabenz durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Für die anderen Mikrosomenarten wurde analog vorgegangen und es ergaben sich für die einzelnen Präparationen die in der Tabelle 3-8 zusammengefaßten Proteinmengen.

Tab. 3-8: Optimale Proteinmengen für die Reduktion von Guanoxabenz durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	Proteinmenge [μg]
Schweineniere	100
Schweineleber	200
Schweinehirn	300
Schweinelunge	500
Schweinedarm	600
Humane Niere	300
Humane Leber	300
Humaner Darm	300

Auch die optimalen Substratkonzentrationen mussten ermittelt werden, damit genügend Substrat für die Reaktion zur Verfügung steht und dies nicht den limitierenden Faktor darstellte. Es wurden Konzentrationen zwischen 0 μ M und 3000 μ M Guanoxabenz eingesetzt und Graphen wie in Abbildung 3-16 erhalten. Die als optimal anzusehende Substratkonzentration war diejenige, bei der bereits eine Sättigung mit Substrat aber keinesfalls eine Hemmung durch einen zu großen Überschuß auftrat. Für die Reduktion durch humane Nierenmikrosomen wurde im Folgenden 1,5 mM Guanoxabenz eingesetzt.

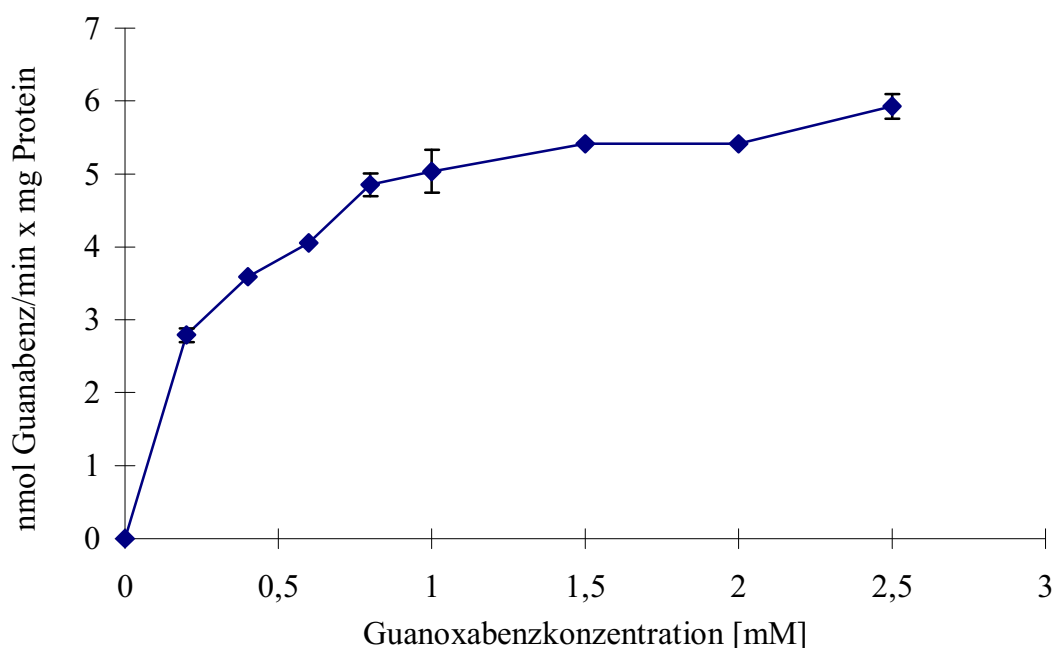


Abb. 3-16: Substratabhängigkeit der Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch humane Nierenmikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Analog zu den humanen Nieren wurde bei den anderen Enzympräparationen vorgegangen. Die resultierenden Substratkonzentrationen sind in Tabelle 3-9 zusammengefaßt. Dabei ergaben sich, wie in der Tabelle ersichtlich, je nach Mikrosomenart Guanoxabenzkonzentrationen von 0,5 bis 3,0 mM.

Tab. 3-9: Optimale Substratkonzentrationen für die Reduktion von Guanoxabenz durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	Substratkonzentration [mM]
Schweineniere	3,0
Schweineleber	1,0
Schweinehirn	1,0
Schweinelunge	1,0
Schweinedarm	1,5
Humane Niere	1,5
Humane Leber	0,5
Humaner Darm	1,5

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit wurde die Inkubationsdauer von 0 min bis 100 min variiert. Wie in Abbildung 3-17 deutlich zu sehen ist, verlief die Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch Schweinenierenmikrosomen über einen Zeitraum von 0 min bis 80 min nahezu linear. Da nach 20 min bereits eine für eine Auswertung genügende Menge an Guanabenz gebildet worden war, wurde diese Zeit für anschließende Inkubationen gewählt.

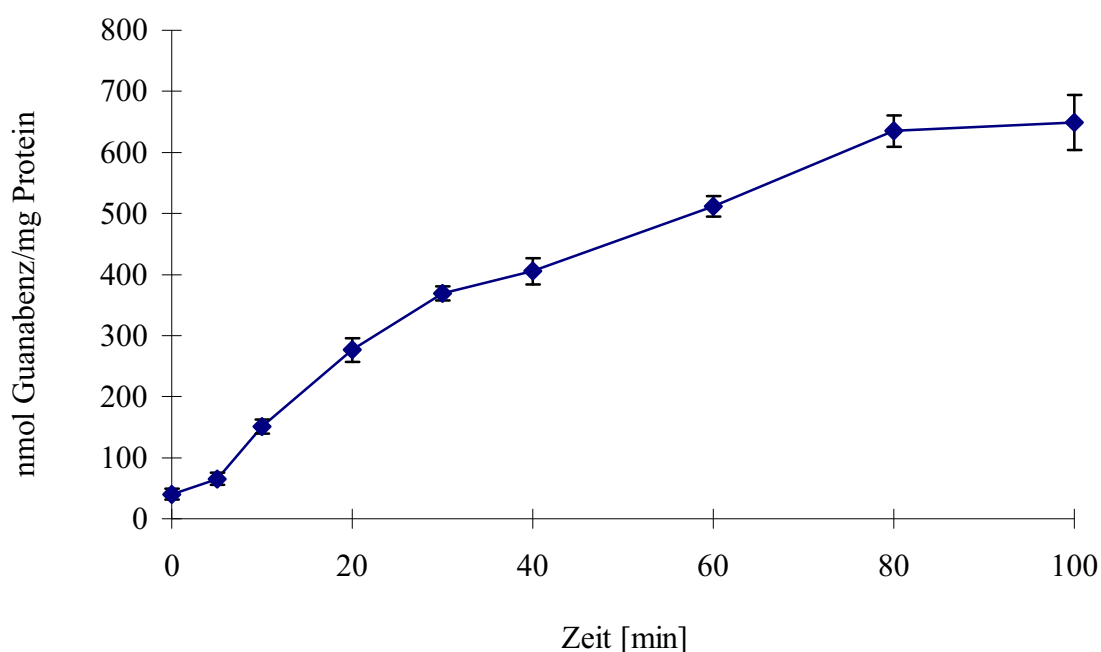


Abb. 3-17: Zeitabhängigkeit der Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Für die übrigen Mikrosomenarten wurden ebensolche Inkubationen durchgeführt, deren optimal einzusetzende Zeiten in Tabelle 3-10 dargestellt sind. Es ergaben sich dabei Werte zwischen 20 und 30 min, die bei der jeweiligen Enzympräparation immer aus dem linearen Bereich gewählt wurden.

Tab. 3-10: Optimale Inkubationszeiten für die Reduktion von Guanoxabenz durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	Inkubationszeit [min]
Schweineniere	20
Schweineleber	30
Schweinehirn	30
Schweinelunge	30
Schweinedarm	30
Humane Niere	30
Humane Leber	30
Humaner Darm	30

Für die Erfassung der optimalen Cosubstratkonzentration für die Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz wurden NADH-Konzentrationen im Bereich von 0 mM bis 2,0 mM für alle mikrosomalen Präparationen durchgetestet. Für humane Nierenmikrosomen ergab sich der in Abbildung 3-18 dargestellte Graph. Wie in der Abbildung deutlich zu sehen, war ab einer Konzentration von 0,8 mM NADH keine Steigerung der Reduktion mehr zu erzielen. Eine Konzentration von 1,0 mM zeigte die gleichen Umsetzungen und wurde für die Inkubationen mit humanen Nierenmikrosomen im Folgenden eingesetzt. Die anderen mikrosomalen Präparationen wurden ebenso vermessen und die Ergebnisse aus diesen Inkubationen sind in Tabelle 3-11 zusammengefaßt.

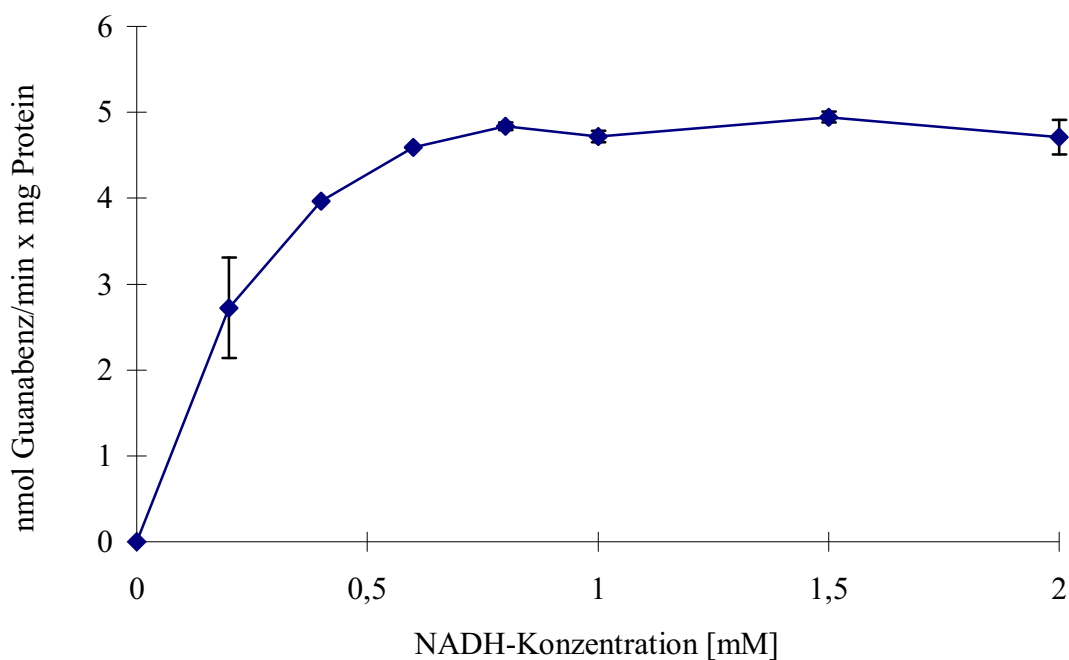


Abb. 3-18: Cosubstratabhängigkeit der Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch humane Nierenmikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Tab. 3-11: Optimale Cosubstratkonzentrationen für die Reduktion von Guanoxabenz durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	NADH-Konzentration [mM]
Schweineniere	0,5
Schweineleber	0,5
Schweinehirn	1,0
Schweinelunge	0,8
Schweinedarm	0,5
Humane Niere	1,0
Humane Leber	1,0
Humaner Darm	0,5

Die pH-Abhängigkeit der einzelnen Mikrosomenarten wurde mit Phosphatpuffern über einen Bereich von pH 4,0 bis 8,0 vermessen. Es sollte der pH-Wert ermittelt werden, bei dem sich für die jeweilige Präparation die besten Umsetzungsraten ergaben. Diese Erkenntnisse waren auch von Bedeutung, um später Aussagen über die reduktive Leistungsfähigkeit der einzelnen Enzympräparationen im Vergleich machen zu können und eventuelle Übereinstimmungen zu entdecken. Die Umsetzungen bei den verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 3-19 beispielhaft für die Schweinedarmmikrosomen dargestellt. Im sauren pH-Bereich unter pH 5,5 wurden hier keine Inkubationen durchgeführt, da das Optimum im leicht sauren bis neutralen Milieu vermutet wurde. Tatsächlich konnten die höchsten Umsetzungen bei pH 7,0 festgestellt und dieser pH-Wert für die weiteren Inkubationen eingesetzt werden.

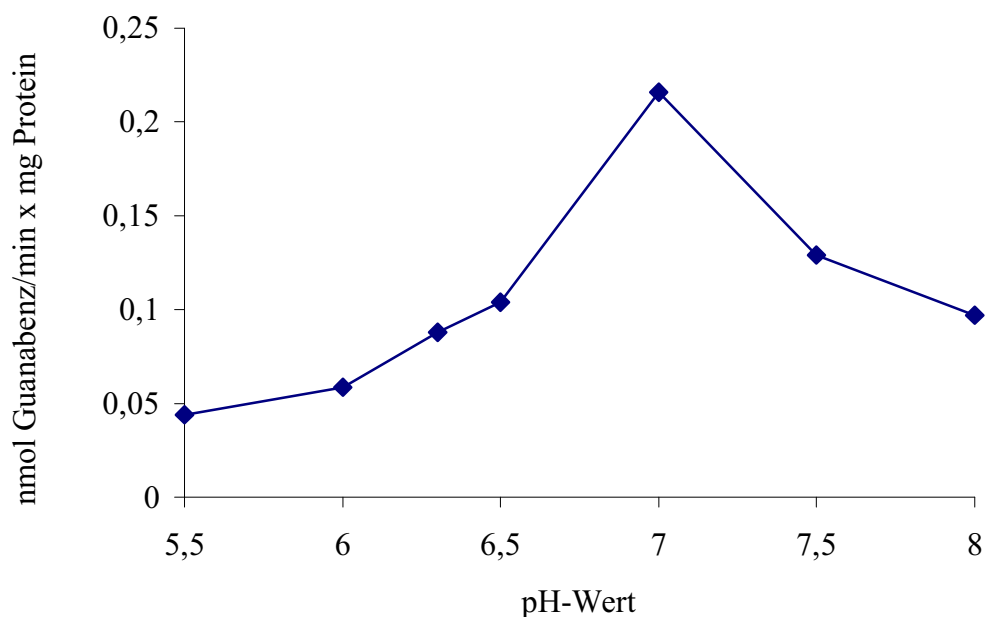


Abb. 3-19: pH-Wertabhängigkeit der Reduktion von Guanoxanthin zu Guanin durch Schweinedarmmikrosomen. Die Umsatzraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Für die anderen mikrosomalen Präparationen wurde die pH-Abhängigkeit auf die gleiche Art und Weise ermittelt. Es ergaben sich unterschiedliche Optima mit Variationen von 6,0 bis 7,0, wie der Tabelle 3-12 zu entnehmen ist. Die hier angegebenen Werte wurden jeweils für die Folgeinkubationen mit der entsprechenden Enzympräparation übernommen.

Tab. 3-12: pH-Wert-Optima für die Reduktion von Guanoxabenz durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	pH-Wert
Schweineniere	6,3
Schweineleber	6,3
Schweinehirn	6,5
Schweinelunge	6,0
Schweinedarm	7,0
Humane Niere	6,5
Humane Leber	6,3
Humaner Darm	7,0

Die Identifizierung der durch die HPLC-Trennung gewonnenen Signalflächen erfolgte anhand von Standardlösungen von Guanoxabenz und Guanabenz, die als Einzelsubstanzen oder auch gemeinsam eingespritzt und analysiert wurden. Anhand der mit den Standardlösungen übereinstimmenden Retentionszeiten ließen sich die bei den Inkubationen gebildeten Metaboliten eindeutig identifizieren. Selbst bei Variation der Fließmittelzusammensetzung stimmten die Signalflächen mit den Standardlösungen überein.

In Abb. 3-20 ist ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm zweier Inkubationen mit humanen Nierenmikrosomen wiedergegeben. Man sieht zum Vergleich unter (A) das Chromatogramm einer Inkubation ohne Zusatz des Cosubstrates NADH und unter (B) das eines Komplettansatzes. Nur bei (B) läßt sich bei etwa 19 min der Metabolit Guanabenz detektieren, bei (A) wurde kein Guanabenz gebildet.

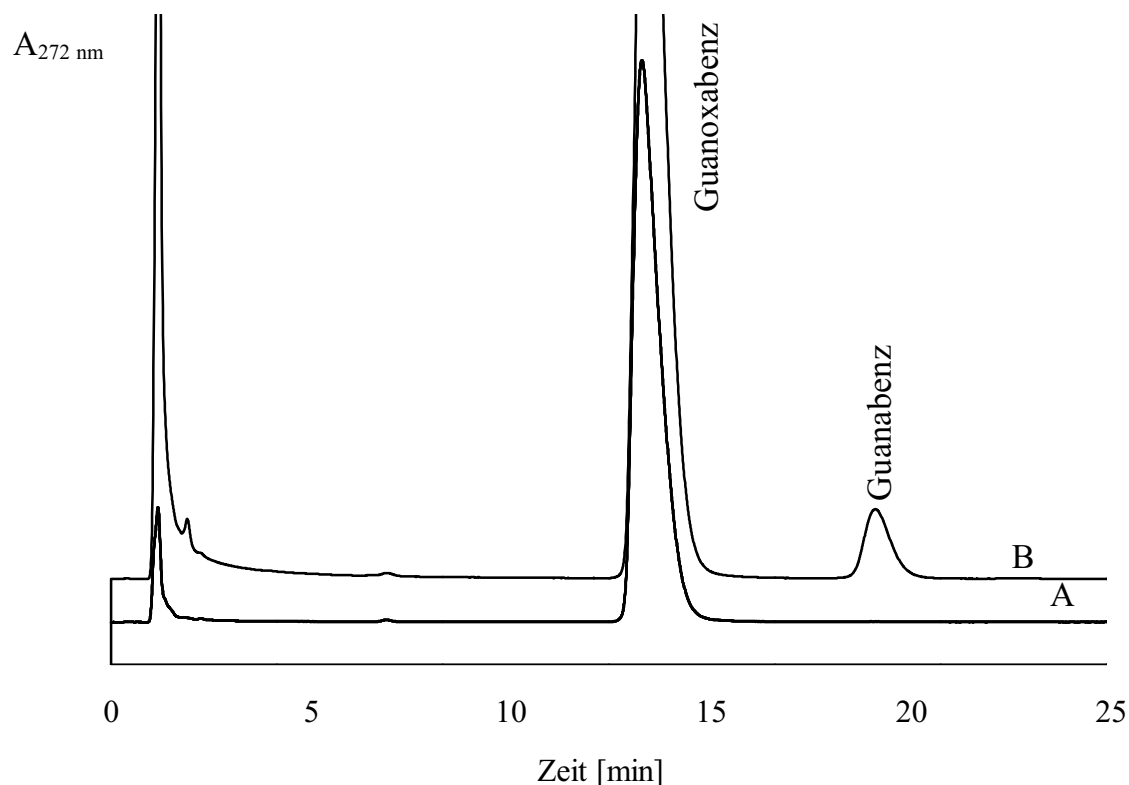


Abb. 3-20: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Eluate der Inkubationen von Guanoxabenz mit humanen Nierenmikrosomen, (A) ohne Cosubstrat, (B) im Komplettansatz mit Cosubstrat. Inkubation und Aufarbeitung erfolgten nach der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Methode.

Die in den oben bereits aufgeführten Abhängigkeiten ermittelten optimalen Bedingungen wurden für jede Mikrosomenart in eine abschließende Inkubation eingesetzt, aus der sich die in Tabelle 3-13 und Abbildung 3-21 zusammengefaßten Umsatzraten ergaben. Die enzymatische Entstehung von Guanabenz aus dem eingesetzten Substrat Guanoxabenz konnte für jede untersuchte mikrosomale Enzympräparation gezeigt werden, wobei NADH im Vergleich zu NADPH immer das bevorzugte Cosubstrat darstellte. Inkubationsansätze, die kein Cosubstrat, kein Substrat oder kein Protein enthielten, zeigten keine oder deutlich geringere Umsetzungen.

Tab. 3-13: Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch die verschiedenen aus Schweineorganen gewonnenen Mikrosomen. Die Umsatzraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. SD, Standardabweichung; ND, nicht detektierbar.

Inkubationsansatz	Niere	Leber	Gehirn	Lunge	Darm
nmol Guanabenz/min x mg Protein \pm SD					
komplett	66,9 \pm 2,9	8,1 \pm 0,06	6,1 \pm 0,01	1,3 \pm 0,07	0,2 \pm 0,01
- NADH	1,32 \pm 0,01	0,01 \pm 0	1,01 \pm 0,47	ND	0,02 \pm 0
- Substrat	ND	ND	0,03 \pm 0,11	ND	ND
- NADH/ + NADPH	11,87 \pm 0,24	3,43 \pm 0,01	2,05 \pm 0,1	0,85 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01
nmol Guanabenz/min \pm SD					
- Protein	1,14 \pm 0,27	ND	0,83 \pm ,19	ND	ND

Alle Werte statistisch signifikant zum Komplettansatz mit $p < 0,001$ (Student's t-Test).

Diese Untersuchungen wurden für Human- und Schweinepräparationen durchgeführt, sind aber nur für die Schweinemikrosomen ausführlich in Tabelle 3-13 dargestellt. Alle Werte dieser Tabelle zeigten statistisch signifikante Unterschiede zum Komplettansatz mit $p < 0,001$ (Student's t-Test). Bei den humanen Präparationen

(Abb. 3-21) konnten Umsetzungsdaten in den Ansätzen ohne Cosubstrat, ohne Substrat oder ohne Protein nicht detektiert werden. Ebenso zeigten sich in Inkubationsansätzen, die zum Zeitpunkt t_0 zum Denaturieren der Proteine mit Methanol abgestoppt worden waren, keine erkennbaren Umsetzungen. Bei den humanen Lebermikrosomen (2) fehlt das Ergebnis der Umsetzung bei pH 7,4, da diese Inkubation mangels Protein nicht durchgeführt wurde.

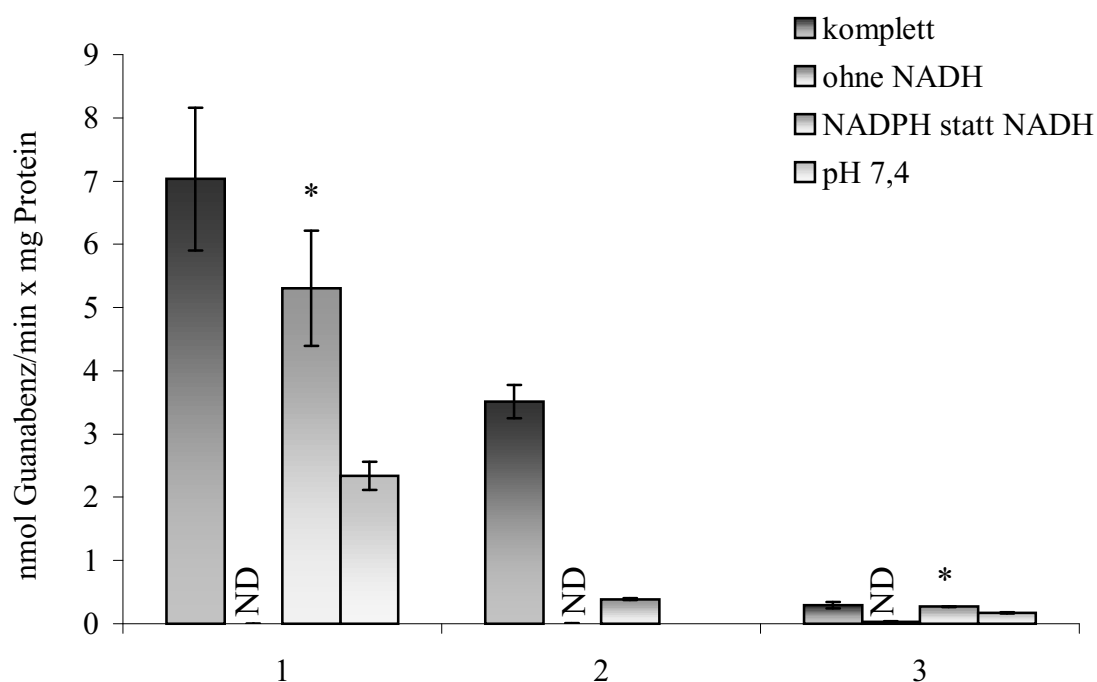


Abb. 3-21: Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch verschiedene humane Mikrosomen. 1, Nierenmikrosomen; 2, Lebermikrosomen; 3, Darmmikrosomen. Die Umsetzungsdaten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. ND, nicht detektierbar; *, kein statistisch signifikanter Unterschied zum Komplettansatz mit $p < 0,05$, alle anderen Werte mit $p < 0,005$ (Student's t-Test).

3.3.2.2. Kinetik

Aus einer unter optimierten Bedingungen durchgeführten Inkubation in Abhängigkeit von der Substratkonzentration konnten die Michaelis-Menten-Konstante K_m , die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und die katalytische Effizienz für die Reduktion von Guanoxabenz gewonnen werden. Die erzielten Umsetzungsraten mussten dafür nach Lineweaver und Burk doppelt reziprok aufgetragen werden, und nach Extrapolation konnten die kinetischen Parameter ermittelt werden. Für die humanen Nierenmikrosomen ergab sich die in Abbildung 3-22 dargestellte Graphik.

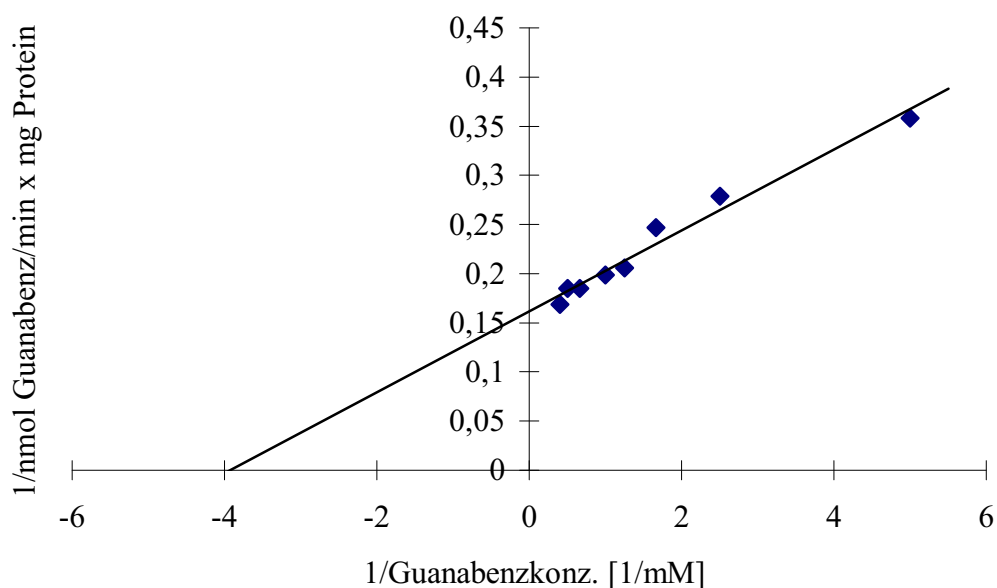


Abb. 3-22: Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch humane Nierenmikrosomen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Darstellung nach Lineweaver-Burk). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Die Reduktion zeigte unter optimierten Bedingungen eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 0,26 nmol Guanabenz/min x mg Protein bei einer Michaelis-Menten-Konstante von 6,2 mM. Die erhaltenen Werte für sämtliche verschiedenen Enzympräparationen zuzüglich der daraus berechneten katalytischen Effizienz sind in Tabelle 3-14 zusammengefaßt.

Tab. 3-14: Michaelis-Menten-Konstanten K_m , maximale Reaktionsgeschwindigkeiten V_{max} und katalytische Effizienzen der Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	K_m	V_{max}	katalyt. Effizienz
	[mM]	[nmol/min x mg]	[min ⁻¹ /mg Protein ⁻¹]
Schweineniere	0,51	181	$3,55 \times 10^{-4}$
Schweineleber	0,19	8,64	$4,55 \times 10^{-5}$
Schweinehirn	0,25	2,24	$8,96 \times 10^{-6}$
Schweinelunge	0,15	1,46	$9,73 \times 10^{-6}$
Schweinedarm	12,1	1,4	$1,16 \times 10^{-7}$
Humane Niere	0,26	6,19	$2,38 \times 10^{-5}$
Humane Leber	0,21	3,85	$1,83 \times 10^{-5}$

3.3.3 Reduktion von Ro 48-3656 durch mikrosomale Fraktionen verschiedener Organe

3.3.3.1. Charakterisierung

Bevor die Umsetzungsraten für die Reduktion vom Sibrafiban-Metaboliten Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch die verschiedenen mikrosomalen Enzympräparationen bestimmt werden konnten, mussten zunächst die optimalen Inkubationsbedingungen für diese Reduktion ermittelt werden. Da nur sehr wenig Substrat zur Verfügung stand, wurden die verschiedenen Reaktionsparameter nur mit den Schweinenierenmikrosomen untersucht. Die hier erhaltenen Werte wurden dann für die anderen mikrosomalen Enzympräparationen übernommen.

Für die Ermittlung der für diese Reaktion benötigten Proteinmengen wurden bei ansonsten gleichbleibenden Ansätzen Proteinmengen zwischen 0 μg und 600 μg eingesetzt. Abb. 3-23 zeigt den Graphen der Proteinabhängigkeit. Es musste die Proteinkonzentration gefunden werden, bei der eine ausreichend hohe Menge an Protein vorlag, sodass die erhaltenen Signalflächen ausgewertet werden konnten, die Reaktion aber noch im linearen Bereich verlief. Aus den Signalflächen wurden mit Hilfe der Kalibrierung die Umsetzungen in nmol Ro 44-3888/min berechnet. In Abb. 3-23 sieht man eine im Bereich von 100 bis 400 μg Protein annähernd linear verlaufende Umsetzung durch die Schweinenierenmikrosomen, bei höheren Proteinkonzentrationen hat die Substratkonzentration wahrscheinlich nicht mehr für eine Steigerung ausgereicht. Eine Proteinmenge von 400 μg erzielte ausreichend hohe Umsetzungsraten für die Detektion und wurde daher für den optimierten Inkubationsansatz eingesetzt.

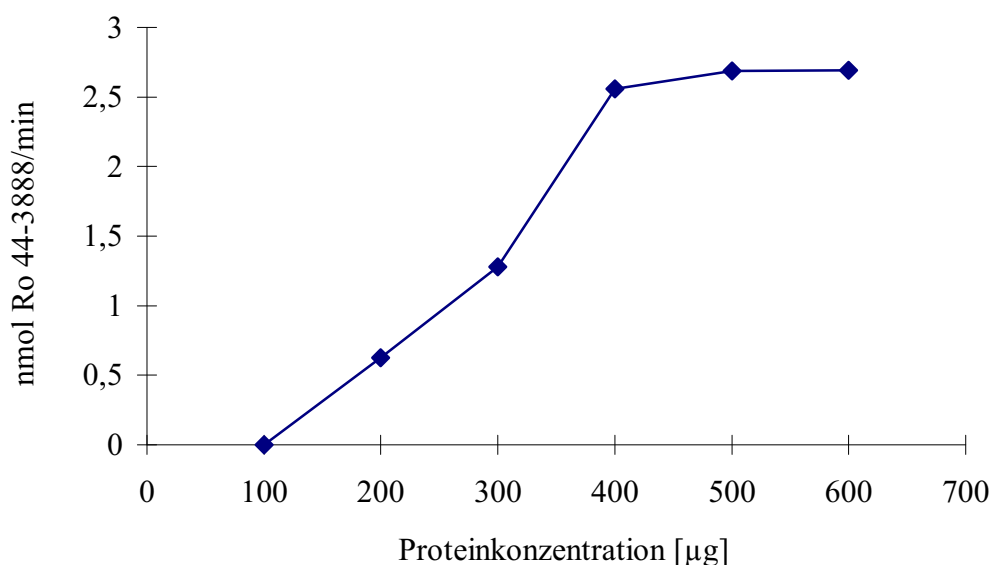


Abb. 3-23: Proteinabhängigkeit der Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Aufgrund der Substratknappheit wurden für die übrigen Mikrosomenarten die Proteinmengen in Anlehnung an die, die bei den beiden bereits untersuchten Substraten verwendet wurden, eingesetzt und es ergaben sich für die einzelnen Präparationen die in der Tabelle 3-15 zusammengefaßten Proteinmengen.

Tab. 3-15: Optimale Proteinmengen für die Reduktion von Ro 48-3656 durch verschiedene mikrosomale Präparationen.

Mikrosomale Präparation	Proteinmenge [μg]
Schweineniere	400
Schweineleber	400
Schweinehirn	600
Schweinelunge	1000
Schweinedarm	1000
Humane Niere	800
Humane Leber	1000
Humaner Darm	300

Auch die optimalen Substratkonzentrationen mussten ermittelt werden, damit genügend Substrat für die Reaktion zur Verfügung steht und dies nicht der limitierende Faktor ist. Es wurden Konzentrationen zwischen 0 μM und 2500 μM Ro 48-3656 eingesetzt und der in Abbildung 3-24 dargestellte Graph erhalten.

Die optimale Substratkonzentration war diejenige, bei der bereits eine Sättigung mit Substrat aber keinesfalls eine Hemmung durch zu hohen Überschuss auftrat. Für die Reduktion durch Schweinenierenmikrosomen wurde 2 mM Ro 48-3656 gewählt, da bei diesem Wert bereits ein leichtes Abflachen der Kurve feststellbar war. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der nur geringen zur Verfügung stehenden Menge nicht untersucht oder eingesetzt werden. Für die anderen Enzympräparationen wurde ebenfalls die Konzentration von 2 mM Ro 48-3656 eingesetzt.

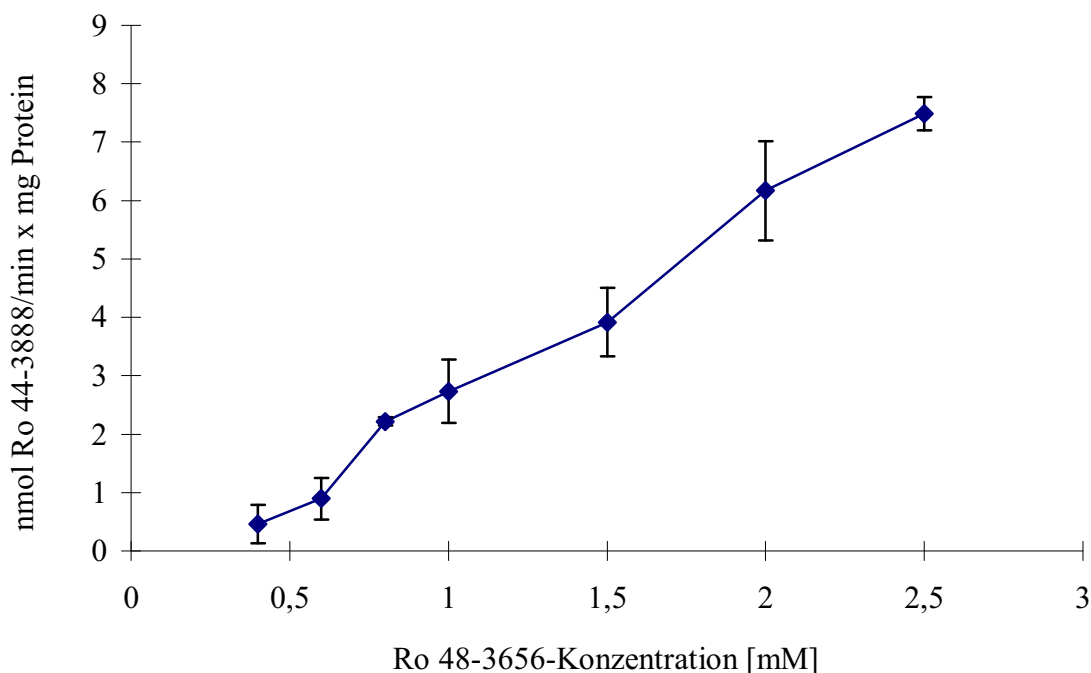


Abb. 3-24: Substratabhängigkeit der Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Zur Ermittlung der Inkubationszeit wurde die Inkubationsdauer von 0 min bis 100 min variiert. Wie in Abbildung 3-25 deutlich zu sehen ist, verlief die Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch Schweinenierenmikrosomen über einen Zeitraum von 0 min bis 40 min nahezu linear. Da nach 30 min bereits eine für eine Auswertung genügende Menge an Ro 44-3888 gebildet worden war, wurde diese Zeit für anschließende Inkubationen übernommen. Für die übrigen Mikrosomenarten wurde ebenfalls 30 min als optimal einzusetzende Zeit gewählt.

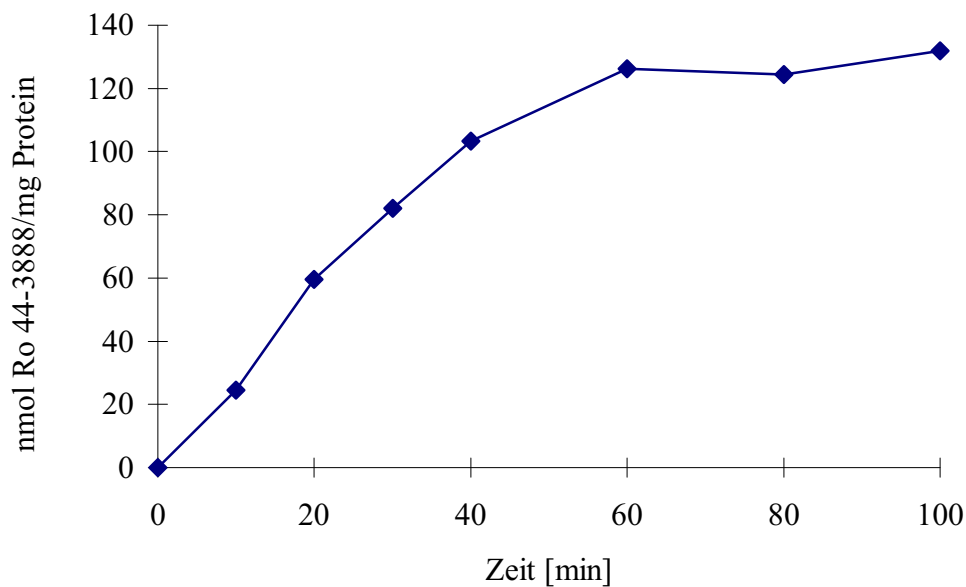


Abb. 3-25: Zeitabhängigkeit der Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsatzraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Für die Ermittlung der optimalen Cosubstratkonzentration für die Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 wurden NADH-Konzentrationen im Bereich von 0 mM bis 2,0 mM für alle mikrosomalen Präparationen durchgetestet. Für Schweinenierenmikrosomen ergab sich der in Abbildung 3-26 dargestellte Graph. Wie in der Abbildung deutlich zu sehen ist, war ab einer Konzentration von 0,8 mM NADH keine Steigerung der Reduktion mehr zu erzielen. Diese Konzentration wurde daher für die Inkubationen mit Schweinenierenmikrosomen und anderen mikrosomalen Präparationen gewählt.

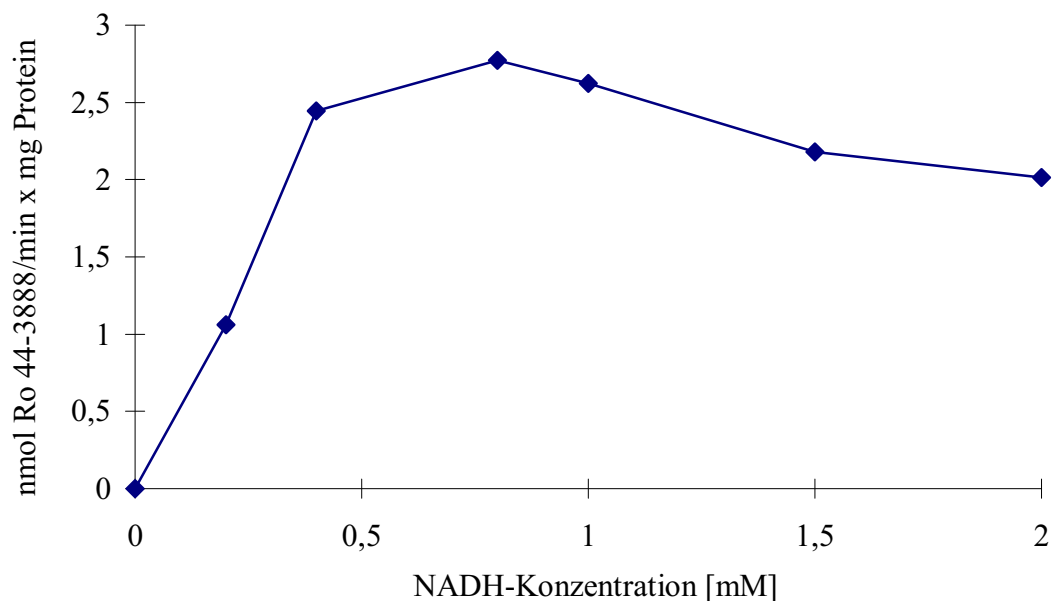


Abb. 3-26: Cosubstratabhängigkeit der Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Die pH-Abhängigkeit wurde mit Phosphatpuffern über einen Bereich von pH 5,0 bis 8,0 vermessen. Es sollte der pH-Wert ermittelt werden, bei dem sich die besten Umsetzungsraten ergaben. Die Umsetzungen bei den verschiedenen pH-Werten sind in Abbildung 3-27 für die Schweinenierenmikrosomen dargestellt. Vom sauren pH-Bereich von 5,0 an stieg die Reduktion stetig an, ab pH 6,5 wurde ein kontinuierlicher Abfall bis pH 8,0 ermittelt. Der pH-Wert von 6,3 konnte als Optimum angesehen werden und wurde für alle Mikrosomenarten für die weiteren Inkubationen eingesetzt.

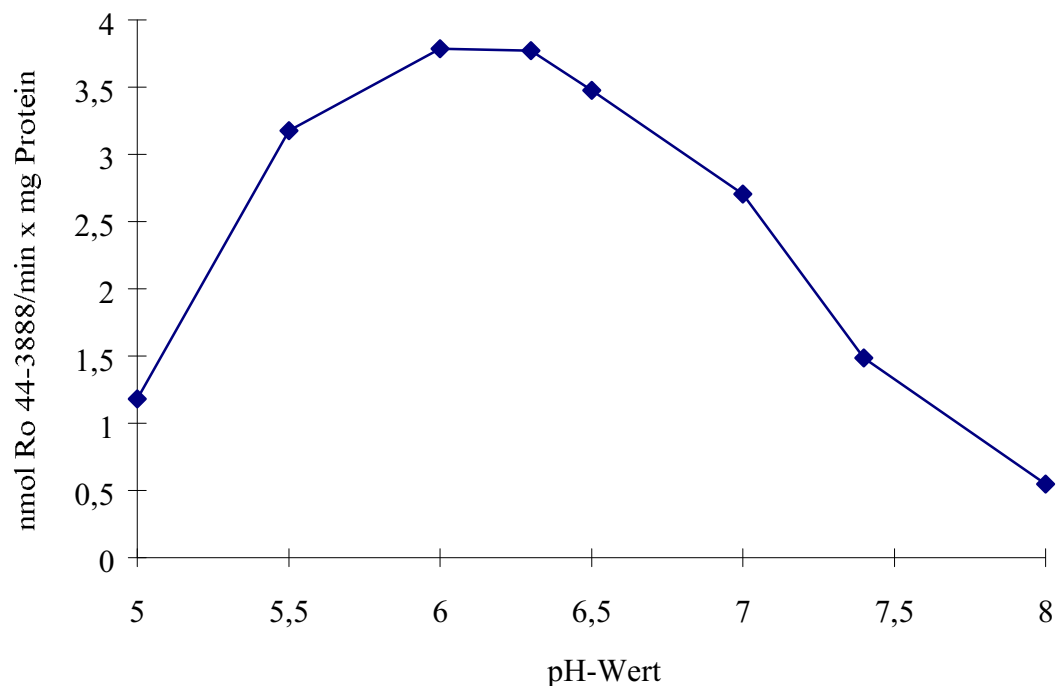


Abb. 3-27: pH-Wertabhängigkeit der Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch Schweinenierenmikrosomen. Die Umsatzraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

Die Identifizierung der durch die HPLC-Trennung gewonnenen Signalflächen erfolgte anhand von Standardlösungen von Ro 48-3656 und Ro 44-3888, die als Einzelsubstanzen oder auch zusammen eingespritzt und analysiert wurden. Anhand der übereinstimmenden Retentionszeiten ließen sich die bei den Inkubationen gebildeten Metaboliten eindeutig identifizieren. In Abb. 3-28 ist ein repräsentatives HPLC-Chromatogramm zweier Inkubationen mit Schweinenierenmikrosomen wiedergegeben. Man sieht zum Vergleich unter (A) das Chromatogramm einer Inkubation ohne Zusatz des Cosubstrates NADH und unter (B) das eines

Komplettansatzes. Nur bei (B) läßt sich Ro 44-3888 bei etwa 6 min detektieren, bei (A) wurde kein Ro 44-3888 gebildet.

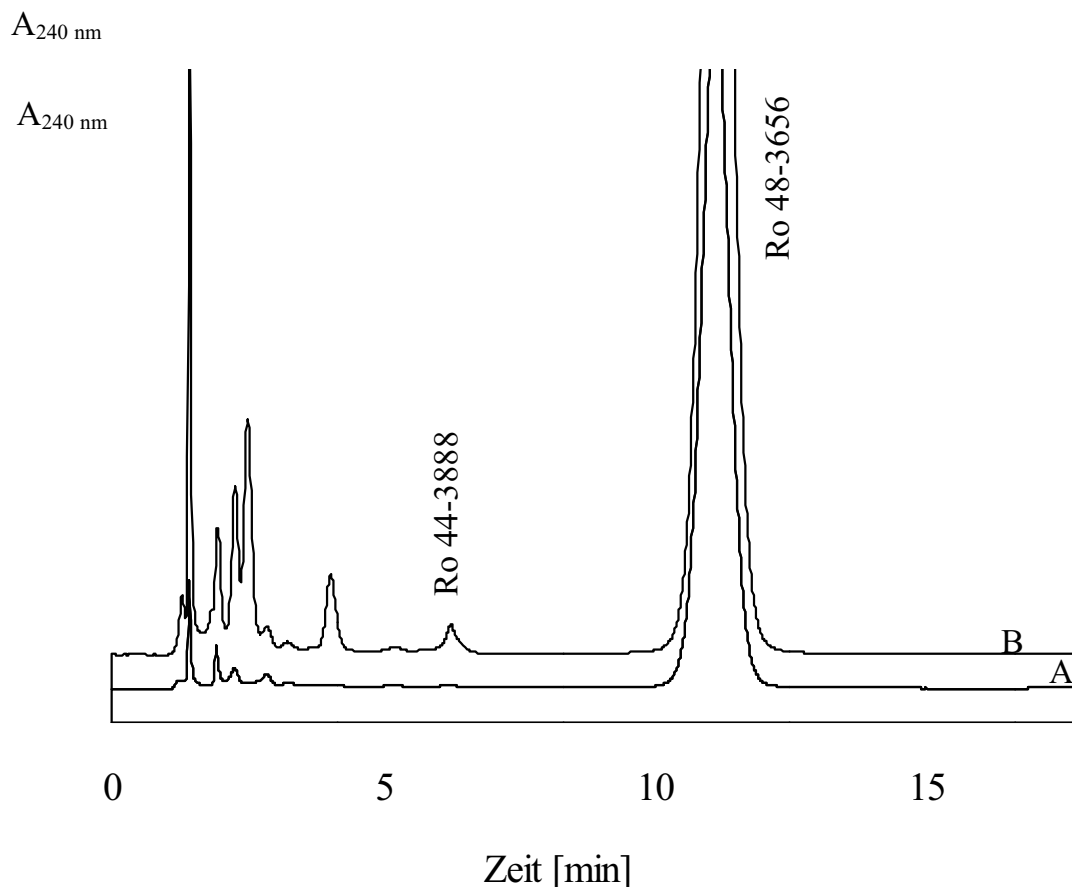


Abb. 3-28: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm der Eluate der Inkubationen von Ro 48-3656 mit Schweinenierenmikrosomen, (A) ohne Cosubstrat, (B) im Komplettansatz mit Cosubstrat. Inkubation und Aufarbeitung erfolgten nach der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Methode.

Die in den oben bereits aufgeführten Abhängigkeiten ermittelten optimalen Bedingungen wurden für jede Mikrosomenart in eine abschließende Inkubation eingesetzt, aus der sich die in Tabelle 3-16 und Abbildung 3-29 zusammengefaßten Umsatzraten ergaben. Die enzymatische Entstehung des wirksamen Metaboliten

Ro 44-3888 aus dem eingesetzten Substrat Ro 48-3656 konnte für jede untersuchte mikrosomale Enzympräparation gezeigt werden, wobei außer bei Nierenmikrosomen kein bevorzugtes Cosubstrat feststellbar war. Die anderen Ansätze mit NADH unterschieden sich nicht signifikant von denen mit NADPH. Inkubationsansätze, die kein Cosubstrat, kein Substrat oder kein Protein enthielten zeigten keine oder deutlich geringere Umsetzungen.

Tab. 3-16: Charakterisierung der Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch die verschiedenen aus Schweineorganen gewonnenen Mikrosomen. Die Umsetzungsdaten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. SD, Standardabweichung; ND, nicht detektierbar.

Inkubationsansatz	Niere	Leber	Gehirn	Lunge	Darm
nmol Ro 44-3888/min x mg Protein \pm SD					
komplett	6,12 \pm 0*	1,5 \pm 0*	0,3 \pm 0*	0,26 \pm 0*	0,13 \pm 0*
- NADH	ND	0,19 \pm 0	ND	ND	ND
- Substrat	ND	ND	ND	ND	ND
- NADH/ + NADPH	4,47 \pm 0*	1,48 \pm 0	0,38 \pm 0	0,37 \pm 0,02	0,16 \pm 0*
nmol Ro 44-3888/min \pm SD					
- Protein	ND	0,05 \pm 0*	ND	ND	ND

*, statistisch signifikant zum Komplettansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

Diese Untersuchungen wurden für Human- und Schweinepräparationen durchgeführt, sind aber nur für die Schweinemikrosomen ausführlich in Tabelle 3-16 dargestellt. Alle Werte dieser Tabelle zeigten statistisch signifikante Unterschiede zum Komplettansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) bis auf die drei mit „*“ markierten Werte für die Umsetzungen mit NADPH. Bei den humanen Präparationen konnten nur geringe Umsetzungsraten in den Ansätzen ohne Cosubstrat, ohne Substrat oder ohne Protein detektiert werden. Ebenso zeigten sich in Inkubationsansätzen, die zum Zeitpunkt t_0 zum Denaturieren der Proteine mit Methanol abgestoppt worden waren, minimale Umsetzungen.

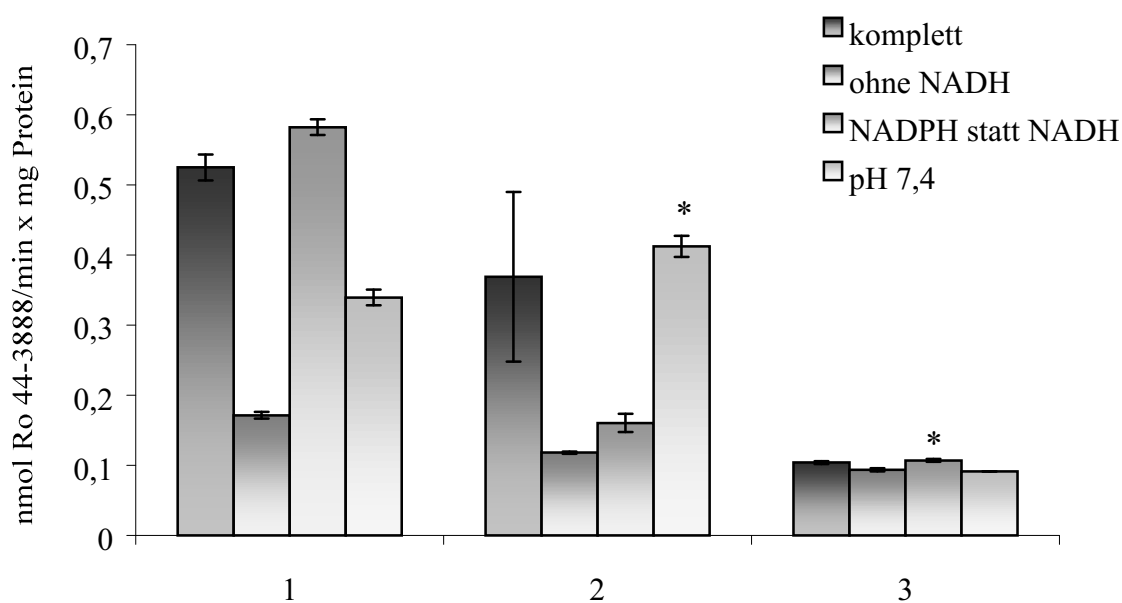


Abb. 3-29: Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch verschiedene humane Mikrosomen. 1, Niere; 2, Leber; 3, Darm. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. *, kein statistisch signifikanter Unterschied zum Komplettansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

3.3.3.2. Kinetik

Aus einer unter optimierten Bedingungen durchgeführten Inkubation in Abhängigkeit von der Substratkonzentration konnten die Michaelis-Menten-Konstante K_m , die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und die katalytische Effizienz für die Reduktion von Ro 48-3656 gewonnen werden. Die erzielten Umsetzungsraten mussten dafür nach Lineweaver und Burk doppelt reziprok aufgetragen werden, und nach Extrapolation konnten die kinetischen Parameter ermittelt werden. Diese Inkubation wurde aufgrund Substratmangels nur mit Schweinenierenmikrosomen durchgeführt und es ergab sich die in Abbildung 3-30 dargestellte Graphik.

Die Reduktion zeigte unter optimierten Bedingungen eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von 8 nmol Ro 44-3888/min x mg Protein bei einer Michaelis-Menten-Konstante von 4,03 mM. Die katalytische Effizienz, $V_{max} : K_m$, beträgt für die Reduktion von Ro 48-3656 durch Schweinenierenmikrosomen $1,99 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}/\text{mg Protein}^{-1}$.

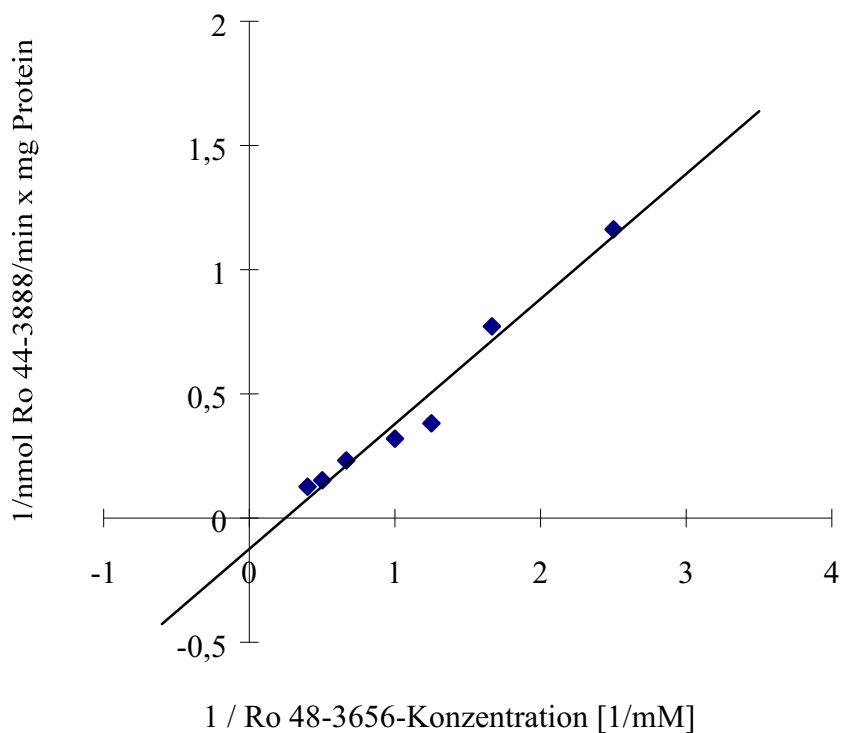


Abb. 3-30: Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888 durch Schweinenierenmikrosomen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Darstellung nach Lineweaver-Burk). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

3.4 DISKUSSION

In dieser Arbeit sollten erstmals Mikrosomen aus verschiedenen Organen mit drei Substraten umgesetzt werden, um das Vorhandensein von extrahepatischen reduktiven Enzymsystemen, wie Cytochrom b₅, NADH-Cytochrom b₅ Reduktase und einem P450 Isoenzym zu untersuchen. Die in dieser Arbeit eingesetzten *N*-hydroxylierten Verbindungen Benzamidoxim, Guanoxabenz und Ro 48-3656 (siehe Abbildungen 3-1, 3-2 und 3-3) waren von ihrer chemischen Struktur her entweder Amidoxime oder *N*-Hydroxyamidinohydrazone. Beide Strukturen können durch reduktive Enzympräparationen dehydroxyliert werden, sodass als Metaboliten Amidine bzw. Amidinohydrazone resultieren.

Für Benzamidoxim war bisher nur die Reduktion durch Lebermikrosomen beschrieben worden [Clement *et al.*, 1997]. Für Guanoxabenz liegen neben den Untersuchungen mit Lebermikrosomen [Demesmaeker, 1996] auch Arbeiten vor, die cytosolische Reduktionen beschreiben [Dambrova *et al.*, 1998a; 1998b; Uhlén *et al.*, 1998]. In diesen Arbeiten wird die Reduktion durch cytosolische Fraktionen verschiedener Organe beschrieben, wobei als Elektronendonatoren Xanthin oder auch NADH eingesetzt werden können. Aufgrund der Blockade dieser Reduktion durch Allopurinol, einem selektiven Xanthinoxidase-Inhibitor, und den Ergebnissen weiterer Aufreinigungsschritte wird für die cytosolische Reduktion die Xanthinoxidase angenommen [Dambrova *et al.*, 1998b]. Im Rattenhirn konnten Dambrova *et al.* [1998c] ebenfalls die Reduktion von Guanoxabenz nachweisen, die hier jedoch weder durch die Xanthinoxidase noch durch P450 Enzyme katalysiert werden soll.

Umwandlungen des Sibrafibans zur aktiven Verbindung sind zwar in zahlreichen klinischen Studien demonstriert worden [Weller *et al.*, 1996; Newby, 2000], jedoch liegen nur wenige *in vitro* Daten zur Charakterisierung der beteiligten Enzyme vor. In einer weiteren Arbeit des Arbeitskreises wird eine mitochondriale Reduktion des Sibrafibans beschrieben [Deters, 2002].

In allen untersuchten Mikrosomen, sowohl vom Schwein als auch vom Menschen, ließen sich eindeutige Umsetzungen der eingesetzten Amidoxime (bzw. des

N-Hydroxyamidinohydrazons) zu den korrespondierenden Amidinen (bzw. zum Amidinohydrazon) nachweisen. Diese *N*-Dehydroxylierung konnte also für alle drei in dieser Arbeit verwendeten Substrate belegt werden. Folglich beinhalten alle hier untersuchten Organe Enzyme oder Enzymsysteme, die zu solchen Reduktionen von Fremdstoffen in der Lage sind. Der extrahepatische Metabolismus von Fremdstoffen ist somit eher von untergeordneter Bedeutung, scheint aber für die untersuchte Reduktion eine sehr wichtige Rolle zu spielen.

Um zu diesen Ergebnissen zu gelangen, mussten zunächst die Reaktionsbedingungen an die verschiedenen Mikrosomen angepasst werden. Die optimalen Inkubationsbedingungen mussten für jedes Substrat und für jede neue mikrosomale Präparation ermittelt werden, da aufgrund ihrer verschiedenen Herkunft sehr unterschiedliche Werte zu erwarten waren. Es musste jeweils die Proteinkonzentration gefunden werden, bei der eine ausreichend hohe Umsetzung ablief, um die erhaltenen Signalflächen auswerten zu können, die Reaktion aber noch im linearen Bereich verlief. Zudem musste die optimale Substratkonzentration ermittelt werden, bei der bereits eine Sättigung mit Substrat aber keinesfalls eine Hemmung auftrat. Die erforderliche Cosubstratkonzentration für eine optimale Umsetzung musste ebenfalls festgelegt werden. Bei der Zeitabhängigkeit galt es die Zeit zu finden, bei der bereits eine genügende Konzentration an Metabolit entstanden war, um ihn quantifizieren zu können. Und anschließend wurde bei der pH-Abhängigkeit der für die Reduktion optimale pH-Wert gefunden, der nicht unbedingt mit dem physiologischen pH-Wert übereinstimmen musste.

Unter Einbeziehung der optimierten Reaktionsbedingungen wurden für Benzamidoxim die in Tabelle 3-6 aufgeführten Umsetzungen für die Schweinemikrosomen erhalten. Die höchsten Umsetzungen zeigten sich in den Nierenmikrosomen, gefolgt von Leber, Lunge, Gehirn und Darm. Auch bei den humanen Mikrosomen (siehe Abb. 3-13) übertrafen die Ergebnisse der Niere die der Leber, und die schwächste Umsetzung wurde im Darm nachgewiesen. NADH stellte bei beiden Spezies bei allen untersuchten Mikrosomen eindeutig das bevorzugte Cosubstrat dar, eine Beobachtung, die bereits

für die Reduktion durch Lebermikrosomen festgestellt worden war [Möller, 1997]. Alternativ konnte auch NADPH als Cosubstrat eingesetzt werden, aber hierbei ergaben sich in den Umsetzungen maximal 60 % des mit NADH erhaltenen Wertes (siehe Abb. 3-13 bzw. Tab. 3-6).

Bei der Untersuchung von Guanoxabenz zeigte sich ein ähnliches Bild. Bei den Schweinemikrosomen (Tab. 3-13) setzte wieder die Niere am stärksten um, gefolgt von Leber, Gehirn, Lunge und Darm, und bei den humanen Mikrosomen (Abb. 3-21) ergab sich die gleiche Reihenfolge für die Reduktionsfähigkeit wie beim Benzamidoxim. Auch hier zeigten sich mit NADH ganz eindeutig die besten Umsetzungsraten, wohingegen mit NADPH lediglich maximal 75 % entstanden (siehe Abb. 3-21 bzw. Tab. 3-13). Auch für die Reduktion von Guanoxabenz war bereits für Schweinelebermikrosomen die Bevorzugung von NADH beschrieben worden [Lomb, 1995].

Die Reduktion des Ro 48-3656 (Tab. 3-16 und Abb. 3-29) zeigte die gleiche Reihenfolge in der Reduktionsstärke wie die vom Guanoxabenz. Bei diesem Substrat ließ sich jedoch die Bevorzugung von NADH nur für Nierenmikrosomen feststellen. Die Umsetzungsraten mit NADH und NADPH unterschieden sich bei Leber, Gehirn und Lunge nicht signifikant voneinander. Bis auf die Reduktionen durch Schweineleber- und Schweinenierenmikrosomen ergaben sich sogar bei der Zugabe von NADPH geringfügig höhere Umsetzungsraten als bei Zugabe von NADH. Die erkennbaren Konzentrationen an Ro 44-3888 in den humanen Ansätzen ohne Zugabe eines Cosubstrates können entweder durch eine Verunreinigung der Ausgangssubstanz Ro 48-3656 mit dem Metaboliten Ro 44-3888 oder eine bereits ausreichende NADH-Konzentration in den Mikrosomen verursacht sein. Eine chemische oder thermische Zersetzung von Ro 48-3656 kann ausgeschlossen werden, weil diesbezüglich durchgeführte Stabilitätsuntersuchungen die Stabilität dieser Substanz belegen können. Selbst bei einer einstündigen Lagerung im Wasserbad bei 37 °C zeigte sich keine Abnahme der Substratkonzentration und nach mehrtägiger Aufbewahrung der gelösten Substanzen bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank waren noch über 97 % der Ausgangskonzentrationen vorhanden.

In zuvor untersuchten Reduktionen mit Lebermikrosomen [Clement *et al.*, 1997] konnte keine Hemmung durch Sauerstoff nachgewiesen werden, weshalb die hier aufgeführten Inkubationen analog zu den Lebermikrosomen ebenfalls im aeroben Milieu durchgeführt wurden.

Erstaunlicherweise waren in beiden Spezies bei allen drei Substraten in der Niere höhere Umsetzungen als in der Leber detektierbar, obwohl letztere eigentlich den Großteil der im Körper stattfindenden Biotransformationen durchführt [Mutschler, 1996]. Zwar werden für die humane Niere auch verschiedene Enzyme, unter anderem Cytochrom P450 1A1, 2D6, 3A4, 4A1, 4A11 und 4A3, als existent beschrieben, aber sie sind in ihrer Konzentration deutlich geringer als in der Leber exprimiert [Park *et al.*, 1995; Lohr *et al.*, 1998]. Auch in der Schweineniere wurden verschiedene P450 Enzyme nachgewiesen [Axén, 1995; Lock und Reed, 1998]. Da aber die Leber im Allgemeinen die höchste P450 Konzentration aller Organe zeigt [Pelkonen und Raunio, 1997], muss dieses Phänomen mit der unterschiedlichen Expression oder Aktivität von P450 Isoenzymen zusammenhängen, oder es sind keine P450 Enzyme beteiligt.

Eine Beteiligung mitochondrialer Enzyme an dieser mikrosomalen Reduktion kann weitgehend vernachlässigt werden, da die eingesetzten Mikrosomen zum Teil durch eine mitochondriale Markerreaktion, den Succinat Cytochrom c Reduktase Assay, in dem die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte Reduktase in Gegenwart des Substrats Natriumsuccinat die Reduktion von Cytochrom c katalysiert, auf mitochondriale Verunreinigungen überprüft wurden (Daten nicht gezeigt) [Sottocasa *et al.*, 1967]. Die Verunreinigungen waren dabei, wie auch in einer parallel durchgeführten Arbeit ausführlich erläutert [Deters, 2002], sehr gering.

Da die Umsetzungsraten immer auf mg Protein bezogen sind, bedeuten die geringeren Raten mit Enzymquellen aus der Leber nicht unbedingt eine schwächere Aktivität der beteiligten Leberenzyme, sondern kann auch darin begründet sein, dass sie nur zu einem viel geringeren Anteil als in der Niere vorliegen.

Die relativ geringen Reduktionsraten in der Lunge und im Gehirn waren zu erwarten, da beide Organe mit ca. 1-3 % des Leber P450 Gehaltes relativ geringe Enzymkonzentrationen besitzen und für den extrahepatischen Metabolismus nicht als besonders aktiv beschrieben werden [Warner und Gustafsson, 1994; Shimada *et al.*, 1992]. Viele hepatisch vorkommende P450 Isoenzyme treten auch in der Lunge auf. Die Literatur beschreibt den Nachweis von 1A1, 2C, 2E1, 3A und 2A6 in humaner Lunge durch Immunoblot [Shimada *et al.*, 1996]. Die metabolische Aktivität der pulmonalen Mikrosomen ist jedoch als gering einzustufen, wie sowohl in dieser Arbeit als auch durch die Literatur belegt wird [Chae *et al.*, 1999]. Grund dafür können die geringen Konzentrationen sein. In der Lunge kommt noch hinzu, dass das Gewebe sehr heterogen ist und über 40 verschiedene Zelltypen besitzt [Park *et al.*, 1995]. In einigen Zelltypen sind relativ hohe P450 Gehälter messbar, wie z.B. in den Clara- oder den Typ-II-Zellen [Forth *et al.*, 1999], in vielen anderen aber kaum, wodurch sich im Endeffekt ein für die gesamte Lunge geringer P450 Gehalt ergibt.

Auch im Hirn haben Ravindranath *et al.* [1995] zu Metabolismusreaktionen fähige Enzyme nachweisen können. Sowohl Phase 1- als auch Phase 2-Enzyme sind in der Literatur beschrieben worden [Krishna und Klotz, 1994]. Hier spielen sie eine entscheidende Rolle bei der lokalen pharmakologischen Aktivierung oder der Biotransformation von Umweltgiften, die ansonsten das Nervensystem angreifen könnten [Ravindranath *et al.*, 1989]. Im Allgemeinen ist die Cytochrom P450 Konzentration im Hirn sehr gering, aber in Cerebellum und im Hirnstamm lassen sich relativ hohe Aktivitäten nachweisen, die in diesen Bereichen einen Metabolismus möglich erscheinen lassen [Bhamre *et al.*, 1992; Pelkonen und Raunio, 1997]. Durch den Einfluß äußerer Faktoren lassen sich die ursprünglich geringen P450 Gehälter durch Induktion steigern. So hat man bei Ratten im Gehirn durch Alkoholkonsum, Lösungsmittelinhalation und Einnahme entsprechend induzierender Arzneistoffe im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren eine Erhöhung der P450 Konzentration auf das 2-6fache erreichen können [Warner *et al.*, 1997]. Die in dieser Arbeit untersuchten Spezies waren jedoch keiner bewußten Induktion ausgesetzt, sodass hier sehr geringe P450 Gehälter, die mit der Methode nach Omura und Sato [1964] nicht einmal

nachgewiesen werden konnten, vorgelegen haben. In Kapitel 2 wurde bereits näher auf diese Bestimmung eingegangen. Die in dieser Arbeit gefundenen geringen Umsetzungen für die Schweinehirnmikrosomen und die bereits in Kapitel 2 aufgeführten geringen P450 Gehälter stimmen sehr gut mit den Angaben der Literatur überein [Bhamre *et al.*, 1992].

Die durch den Einsatz von Darmmikrosomen erhaltenen Reduktionen waren bei allen drei Substraten sehr gering. Da der Dünndarm auch eher als Ort der Resorption und der Dickdarm als Ort der Eindickung der Faeces als die des Metabolismus angesehen werden, ist dies ein bereits erwartetes Ergebnis. Es werden zwar verschiedene Cytochrom P450 Enzyme im Darm beschrieben, aber auch ihre recht geringe Expression. Im humanen Darm findet man 1A1, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 und 3A5, wobei 3A4 die im Intestinum am meisten und 3A5 die im Kolon hauptsächlich exprimierte Form darstellt [Prueksaritanont *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999; Obach *et al.*, 2001]. Nissen *et al.* [1998] beschreiben das Vorkommen von P450 Isoenzymen im porcinen Dünndarm, die sie den Unterfamilien 3A und 2C zuordnen. Sicherlich existieren analog zum humanen Darm noch weitere Isoenzyme im Schweinedarm, jedoch ist die Anzahl relevanter Studien hier noch sehr gering.

Wenn man Überlegungen bezüglich der Reduktionsfähigkeit des Darms anstellt, darf man die dort vorliegende mikrobielle Darmflora nicht außer Acht lassen, da die Mikroorganismen Pharmaka enzymatisch derart verändern können, dass deren Resorption beeinflusst wird [Forth *et al.*, 1998]. Diese Mikroorganismen treten jedoch hauptsächlich im Dickdarm auf. Viele oral eingenommene Arzneistoffe werden schon im Dünndarm fast vollständig resorbiert und kommen daher gar nicht oder nur zu einem sehr kleinen Prozentsatz mit ihnen in Kontakt. Für diese Arbeit und die darin untersuchte Reduktionsleistung dürften diese Mikroorganismen keine große Rolle gespielt haben, da größtenteils Dünndarm verarbeitet wurde und die Darmstücke sehr sorgfältig gereinigt wurden.

Zusammengefaßt ergeben sich bei den Schweinemikrosomen für alle Substrate etwa 10fach höhere Reduktionsraten als bei den humanen Mikrosomen. Dies spricht

zunächst für höhere Konzentrationen und Aktivitäten der zur Reduktion befähigten Enzyme in Organen des Schweins. Allerdings stand bei den humanen Proben immer nur wenig Material zur Verfügung, und zudem können Aktivitätsverluste durch unsachgemäße kurzzeitige Aufbewahrung unmittelbar nach der Organentnahme und vor der Mikrosomenpräparation nicht ganz ausgeschlossen werden. Vielleicht liegt es auch an der besseren Qualität der porcinen Organe, die alle von gesunden Tieren erworben wurden, während das humane Material von erkrankten Personen stammte.

Bei der Beurteilung der Enzymaktivitäten der Schweine ist der Stress zu berücksichtigen, dem die Schweine vor und während der Schlachtung ausgesetzt waren. Es ist erwiesen, dass Schweine sehr empfindlich auf äußere Faktoren wie enges Zusammenstellen, Transporte, Klimafaktoren, Quantität und Qualität von Umweltreizen und Hitzebelastungen reagieren [Mornet *et al.*, 1989]. Wenn die Umgebungstemperatur stark ansteigt, was ohne weiteres während eines längeren Transportes zum Schlachthof passieren kann, steigt ebenfalls die Körpertemperatur des Tieres an, die normalerweise bei 39 °C liegt [Mornet *et al.*, 1989]. Diese Erhöhung führt recht schnell zu einer Veränderung der Futteraufnahme und Verwertung und natürlich auch des Stoffwechsels. Dadurch können sich vermutlich auch die Enzyme in Expression und Aktivität verändern. Eine weitere Temperaturerhöhung mussten die Tiere im Brühltunnel bzw. Brühbad erfahren, wobei beides erst nach dem Tod und auch nur von kurzer Einwirkung war. Dies spricht allerdings eher für niedrigere Aktivitäten der Schweineenzyme. Auch der Transport als solches belastet beim Schwein den Magen-Darm-Trakt, sodass Infekte oder Störungen in diesem Bereich auftreten. Auch dabei wäre eine Beeinflussung der dort vorliegenden Enzyme denkbar. Generell reagieren Schweine auf Stress mit einer Steigerung der Herzfrequenz, einer beschleunigten Atmung, einem Anstieg der Körpertemperatur und im schlimmsten Fall mit einer Muskelstarre und Schock [Mornet *et al.*, 1989]. Es stellt sich nun die Frage, wie stark sich solche Ereignisse auf Enzyme auswirken und so Ergebnisse verändern können. Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere stammten alle aus dem Schlachthof, und es ist nicht bekannt, wie lange sie einem derartigen Stress ausgesetzt waren. Dieser Stressfaktor wäre sicherlich ein interessanter Punkt, den man in einer anderen Arbeit

eingehender untersuchen könnte. Zumal gerade bei P450 Isoenzymen viele Fälle von Induktion oder Inhibition bekannt sind (siehe Kapitel 1.2), und sich bereits Nahrungsveränderungen auf das Isoenzym-Profil innerhalb einer Art auswirken können [Rosenberg, 1991].

Betrachtet man die kinetischen Parameter, so stellt man bei den Michaelis-Menten-Konstanten für die Reduktion von Benzamidoxim für Schweineleber, -leber und -hirn vergleichbare Werte fest, wohingegen Schweinelunge und -darm etwas höhere Werte ergeben. Die humanen Konstanten sind wiederum höher und lassen sich nicht miteinander vergleichen. Eine Erklärung für derart abweichende Konstanten bei dieser Reduktion könnte im Zusammenwirken mehrerer verschiedener Enzymsysteme in den Mikrosomen liegen. Die Michaelis-Menten-Konstanten der Guanoxabenz-Umsetzung liegen alle im gleichen Bereich mit Werten von 0,15 – 0,51 mM, lediglich der Darm ergibt einen höheren Wert. Ein Grund für diese Abweichung kann derzeit noch nicht angegeben werden, aber die Theorie vom additiven Effekt mehrerer Enzymsysteme könnte eine Erklärung geben. Trotz dieser einen Ausnahme sprechen die Ergebnisse eindeutig für die Umsetzung durch das gleiche Enzymsystem in den Organen mit übereinstimmenden Konstanten. Es stellt sich die Frage, ob die Reduktion von Guanoxabenz zu Guanabenz nur durch ein Enzymsystem und die von Benzamidoxim zu Benzamidin durch zwei oder sogar mehrere Enzymsysteme katalysiert wird. Die Beantwortung dieser Fragen wird sicherlich nach weiteren Studien, in denen die Einzelkomponenten aus den Organen gereinigt werden müssen, möglich sein.

Für Ro 48-3656 konnte wegen der geringen Substanzmenge leider keine Studie der kinetischen Parameter mit den verschiedenen Mikrosomen durchgeführt werden, weshalb an dieser Stelle auch keine Vergleiche gezogen werden können. Ebenso sind mit den humanen Darmmikrosomen keine Kinetikstudien der Substanzen Benzamidoxim und Guanoxabenz unternommen worden, da nur eine geringe Menge an diesen Mikrosomen vorlag. Es wäre aber sicher interessant, gerade die humanen Darmmikrosomen näher zu untersuchen, da fast alle oral applizierten Arzneistoffe den Darm passieren müssen und so den dort ablaufenden Metabolismusreaktionen

ausgeliefert sind. Zudem konnten die Ergebnisse der humanen Darmmikrosomen mit Ro 48-3656 bisher nur mit den optimierten Bedingungen der Schweinedarmmikrosomen durchgeführt werden. Bei Einsatz der wirklich optimalen Inkubationsbedingungen sind eventuell gesteigerte Umsetzungsraten zu erzielen, die die Bedeutung des Darms für den extrahepatischen Metabolismus belegen können.

Es stellt sich auf jeden Fall die Frage, ob die in den verschiedenen mikrosomalen Präparationen beobachteten Reduktionen alle von demselben oder nur von ähnlichen Enzymsystemen katalysiert wurden. Eine weitere Möglichkeit bietet sich mit dem Zusammenwirken mehrerer Enzymsysteme, die trotz verschiedener Zusammensetzung die gleiche Reduktion vollziehen. Da mit Mikrosomen und nicht mit gereinigten Enzymen gearbeitet wurde, kann diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden.

Insgesamt lässt sich aber festhalten, dass umfassende Reduktionen sowohl mit Enzymquellen aus dem Schwein als auch aus dem Menschen ablaufen. Wenn auch die Umsetzungsraten mit humanen Mikrosomen generell niedriger sind als die mit porcinen, so stellen die Schweinemikrosomen trotzdem ein sehr gutes Modell zum Studium des reduktiven Metabolismus dar, da alle untersuchten analogen Enzymquellen sowohl vom Menschen als auch vom Schwein Aktivitäten zeigen. Zudem treten sogar vergleichbare Reihenfolgen in den Aktivitäten verschiedener Organe auf. Es zeigt sich auch, dass das Prodrug-Prinzip Amidoxime anstelle von Amidinen auf enzymatische Umwandlungen in vielen Organen beruht und somit eine vollständige Reduktion zu den wirksamen Amidinen garantiert ist.

4 CHARAKTERISIERUNG DES *N*-REDUKTIVEN MIKROSOMALEN ENZYMSYSTEMS VERSCHIEDENER ORGANE

4.1 EINLEITUNG

4.1.1 Bisherige Untersuchungen

In vorangegangenen Studien konnten Clement *et al.* [1988a, 1993a, 1993b] in allen bisher untersuchten Spezies (Ratte, Kaninchen, Schwein und Mensch) ein effektives katalytisches System nachweisen, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zur Reduktion stark basischer *N*-hydroxylierter Verbindungen in der Lage ist. In weiterführenden Studien konnten die Einzelkomponenten eines *N*-reduktiven mikrosomalen Enzymsystems aus Schweineleber bestimmt werden. Die darin beteiligten Komponenten konnten als Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und ein als *Benzamidoxim-Reduktase* bezeichnetes drittes Protein nachgewiesen werden [Lomb, 1995]. Die Reduktion lief sauerstoffunabhängig mit der höchsten Aktivität im schwach sauren Milieu ab und benötigte NADH als Cosubstrat. Damit zeigte dieses Enzymsystem die gleichen Eigenschaften wie die von Kadlubar und Ziegler [1974] aus Schweineleber isolierte Hydroxylamin-Reduktase, von der aber nur zwei Komponenten identifiziert werden konnten.

In weiteren Studien konnten Clement *et al.* [1997] das bis dahin noch unbekanntes an der *N*-Reduktion beteiligte dritte Protein, die *Benzamidoxim-Reduktase*, aus Schweineleber aufreinigen und identifizieren. Die Aminosäuresequenzanalyse ergab eine ausgeprägte Homologie zu Sequenzen der Cytochrom P450 Isoenzymfamilie 2D, einer bis dahin noch nicht beim Schwein beschriebenen Unterfamilie. Über das Kohlenmonoxidspektrum und durch die Katalyse der *O*-Demethylierung von Dextromethorphan (siehe Abb. 4-1), einer charakteristischen Monooxygenasereaktion für Cytochrom P450 Isoenzyme der Unterfamilie 2D, konnte die Zugehörigkeit des gereinigten Proteins aus Schweineleber zu dieser Unterfamilie bestätigt werden

[Möller, 1997]. Das für die gereinigte *Benzamidoxim-Reduktase* erhaltene Molekulargewicht betrug 50 kDa und stimmte mit der Größe verschiedener P450 Isoformen anderer Spezies überein [Möller, 1997].

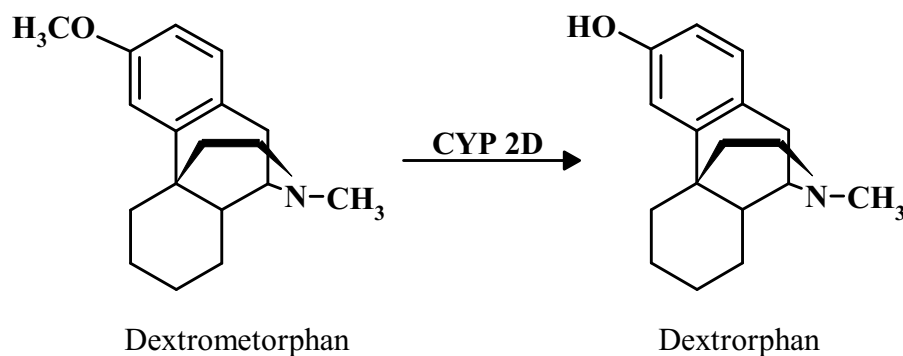


Abb. 4-1: Dextromethorphan-*O*-Demethylierung durch Cytochrom P450 2D [Möller, 1997].

Auch aus humaner Leber ist bereits die Isolierung und Identifizierung der Einzelkomponenten eines *N*-reduktiven Enzymsystems beschrieben worden [Behrens, 1999; Rieckert, 1999]. Dabei zeigten sich die gleichen Eigenschaften wie beim porcinen Enzymsystem. Die humane *Benzamidoxim-Reduktase* stellte ebenfalls ein P450 Enzym dar, wie sich anhand des Kohlenmonoxidspektrums beweisen ließ. Durch eine Aminosäuresequenzanalyse ergab sich eine große Homologie zum Cytochrom P450 Isoenzym 2A6. Das Molekulargewicht des humanen Enzyms betrug ebenfalls 50 kDa und war damit mit dem von Cytochrom 2A6 identisch [Behrens, 1999; Rieckert, 1999]. Zusätzlich konnte das humane dritte Protein unter Zugabe der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase und NADPH die Cumarin-7-Hydroxylierung (siehe Abb. 4-2), eine für Cytochrom P450 2A6 charakteristische Reaktion [Nedelcheva und Gut, 1994], katalysieren. Damit gelang gleichzeitig der erstmalige Nachweis eines neuen, reduktiven Reaktionstyps für das Isoenzym 2A6, da von diesem

Enzym bisher nur die Monooxygenaseaktivität bekannt gewesen war [Behrens, 1999; Rieckert, 1999].

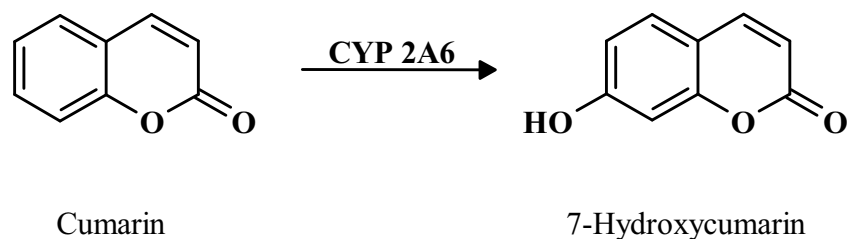


Abb. 4-2: Cumarin-7-Hydroxylierung durch Cytochrom P450 2A6 [Nedelcheva und Gut, 1994].

Sowohl im humanen als auch im porcinen *N*-reduktiven Enzymsystem werden *in vitro* neben einem P450 Isoenzym als weitere Komponenten Cytochrom b_5 und die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase zur Rekonstitution benötigt. Dieses stellt eine neue Funktion für P450 Enzyme dar. Bisher waren nur oxidative Umwandlungen unter Beteiligung von Cytochrom P450, Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 Reduktase bekannt [Testa, 1995].

Cytochrom b_5 ist ein Hämoprotein, welches überwiegend an der äußeren Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, wobei das hydrophile Ende in das Cytoplasma hineinragt und das hydrophobe der Verankerung in der Membran dient [Oshino, 1982]. Diese membrangebundene Form des Cytochrom b_5 hat einen amphiphilen Charakter und ist an zahlreichen Oxidations- und Reduktionsprozessen beteiligt, indem es dem Cytochrom P450 oder anderen Elektronenakzeptoren wie den Desaturasen Elektronen transferiert. Eine Übersicht über die Beteiligung von Cytochrom b_5 am physiologischen Elektronentransport ist in Abbildung 4-3 dargestellt. Neben der membrangebundenen Form gibt es auch ein lösliches Cytochrom b_5 , das man hauptsächlich im Cytosol von Erythrozyten findet. Es ähnelt dem mikrosomalen Cytochrom b_5 , hat aber den amphiphilen Charakter verloren [Oshino, 1982]. Man hat

dieses Hämoprotein bereits aus der Leber verschiedenster Arten wie Rind, Ratte, Kaninchen, Schwein, Mensch, Pferd und Huhn reinigen können, wobei bei einer zu 88 % identischen Primärstruktur eine sehr hohe Homologie zwischen den verschiedenen Spezies herrscht [Arinc, 1991]. Aufgrund der dennoch bestehenden geringfügigen Abweichungen ist es sogar möglich, verschiedene Spezies über ihr Cytochrom b_5 zu identifizieren [Hsieh *et al.*, 2001]. Des Weiteren wird von Oshino [1982] auch das Vorkommen in anderen Organen wie in Niere, Lunge und Darm berichtet. Auch im Hirn vermutet er Cytochrom b_5 , weil dort Desaturase-Aktivitäten gefunden wurden, die das Vorkommen dieses Hämoproteins voraussetzen.

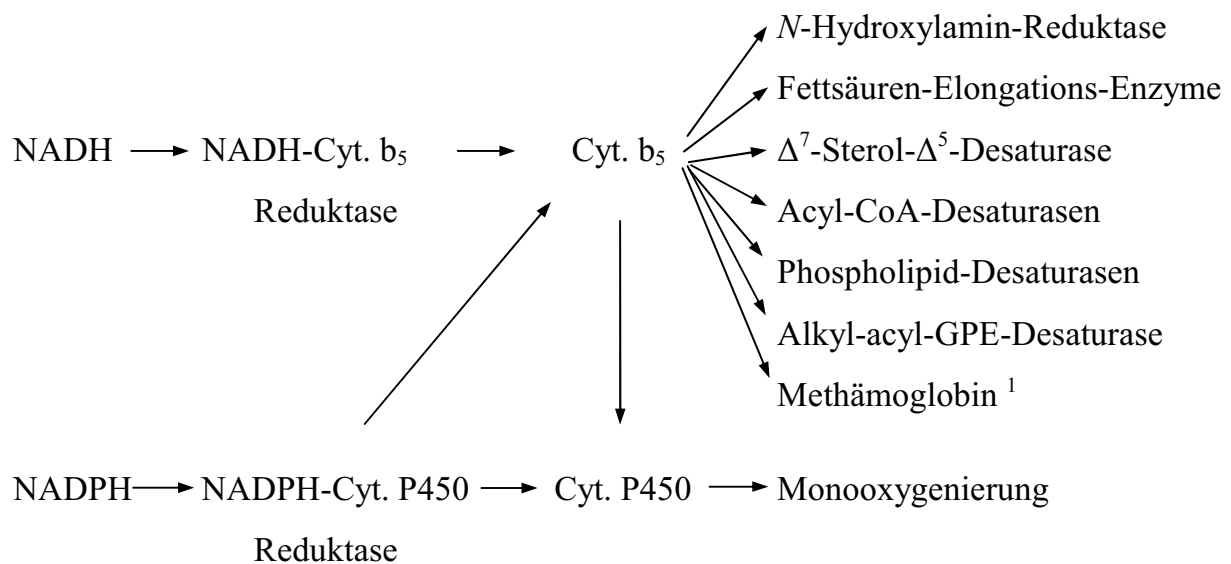


Abb. 4-3: Cytochrom b_5 -abhängiger Elektronentransfer modifiziert nach Oshino [1982].¹, [Hultquist und Passon, 1971]; GPE, Glycerol-3-phosphoryl-ethanolamin; Cyt., Cytochrom.

Da Cytochrom b_5 nur ein Elektron aufnehmen kann, NADH und NADPH aber zwei Elektronen liefern, kann es das Elektron nicht direkt aufnehmen, sodass zusätzlich die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase als Vermittler zwischen einem Molekül NADH und

zwei Molekülen Cytochrom b_5 benötigt wird [Bewley *et al.*, 2001]. Daneben kann Cytochrom b_5 auch Elektronen vermitteln, die von NADPH über die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase auf das Cytochrom P450 Enzymsystem übertragen werden sollen (siehe Abb. 4-3).

Die bereits erwähnte NADH-Cytochrom b_5 Reduktase ist ein Flavoprotein, welches ebenfalls einen amphiphilen Charakter aufweist und mit dem hydrophoben Ende beispielsweise in der Membran vom Endoplasmatischen Retikulum verankert vorliegt [Ozols *et al.*, 1985]. Ihre Funktion liegt im Transfer von Reduktionsäquivalenten von NADH auf Cytochrom b_5 [Testa, 1995]. Auch von der Reduktase gibt es neben der membrangebundenen eine lösliche Form, die in Erythrozyten vorkommt [Arinc *et al.*, 1992] und dort neben Cytochrom b_5 an der Reduktion von Methämoglobin (siehe Abb. 4-3) beteiligt ist [Hultquist und Passon, 1971].

Die Isolierung der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase wurde erstmals aus Kaninchen- bzw. Kalbsleber beschrieben [Spatz und Strittmatter, 1973; Mihara und Sato, 1975], konnte aber inzwischen auch für andere Arten wie Ratte, Schwein und Mensch beschrieben werden [Bewley *et al.*, 2001]. Die Homologie dieser Reduktase ist zwischen den verschiedenen Spezies in Analogie zum Cytochrom b_5 sehr hoch. Die mikrosomale Cytochrom b_5 Reduktase von Schwein und Ratte unterscheidet sich beispielsweise in der räumlichen Anordnung dreier Lysinreste, die für die Interaktion mit Cytochrom b_5 eine entscheidende Rolle spielen. So sitzen bei der Ratte alle drei Reste räumlich in einer Ebene, während sich beim Schwein ein einzelner Lysinrest in entgegengesetzter Richtung befindet [Bewley *et al.*, 2001].

Durch solche scheinbar geringfügigen Unterschiede lassen sich unterschiedliche Reaktionen verschiedener Spezies auf dieselben Xenobiotika erklären.

4.1.2 Zielsetzung

Aufbauend auf vorangegangene Studien, in denen die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und Cytochrom b_5 als essentielle Bestandteile eines aus humaner und porciner Leber isolierten *N*-reduktiven Enzymsystems charakterisiert worden waren, sollte versucht werden, diese beiden Komponenten auch in anderen Organen zu finden und zu detektieren. Anhand der in den bisherigen Studien für die Lebermikrosomen eingesetzten Assays sollten die Gehälter und Aktivitäten in den in dieser Arbeit gewonnenen Mikrosomen ermittelt und miteinander verglichen werden.

Anschließend sollte mit Hilfe einer Gelelektrophorese (SDS-PAGE) versucht werden, die mikrosomalen Präparationen und die in ihnen enthaltenen Proteine zu vergleichen. Dabei sollte gezielt auf das Auftreten charakteristischer Banden, wie z.B. der Bande von Cytochrom b_5 und der Bande von der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, geprüft werden. Ebenso sollte das Auftreten einer Bande bei 50 kDa überprüft werden, da diese ein Hinweis auf die *Benzamidoxim-Reduktase* sein könnte.

Des Weiteren sollte ein vorliegender und gegen die *Benzamidoxim-Reduktase* aus Schweineleber exprimierter Antikörper eingesetzt werden, um die Anwesenheit dieses Enzyms auch in anderen Organen zu überprüfen. Die Frage, ob eine solche Reaktion auch zwischen einem Antikörper, der gegen ein hepatisches Enzym gebildet wurde, und einem aus einem anderen Organ derselben oder sogar einer anderen Spezies stammenden Enzym ablaufen kann, sollte hiermit beantwortet werden.

Ferner sollte der Einfluss dieses Antikörpers auf die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin, die bei allen im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Mikrosomen nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3), mit verschiedenen mikrosomalen Präparationen untersucht werden.

4.2 METHODEN

4.2.1 Materialien und Geräte

Vortexer VF2, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. Halbmikroküvetten (Polystyrol), *Fa. Sarstedt, Nümbrecht*. Photodiodenarray-Spektrometer DU[®] 7500, *Fa. Beckman, München*. Schüttelwasserbad GFL 1083, *Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel*. Vibrationsmischer IKA Vibrax VXR, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. Mikroliterzentrifuge EBA 12, *Fa. Hettich, Tuttlingen*. 1,5 ml Reaktionsgefäße, *Fa. Sarstedt, Nümbrecht*. PH-Meter inoLab pH Level 1, *Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim*. Membranfilter Sartolon[®] 0,45µM, *Fa. Sartorius, Göttingen*. Ultraschallbad Sonorex Super, *Fa. Bandelin, Berlin*.

Benzamidoxim konnte aus Benzonitril und Hydroxylamin nach dem von Krüger [1885] beschriebenen Verfahren synthetisiert werden. Die Substanz lag bereits in ausreichender Menge im Arbeitskreis vor. Der Antikörper 4D12 wurde freundlicherweise von Frau Dr. Berger zur Verfügung gestellt. Benzamidin wurde von der *Fa. Aldrich-Chemie, Steinheim*, bezogen. Natriumoctylsulfonat stammte von der *Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*, NADH und NADPH von der *Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz*. Triton X-100 wurde von der *Fa. Serva, Heidelberg*, bezogen. Acetonitril wurde von der *Fa. Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland*, und alle weiteren nicht extra aufgeführten Chemikalien wurden von der *Fa. Merck, Darmstadt*, bezogen.

Acetonitril und Methanol waren von HPLC-Qualität, alle anderen verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel von analytischer Reinheit.

4.2.2 Cytochrom b₅-Gehaltsbestimmung

Der Cytochrom b₅-Gehalt wurde nach der Methode von Estabrook und Werringloer [1978] bestimmt. Hierfür wurde zunächst ein Spektrum der zu vermessenden Enzymprobe im Wellenlängenbereich von 400-500 nm aufgenommen und gespeichert. Nach Zugabe von 10 µl einer 30 mM NADH-Lösung (in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) wurde nach 60 s ein zweites Spektrum bei 400-500 nm aufgenommen. Aus diesen beiden Spektren wurde das Differenzspektrum von reduzierter und oxidierte Form des Cytochrom b₅ gebildet. Das folgende Schema zeigt die Zusammensetzung einer solchen Gehaltsbestimmung:

	Probe	Mikrosomen
Enzympräparation	max. 1000 µl	100 µl
Phosphatpuffer	bei Bedarf Verdünnung im Verhältnis 1:10	890 µl
Mischen, 1. Spektrum aufnehmen, Reaktion starten durch Zugabe von		
NADH	in steigender Menge	10 µl

Es wurden so oft je 10 µl der NADH-Lösung dazupipettiert und das Differenzspektrum gebildet, bis es sich nicht mehr veränderte. Dabei wurde stets die zugegebene Menge an NADH notiert. Da die Mikrosomen meist sehr konzentriert waren, mußten sie vor der Messung fast 1:10 mit 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, verdünnt werden. Bei sehr trüben Proben mußte Triton X-100 zum Aufklaren der Lösung in den Puffer gegeben werden. Der Cytochrom b₅-Gehalt konnte mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten von 185 mM⁻¹cm⁻¹, des Verdünnungsfaktors und des Proteingehaltes aus der Absorptionsdifferenz zwischen 426 und 409 nm berechnet werden.

4.2.3 NADH-Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Mihara und Sato [1978], bei der die Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat (III) zu (II) spektralphotometrisch über 20 sec bei 420 nm verfolgt wird. Da diese Reaktion temperaturabhängig ist, ist bei der Durchführung der Messung auf eine konstante Temperatur von 25°C achten.

Für die Reaktion wurden eine 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ - und eine 10 mM NADH-Lösung mit 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, hergestellt und auf Eis gelagert, während der Phosphatpuffer auf 25 °C temperiert wurde. Die Inkubationsansätze wurden gemäß folgendem Schema gemischt:

	Probe	Referenz
Enzympräparation	10 μ l	-
Phosphatpuffer	880 μ l	890 μ l
$K_3[Fe(CN)_6]$	100 μ l	100 μ l
Mischen, Reaktion starten durch Zugabe von		
NADH	10 μ l	10 μ l

Nach der Zugabe der NADH-Lösung mußte der Ansatz zügig vermessen werden. Die Reduktionsrate von $K_3[Fe(CN)_6]$ zu $K_4[Fe(CN)_6]$ konnte anhand des Absorptionskoeffizienten von $1,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet werden und wurde unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors und des Proteingehaltes in die NADH Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivität in Units pro ml ($1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol } [Fe(CN)_6]^{3-}/\text{min}$) umgerechnet.

4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Geräte:

Vertikale Gelelektrophoresekammer Modell 2001 mit Zubehör, *Fa. Pharmacia, Freiburg*. Stromversorger Macrodrive Modell 2301, *Fa. Pharmacia, Freiburg*. Gelrockner Modell 2003 mit Zubehör, *Fa. LKB, Bromma, Schweden*. Kälteumwälzthermostat Modell F20, *Fa. Julabo, Seelbach/Schwarzwald*. 50 µl und 100 µl Spritze, *Fa. Hamilton, Bunaduz, Schweiz*. Taumelschüttler Modell BEAX, *Fa. Heidolph, Kehlheim*. Blotting-Apparatur 2117-250 Nova Blot und Zubehör, *Fa. LKB, Bromma, Schweden*.

Materialien :

Acrylamid, Bisacrylamid, Coomassie brilliant blue R250, Saccharose, Bromphenolblau, Ammoniumpersulfat (APS), *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol wurden von der *Fa. Serva, Heidelberg*, bezogen. Abdeckfolie und Chromatographiepapier für die Trocknung des SDS-Gels stammten von der *Fa. Pharmacia, Freiburg*. Der Molekulargewichtsstandard (LMW = low molecular weight calibration kit) für die SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung wurde von der *Fa. Pharmacia, Freiburg*, bezogen. Dieser enthielt Phosphorylase b (M_r 94.000), Albumin (M_r 67.000), Ovalbumin (M_r 43.000), Carboanhydrase (M_r 30.000), Trypsininhibitor (M_r 20.100) und α -Lactalbumin (M_r 14.400).

Der Molekulargewichtstandard für die SD-PAGE mit anschließendem Westernblot P7708S war von der *Fa. New England BioLabs Inc.* Dieser war blau eingefärbt und enthielt MBP- β -Galactosidase (M_r 175.000), MBP-Paramyosin (M_r 83.000), Glutamin Dehydrogenase (M_r 62.000), Aldolase (M_r 47.500), Triosephosphat Isomerase (M_r 32.500), β -Lactoglobulin A (M_r 25.000), Lysozym (M_r 16.500) und Aprotinin (M_r 6.500).

Für den Antikörpertest wurden der BM Chromogenic Western Blotting Kit, *Boehringer Mannheim*, verwendet. Das Gel-Blotting-Papier und die Blotting-Membran (Transfer Medium) Protran BA 83 (Cellulosenitrat E) stammten von der *Fa. Schleicher & Schnell, Dassel*. Ponceau-Rot wurde von der *Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA*, bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen den Reinheitsanforderungen für Elektrophorese.

Durchführung:

Die SDS-PAGE wurde mit Modifikationen nach der Methode von Laemmli [1970] durchgeführt. Für die Auftrennung der eingesetzten mikrosomalen Enzympräparationen wurden ein 10 %iges oder ein 12 %iges Trenngel, wobei das erst genannte die Cytochrom P450 Enzyme weiter auseinander zog, und ein 3 %iges Sammelgel eingesetzt.

Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels:

	Trenngel [ml]		Sammelgel [ml]
	10 %	12 %	3 %
Acrylamidlösung	10,3	12,3	1,75
Trenngelpuffer	15,0	15,0	-
Sammelgelpuffer	-	-	5,0
Aqua bidest.	4,7	2,7	3,25
Ammoniumpersulfatlösung	1,5	1,5	0,5
TEMED	0,03	0,03	0,03

Die verwendeten Lösungen wurden wie im folgenden Schema aufgeführt frisch mit Aqua bidestillata hergestellt oder kurzzeitig im Kühlschrank gelagert:

Lösung	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	0,75 M Tris-HCl, 0,2 % (G/V) SDS, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,25 M Tris-HCl, 0,2 % (G/V) SDS, pH 6,8
Elektrodenpuffer	25 mM Tris-HCl, 0,1 % (G/V) SDS, 195 mM Glycin, pH 8,3
Inkubationspuffer	187 mM Tris-HCl, 2 % (G/V) SDS, 10 % (G/V) Glycerol, 5 % (G/V) β -ME, 0,001 % (G/V) Bromphenolblau, pH 6,8
Acrylamid/Bisacrylamid	30 % (G/V) Acrylamid, 0,8 % (G/V) Bisacrylamid
Ammoniumpersulfat	1,5 % (G/V) Ammoniumpersulfat
Färbelösung	2,0 g Coomassie Brilliant Blue R250, 250 ml Isopropanol, 100 ml Eisessig, 650 ml Aqua bidest.
Entfärbelösung	250 ml Isopropanol, 250 ml Eisessig, 1500 ml Aqua bidest.
Transferpuffer	25 mM Tris/HCl, 114 mM Glycin, 10 % Methanol (V/V), pH 8,3
TBS-Puffer	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TBST-Puffer	0,1 % Tween 20 (V/V) in TBS-Puffer
Maleinsäurelösung	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5

Zur Herstellung der oben beschriebenen Gele wurden 2 Glasplatten mit Feststellschrauben in einem Gießstand eingespannt, sodass sie durch zwei

Abstandhalter 1,5 mm voneinander entfernt waren, und unten mit einer gefetteten Gummidichtung verschlossen. Das frisch hergestellte Trenngel wurde bis zur Markierung von 10 cm Laufstrecke zwischen die Glasplatten gefüllt und vorsichtig mit 2 ml Aqua bidestillata überschichtet. Nach einstündiger Polymerisation bei Raumtemperatur wurde das überstehende Wasser vorsichtig abdekantiert und die verbliebene Restfeuchte mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurde der Probenkamm zwischen die zwei Glasplatten gesteckt und das frisch hergestellte Sammelgel zügig mit einer Pipette bis zur Oberkante der Glasplatten eingefüllt. Dann wurden die Gele erneut 1 h bei Raumtemperatur zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Probenkammes wurden die entstandenen Taschen mehrmals mit Elektrodenpuffer gespült.

Probenauftrag:

Für den Probenauftrag wurden die Proteinproben und der Molekulargewichtsstandard mit Inkubationspuffer auf die Probenvolumina verdünnt. Nach 5 minütigem Erhitzen bei 95°C zum Denaturieren wurden die Proben mit einer Mikroliterspritze in die Probenaschen gefüllt. Von den mikrosomalen Proteingemischen wurden je 50 µl (etwa 20 µg Protein) pro Bahn aufgetragen, von den Standards je 8-10 µl. Das beladene Gel wurde in eine ausreichend mit Elektrodenpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingehängt und vorsichtig mit Elektrodenpuffer überschichtet.

Elektrophorese:

Vor Beginn der Elektrophorese wurde die Elektrophoresekammer mit einem Umwälzthermostaten auf konstant 10°C temperiert. Die Vorelektrophorese wurde ca. 1 h bei einer Stromstärke von 25 mA und einer Spannung von 65 – 130 V durchgeführt. Danach wurde die Hauptelektrophorese bei einer Stromstärke von 50 mA (Spannung 200 - 500 V) angeschlossen, die dann beendet wurde, wenn das

Bromphenolblau, das den Proben beigemischt worden war, das Ende der markierten Trennstrecke erreicht hatte (2-3 h).

Färbung des Gels mit Coomassie:

Das Gel wurde vorsichtig zwischen den zwei Glasplatten herausgenommen und das Sammelgel vorsichtig vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde zum Einfärben für 1 h auf einem Taumelschüttler in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde es zum Entfärben 1 h in der Entfärbelösung geschwenkt. Dieser Entfärbeprozess wurde 3-4-mal mit jeweils frischer Entfärbelösung wiederholt, bis sich der Hintergrund des Gels annähernd entfärbt hatte und die Banden sichtbar geworden waren. Das Gel wurde kurz gewässert, auf kräftiges Papier gelegt, mit Folie abgedeckt und auf einem Geltrockner bei 70°C und Vakuum über ca. 4 h getrocknet.

Antikörpertest:

Für den Antikörpertest wurde das gerade aus der Elektrophorese genommene Trenngel, das wiederum vom Sammelgel abgetrennt worden war, eingesetzt. Die Reaktion mit dem Antikörper gegen die *Benzamidoxim-Reduktase* wurde anhand eines Westernblots durchgeführt.

Vier Stück Gel Blotting Papier wurden auf die Trenngelgröße zurechtgeschnitten, kurz mit Transfer-Puffer befeuchtet und mittig auf die Fläche der Blotting-Apparatur gelegt. Auch die Blotting-Membran wurde auf die passende Größe geschnitten, etwa 30 min gewässert und deckend auf das Papier plaziert. Auf diesen Stapel wurde das Gel gelegt und mit drei weiteren mit Transfer-Puffer getränkten Filtern bedeckt. Die Apparatur wurde geschlossen und die transparente Abdeckung aufgesetzt. Der Elektrophoresevorgang wurde bei einer Stromstärke von 80 mA begonnen, wobei ständig die Spannung kontrolliert werden mußte. Sie sollte innerhalb von etwa 45 min

von einer Anfangsspannung von 7 V auf 13 V gestiegen sein. Falls die Spannung zu schnell oder zu langsam anstieg, mußte manuell gegenreguliert werden.

Um zu kontrollieren, ob die Membran ausreichend geblottet worden war, wurde sie kurz in Ponceau-Rot-Lösung gelegt. Nach etwa 2 min konnte man die übertragenen Banden als rote Linien erkennen und vorsichtig markieren. Die Membran wurde durch Einlegen in Wasser wieder entfärbt und für 30 min in 15 ml Blocking-Reagenz, die zuvor 1:10 mit 100 mM Maleinsäurelösung verdünnt worden war, gelegt. Anschließend wurde die Membran für 1 h in ca. 15 ml des ersten Antikörpers (4D12), der vorher 1:1 mit Blocking-Reagenz verdünnt worden war, gegeben und leicht geschwenkt. Nach dieser Einwirkzeit wurde die Membran 6-mal 5 min mit je 15 ml TBST-Puffer gewaschen. Nun wurde der Anti-Maus-Antikörper (BM Chromogenic Western Blotting Kit) aufgetragen, indem die Membran wieder 1 h lang in etwa 15 ml der entsprechenden Lösung (54 µl Antikörper-Lösung + Blocking-Reagenz ad 15 ml) schwenkte. Danach wurde 4-mal 5 min mit 15 ml TBST-Puffer gewaschen.

Nun folgte die Detektion mittels des Substrates für den zweiten Antikörper. Die Substratlösung musste sehr vorsichtig auf die Membran gegossen werden, da die Bindung eine sehr empfindliche Reaktion darstellt. Die vom Antikörper vermittelte Reaktion zeigte sich nach max. 20 min, alle später erfolgten Färbungen beruhen auf unspezifischen Bindungen. Nach der Reaktion von Antikörper und Substrat konnte die Membran mit Wasser gewaschen und auf Zellstoff getrocknet werden.

4.2.5 Inkubation mit einem Antikörper gegen die *Benzamidoxim-Reduktase*

4.2.5.1. Inkubationsbedingungen

Die Hemmstudien mit dem Antikörper (4D12) gegen die *Benzamidoxim-Reduktase* orientierten sich an der von Pfundner [1991] beschriebenen Durchführung. Die Ansätze wurden im Wasserbad bei 37°C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen inkubiert. Ein Inkubationsansatz beinhaltete 100 µg mikrosomales Protein, 800 µM Benzamidoxim, 0,5 mM NADH, variable Mengen an Antikörper-Lösung und 100 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, ad 300 µl. Als Bezugswerte wurden Ansätze ohne Antikörper-Zugabe inkubiert, deren Umsetzungen als 100 % Aktivität gesetzt wurden. Nach Vorlage von Puffer, Mikrosomen und Antikörper-Lösung wurden die Ansätze 10 min bei Raumtemperatur preinkubiert. Darauf wurde Benzamidoxim zugefügt, 3 min bei 37°C vorinkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet. Nach 20 minütiger Inkubationszeit wurde mit je 300 µl Methanol abgestoppt, kurz auf dem Vibrationsmischer geschüttelt und 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Im Anschluß erfolgte die Vermessung per HPLC.

4.2.5.2. HPLC-Analytik

Die HPLC-Analytik erfolgte in Anlehnung an die Methode von Wohlers [1994].

HPLC-Pumpe: W 600 Pumpe mit einem W 600 E System Controller, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Detektor: W 486 Tunable Absorbance Detector, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Autosampler: Automatischer Probennehmer W 700 Satellite WISP, *Fa. Waters, Milford, CT, USA*

Integrator:	EZ Chrom™ Chromatography Data System, Version 6,7, <i>Scientific Software Inc., San Ramon, CA, USA</i>
Stationäre Phase:	LiChrospher® RP-Select B (5 µm), iD 5 mm, Länge 125 mm, Kartusche mit ManuCart, Vorsäule RP-Select B (5 µm), 4 x 4mm, <i>Fa. Merck</i>
Mobile Phase:	3 mM Octylsulfonat, pH 2,5, eingestellt mit 85 %iger Phosphorsäure / Acetonitril (90/10, V/V)
Detektion:	UV 229 nm
Flußrate:	1,0 ml / min
Injektionsvolumen:	10 µl, 2 x je Probe
Retentionszeiten:	Benzamidoxim: 18,5 ± 0,2 min Benzamidin: 22,0 ± 0,6 min
Laufzeit:	30 min

Die Octylsulfonatlösung wurde nach der Zugabe der Phosphorsäure durch Vakuumfiltration (0,45 µm Membranfilter) von Partikeln befreit und nach Zugabe von Acetonitril 15 min im Ultraschallbad entgast.

Die Validierung der quantitativen Bestimmung des Metaboliten Benzamidin erfolgte über die bei einer 5-Punkt-Kalibrierung erhaltenen Signalflächen. Es wurden Konzentrationen von 20 bis 160 µM in Fließmittel gelöst und vermessen. Die Kalibriergerade verlief über den gesamten Konzentrationsbereich linear ($r^2 = 0,9981$, $N = 20$). Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die auch für die Kalibrierung eingesetzten Konzentrationen an Benzamidin den oben beschriebenen Inkubationsansätzen zugegeben, wobei jedoch kein Cosubstrat zugefügt wurde. Die Ansätze wurden wie die üblichen Inkubationsansätze behandelt und aufbereitet (siehe 4.2.5.1). Die daraus abgeleitete Wiederfindungsrate lag bei 104 % ($r^2 = 0,998$, $N = 20$). Die Bestimmungsgrenze aus den Inkubationsansätzen lag bei 20 µM.

Abb. 4-4 zeigt die Kalibrier- und Wiederfindungsgeraden von Benzamidin, die durch lineare Regression der bei den Schweinenierenmikrosomen gemessenen Werte erhaltenen wurden.

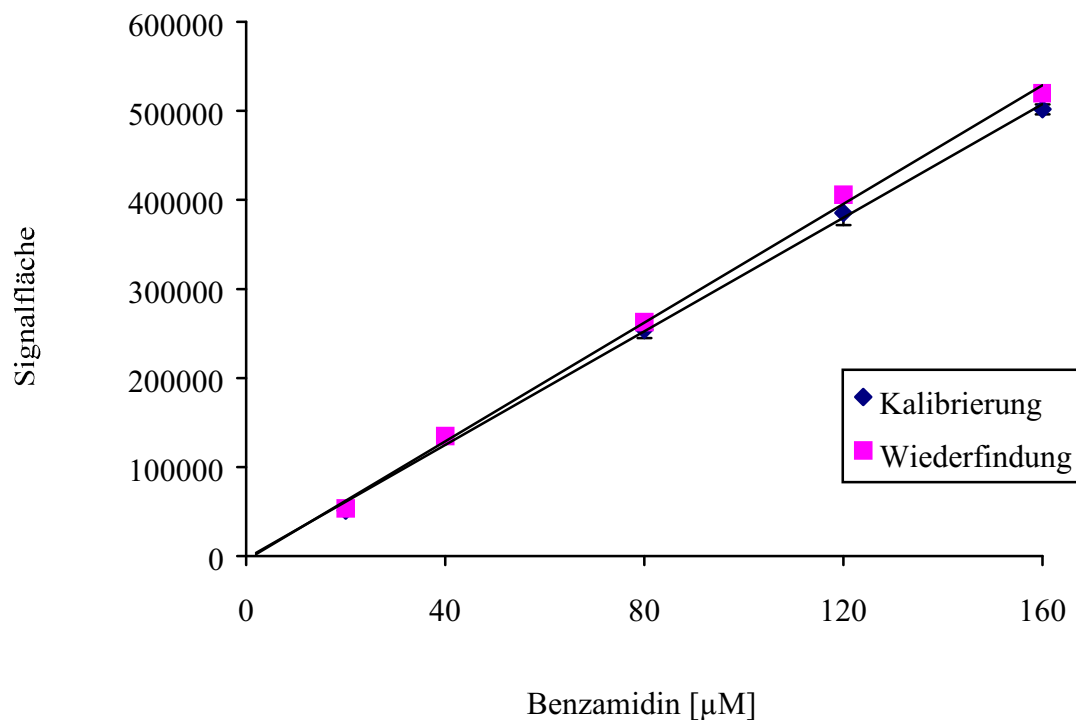


Abb. 4-4: Kalibrier- und Wiederfindungsgerade von Benzamidin aus Biotransformationsansätzen mit Schweinenierenmikrosomen. Aufarbeitung und HPLC-Analytik sind im Methodenteil beschrieben. Pro Konzentration wurden 2 Ansätze inkubiert und doppelt vermessen.

4.3 ERGEBNISSE

4.3.1 Cytochrom b₅-Gehaltsbestimmung

Ausgehend von vorherigen Studien, in denen Cytochrom b₅ als ein Bestandteil des Amidoxime reduzierenden Enzymsystems der *Benzamidoxim-Reduktase* identifiziert wurde [Lomb, 1995], wurde auf das Vorhandensein dieser Komponente geprüft. Dabei konnte in allen untersuchten Mikrosomen Cytochrom b₅ nachgewiesen werden und ergab je nach mikrosomaler Präparation einen spezifischen Gehalt zwischen 0,378 und 0,027 nmol Cytochrom b₅/mg Protein. Die einzelnen Gehälter sind Abbildung 4-1 zu entnehmen. Für die humanen Darmmikrosomen konnten dieser und der folgende Assay (Tab. 4-1 und Tab. 4-2) aufgrund der nur geringen vorliegenden Mengen nicht durchgeführt werden.

Tab. 4-1: Spezifische Cytochrom b₅-Gehälter für die verschiedenen mikrosomalen Präparationen. Die Bestimmung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens vier Messwerten.

Mikrosomale Präparation	Cytochrom b ₅ -Gehalt [nmol/mg]
Schweineniere	0,14
Schweineleber	0,378
Schweinehirn	0,055
Schweinelunge	0,08
Schweinedarm	0,027
Humane Niere	0,07
Humane Leber	0,21

4.3.2 NADH Cytochrom b₅ Reduktase-Aktivitätsbestimmung

Die Cytochrom b₅ Reduktase ist als eine der drei Komponenten der *Benzamidoxim-Reduktase* beschrieben worden [Lomb, 1995], weshalb ihre Aktivität in allen gewonnenen mikrosomalen Präparationen bestimmt wurde. Es konnte in allen untersuchten Proben eine Aktivität detektiert werden, die eine Spanne von 3,27 bis 1,30 U/mg Protein umfasste (1 U = 1 µmol [Fe(CN)₆]³⁻/min). Die einzelnen Werte dieser Bestimmung sind in Tabelle 4-2 aufgeführt.

Tab. 4-2: Spezifische Cytochrom b₅ Reduktase-Aktivitäten für die verschiedenen mikrosomalen Präparationen. Die Bestimmung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens vier Messwerten.

Mikrosomale Präparation	Cytochrom b ₅ Reduktase-Aktivität [U/mg]
Schweineniere	3,27
Schweineleber	3,22
Schweinehirn	1,43
Schweinelunge	2,72
Schweinedarm	1,30
Humane Niere	3,08
Humane Leber	2,17

4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde durchgeführt, um in den humanen und porcinen Enzympräparationen jeweils nach Bestandteilen des *Benzamidoxim-Reduktase*-Systems zu suchen (Abb. 4-5).

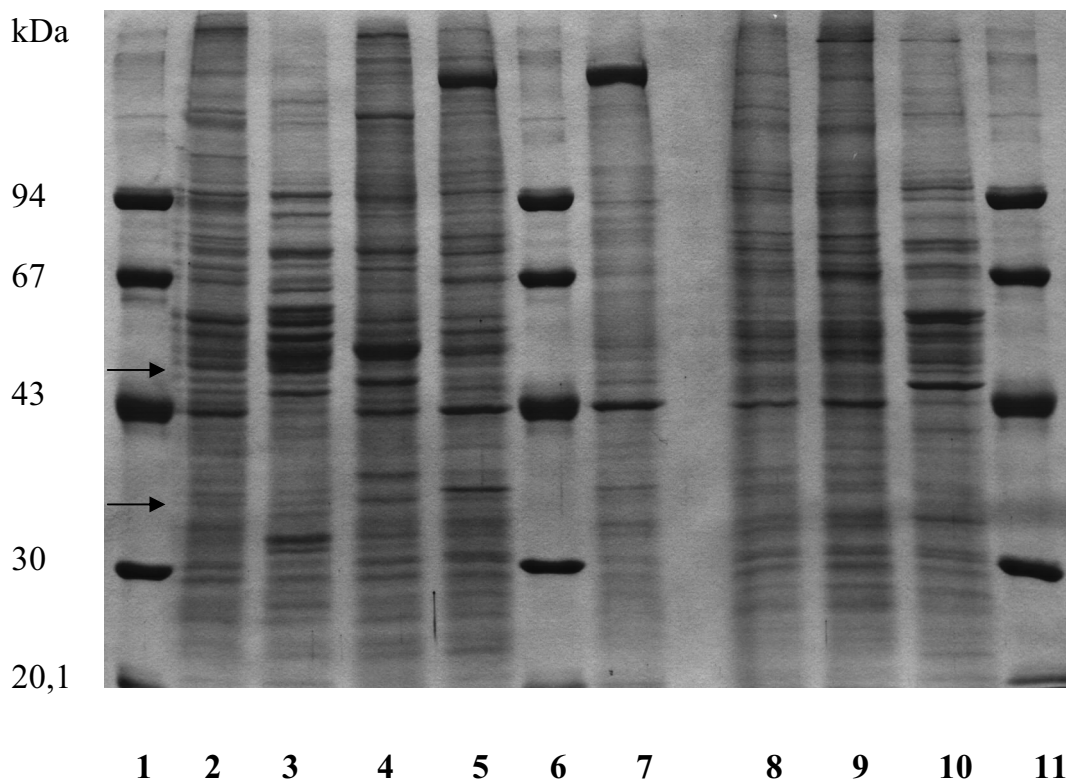


Abb. 4-5: SDS-PAGE der verschiedenen mikrosomalen Enzympräparationen.

1, 6, 11: Molekulargewichtsstandard; 2: Schweineniere; 3: Schweineleber; 4: Schweinehirn; 5: Schweinelunge; 7: Schweinedarm; 8: Humane Niere 1; 9: Humane Niere 2; 10: Humane Leber

Die Bande bei ca. 16 kDa, die dem Cytochrom b_5 zugeordnet werden kann [Spatz und Strittmatter, 1973], ist nicht mehr auf dem Gel zu sehen, sodass diese Komponente nicht ausgewertet werden kann. Die Bande der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase tritt bei etwa 35 kDa auf [Mihara und Sato, 1975]. Bei allen Enzympräparationen kann man in diesem Bereich eine Bande erkennen, sodass die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase in allen Proben vermutet werden kann. Im Bereich von 45-60 kDa sind bei allen mikrosomalen Proben zahlreiche Banden zu erkennen. Dies ist der Bereich, in dem die verschiedenen Cytochrom P450 Isoenzyme entsprechend ihres Molekulargewichts auftreten [Schwab und Johnson, 1987]. Man sieht sehr deutlich die Unterschiede in der Expression der verschiedenen Isoenzyme in Qualität und Quantität und die eindeutig geringere Ausbildung an Cytochrom P450 Enzymen in den Darmmikrosomen (7).

Die dritte Komponente, die *Benzamidoxim-Reduktase*, ein Cytochrom P450 Isoenzym mit dem Molekulargewicht von 50 kDa [Möller, 1997], kann bei allen Präparationen aufgrund dort liegender Banden vermutet werden. Die beiden Pfeile in Abb. 4-5 markieren die Bereiche von 35 kDa und 50 kDa, in denen die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und die *Benzamidoxim-Reduktase* auftreten können.

Zur genaueren Aufklärung wurde ein Westernblot mit einem gegen die *Benzamidoxim-Reduktase* aus Schweineleber exprimierten Antikörper (4D12) durchgeführt. In Abbildung 4-6 ist das Ergebnis dieser Reaktion dargestellt. Man sieht eine eindeutige Reaktion des Antikörpers mit den Schweinenieren- und Schweinelebermikrosomen. Letztere dienten zugleich als Kontrolle, ob der Westernblot erfolgreich durchgeführt worden war, weil die *Benzamidoxim-Reduktase* dort garantiert enthalten ist [Möller, 1997]. Mit den Schweinemikrosomen der anderen untersuchten Organe konnte vorerst keine Reaktion festgestellt werden. Im Westernblot mit humanen Nieren- und Lebermikrosomen mit demselben Antikörper war keine Reaktion detektierbar. Dieses Ergebnis war aufgrund der unterschiedlichen Spezies zu erwarten.

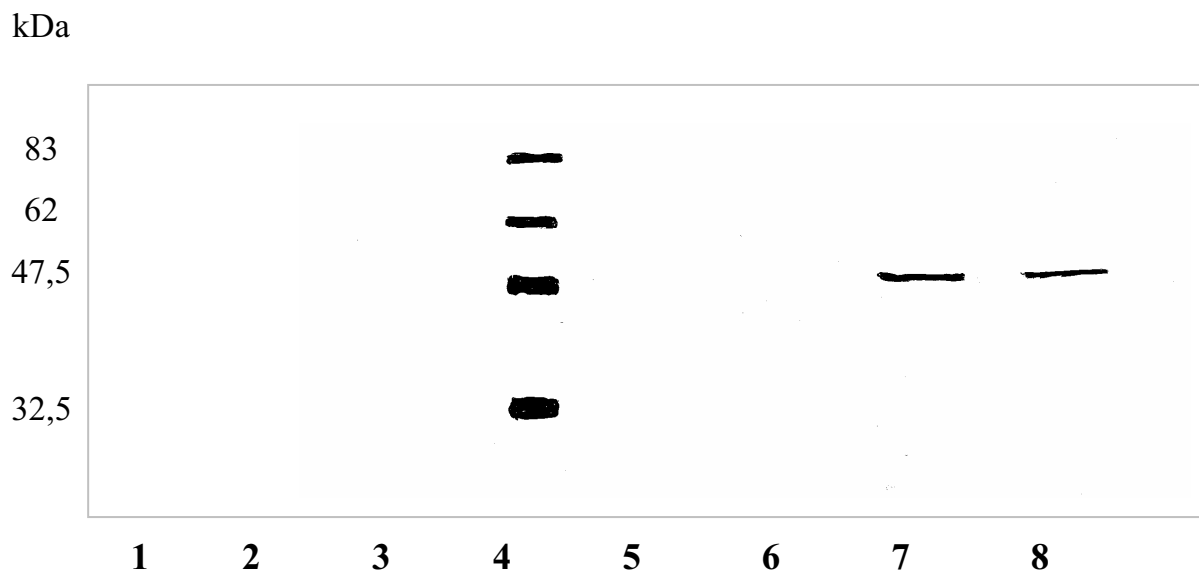


Abb. 4-6: Western-Blot mit verschiedenen mikrosomalen Enzympräparationen und dem gegen die *Benzamidoxim-Reduktase* aus Schweineleber exprimierten Antikörper (4D12). 1: humane Leber; 2: humane Niere, 3: Schweinedarm; 4: Molekulargewichtsstandard; 5: Schweinelunge; 6: Schweinehirn; 7: Schweineleber; 8: Schweineniere.

4.3.4 Inkubation mit einem Antikörper gegen die *Benzamidoxim-Reduktase*

Der Antikörper wurde zunächst in Hemmstudien mit den Mikrosomen eingesetzt, die bei der Umsetzung von Benzamidoxim die höchsten Umsetzungsraten erzielt hatten, den Schweinenierenmikrosomen. In diesen Hemmstudien konnte nur eine geringfügige Hemmung beobachtet werden, die jedoch mit steigender Konzentration an Antikörper zunahm. In Abbildung 4-7 ist zu sehen, dass die prozentuale Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin zwar maximal 14 % betrug, aber signifikant war.

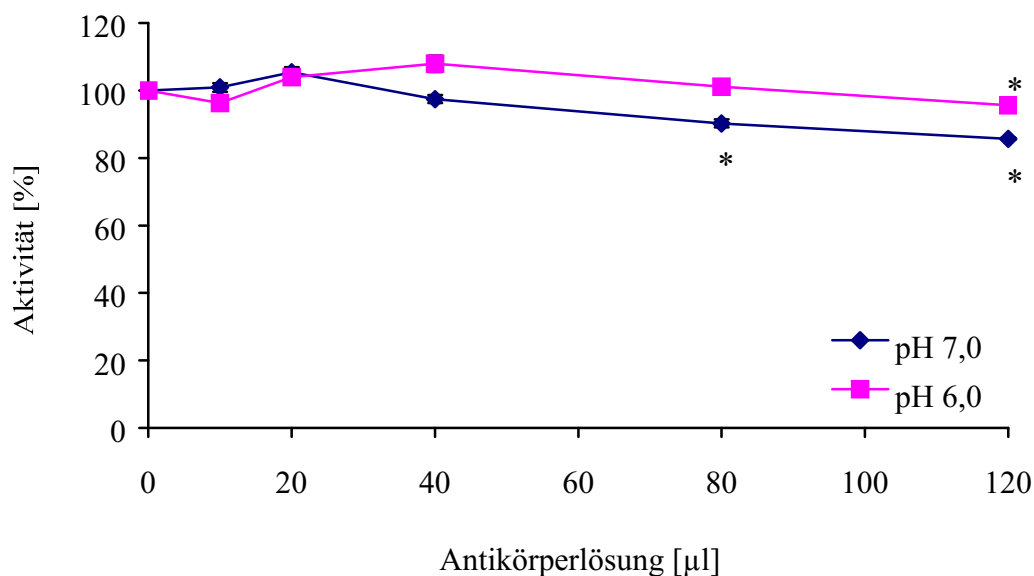


Abb. 4-7: Hemmung der mikrosomalen Reduktion (Schweiniere) von Benzamidoxim zu Benzamidin durch einen *Benzamidoxim-Reduktase* Antikörper (4D12). Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. *, statistisch signifikanter Unterschied zum Komplettansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test); SD, Standardabweichung.

Der Gehalt des Antikörpers in der Lösung war leider nicht bekannt, da er sich noch im Medium befand und nicht aufgereinigt war. Es wurde zum einen das Original-Medium (pH 7,0) und zum anderen ein schwach saures Medium (pH 6,0), welches die Inkubation im optimalen pH-Bereich der Reduktion ermöglichte, eingesetzt. In Abbildung 4-7 sieht man, dass mit dem Original-Medium in diesem Fall die etwas effektivere Hemmung erfolgte. Aufgrund dieser schlechten Hemmung wurde auf weitere Hemmstudien mit anderen mikrosomalen Präparationen verzichtet.

4.4 DISKUSSION

In vorangegangenen Studien konnte belegt werden, dass das *N*-reduktive mikrosomale Enzymsystem, welches im Arbeitskreis bereits in verschiedenen Spezies untersucht worden ist, in Schweine- und humaner Leber aus drei essentiellen Komponenten besteht: Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und einem Cytochrom P450 Isoenzym. Im Schwein wurde dieses Isoenzym der 2D Unterfamilie zugeordnet und im Menschen als CYP2A6 identifiziert [Möller, 1997; Behrens, 1999; Rieckert, 1999].

In dieser Arbeit konnten erstmals Mikrosomen verschiedener Organe auf Gehalt und Aktivität dieser essentiellen Komponenten untersucht werden. Der Cytochrom b_5 -Gehalt konnte in allen mikrosomalen Präparationen nach der Methode von Estabrook und Werringloer [1978] bestimmt werden. Die Schweineleber zeigte wie erwartet den höchsten Cytochrom b_5 -Gehalt mit einem Wert von 0,378 nmol/mg Protein. Dieser Gehalt entspricht der Größenordnung der Angaben der Literatur, in der 0,58 nmol/mg Protein für Schweinelebermikrosomen angeführt werden [Möller, 1997]. Obwohl von der Untersuchung von Schweinenierenmikrosomen berichtet wird [Passon *et al.*, 1972], findet man in der Literatur lediglich Gehaltsangaben für andere Tierarten wie Ratte mit 0,15 nmol/mg Protein oder Kaninchen mit 0,1 nmol/mg Protein [Oshino, 1982], die trotz der anderen Spezies mit dem in dieser Arbeit für Schweinenierenmikrosomen gemessenen Gehalt von 0,14 nmol/mg Protein übereinstimmen. Arinç [1991] beschreibt die Isolierung von Cytochrom b_5 aus Schweinelunge, gibt aber keine weiteren Informationen über die Expression oder den mikrosomalen Gehalt an. Für Rattenlunge findet man in der Literatur [Oshino, 1982] einen Wert von 0,03-0,05 nmol/mg Protein, der damit etwas geringer als der in dieser Arbeit für Schweinelunge erhaltene Wert von 0,08 nmol/mg Protein ist. Auch für den Rattendarm gibt Oshino [1982] einen Cytochrom b_5 -Gehalt an, der 0,13 nmol/mg Protein betragen soll. Der für Schweinedarmmikrosomen ermittelte

Wert ist dagegen mit 0,027 nmol/mg Protein deutlich geringer, was aber in den verschiedenen Spezies begründet sein kann.

Humane Vergleichswerte aus der Literatur lagen nicht vor, aber die in dieser Arbeit bestimmten Cytochrom b_5 -Gehälter ergaben lediglich halb so hohe Werte wie die der porcinen Vergleichsorgane. Ein Grund für die relativ geringen Konzentrationen in den humanen Präparationen könnte die Verwendung von Organen erkrankter Personen sein. Vielleicht ist dieses Hämoprotein aber auch tatsächlich beim Schwein stärker exprimiert als beim Menschen.

Die Bestimmung der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Mihara und Sato [1978], wobei sich wiederum in allen untersuchten Mikrosomen Aktivitäten detektieren ließen (siehe Tab. 4-2). Im SDS-PAGE (Abb. 4-5) ließen die bei 35 kDa auftretenden Banden bereits bei allen Mikrosomen das Vorkommen der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase vermuten. Diese Annahme konnte durch die im Assay erhaltenen Aktivitäten bestätigt werden. Die höchsten Werte zeigten Schweinenieren- und Schweinelebermikrosomen mit Aktivitäten von 3,2 U/mg Protein, wobei der Leberwert durch die Literatur (2,71 U/mg Protein) bestätigt wird [Möller, 1997]. Auch die in den humanen Lebermikrosomen gemessene Aktivität von 2,17 U/mg Protein wurde durch Literaturangaben (2,2 U/mg Protein) bekräftigt [Möller, 1997]. Betrachtet man die Dimension der erhaltenen NADH-Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivitäten, so liegen alle in dieser Arbeit untersuchten Mikrosomen in einem relativ engen Bereich von 1,30 bis 3,27 U/mg Protein (siehe Tab. 4-2), wobei die Aktivitäten in Niere und Leber bei beiden Spezies dominieren.

Vergleicht man die Werte von Cytochrom b_5 und der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase aus dieser Arbeit organweise miteinander, indem man den Reduktase-Gehalt als 100 % definiert, so ergibt sich für den Cytochrom b_5 -Gehalt je ein 2-4 %iger Wert des Reduktase-Gehalts. Eine Ausnahme bildet dabei die Leber, bei der sowohl beim Schwein als auch beim Menschen ein ca. 10 %iger Gehalt resultiert. In allen Organen

scheint also das Verhältnis von Cytochrom b_5 zu seiner Reduktase ähnlich ausgeprägt zu sein, unabhängig von dem jeweils betrachteten Organ. In der Leber treten selbstverständlich höhere Konzentrationen auf, weil in diesem Organ diverse Metabolismusreaktionen endogener und exogener Verbindungen stattfinden, die entsprechend mit Reduktionsäquivalenten versorgt werden müssen, die unter anderem von Cytochrom b_5 und der Reduktase geliefert werden (siehe Abb.4-3). Tatsächlich scheinen alle in dieser Arbeit untersuchten Organe befähigt zu sein, sowohl körpereigene Verbindungen als auch Fremdstoffe über den in Abbildung 4-8 dargestellten Mechanismus metabolisieren zu können. Alle für den Ablauf dieser Reaktion benötigten Komponenten konnten in den Präparationen entweder im Rahmen dieser Arbeit detektiert oder anhand von Literaturstellen bestätigt werden.

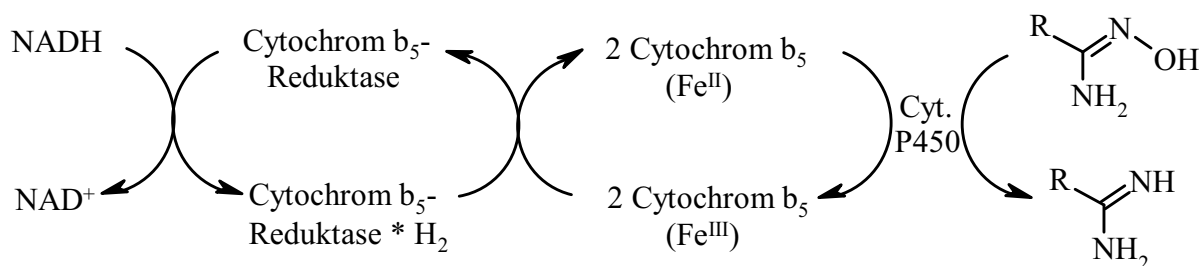


Abb. 4-8: Schematische Darstellung des Elektronentransports der *N*-Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen nach Möller [1997].

Anhand der im SDS-Gel (siehe Abb. 4-5) im Bereich von 45-60 kDa deutlich erkennbaren Banden bei allen aufgetragenen Mikrosomen konnte die in der Literatur angeführte organweite Verteilung von Cytochrom P450 [Guengerich, 1995] belegt werden. Es galt aber noch herauszufinden, ob das gleiche Isoenzym wie in der Leber auch in anderen Organen vorliegt und dort die Reduktion *N*-hydroxylierter Stickstoffverbindungen zu katalysieren vermag. Mit einem gegen die *Benzamidoxim-Reduktase* exprimierten Antikörper zeigten jedoch nur Schweineleber- und

Schweinenierenmikrosomen eine Reaktion (siehe Abb. 4-6). Das Ausbleiben der Antigen-Antikörper-Reaktion bei den anderen Schweineorganen kann entweder darin begründet sein, dass die *Benzamidoxim-Reduktase* in entsprechenden Organ nicht vorliegt oder dass ihre Konzentration zu gering war. Falls sie in den anderen Organen nicht präsent sein sollte, müssten andere Enzymsysteme als in der Leber in die in Kapitel 3 aufgeführte *N*-Reduktion involviert sein. Das Auftreten der benötigten Komponenten Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und die sehr ähnlichen K_m -Werte sprechen aber eher nicht für die Existenz eines anderen Enzymsystems.

Die Reaktion mit dem Antikörper kann jedoch auch mit einem anderen Cytochrom P450 Isoenzym der Unterfamilie 2D stattgefunden haben. Zeitgleich mit der Veröffentlichung des Vorhandenseins des CYP 2D Isoenzym aus Schweineleber von Clement *et al.* [1997] wurden von Postlind *et al.* [1997] Daten zur Vitamin D₃ 25-Hydroxylase, die später vom P450 Nomenklatur Komitee als CYP2D25 betitelt wurde [Nelson, 2000], aus Schweineleber publiziert.

Der Vergleich der Peptidsequenzen von Fragmenten der *Benzamidoxim-Reduktase* mit Sequenzen des humanen Isoenzym CYP2D6 und der mikrosomalen Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) ergab eine 98 %ige Übereinstimmung zwischen den Fragmenten der *Benzamidoxim-Reduktase* und denen der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase [Berger, 2002]. Zwischen *Benzamidoxim-Reduktase* und humanem CYP2D6 zeigten sich dagegen deutliche Unterschiede in zwei von drei verfügbaren Peptiden. Hosseinpour und Wikvall [2000] berechneten eine 77 %ige Übereinstimmung der Gesamtaminosäuresequenz von CYP2D6 und CYP2D25, sodass man folglich von einer 77 % übersteigenden Gesamthomologie von der *Benzamidoxim-Reduktase* und CYP2D25 ausgehen kann, wobei Berger [2002] belegen konnte, dass die Enzyme trotz großer Ähnlichkeit wegen geringfügiger Unterschiede nicht identisch sind. Aufgrund dieser Gleichartigkeit ließ sich CYP2D25 von Berger [2002] mit dem in dieser Arbeit ebenfalls verwendeten Antikörper (4D12) nachweisen. Daher kann, falls CYP2D25 in den untersuchten Mikrosomen vorhanden gewesen sein sollte, eine analoge Reaktion im Westernblot nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Bindung der Schweinenierenmikrosomen mit dem Antikörper (4D12) wurden Hemmstudien mit dem gleichen Antikörper durchgeführt. Wider Erwarten war jedoch maximal eine 14 %ige Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin zu erzeugen (siehe Abb. 4-7). Da bereits im Westernblot die Affinität zum Antikörper bewiesen wurde, gibt es für diese nur schwache Hemmwirkung mehrere mögliche Erklärungen.

Eine Erklärung ist das Arbeiten mit Mikrosomen und nicht mit gereinigten Enzymen. Es besteht die Möglichkeit, dass zwei oder mehrere verschiedene Enzymsysteme die *N*-Reduktion katalysieren, und durch die Antikörperreaktion nur das eine System, das die *Benzamidoxim-Reduktase* beinhaltet, gehemmt wird. Andere potentiell vorhandene Enzymsysteme bleiben davon unbeeinflusst und können weiterhin Benzamidoxim zu Benzamidin reduzieren.

Die zweite Möglichkeit besteht in einer Bindung des Antikörpers an einen Bereich des Cytochrom P450 Isoenzym, der nicht einen Teil des aktiven Zentrums darstellt oder das aktive Zentrum beeinflusst. Die Bindung zum Antikörper existiert zwar, aber es ergibt sich keine oder nur eine geringfügige Beeinflussung der katalytischen Fähigkeiten, sodass die generelle Funktion des Enzyms erhalten bleibt. Eventuell ergibt sich auch durch die Bindung eine leichte Konformationsänderung des Gesamtzyms oder des katalytischen Zentrums, sodass daraus eine schwache Hemmung resultiert.

Eine dritte Möglichkeit wäre die Bindung des Antikörpers an das aktive Zentrum, während die Reduktion des Benzamidoxims aber über einen anderen Teil des Enzyms gesteuert wird. Wahrscheinlich scheint aber eine zu geringe Konzentration an Antikörper oder für eine Bindung nicht optimale Bedingungen der Grund für die schwache Hemmung zu sein.

Es bedarf auf jeden Fall noch weiterer Studien, in denen dem Wirkmechanismus des porcinen Isoenzym im Detail auf den Grund gegangen werden muss. Einige diesbezügliche Studien wurden bereits von Karhan [2002] durchgeführt und

beschrieben. Eine Aufklärung könnte helfen, die genaue Struktur des Enzyms, insbesondere des aktiven Zentrums, zu erkennen, sodass im Anschluss die Erforschung der organweiten Lokalisation des Enzymsystems beim Schwein einfacher wäre.

Neben den Schweinemikrosomen wurden ebenfalls die humanen Mikrosomen im Westernblot mit dem Antikörper gegen die *Benzamidoxim-Reduktase* aus Schweineleber (4D12) untersucht (siehe Abb. 4-6). Da die Mikrosomen von Schwein und Mensch die gleiche Reduktion zu katalysieren vermögen, konnte eine Reaktion mit dem gleichen Antikörper vermutet werden. Es wurden jedoch keine Banden sichtbar und damit auch keine Antikörper-Reaktion detektiert. Der Grund für das Ausbleiben der Reaktion könnte darin liegen, dass das humane Isoenzym des *N*-reduktiven Enzymsystems nicht wie das Schwein ein 2D Isoenzym darstellt und folglich auch eine andere Aminosäuresequenz zeigt und einen anderen Antikörper zur Bindung benötigt. Das entsprechende Isoenzym wurde beim Menschen als CYP2A6 identifiziert [Rieckert, 1999; Behrens, 1999]. In einer parallel zu dieser Arbeit erfolgten Reinigung des humanen Isoenzym nach der publizierten Vorschrift für das Cytochrom P450 Isoenzym 2A6 [Yun *et al.*, 1991] und Untersuchung auf seine *Benzamidoxim-Reduktase*-Aktivität konnte eine Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin belegt werden [Karhan, 2002]. Ein Vorkommen von CYP2A6 in anderen Organen kann vermutet werden, da in der Literatur Hinweise auf die P450 Unterfamilie 2A in humaner Niere, Lunge und Nase beschrieben werden, wobei in der Maus bereits 2A Isoenzyme in Lunge und Niere nachgewiesen werden konnten [Koskela *et al.*, 1999]. Daher sind noch weiterführende Studien geplant, in denen die humanen Mikrosomen mit Antikörpern gegen Cytochrom P450 2A Isoenzyme untersucht werden sollen. In diesem Rahmen sind auch weitere Westernblots mit humanen und porcinen Mikrosomen vorgesehen, um das Auftreten von CYP2A in verschiedenen Organen zu überprüfen.

In Mensch und Schwein scheinen also unterschiedliche Isoenzyme in das *N*-reduktive Enzymsystem involviert zu sein. Die Frage, ob die reduzierenden Enzymsysteme der in

dieser Arbeit untersuchten Organe vom Schwein identisch sind, konnte anhand der im Rahmen dieses Kapitels durchgeführten Studien nicht geklärt werden. Die Enzymsysteme in porciner Leber und Niere scheinen durch die gleichsam erfolgte Antikörper-Reaktion im Westernblot identisch zu sein. Für definitive Aussagen sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

5 REDUKTION VON BENZAMIDOXIM DURCH BLUT UND BLUTBESTANDTEILE

5.1 EINLEITUNG

5.1.1 Bisherige Untersuchungen

Das Blut dient dem Organismus als flüssiges Transportsystem für verschiedenste Verbindungen. Zudem erfüllen die darin enthaltenen Blutzellen, die man auch als Hämatokrit zusammenfasst, vielseitige Funktionen. So spielen die Leukozyten eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr, die Thrombozyten besitzen einen nicht unbedeutenden Anteil an der Blutgerinnung und die Erythrozyten dienen dem Sauerstoff- und Kohlendioxidtransport.

Auch die meisten Arzneistoffe werden über das Blut zu ihrem Wirkort transportiert und sind dadurch den Effekten, die Blut oder Blutbestandteile auf sie ausüben können, ausgeliefert. Daher ist das Blut sowie die darin enthaltenen Komponenten in der Arzneimitteltherapie für die Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit von großer Relevanz und auch schon in diversen Arbeiten untersucht worden.

Sugihara *et al.* [2000] untersuchten, ob Kaninchenblut in der Lage ist, Hydroxamsäuren zu reduzieren, und machten dabei die Entdeckung, dass die Reduktion allein durch die Erythrozyten verursacht wird und dem Plasma diesbezüglich keine Bedeutung zukommt. Zuvor hatten sie bereits die Reduktionsfähigkeit von Rattenblut gegenüber p,p'-DDT (p,p'-Dichlorodiphenyltrichloroethan) erforscht und dabei festgestellt, dass die Reduktion durch das Hämgerüst des Hämoglobins ermöglicht wird [Sugihara *et al.*, 1998]. Die gleiche Reduktion beschrieben auch Kitamura *et al.* [2002] mit abgekochten Rattenlebermikrosomen, wobei hier das Hämgerüst vom Cytochrom P450 in Gegenwart von NAD(P)H und FMN für die Reduktion verantwortlich gemacht wurde.

In Kaninchen- und Rinderblut konnte die Reduktion von Brucin-*N*-Oxid zum Amin nachgewiesen werden, wobei die Hämgruppe der Katalase eine entscheidende Rolle spielte [Takekawa *et al.*, 2001]. Diese Reduktion konnte auch mit Hämoglobin durchgeführt werden, ergab jedoch geringere Ausbeuten von ca. 10 %.

Es wurde ferner festgestellt, dass einige Hydroxylamine, die als Antioxidantien, Bräunungsmittel, in der Fotografie oder auch für Synthesen eingesetzt werden können, in humanen Erythrozyten zu stark oxidativen Effekten und Toxizität führen können [Evelo *et al.*, 1998; Spooren und Evelo, 1998]. Neben der Methämoglobinbildung äußerte sich der schädigende Einfluß der Hydroxylamine auf die Erythrozyten auch in einer Destabilisierung der Membranen [Nohl und Stolze, 1998]. Die Enzyme Katalase und Superoxiddismutase wurden aber in ihrer Aktivität nicht beeinflusst [Spooren und Evelo, 1998].

Jacobasch [2000] konnte in ihren Studien in den Erythrozyten verschiedene Enzyme der Glucoseverwertung nachweisen wie z.B. Hexokinase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Aldolase, Enolase, Pyruvat-Kinase, Lactat-Dehydrogenase und Glutathion-Reduktase.

Die Aktivitäten der in den Erythrozyten auftretenden Enzyme können aber bei verschiedenen Individuen einer Art stark variieren, da äußere Einflüsse oder Umweltbelastungen nicht ohne Folgen bleiben. So wurden bei Personen, die über längeren Zeitraum Quecksilberdämpfe einatmen mussten, erniedrigte Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase- und gesteigerte Acetylcholinesteraseaktivitäten bei signifikant gestiegenen Hämatokritwerten gefunden [Zabiński *et al.*, 2000]. Selbst die Umgebungstemperatur spielt für die Erythrozyten eine nicht unerhebliche Rolle, da Mercer *et al.* [1999] bei gesunden Probanden, die für eine Stunde einer Temperatur von 11 °C ausgesetzt waren, eine um 3,2 % erhöhte Erythrozytenkonzentration nachweisen konnten.

Die NADH-Cytochrom b₅ Reduktase, eine Komponente des aus der Leber gereinigten *N*-reduktiven Enzymsystems [Clement *et al.*, 1997], ist bereits in Erythrozyten von

Kaninchen [Yubisui und Takeshita, 1982] und vom Menschen detektiert worden [Yubisui *et al.*, 1986; Arinc *et al.*, 1992]. Jenkins und Prchal [1997] berichteten sogar von einem Polymorphismus in der Expression der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase bei Afro-Amerikanern.

Auch Cytochrom b₅ wurde in Erythrozyten von Kaninchen [Oshino, 1982] und den in dieser Arbeit untersuchten Arten Schwein und Mensch nachgewiesen [Passon *et al.*, 1972; Abe *et al.*, 1985; Chen und Banerjee, 1998]. Dabei wurde in vergleichenden Studien festgestellt, dass erythrozytäres Cytochrom b₅ dem aus Mikrosomen und äußerer Mitochondrienmembran sehr ähnlich ist [Passon *et al.*, 1972]. Auch zwischen den verschiedenen Spezies konnten sehr hohe Homologien beobachtet werden. Die Aminosäuresequenz des humanen und des porcinen löslichen Cytochrom b₅ stimmt bis auf den C-terminalen Rest 97, der beim Menschen von Prolin und beim Schwein von Serin belegt ist, überein [Kimura *et al.*, 1984; Abe *et al.*, 1985].

Selbstverständlich werden in der Literatur auch Untersuchungen anderer Zellen bezüglich ihrer Enzyme erwähnt. So konnten beispielsweise in Lymphozyten verschiedene P450 Isoenzyme (1A1, 2D6, 2E1, 2F1 und 3A) nachgewiesen werden [Stärkel *et al.*, 1999; Krovat *et al.*, 2000]. In den Leukozyten wird das Auftreten von CYP3A [Krishna und Klotz, 1994] und bei unkontrollierten Diabetikern von CYP2E1 in der Literatur angeführt [Gonzalez und Gelboin, 1994]. Das Blut und die in ihm enthaltenen zellulären Blutbestandteile beinhalten also eine große Zahl von Enzymen, die einen Anteil an der Biotransformation wahrscheinlich scheinen lassen.

5.1.2 Zielsetzung

Aufbauend auf den Ergebnissen der Studien mit Mikrosomen verschiedener Organe, in denen die *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin eindeutig bewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3), sollte auch das Blut auf eine derartige Reduktionsfähigkeit hin untersucht werden.

In der Literatur ist bereits von verschiedenen Reduktionen in Blut und Blutbestandteilen berichtet worden, so dass nun in dieser Arbeit ein Enzymsystem gefunden werden sollte, welches in der Lage ist, *N*-hydroxylierte Amidine (Amidoxime) zu den Amidinen zu reduzieren. Als einzusetzendes Substrat wurde das Benzamidoxim gewählt, da es bereits bei den verschiedenen Organen eindeutige Umsetzungen gezeigt hatte und in ausreichender Menge im Arbeitskreis vorlag.

Zunächst sollte im Vollblut anhand des Benzamidoxims untersucht werden, ob überhaupt *N*-reduktive Fähigkeiten gegenüber Amidoximen nachzuweisen sind. Im Falle einer Reduktion sollte diese anschließend genauer lokalisiert werden, indem Plasma und Erythrozyten gewonnen und separat mit dem Substrat inkubiert werden sollten.

Für diese Untersuchungen mit Blut und Blutbestandteilen sollten die analytischen Verfahren und Methoden, die schon in den vorherigen Studien eingesetzt wurden, übernommen und gegebenenfalls modifiziert werden. Die Ergebnisse aus den Blutuntersuchungen sollten abschließend mit den Ergebnissen der anderen Organe verglichen und Folgerungen für den extrahepatischen Metabolismus gezogen werden.

5.2 METHODEN

5.2.1 Gewinnung der verschiedenen untersuchten Präparationen

5.2.1.1. Materialien und Geräte

Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E mit Rotorköpfen JA 14 und den dazugehörigen Weithalszentrifugenflaschen, *Fa. Beckman, München*. Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti und 70 ml Polycarbonat Zentrifugengefäße, *Fa. Beckman, München*. Labofuge 200, *Fa. Heraeus, Osterode am Harz*, mit 10 ml Zentrifugenröhrchen und Eindrückstopfen (rot), *Fa. Sarstedt, Nümbrecht*. Vortexer VF2, *Fa. Janke & Kunkel, Staufen*. 1,5 ml Reaktionsgefäße, *Fa. Sarstedt, Nümbrecht*. EDTA-Monovetten (9 ml), *Fa. Sarstedt, Nümbrecht*. Mikroprozessor-pH-mV-Meter pH 537, *Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim*.

EDTA wurde von der *Fa. Fluka Chemie, Buchs, Schweiz*, Glycerol von der *Fa. Riedel-de-Haën, Seelze*, bezogen. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle weiteren hier nicht aufgeführten Chemikalien von der *Fa. Merck, Darmstadt*, bezogen.

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel waren von höchster verfügbarer Reinheit.

Verwendete Puffer:

Puffer	Zusammensetzung
PBS-Puffer	22,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 5,6 mM KH ₂ PO ₄ , 123,3 mM NaCl, 10 mM Glucose H ₂ O, pH 7,4
Lysepuffer	5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 8,0

5.2.1.2. Porcines Vollblut

Die Blutproben wurden frisch bei einem lokalen Schlachtereibetrieb geholt. Nach dem Töten der Schweine wurde das Blut sofort aus der Halsschlagader entnommen, in zwei Plastikgefäße gefüllt und zum Labor transportiert. Während des Transportes wurden diese Gefäße kontinuierlich geschwenkt, um eine Blutgerinnung zu vermeiden. Dieses Vollblut wurde sofort der Inkubation zugeführt.

5.2.1.3. Porcines Plasma

Die Blutproben wurden frisch bei einem lokalen Schlachtereibetrieb geholt. In die Plastikgefäße war zuvor in Anlehnung an Kontush und Beisiegel [1999] die Menge an EDTA eingewogen und mit wenig Aqua bidest. angelöst worden, die nach dem Füllen eine finale Konzentration von 1,6 mg/ml ergab. Nach dem Töten der Schweine wurde das Blut sofort aus der Halsschlagader direkt in die Gefäße entnommen und zum Labor transportiert. Während des Transportes wurden die Gefäße kontinuierlich geschwenkt, um eine Gerinnung zu vermeiden. Zur Plasmagewinnung wurde in der Hochleistungszentrifuge (Rotor JA 14) über 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Hierbei trennten sich zelluläre Elemente (Hämatokrit) und Plasma, welches zum einen frisch für die Inkubation eingesetzt und zum anderen in 2 ml Reaktionsgefäßen bei -20°C eingefroren wurde.

5.2.1.4. Porcine Erythrozyten

Die Blutproben wurden wie in Kapitel 5.2.1.3 beschrieben beschafft und behandelt. Nach der Zentrifugation bei 1000 g in der Hochleistungszentrifuge wurde der Rückstand, der die Erythrozyten enthaltene Hämatokrit, gewonnen und das Plasma

durch Abpipettieren verworfen. Dieser Rückstand wurde gefäßfüllend mit PBS-Puffer versetzt und sehr vorsichtig geschwenkt, so dass sich eine gleichmäßige Suspension bildete. Diese wurde erneut in der Hochleistungszentrifuge bei 1000 g zentrifugiert. Nach 3 Waschschrritten mit PBS-Puffer wurde erneut abpipettiert und die resultierenden Erythrozyten 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt. Diese Erythrozyten-Lösung wurde frisch für die Inkubationen eingesetzt, kurzzeitig im Kühlschrank gelagert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80°C eingefroren. Vor dem Einfrieren wurden die dafür vorgesehenen Proben mit 40 % Glycerol versetzt, um die Lösung viskoser zu machen und damit das Einfrieren schonender zu gestalten.

5.2.1.5. Aufgeschlossene porcine Erythrozyten

Die Blutproben wurden wie in Kapitel 5.2.1.4 beschrieben beschafft und behandelt. Die so erhaltenen Erythrozyten wurden zum Aufschließen 5 min auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend zusätzlich 5 min in das Ultraschallbad gestellt. Nach dem Aufschließen wurden sie sofort für die Inkubationen eingesetzt.

5.2.1.6. Erythrozytenmembran

Die Blutproben wurden wie in Kapitel 5.2.1.4 beschrieben geschafft und behandelt. Die so erhaltenen Erythrozyten wurden in Anlehnung an Sheetz und Singer [1977] im zehnfachen Volumen an Lysepuffer für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Diese Lösung wurde anschließend zum Abtrennen der Membran über 10 min bei 20.000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Im resultierenden Überstand lagen die freigesetzten gelösten Zellbestandteile mit dem Cytosol vor und im Rückstand die aufgeschlossenen Zellmembranen. Letztere wurden frisch für die Inkubationen eingesetzt.

5.2.1.7. Humane Erythrozyten

Die humanen Blutproben wurden von freiwilligen, gesunden Personen durch Fachpersonal der Klinik der Christian-Albrechts-Universität Kiel entnommen und direkt in EDTA-Monovetten, die 1,2-2 mg EDTA/ml Blut enthielten, gegeben. Aus diese Proben wurden humane Erythrozyten analog zu den porcinen Erythrozyten (siehe 5.2.1.4) gewonnen. Für die Zentrifugation wurde wegen der geringeren Blutvolumina der humanen Proben die Labofuge 200 eingesetzt. Dabei wurde bei der gleichen Umdrehungszahl wie bei den porcinen Erythrozyten zentrifugiert. Auch hier wurden die nach dem letzten Waschgang erhaltenen Erythrozyten im Verhältnis 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt. Die so bereitete Erythrozyten-Lösung wurde frisch für die Inkubationen eingesetzt, kurzzeitig im Kühlschrank gelagert oder in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -20°C eingefroren. Vor dem Einfrieren wurden die dafür vorgesehenen Proben mit 40 % Glycerol versetzt.

5.2.1.8. Humanes Hämoglobin

Humanes Hämoglobin konnte von der *Fa Sigma, Chemical Co., Deisenhofen*, bezogen werden und musste nicht weiter aufgereinigt werden.

5.2.2 Umsetzung mit Benzamidoxim

5.2.2.1. Materialien und Geräte

Die Materialien und Geräte entsprechen denen, die bereits in Kapitel 3.2.1.1 aufgeführt wurden.

5.2.2.2. Inkubationsbedingungen

Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37°C oder 70°C in einem Schüttelwasserbad in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz von 300 µl beinhaltete 100 µl Erythrozytenlösung, 2,0 mM Benzamidoxim und 1,0 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer, pH 5,5. Benzamidoxim und NADH waren in Phosphatpuffer gelöst und aus dieser Stammlösung zugegeben worden. Nach 3 minütiger Vorinkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH gestartet und nach 30 min durch die Zugabe von 300 µl Methanol beendet. Es wurden auch Vergleichsansätze ohne Enzymquelle, Cosubstrat oder Substrat oder mit NADPH statt NADH inkubiert. Die Ansätze wurden für 1 h bei -20°C eingefroren, zum Auftauen für 15 min bei 37°C in ein Schüttelwasserbad gestellt, kurz auf dem Vibrationsmischer geschüttelt, 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und die klaren Überstände anhand HPLC analysiert.

5.2.2.3. HPLC

Die HPLC-Analytik wurde wie in Kapitel 3.2.5.2. beschrieben durchgeführt.

5.2.3 Bestimmung der Ausbeute durch Zellzählung

Um eine Angabe über die Anzahl an Erythrozyten pro ml Erythrozyten-Lösung zu bekommen, wurden die Erythrozyten in einer Neubauerkammer-Zählkammer (*Fa. Merck, Darmstadt*) gezählt. Auf ein Anfärben konnte verzichtet werden, da die Erythrozyten durch ihre Eigenfärbung sehr gut zu erkennen waren.

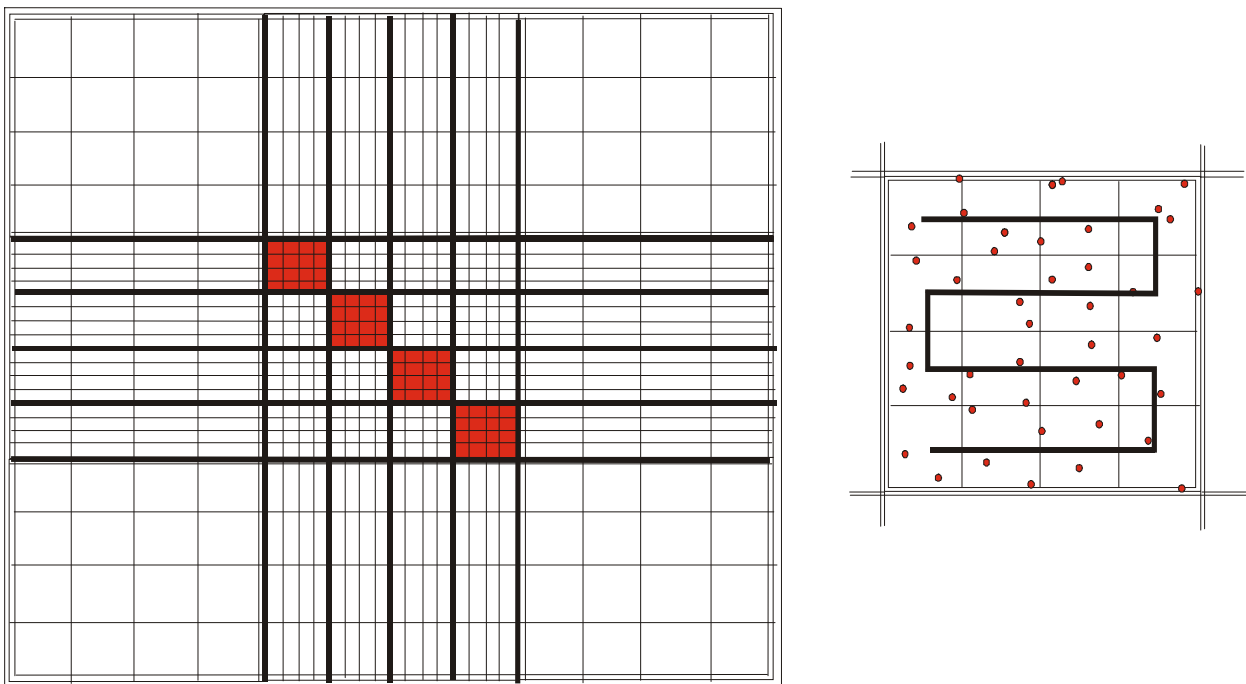


Abb. 5-1: Darstellung und Vergrößerung einer Neubauerkammer.

Gezählt wurden die Erythrozyten in den diagonal markierten Gruppenquadraten, wobei die Kleinstquadrate in schlangenförmigem Verlauf von links oben nach links unten durchgezählt wurden.

Zwischen den Überlaufrinnen der Neubauerkammer bildeten sich durch waagerechte und senkrechte Linien 2 x 16 Gruppenquadrate aus. Jedes dieser 16 Gruppenquadrate bestand wiederum aus 16 Kleinstquadraten, da sich immer sowohl 4 Felder in der Waagerechten als auch in der Senkrechten ($4 \times 4 = 16$) ergaben. Ein so entstandenes

Gruppenquadrat hatte ein Volumen von 4×10^{-6} ml ($16 \times (0,0025\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm})$). Die Neubauerkammer und das plangeschliffene Deckgläschen wurden vor der Zählung gründlich mit 70 %igem Ethanol gereinigt. Das Deckgläschen wurde leicht befeuchtet und auf die Neubauerkammer gelegt. Durch leichtes Andrücken bilden sich sogenannte Newtonsche Ringe, regenbogenartige Lichtinterferenzeffekte. Mit einer Eppendorf-Pipette wurde die verdünnte Erythrozytenlösung langsam zwischen Deckgläschen und Neubauerkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop (Modell CK 2, *Fa. Olympus, Hamburg*) wurden die zwei 16er Gruppenquadrate ausgezählt, indem je die 4 diagonal liegenden Gruppenquadrate (siehe Abb. 5-1) nach dem dargestellten Verlauf gezählt wurden. Aus den durchgeführten Zählungen wurde der Mittelwert errechnet und anhand der folgenden Gleichung die Erythrozytenzahl pro ml Erythrozytenlösung gewonnen.

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{X \times F}{V \times N}$$

X = Mittelwert der Erythrozytenzahl

F = Verdünnungsfaktor

V = Volumen eines Gruppenquadrates

N = Anzahl der ausgezählten Gruppenquadrate

Mit Hilfe dieser Zählmethode war es möglich, die erhaltenen Blutproben miteinander zu vergleichen und die Umsetzungsraten auf eine bestimmte Erythrozytenzahl zu definieren.

5.3 ERGEBNISSE

5.3.1 Porcines Vollblut

Die Inkubationsansätze mit Vollblut von Schweinen zeigten, wie in Abbildung 5-2 dargestellt, deutliche Umsetzungen von Benzamidoxim zu Benzamidin. Hier sind die Umsetzungen der verschiedenen Ansätze bezogen auf die jeweils eingesetzte Blutmenge aufgeführt. Die Bildung des Metaboliten Benzamidin stieg dabei mit zunehmender Menge an Vollblut kontinuierlich an.

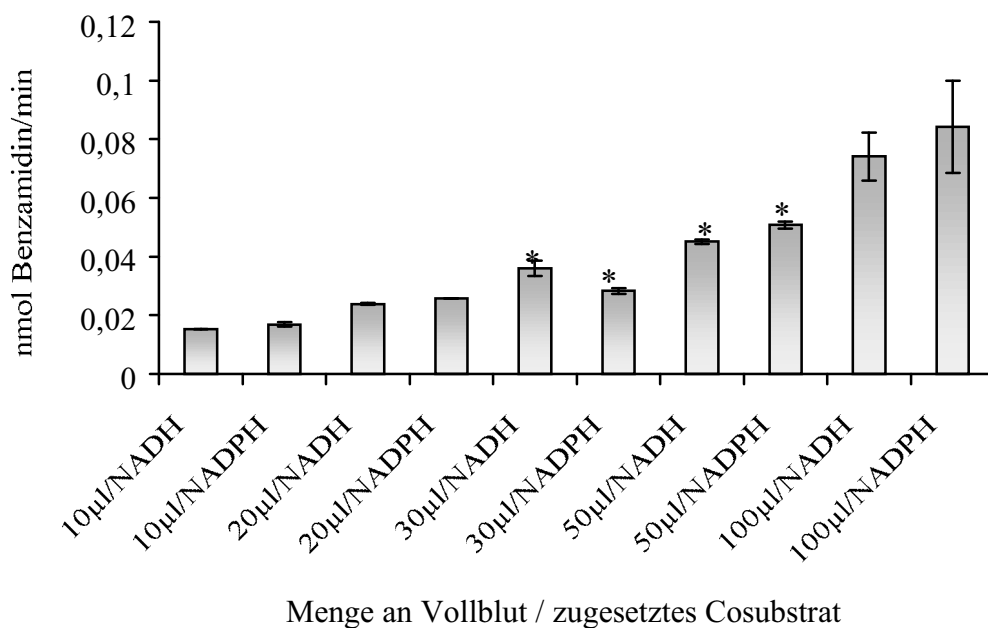


Abb. 5-2: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcines Vollblut.

Die Umsetzungsdaten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. SD, Standardabweichung; *, statistisch signifikanter Unterschied zwischen NADH- und NADPH-Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

Bei der Reduktion durch Vollblut konnte keine eindeutige Bevorzugung zwischen den Cosubstraten NADH und NADPH festgestellt werden, da sich lediglich die Ansätze mit 30 μl und 50 μl mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) signifikant voneinander unterschieden. Auch in Ansätzen ohne Cosubstratzugabe zeigte sich eine vergleichbare Benzamidinbildung (Daten nicht gezeigt, siehe Abb. 5-5 ff.).

5.3.2 Porcines Plasma

In den Inkubationen mit Plasma, das nach Zugabe von EDTA durch Zentrifugation aus einem Teil des Vollbluts gewonnen worden war, zeigten sich nur sehr geringe Umsetzungen, die weit unter den Werten des Vollbluts lagen. Für den Ansatz von 100 μl mit NADH war die Umsetzung beispielsweise nur 17% des Vollblutwertes. Ein Zusatz von EDTA zeigte in einer separat durchgeführten Versuchsreihe keinen hemmenden oder aktivierenden Einfluss auf die Reduktion (Daten nicht gezeigt).

Auch bei den Inkubationen mit Plasma konnte weder eine Bevorzugung von NADH noch von NADPH beobachtet werden.

In Abbildung 5-3 sind die Umsetzungen mit dem Cosubstrat NADH gezeigt, wobei sich nur der 100 μl -Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) signifikant vom 50 μl -Ansatz unterschied. Auf die Darstellung der Umsetzungen mit NADPH wurde hier verzichtet, da sich die Werte kaum von denen mit NADH unterschieden und keinerlei Signifikanz zeigten.

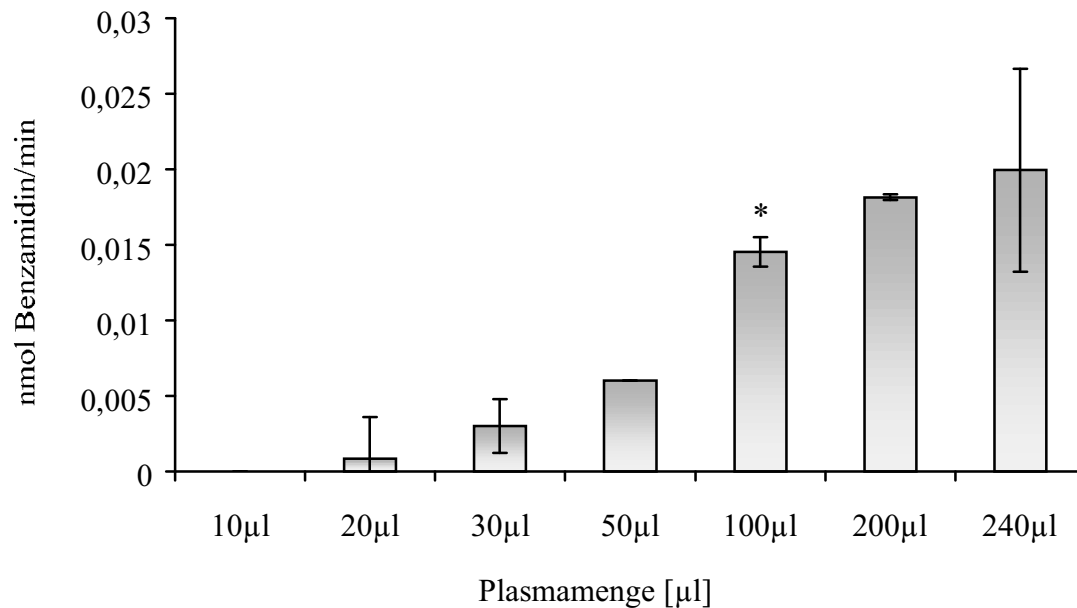


Abb. 5-3: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcines Plasma.

Die Umsetzungsdaten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. SD, Standardabweichung; *, statistisch signifikanter Unterschied zum vorherigen Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

5.3.3 Porcine Erythrozyten

Bei den Inkubationen mit porcinen Erythrozyten ergaben sich im Vergleich zu Vollblut und Plasma recht hohe Umsetzungsdaten. Zur genaueren Charakterisierung wurden die optimalen Bedingungen für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin analog zu Kapitel 3.3.1.1 bestimmt. Es ergaben sich die in Tabelle 5-1 aufgeführten Optima.

Tab. 5-1: Zusammenstellung der ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen für die Reduktion von Benzamidoxim durch porcine Erythrozyten.

Erythrozytenmenge [μ l]	Substratkonz. [mM]	Cosubstratkonz. [mM]	pH-Wert -	Inkubationszeit [min]
100	2,0	1,0	5,5	30

Bei längeren Inkubationszeiten ergaben sich nicht die besseren Umsetzungen, aber um die durch Erythrozyten erhaltenen Werte besser mit durch andere Enzymquellen erhaltenen Werten vergleichen zu können, wurden 30 min als Optimum eingesetzt. Tatsächlich waren die Umsetzungen in sofort abgestoppten Ansätzen am höchsten und nahmen mit zunehmender Inkubationszeit ab. Ein Beispiel für eine solche Abnahme ist in Abbildung 5-4 dargestellt. Durch Umrechnung mit der jeweils eingesetzten Inkubationszeit ergab sich so ein gegen Null strebender Verlauf.

Bei der Cosubstratabhängigkeit zeigte sich bei einer Konzentration von 1 mM NADH die höchste Bildung von Benzamidin, wobei sich die erhaltenen Werte jedoch nicht signifikant von den anderen unterschieden. Die Zugabe eines Cosubstrates war, wie sich bei einer anschließenden Inkubation zeigte, für den Ablauf der Reduktion von Benzamidoxim nicht notwendig. In Abbildung 5-5 sind die Inkubationen unter Zugabe von NADH, von NADPH oder ohne Zusatz eines Cosubstrates mit den Ergebnissen der Charakterisierungskubation, bei der die in der Tabelle 5-1 aufgeführten Parameter eingesetzt wurden, zusammengefasst dargestellt. Man sieht deutlich, dass auch ohne Cosubstrat eine entsprechende Menge an Benzamidoxim zu Benzamidin umgesetzt wird.

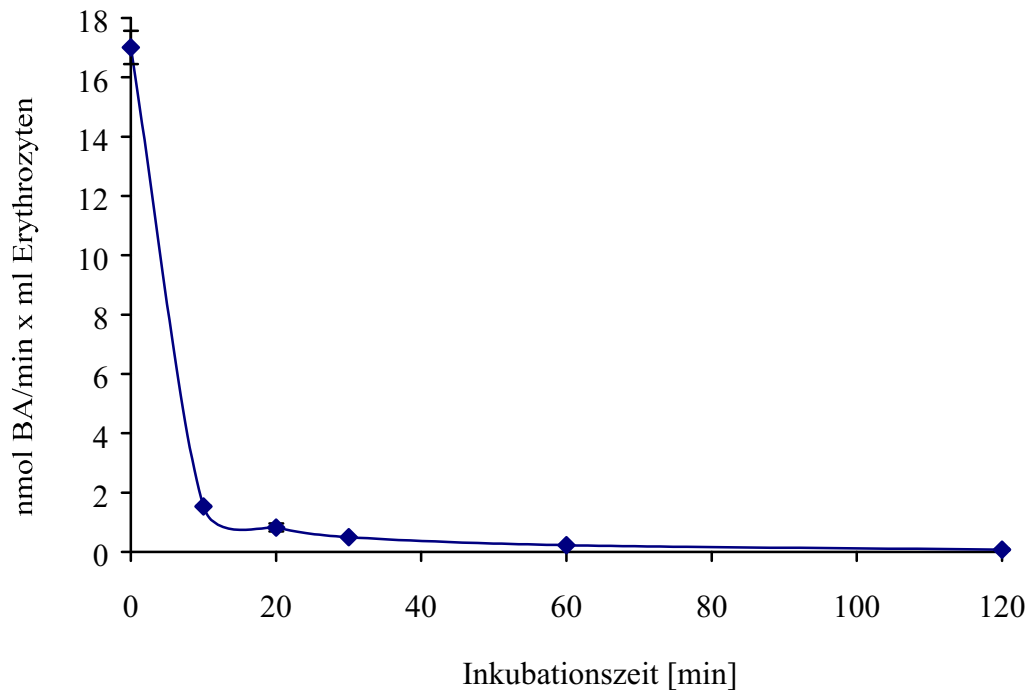


Abb. 5-4: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine Erythrozyten bei verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. BA, Benzamidin.

Zusätzlich zu den frischen Erythrozyten wurden auch denaturierte Erythrozyten inkubiert. Die Denaturierung erfolgte durch 5 minütiges Aufkochen bei 70°C und zeigte sich durch eine Braunfärbung der Erythrozytenlösung. Auch diese Erythrozyten waren in der Lage, Benzamidoxim zu Benzamidin zu reduzieren. Aus Abbildung 5-5 ist ersichtlich, dass diese Umsetzungen mit den Werten der Ansätze mit NADH, mit NADPH und auch ohne Cosubstrat übereinstimmen. Es konnte lediglich zwischen dem Ansatz mit frischen Erythrozyten und NADH und dem cosubstratfreien Ansatz ein statistisch signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) festgestellt werden, während sich die übrigen Ansätze weder untereinander noch zum cosubstratfreien

Ansatz signifikant unterschieden. Die Ansätze $t = 0$, die bereits nach der Vorinkubationszeit mit Methanol abgestoppt worden waren, sind in dieser Abbildung nicht auf min umgerechnet, sodass man den dargestellten Wert eigentlich wegen der 30 minütigen Inkubationsdauer der anderen Ansätze mit 30 hätte multiplizieren müssen, um die wahre Umsetzung zu erhalten. Auch zwischen diesen Ansätzen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

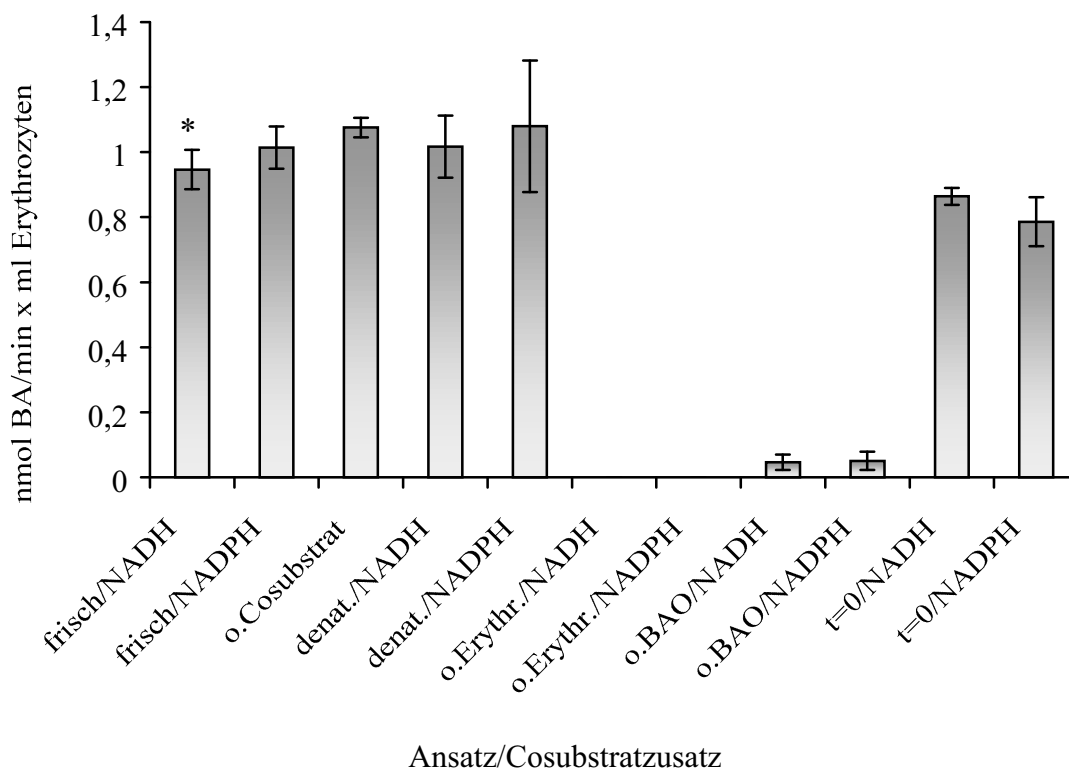


Abb. 5-5: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine Erythrozyten unter Zugabe von verschiedenen Cosubstraten bei 37°C. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. o., ohne Zusatz von; denat., denaturiert; Erythr., Erythrozyten; BAO, Benzamidoxim; BA, Benzamidin; SD, Standardabweichung; *, statistisch signifikanter Unterschied zum cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

Aufgrund der unerwarteten Umsetzungen durch die denaturierten Erythrozyten, wurden auch Inkubationen bei 70°C durchgeführt. Bei diesen Ansätzen ergaben sich die in Abbildung 5-6 zusammengestellten Umsetzungen. Erstaunlicherweise zeigten sowohl die frischen als auch die zuvor denaturierten Erythrozyten bei 70°C höhere Umsetzungen als bei 37°C. In den Ansätzen ohne Cosubstrat ließen sich abermals vergleichbare Mengen an Benzamidin nachweisen, wobei sich keine signifikanten Unterschiede ergaben. Diese bei 70°C detektierten Umsetzungen waren um den Faktor 2-3 höher als die entsprechenden bei 37°C. Die Umsetzungen der Ansätze t=0 zeigten trotz schnellen Abstoppens mit Methanol nur geringfügig niedrigere Umsetzungen.

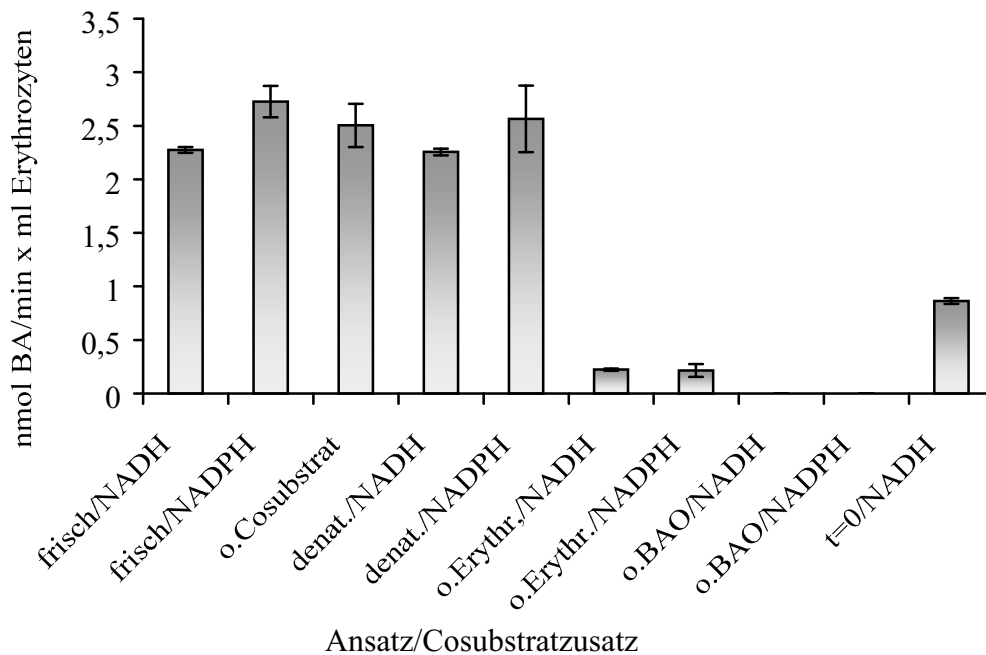


Abb. 5-6: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine Erythrozyten bei 70°C. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. o., ohne Zusatz von; denat., denaturiert; Erythr., Erythrozyten; BAO, Benzamidoxim; BA, Benzamidin; SD, Standardabweichung; kein statistisch signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) zum cosubstratfreien Ansatz.

Ein Teil der gewonnenen Erythrozyten wurde mit 40 % Glycerol versetzt eingefroren und nach einer mehrtägigen Lagerung bei -20°C vermessen. Dabei sollte getestet werden, ob sich die Erythrozyten ohne Verlust der reduktiven Fähigkeiten einfrieren und dadurch für weitere Untersuchungen lagern lassen. Bei einer Lagerung im Kühlschrank waren bereits nach einigen Tagen Verluste in den Umsetzungsraten festzustellen. Für die eingefrorenen Erythrozyten ergaben sich die in Abbildung 5-7 zusammengefaßten Umsetzungen. Da diese Untersuchungen mit einer anderen Charge Erythrozyten durchgeführt wurden, ist hier noch einmal die Gegenüberstellung von frischen zu eingefrorenen Erythrozyten gezeigt.

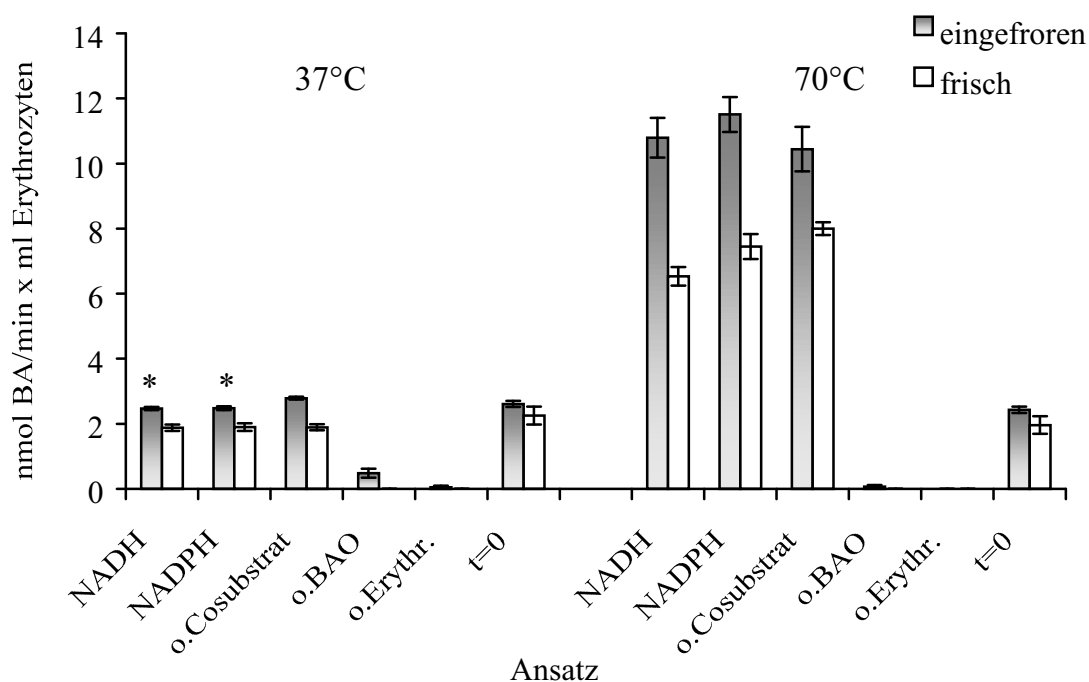


Abb. 5-7: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch zuvor eingefrorene porcine Erythrozyten bei 37°C und 70°C. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. o., ohne Zusatz von; Erythr., Erythrozyten; BAO, Benzamidoxim; BA, Benzamidin; SD, Standardabweichung; *, statistisch signifikanter Unterschied zum cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

Die Bildung von Benzamidin war sowohl in den Ansätzen bei 37°C als auch bei 70°C höher als in den entsprechenden mit frischen Erythrozyten. Es zeigten sich in den Ansätzen mit NADH und mit NADPH bei 37°C statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) zum cosubstratfreien Ansatz. Bei 70°C ließ sich dagegen bei den Ergebnissen keine Signifikanz nachweisen, die Werte unterschieden sich jedoch alle signifikant von den bei 37°C erhaltenen Werten.

5.3.4 Aufgeschlossene porcine Erythrozyten

Die aufgeschlossenen porcinen Erythrozyten wurden mit Benzamidoxim inkubiert, um Hinweise darauf zu bekommen, ob z.B. aus dem Cytosol freigesetzte Bestandteile die Reduktionsleistung erhöhen können. Diese Untersuchungen wurden analog zu den Erythrozyten (5.3.3) sowohl bei 37°C als auch bei 70°C durchgeführt. Abbildung 5-8 zeigt die resultierenden Benzamidinraten aus diesen Ansätzen, die wiederum bei 70°C die eindeutig höheren Werte als bei 37°C ergaben. Alle Ansätze mit aufgeschlossenen Erythrozyten zeigten bei 37°C statistisch signifikante Unterschiede zum cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test), während sich die Ansätze mit NADH und mit NADPH bei 70°C nicht signifikant vom cosubstratfreien Ansatz unterschieden. Die bei 70°C erhaltenen Werte unterschieden sich jedoch hochsignifikant von den 37°C-Werten.

Der Faktor zwischen den verschiedenen Inkubationstemperaturen betrug in den Ansätzen mit NADH, mit NADPH oder ohne Cosubstrat ungefähr 4.

Die Umsetzungen der Ansätze $t=0$ waren fast gleich, da die Ansätze bereits nach der dreiminütigen Vorinkubation abgestoppt und eingefroren worden waren.

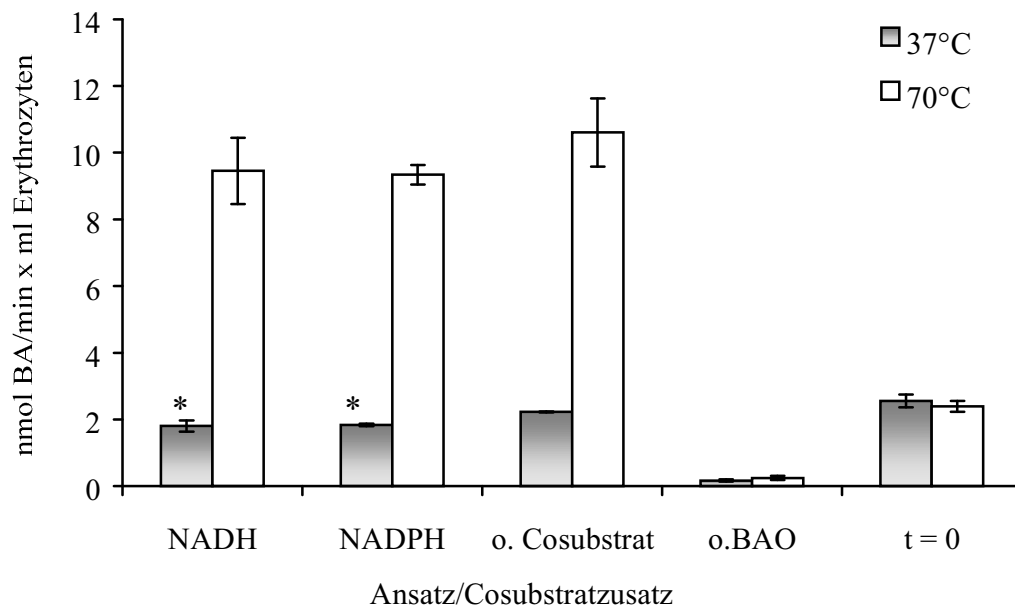


Abb. 5-8: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch aufgeschlossene porcine Erythrozyten bei 37°C und 70°C. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. o., ohne Zusatz von; BAO, Benzamidoxim; BA, Benzamidin; SD, Standardabweichung. *, statistisch signifikanter Unterschied zum cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

5.3.5 Porcine Erythrozytenmembran

Um die Lokalisation der Reduktion von Benzamidoxim in Erythrozyten weiter eingrenzen zu können, wurde auch die Erythrozytenmembran untersucht. Die Ergebnisse dieser Inkubationen, die wieder bei 37°C und 70°C durchgeführt wurden,

sind in Abbildung 5-9 zusammengefaßt. Auch hier zeigte sich eine deutlich höhere Benzamidinbildung bei 70°C, die sich signifikant von den bei 37°C erhaltenen Werten unterschied. Im Vergleich zu den Ansätzen bei 37°C ergaben sich für die Komplettansätze mit NADH, mit NADPH und die cosubstratfreien Ansätze etwa dreimal höhere Werte. Bei 37°C ergaben sich in den Ansätzen mit Cosubstrat keine statistisch signifikanten Unterschiede mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) zum cosubstratfreien Ansatz. Bei 70°C war ebenso keine Signifikanz zum cosubstratfreien Ansatz festzustellen. Auch bei der Erythrozytenmembran waren sich die Ansätze $t=0$ sehr ähnlich, da die Einwirkung der Temperatur nur über die Vorinkubationszeit von 3 min ging, da die Ansätze danach sofort abgestoppt und eingefroren worden waren.

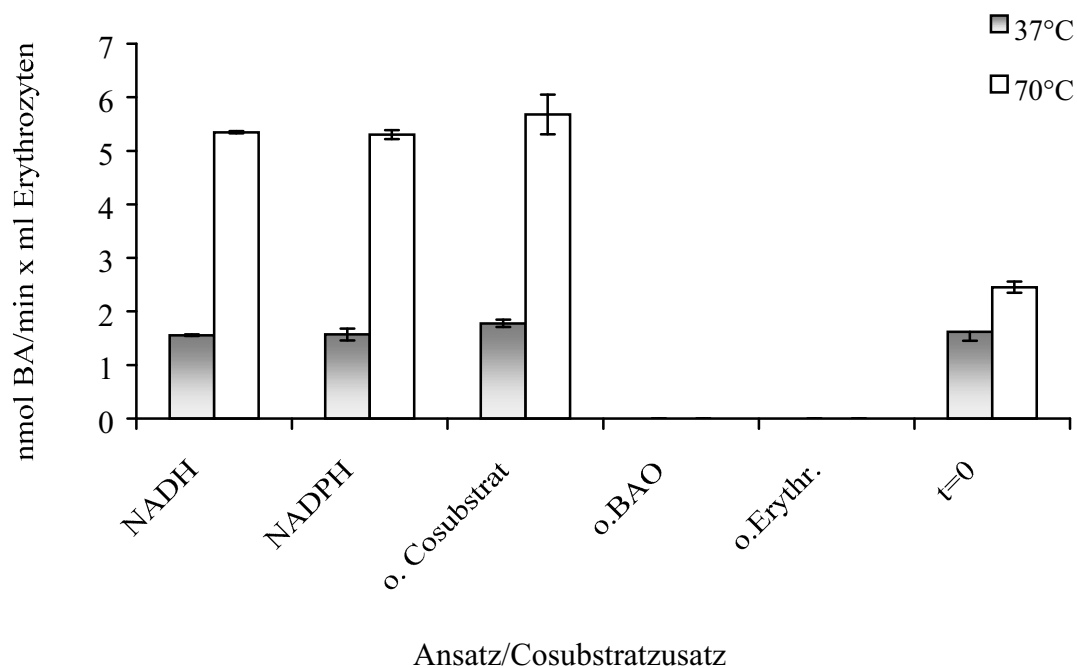


Abb. 5-9: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine Erythrozytenmembran bei 37°C und 70°C. Die Umsatzraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. o., ohne Zusatz von; Erythr., Erythrozyten; BAO, Benzamidoxim; BA, Benzamidin; SD, Standardabweichung. kein statistisch signifikanter Unterschied zum cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

5.3.6 Humane Erythrozyten

Aufbauend auf die Erkenntnisse, die bei der Untersuchung von porcinem Blut und Blutbestandteilen gewonnen worden waren, wurden von humanen Blutproben gleich die Erythrozyten gewonnen und auf eine Gewinnung von Vollblut oder Blutplasma verzichtet. Abbildung 5-10 faßt die Umsetzungen von Benzamidoxim zu Benzamidin durch verschiedene humane Erythrozytenchargen zusammen.

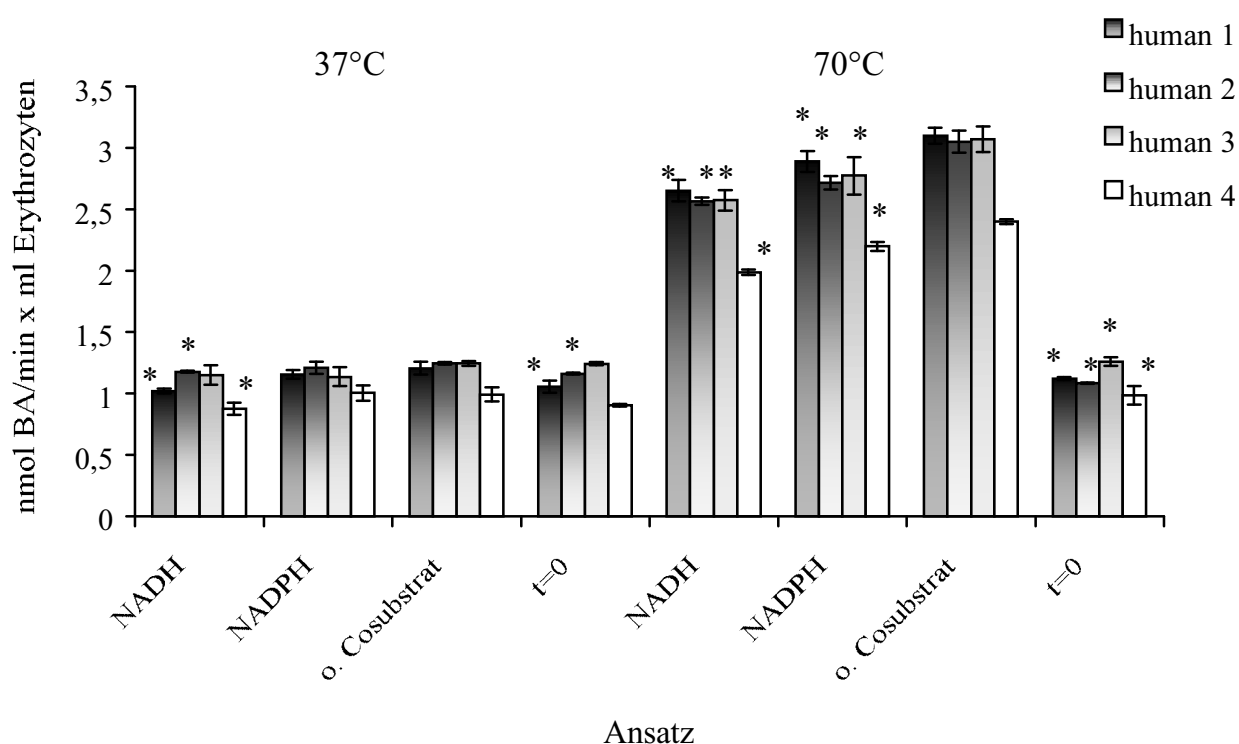


Abb. 5-10: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch humane Erythrozyten bei 37°C und 70°C. Die Umsetzungsdaten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. o., ohne Zusatz von; t=0, sofort abgestoppt und aus dem Wasserbad entnommen; BA, Benzamidin; SD, Standardabweichung. *, statistisch signifikanter Unterschied zum cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

In dieser Graphik sind nicht alle untersuchten Chargen dargestellt, aber in der noch folgenden Tabelle 5-2 findet man noch einmal eine Übersicht über alle Erythrozytenchargen und ihren Umsetzungsraten. Die ersten vier Säulengruppen der Abbildung zeigen die Umsetzungen bei 37°C und die weiteren vier die bei 70°C entstandenen Benzamidinkonzentrationen. Die Ansätze ohne das Substrat Benzamidoxim oder ohne einen Zusatz von Erythrozyten wiesen keine erkennbaren Umsetzungen auf und sind daher in Abbildung 5-10 nicht mit aufgeführt. Bei allen untersuchten Chargen zeigte sich in den Komplettansätzen mit beliebigem Cosubstrat oder in den Ansätzen ohne Cosubstrat eine deutliche Reduktion zu Benzamidin, wenn auch mit unterschiedlich starkem Ausmaß, wobei auch bei humanen Erythrozyten die höchsten Umsetzungen bei 70°C zu detektieren waren. Diese Werte unterschieden sich alle signifikant von den bei 37°C erhaltenen Werten. Die sich statistisch signifikant vom cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) unterscheidenden Umsetzungen sind entsprechend in Abb. 5-10 markiert (*). Bei 37°C unterschieden sich nur drei Ansätze mit NADH (human1, 2 und 4) und zwei t=0-Ansätze (human 1 und 2) signifikant vom Ansatz ohne Cosubstrat, wohingegen bei 70°C bei allen Werten eine Signifikanz zu beobachten ist. Die Reduktionsraten der Komplettansätze variierten, wie man auch in der Abbildung sehen kann, bei 37°C von 0,91 bis 2,04 nmol Benzamidin/min/ml Erythrozytenlösung und bei 70°C über eine Spanne von 1,36 bis 5,38 nmol.

Analog zu den porcinen Erythrozyten wurden auch von humanen Erythrozyten Proben eingefroren und nach mehrtägiger Lagerung bei -20°C aufgetaut und mit Benzamidoxim umgesetzt. In Abbildung 5-11 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen für die Inkubationen bei 37°C und 70°C wiedergegeben. Man sieht bei allen Erythrozytenchargen in den Komplettansätzen mit beliebigem Cosubstrat oder in den Ansätzen ohne Cosubstrat deutliche Umsetzungen zu Benzamidin, die wiederum bei 70°C die höheren Werte ergaben. Auch hier sind statistisch signifikante Unterschiede zum cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) in der Abb. 5-11 markiert worden (*). Signifikante Unterschiede waren bei beiden Temperaturen jedoch nur vereinzelt zu beobachten, wohingegen sich 37°C und 70°C

wieder signifikant voneinander unterschieden. So ergaben bei 37°C zwei Ansätze mit NADH (human 1 und 2), einer mit NADPH (human 4) und drei Ansätze mit t=0 (human 1, 3 und 4) und bei 70°C ein Ansatz mit NADH (human 2) und alle mit t=0 signifikante Unterschiede zum cosubstratfreien Ansatz. Bei den eingefrorenen und wieder aufgetauten Erythrozyten zeigten sich bei einer Inkubationstemperatur von 37°C Benzamidinkonzentrationen von 0,59 bis 1,48 nmol und bei 70°C von 3,4 bis 3,9 nmol Benzamidin/min/ml Erythrozytenlösung.

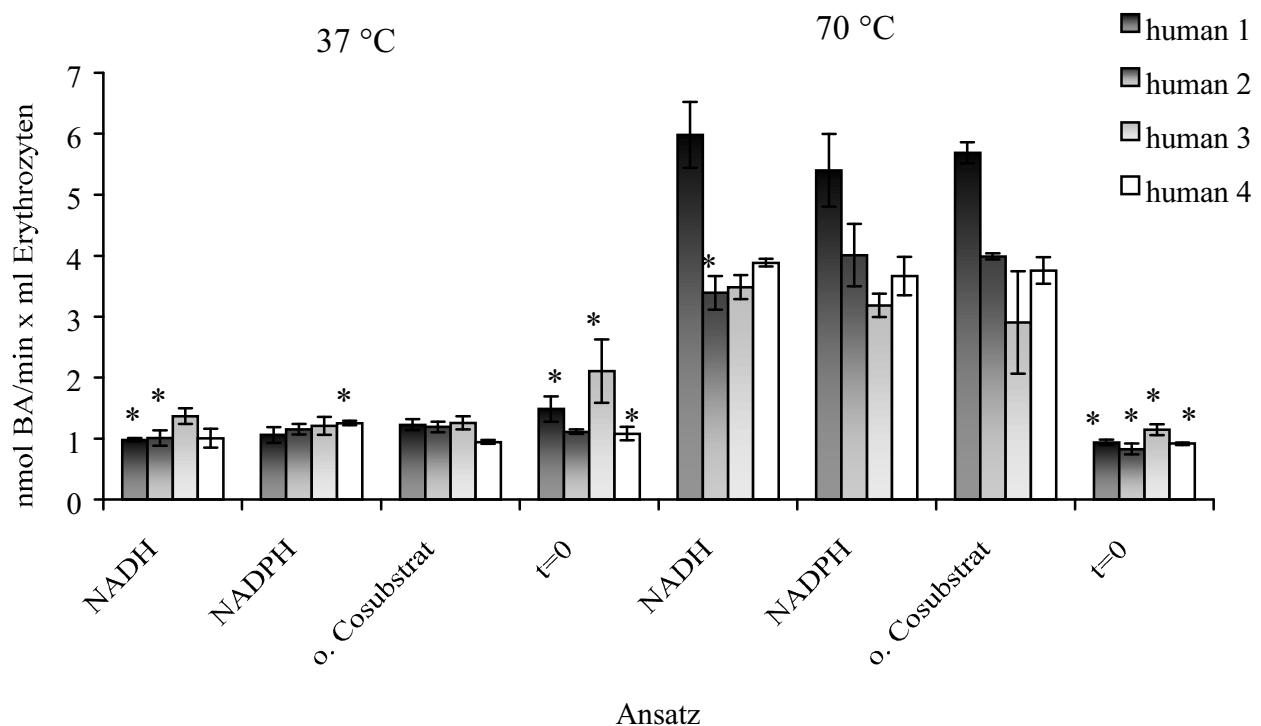


Abb. 5-11: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch zuvor eingefrorene humane Erythrozyten bei 37°C und 70°C. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. o., ohne Zusatz von; t=0, sofort abgestoppt und aus dem Wasserbad entnommen; BA, Benzamidin; SD, Standardabweichung; *, statistisch signifikanter Unterschied zum cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

5.3.7 Humanes Hämoglobin

Neben den Inkubationen mit Erythrozyten wurden auch Inkubationen mit Hämoglobin durchgeführt, um zu untersuchen, ob die *N*-Reduktion von Benzamidoxim durch die Anwesenheit eines Hämgerüsts ablaufen kann. Tatsächlich konnte in den Hämoglobin-Ansätzen eine Benzamidin-Bildung beobachtet werden, die in Abb. 5-12 dargestellt ist. Die Inkubation mit Hämoglobin erzielte nach Zugabe eines Cosubstrates bessere Umsetzungsraten, wobei es gleichbedeutend war, ob NADH oder NADPH zugefügt wurde. Jedoch zeigte sich auch ohne Cosubstrat noch eine, wenn auch geringere, Umsetzung, wobei die Werte der verschiedenen Ansätze keine statistisch signifikanten Unterschiede mit $p < 0,05$ (Student's t-Test) zeigten.

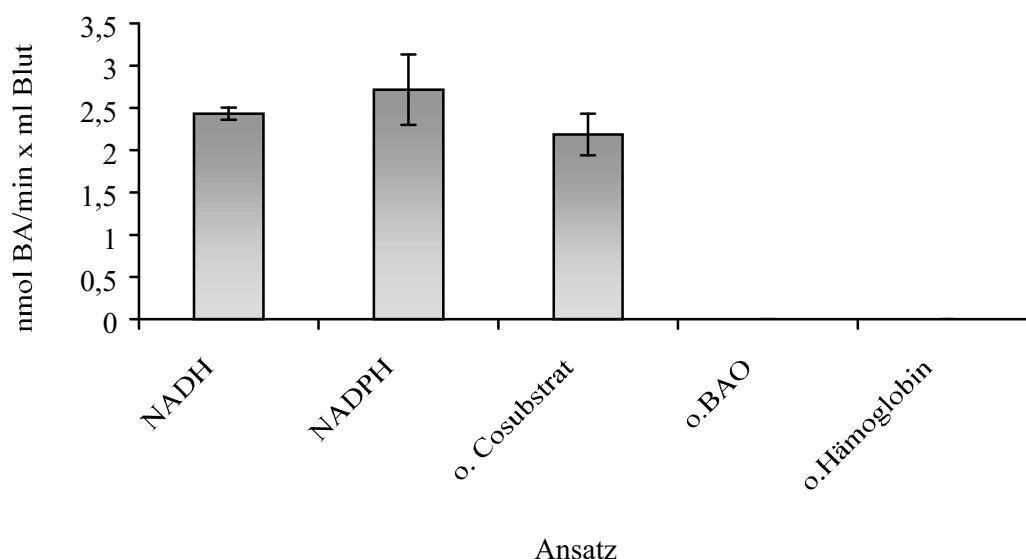


Abb. 5-12: Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Hämoglobin. Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten, doppelt analysierten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. o., ohne Zusatz von; BA, Benzamidin; BAO, Benzamidoxim; SD, Standardabweichung; kein statistisch signifikanter Unterschied zum cosubstratfreien Ansatz mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

5.3.8 Bestimmung der Ausbeute durch Zellzählung

Um die verschiedenen Chargen an gewonnenen Erythrozytenpräparationen miteinander vergleichen zu können, mussten die darin enthaltenen Erythrozyten gezählt werden. Diese Zählung erfolgte mit der im Methodenteil erklärten Neubauerkammer und ergab die in Tabelle 5-2 aufgeführten Werte.

Sämtliche gewonnenen Erythrozytenpräparationen besaßen Zellzahlen im Bereich von 10^9 Zellen pro ml Erythrozytenlösung. So lagen die Konzentrationen durch das Verdünnen mit PBS-Puffer ungefähr bei der normalen Blutkonzentration. Um die Umsetzungsraten der einzelnen Erythrozytenchargen besser miteinander vergleichen zu können, sind die erhaltenen Umsetzungen auf die entsprechende Erythrozytenzahl umgerechnet worden und ebenfalls in Tabelle 5-2 aufgeführt. Unter diesen Werten ergeben sich kaum statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich der Umsetzungen der verschiedenen Chargen zueinander mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

Tabelle 5-2: Ausbeute der verschiedenen Erythrozytenpräparationen und Vergleich der erhaltenen Umsetzungen von Benzamidoxim zu Benzamidin unter Einbeziehung der Zellzahl. Die Ausbeuten sind jeweils auf den ml Erythrozytenlösung bezogen, die Umsetzungen auf 10^9 Zellen \pm SD. n.b., nicht bestimmt; SD, Standardabweichung.

Untersuchte Probe	Ausbeute (x 10^9 Zellen)	nmol Benzamidin/min x 10^9 Zellen			
		frisch		gefroren	
		37°C	70°C	37°C	70°C
Schwein 1	3,1	0,17 \pm 0,02	n.b.	0,37 \pm 0,02*	n.b.
Schwein 2	3,4	0,32 \pm 0,01	0,76 \pm 0,01*	0,73 \pm 0,01	2,26 \pm 0,05*
Schwein 3	5,9	0,32 \pm 0,02*	1,11 \pm 0,05*	0,42 \pm 0,01	1,83 \pm 0,17*
Human 1	3,7	0,55 \pm 0,01*	1,45 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	0,97 \pm 0,15*
Human 2	4,3	0,27 \pm 0,0	0,60 \pm 0,01	0,23 \pm 0,02	0,79 \pm 0,06
Human 3	3,2	0,27 \pm 0,03	0,62 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03	1,22 \pm 0,01
Human 4	3,1	0,37 \pm 0,02	0,83 \pm 0,3*	0,32 \pm 0,04	1,13 \pm 0,03
Human 5	5	0,25 \pm 0,0	n.b.	0,30 \pm 0,02	n.b.
Human 6	3,6	0,26 \pm 0,01	0,38 \pm 0,03*	0,33 \pm 0,0	n.b.

*, statistisch signifikanter Unterschied zu allen anderen Ansätzen dieser Spalte der jeweiligen Art mit $p < 0,05$ (Student's t-Test).

Die aus den Inkubationen mit Hämoglobin (siehe 5.3.7) resultierenden Umsetzungsraten sind in Tabelle 5-3 zum Vergleich mit denen aus humanen und porcinen Erythrozyten aufgeführt. Durch eine Umrechnung über die ermittelten Erythrozytenzahlen in den einzelnen Erythrozytenchargen ist die Angabe der Umsetzung in nmol/ml Blut möglich. Interessanterweise ergaben sich sehr ähnliche Werte für die Umsetzungen mit Hämoglobin und mit Erythrozyten.

Tab. 5-3: Umsetzungsraten der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch porcine und humane Erythrozyten bzw. Hämoglobin bei 37 °C. Für die Erythrozyten sind die Mittelwerte der in Tabelle 5-2 angegebenen Umsetzungsraten eingesetzt worden. Die durchschnittliche Erythrozytenzahl wurde aus Tabelle 5-4 übernommen.

	Umsetzung [nmol/min x 10 ⁹ Zellen]	durchschnittliche Erythrozytenzahl/ml	Umsetzung [nmol/ml Blut]
Porcine Erythrozyten	0,27	6 x 10 ⁹	1,62
Humane Erythrozyten	0,33	5 x 10 ⁹	1,65
Hämoglobin	~ 0,39	-	2,3

5.4 DISKUSSION

In dieser Arbeit gelang erstmals der Nachweis der *N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Blut bzw. Blutbestandteile. Es konnten Vollblut, Plasma und Erythrozyten gewonnen und auf ihre Reduktionsfähigkeit untersucht werden, wobei zunächst porcine und im folgenden auch humane Blutproben analysiert wurden. Dabei ließ sich in allen eingesetzten Präparationen die Bildung des Metaboliten Benzamidin nachweisen.

Bereits im Vollblut ergaben sich deutliche Umsetzungsraten, wobei jedoch keine Bevorzugung von NADH oder NADPH als Cosubstrat erkennbar war (siehe Abb. 5-2). Nach diesem Ergebnis galt es nun, den Ort der Reduktion näher zu bestimmen. Da in den Ansätzen mit Blutplasma im Vergleich zum Vollblut kaum Benzamidin gebildet wurde (Abb. 5-3), konnte darauf geschlossen werden, dass die Erythrozyten die entscheidende Rolle bei dieser Reduktion spielen. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Beobachtungen von Sugihara *et al.* [2000], die für die Reduktion von Hydroxamsäuren in Kaninchenblut die Erythrozyten verantwortlich machten.

Die porcinen Erythrozyten wurden charakterisiert, um die optimalen Bedingungen für diese Reduktion zu erhalten. Die Zeitabhängigkeit zeigte keine Steigerung der Umsetzungsrate mit zunehmender Inkubationsdauer. In Abb. 5-4 wird deutlich, dass bereits bei einem sofortigen Abstoppen die komplette Umsetzung stattgefunden hatte und sich nicht weiter steigern ließ. Daher verläuft die Kurve in dieser Abbildung stetig gegen Null. Des Weiteren ergab sich interessanterweise ein optimaler pH-Wert von 5,5, wohingegen der physiologische pH-Wert des Blutes bei 7,3-7,5 liegt. Bei einem pH-Wert von 5,5 scheinen die Erythrozyten noch relativ stabil zu sein, da Chernitsky *et al.* [2001] beschreiben, dass eine durch pH-Wert-Einfluss verursachte Hämolyse im Bereich von pH 5,8-7,2 gegen Null strebt. Zou *et al.* [2000] beobachteten dagegen einen Anstieg der Hämolyserate im Bereich von pH 5,8-6,4 im Glycerolmedium bei humanen Erythrozyten. Folglich scheint ein Glycerolzusatz trotz gleichen pH-Wertes zu verstärkter Hämolyse zu führen. In den Inkubationsansätzen mit frischen

Erythrozyten war jedoch kein Glycerol enthalten. Die Hämolyse wurde in dieser Arbeit aber auch nicht als ein Problem betrachtet, da sie die zu untersuchende Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin nicht unterband. Es kann sogar die Vermutung angestellt werden, dass eine Hämolyse die Umsetzungsraten zu steigern vermag, da die mit Glycerol versetzten eingefrorenen Ansätze in dieser Arbeit keine Hemmungen verursachten, sondern sogar gesteigerte Metabolismusraten im Vergleich zu den glycerolfreien Ansätzen zeigten (siehe Abb. 5-7). Hingegen beschreibt Iijima [1998], dass Lösungen mit einem Glycerolanteil von 30-40 % eine vergleichsweise geringe Hämolyse aufweisen, wenn sie bei 20-80 °C eingefroren wurden. Diese Voraussetzungen wurden in dieser Arbeit eingehalten, sodass dementsprechend eine verhältnismäßig geringe Hämolyse resultieren sollte. Eine beabsichtigt durchgeführte Hämolyse zeigte dagegen bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C keine und bei 70 °C eine leichte Steigerung der Umsetzungsrate (siehe Abb. 5-7 und Abb. 5-8). Das Einfrieren und der Glycerolzusatz scheinen also einen fördernden Effekt bezüglich der *N*-Reduktion von Benzamidoxim auszuüben, eine Hämolyse hingegen nicht. Aus humanem Blut wurden ebenfalls Inkubationen mit frischen und mit zuvor eingefrorenen Erythrozyten durchgeführt. Hier zeigten sich die bereits bei porcinen Erythrozyten gemachten Beobachtungen bestätigt (siehe Abb. 5-10 und Abb. 5-11), da die eingefrorenen Erythrozyten wiederum die eindeutig stärkere Benzamidinbildung ergaben.

Um zu lokalisieren, ob die Reduktion durch membrangebundene oder im Zellinneren gelöst vorliegende Komponenten bewirkt wird, wurde die Erythrozytenmembran aufgeschlossen und vom Zellinhalt abgetrennt. Bei einer mit dieser Erythrozytenmembran durchgeführten Inkubation zeigte sich eine Umsetzungsrate von über 80 % bezogen auf die entsprechenden Erythrozyten. Dieser vergleichsweise hohe Wert (siehe Abb. 5-7 und Abb. 5-9) lässt darauf schließen, dass die Reduktion zum Großteil durch die Membran oder an ihr gebundene Komponenten abläuft.

Die oben aufgeführten Versuche wurden zusätzlich zu der Inkubation bei 37 °C auch bei 70 °C durchgeführt. Bei diesen ergaben sich, wie man in den Abbildungen 5-6 bis

5-11 sehen kann, die gleichen Verhältnisse der verschiedenen Ansätze zueinander wie bei den 37 °C-Inkubationen. Die Durchführung der Inkubation bei dieser hohen Temperatur liegt darin begründet, dass der Reduktion auch eine chemische Reaktion zugrunde liegen könnte. Die sehr schnell ablaufende Reaktion und die nicht belegbare Notwendigkeit einer Cosubstratzugabe sprechen eindeutig dafür. Sowohl mit porcinen als auch mit humanen Erythrozyten waren die Reduktionen in den Ansätzen mit NADH, mit NADPH oder ohne Cosubstrat nahezu identisch. Diese Gegebenheit kann allerdings auch dadurch hervorgerufen werden, dass bereits hinreichend Cosubstrat in den Zellen vorkommt. In den Erythrozyten liegt natürlicherweise eine gewisse Konzentration an NADH und NADPH vor, da diese für physiologisch ablaufende Reaktionen benötigt werden [Jacobasch, 2000; May *et al.*, 2001].

Tatsächlich zeigten sich bei 70 °C mit zwei- bis dreifachen Umsetzungsraten deutlich höhere Benzamidinkonzentrationen als bei 37 °C. Gegen eine chemische Reaktion spricht aber die Tatsache, dass die Erythrozyten maximal 4 Tage bei ständiger Lagerung im Kühlschrank zu nutzen waren, während die Umsetzungsraten von Benzamidoxim zu Benzamidin dabei stark nachließen. Es wird von Thews *et al.* [1999] beschrieben, dass das Altern von Erythrozyten mit einer Abnahme der Enzymaktivität verbunden ist. Auch Moore *et al.* [1993] berichten von dem Problem, dass Erythrozyten schwer längere Zeit ungefroren zu lagern sind und einer speziellen additiven Lösung bedürfen. An solchen Zusätzen und einer Optimierung der Lagerbedingungen wurde und wird noch sehr intensiv geforscht, da hier besonders im Bereich von Blutkonserven ein erhebliches Verbesserungspotenzial besteht [Kim *et al.*, 2000; Valerie *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 2001]. Bei der Lagerfähigkeit ist auch von Bedeutung, wie lang die Lebensdauer der jeweiligen Erythrozyten ist. Beim Menschen beträgt sie 100-120 Tage, aber beim Schwein lediglich 65 Tage [Loeffler, 1994], sodass sich schon dadurch Probleme mit der Lagerung ergeben können.

Bei vergleichenden Studien zwischen Schwein und Mensch sind neben der unterschiedlichen Lebensdauer von Erythrozyten aber auch andere Differenzen zu beachten. Generell zeigt das Schwein mit 45-65 ml/kg Lebendmasse eine geringere

Blutmenge als andere Tierarten und auch der Mensch. Zudem hat man festgestellt, dass Schweine, die durch gezielte Fütterung sehr schnell an Gewicht zunehmen, eine noch geringere Blutmenge aufweisen als normal genährte Tiere [Mornet *et al.*, 1989]. Im Zuchtbereich legen Schweine in etwa 110 Tagen von 20 kg ausgehend bis auf 100 kg an Körpergewicht zu. Bei Erreichen dieses Gewichts besitzen sie ein ungefähres Blutvolumen von 5,8 l [Mornet *et al.*, 1989]. Die Blutmenge des Menschen beträgt indessen mit 80 ml/kg Körpergewicht bei einem Durchschnittsgewicht von 70 kg bereits 5,6 l. Der Mensch hat damit auf sein Körpergewicht bezogen ein viel höheres Blutvolumen und damit auch ein ganz anderes Verteilungsvolumen für Xenobiotika. Wenn also Enzymaktivitäten von Schwein und Mensch miteinander verglichen werden sollen, um Folgerungen auf Arzneistoffdosierungen oder –wirkungen zu ziehen, ist dieses größere Verteilungsvolumen pro kg Körpergewicht stets zu beachten. Bei Verabreichung der gleichen Dosis an Arzneistoff können allein durch diesen Unterschied ganz verschiedene Wirkungsstärken resultieren.

Betrachtet man die Erythrozytenmenge bei den beiden untersuchten Arten, so findet man beim Schwein $5-8 \times 10^6$ Zellen/ μ l Blut [Mornet *et al.*, 1989], wohingegen der Mensch lediglich $4,5-5,5 \times 10^6$ Zellen/ μ l Blut besitzt. Auch die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokritanteil allgemein können sich bei den beiden Spezies unterscheiden. Zur Veranschaulichung sind in folgender Tabelle (5-4) einige Blutparameter vergleichend zusammengefasst.

Tab. 5-4: Übersicht über Blut und Blutbestandteile bei Schwein und Mensch [Mornet *et al.*, 1989; Thews *et al.*, 1999].

	Schwein	Mensch
Hämatokrit [%]	32-50	43-47
Erythrozyten [x 10 ⁶ Zellen/ μ l]	5-8	4,5-5,5
Thrombozyten [x 10 ⁵ Zellen/ μ l]	3,2-7,1	15-35
Leukozyten [x 10 ³ Zellen/ μ l]	10-23	4-8
Hämoglobinkonzentration [g/l]	110-140	120-180

Für vergleichende Beobachtungen zwischen Schwein und Mensch müssen also immer die entsprechenden unterschiedlichen Blutparameter wie differierende Erythrozytenzahlen Berücksichtigung finden, weshalb die Umsetzungen in Tabelle 5-2 auch auf 10⁹ Zellen bezogen werden. Man könnte die Überlegung anstellen, ob die nachgewiesenen Reduktionen durch andere Zellen aus dem Blut als die Erythrozyten verursacht sein können. Da die Erythrozyten aber die Hauptmasse der zellulären Bestandteile bilden (siehe Tab. 5-4), sind Verunreinigungen mit den anderen Zellen zu vernachlässigen.

Es wurden bereits Überlegungen darüber angestellt, ob die in den Erythrozyten ablaufende Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch eine enzymatische oder eine chemische Reaktion verursacht wird. Takekawa *et al.* [2001] konnten in Studien mit Kaninchen- und Rinderblut eine durch die Anwesenheit eines Hämgerüsts ablaufende nicht-enzymatische Reduktion nachweisen, wobei auch bei ihnen die Erythrozyten und nicht das Plasma für die Reduktion verantwortlich waren. Nicht-

enzymatische Reduktionen wurden ferner am Beispiel von Hydroxamsäuren durch Cytochrom P450 in Rattenleber und durch Hämoglobin in Kaninchenblut [Kitamura *et al.*, 1999a; Sugihara *et al.*, 2000] und von Imipamin *N*-Oxid durch ein Hämoprotein in Rattenlebercytosol [Kitamura *et al.*, 1999b] beschrieben. In ihrer Arbeit stellten Takekawa *et al.* [2001] die Katalase als entscheidendes Enzym heraus, wohingegen das Hämoglobin, das ebenfalls ein Hämgerüst besitzt, nur etwa 10 % der Reduktion zeigte. Ein Abkochen des Blutes ließ die Umsetzungen auf 45-50 % absinken, aber immer noch stattfinden [Takekawa *et al.*, 2001].

In dieser Arbeit wurden auch Inkubationen mit Hämoglobin durchgeführt, um zu untersuchen, ob die *N*-Reduktion von Benzamidoxim durch die Anwesenheit eines Hämgerüsts ablaufen kann. Falls die Reduktion durch ein Hämgerüst bedingt sein sollte, würde sich erklären lassen, warum sich Benzamidin sowohl mit „normalen“ als auch mit denaturierten Erythrozyten gebildet hat, zumal diese in ihren Umsetzungen fast identische Werte ergaben (siehe Abb. 5-5). Tatsächlich konnte in den Hämoglobin-Ansätzen eine Benzamidin-Bildung beobachtet werden, die sich bei Zugabe von einer definierten Menge an Erythrozyten entsprechend erhöhte (siehe Abb. 5-12). Die daraus resultierenden Umsetzungsdaten für Hämoglobin sind in Tabelle 5-3 zusammen mit denen aus humanen und porcinen Erythrozyten aufgeführt. Interessanterweise ergaben sich sehr ähnliche Werte für die Umsetzungen mit Hämoglobin und mit Erythrozyten. Eine Beteiligung des Hämgerüsts kann anhand dieser Ergebnisse vermutet werden.

Die Inkubation mit Hämoglobin erforderte jedoch im Gegensatz zu denen mit Erythrozyten die Zugabe von NADH oder NADPH, um bessere Umsetzungsdaten zu erzielen, wobei es gleich war, welches zugefügt wurde. Jedoch zeigte sich auch ohne Cosubstrat noch eine, wenn auch geringere, Umsetzung. Eine Erklärung könnte darin liegen, dass die Erythrozyten bereits eine für die Reduktion ausreichende Menge an Cosubstrat besitzen, das Hämoglobin aufgrund der Aufreinigung nur sehr wenig oder gar nicht.

Im Unterschied zu Takekawa *et al.* [2001] ergaben sich jedoch in Inkubationen, die bei der höheren Temperatur von 70 °C durchgeführt wurden, immer höhere Benzamidinkonzentrationen als bei der geringeren Temperatur von 37 °C. Dabei spielte es in dieser Arbeit keine Rolle, ob die Erythrozyten vorher abgekocht wurden oder nicht. Ferner nahm die Reduktion mit abgekochten Erythrozyten in seinen Studien ab, wohingegen in dieser Arbeit abgekochte wie frische Erythrozyten unter gleichen Bedingungen auch immer gleiche Umsetzungen ergaben (siehe Abb. 5-5 und Abb. 5-6).

Eine Erklärung für die bei höheren Temperaturen ansteigenden Umsetzungsraten könnte die Abspaltung oder Zerstörung von hemmenden Strukturen sein.

Eine aufgrund dieser Erkenntnis durchgeführte Temperaturabhängigkeit zeigte, dass eine Variation der Inkubationstemperatur zwischen 4 und 60 °C keinen Einfluss auf die Umsetzungsrate ausübte. In diesem Temperaturbereich waren die Umsetzungsraten von Benzamidoxim zu Benzamidin identisch, also die verantwortlichen Strukturen noch stabil. Ab 70 °C aufwärts stiegen die Umsetzungen dagegen steil an, sodass sich bei 90 °C eine siebenfach höhere Benzamidinkonzentration ergab.

Ein ähnliches Verhältnis zeigte sich bei der bei 70 °C durchgeführten Zeitabhängigkeit. Im sofort abgestoppten Ansatz hatte sich bereits eine Menge von ca. 20 nmol Benzamidin gebildet, die sich bis zu einer Inkubationszeit von 10 min nicht änderte. Aber danach stieg die Umsetzung stetig an, bis sie nach 120 min einen Wert von 125 nmol Benzamidin erreichte. Es muss also etwa 10 min gedauert haben, bis sich die Ansätze auf über 60 °C erwärmt haben oder die Häm-Struktur sich zu verändern begann. Je länger die Ansätze im folgenden der hohen Temperatur ausgesetzt waren, um so stärker wurde die Umsetzung. Eine Erklärung für dieses Phänomen läßt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht geben, wird aber sicherlich in weiteren Arbeiten mit Erythrozyten verfolgt werden.

Ein Faktor, der sicherlich auch die Ergebnisse aus Tab. 5-3 beeinflusst haben könnte, ist die starke Variabilität des Hämoglobingehalts. Er hängt wie auch die Anzahl der

Erythrozyten mit Alter, Geschlecht, Ernährung, Jahreszeit, Klima und Erkrankungen zusammen. Daher unterliegen für Hämoglobin oder Erythrozyten erhaltene Ergebnisse, wie die in diesem Kapitel aufgeführten, starken Schwankungen und damit auch stets einer gewissen Ungenauigkeit. Besonders bei Schweinen macht sich eine jahreszeitliche oder altersbedingte Abhängigkeit bemerkbar [Wege, 1967; Arkenau, 1996]. Selbst Bewegungsmangel durch zu enge Stallhaltung kann den Hämoglobinwert und damit auch daraus berechnete Ergebnisse verändern [Link, 1993]. Diese Faktoren sind in der vorliegenden Arbeit außer acht gelassen worden, da nicht genügend Informationen vorhanden waren.

Sicherlich dürften die Ergebnisse von Vollblut, Blutplasma und Erythrozyten bezüglich des extrahepatischen Metabolismus von nicht unerheblicher Bedeutung sein, da bereits im Blut ein gewisser Anteil der in pharmakologischer Absicht applizierten Arzneistoffe metabolisiert werden kann. Ebenso können toxische Xenobiotika schon im Blut durch Biotransformation entgiftet werden, sodass sie vor Erreichen und Schädigung anderer Organe eliminiert werden können.

Diese Arbeit belegt, dass stickstoffhaltige funktionelle Gruppen, die im Rahmen des Prodrug-Prinzips als Amidoxim hydroxyliert verabreicht wurden, während der Passage durch das Blut bereits - wenn auch zu einem geringen Teil - zum Amidin reduziert werden können, und somit auch die Erythrozyten zur zügigen und vollständigen Bioaktivierung der Amidoxime beitragen. Da viele der Amidoxim-Prodrugs in die Blutgerinnung eingreifen (Thrombin-Inhibitoren, Faktor Xa-Antagonisten, Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor-Antagonisten) ist die teilweise Bereitstellung der Amidine im Blut sicherlich ein Vorteil.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin in Erythrozyten und damit auch im Blut bewiesen werden. Anhand gezielter Inkubationen konnte die Reduktion näher eingegrenzt werden, sodass von einer Beteiligung der Erythrozytenmembran bzw. daran gebundener Strukturen ausgegangen werden kann. Ebenfalls konnte die Reduktionsfähigkeit von Hämoglobin

gegenüber Benzamidoxim ohne Zusatz weiterer Faktoren außer NADH oder NADPH als Cosubstrat gezeigt werden. Es wurden keine weiteren Enzyme oder Elektronendonatoren für die Reaktion benötigt. Die Reduktion ließ sich durch Temperaturerhöhung steigern, und die Reaktion selbst erfolgt sehr zügig. Diese Ergebnisse sprechen für eine - zumindest überwiegende - chemische Reaktion, die durch Hämgerüste offenbar gefördert wird. Die auf diesem Wege entstehenden Benzamidinmengen sind gering, und die durch enzymatische Katalyse in den verschiedenen Organen und Zellorganellen gebildeten Mengen dürften für den Großteil der Bioaktivierung verantwortlich sein.

Es stellt sich noch die Frage, ob zusätzlich eine geringere rein enzymatische Umsetzung abläuft. Aufgrund des Auftretens von Cytochrom b₅ und der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase [Passon *et al.*, 1972; Abe *et al.*, 1985; Yubisui *et al.*, 1986; Arinc *et al.*, 1992; Chen und Banerjee, 1998] in den Erythrozyten war die Existenz eines mit den anderen Organen vergleichbaren Enzymsystems vermutet worden. Ob sich in den Erythrozyten ein solches finden lässt, wird in weiteren Studien zu klären sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der enzymatischen Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen im Rahmen des extrahepatischen Metabolismus. In vorangegangenen Studien konnte die *in vitro* und *in vivo* Bedeutung dieser Reduktion für verschiedene Spezies belegt werden [Clement et al., 1993b; Clement et al., 1996]. Wurde bislang lediglich die Leber verschiedener Tierarten untersucht, wurden in dieser Arbeit erstmals verschiedene andere Organe erforscht.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Mikrosomen aus Leber, Niere, Gehirn, Lunge und Darm vom Schwein und Leber, Niere und Darm vom Menschen gewonnen. Daneben wurden auch Blut und Blutbestandteile von Schwein und Mensch beschafft, präpariert und in die Untersuchungen einbezogen.

In den Studien wurden die Mikrosomen aus den verschiedenen Organen mit drei Substraten umgesetzt, um das Vorhandensein eines reduktiven Enzymsystems, das in der Leber aus Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und einem P450 Isoenzym besteht [Clement et al., 1997], zu belegen. Die in dieser Arbeit untersuchten *N*-hydroxylierten Verbindungen Benzamidoxim, Guanoxabenz und Ro 48-3656 waren von ihrer chemischen Struktur her entweder Amidoxime oder *N*-Hydroxyamidinohydrazone, die durch reduktive Enzymsysteme dehydroxyliert werden können, sodass als Metaboliten Amidine bzw. Amidinohydrazone entstehen.

In allen Mikrosomen, sowohl vom Schwein als auch vom Menschen, wurde eine eindeutige Umsetzung der eingesetzten Amidoxime (bzw. des *N*-Hydroxyamidinohydrazons) zu den korrespondierenden Amidinen (zum Amidinohydrazon) nachgewiesen, sodass die *N*-Dehydroxylierung für die drei verwendeten Substrate in den in dieser Arbeit eingesetzten Organen belegt werden konnte. Die Reduktionen zeigten mit Ausnahme des Darms alle die Bevorzugung eines leicht sauren Reaktionsmilieus und alle die Erfordernis einer Cosubstratzugabe. Dabei ergab sich in Übereinstimmung mit bisherigen Studien eine Präferenz von NADH

gegenüber NADPH. Die folgende Abbildung 6-1 fasst noch einmal die in diesen Studien nachgewiesenen Reduktionen zusammen.

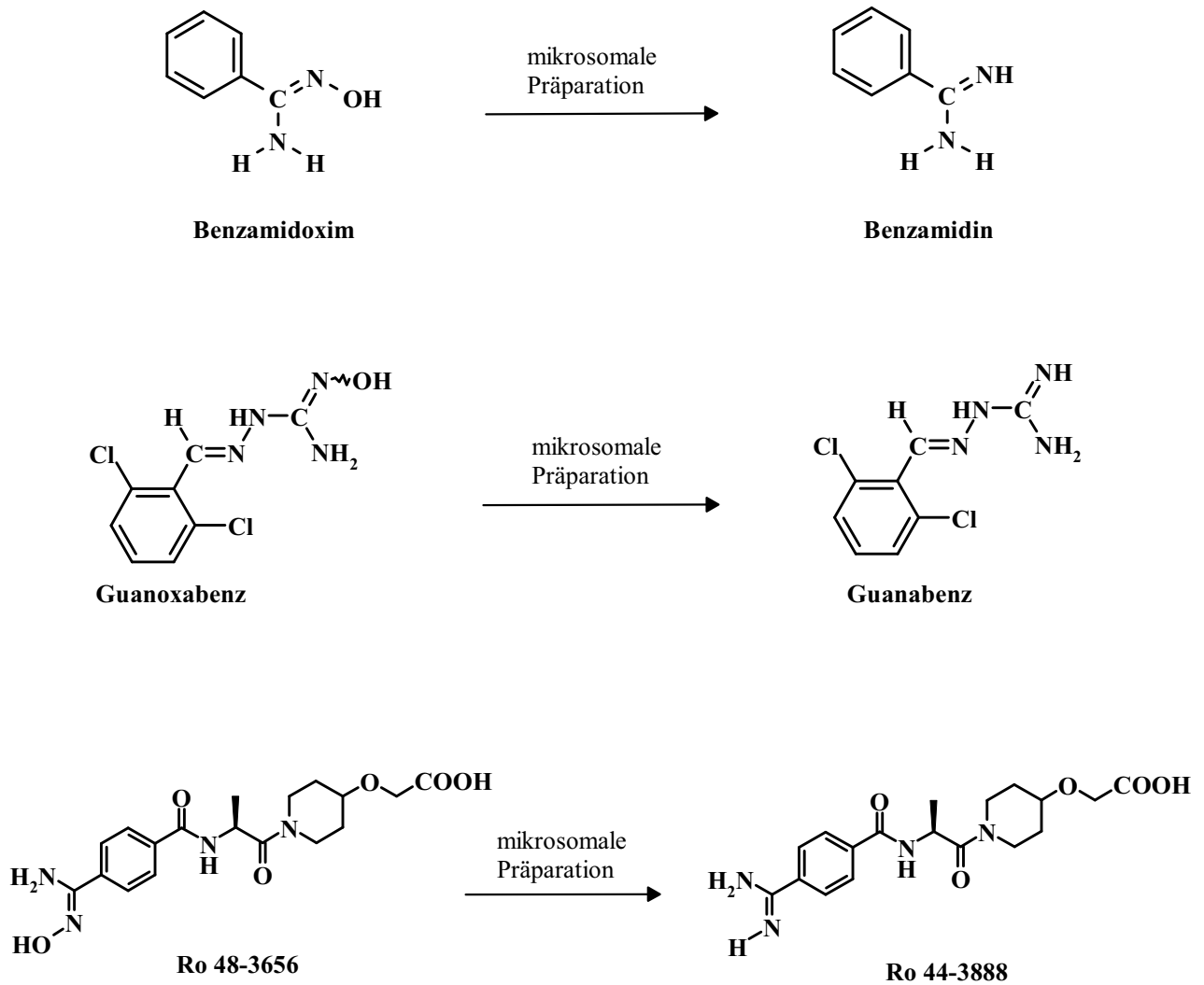


Abb. 6-1: Nachgewiesene extrahepatische Reduktionen von verschiedenen N-hydroxylierten Verbindungen (Mikrosomen aus Leber, Niere, Gehirn, Lunge und Darm vom Schwein bzw. Leber, Niere und Darm vom Menschen).

Folglich beinhalten alle hier untersuchten Organe Enzyme oder Enzymsysteme, die zu solchen Reduktionen von Fremdstoffen in der Lage sind. Extrahepatische Biotransformationen waren zwar auch zuvor schon beschrieben worden, aber das Ausmaß der in dieser Studie gezeigten reduktiven Umwandlungen ist sehr überraschend, zumal Nierenmikrosomen höhere Umsetzungsraten als solche aus der Leber zeigen.

Die Charakteristika der enzymatischen Umsetzungen sind sehr ähnlich und lassen auf vergleichbare Enzymsysteme in allen Organen schließen. Diese dürften wie das bereits zuvor nachgewiesene mikrosomale Lebersystem [Clement *et al.*, 1997] aus Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und einem P450 Isoenzym bestehen. Studien mit einem Antikörper zeigten, dass zumindest in der Leber und in der Niere vom Schwein die dritte Komponente, das P450 Isoenzym, identisch oder sehr ähnlich sein dürfte.

Das Vorkommen von diesen Reduktasen in allen Organen lässt auch Rückschlüsse auf ein Enzymsystem mit wichtiger Funktion im endogenen Stoffwechsel zu, welches mit Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 Reduktase als Elektronenüberträger zusätzlich *N*-Hydroxyverbindungen reduzieren kann. Die Hinweise aus anderen Studien [Berger, 2002] auf die Beteiligung einer Vitamin D_3 -Hydroxylase [Bergman und Postlind, 1990; Postlind *et al.* 1997], werden durch die vorgelegte Studie erhärtet, da diese lebensnotwendige Vitamin D_3 -Hydroxylase auch in den Organen [Axén *et al.*, 1992; Hosseinpour und Wikvall, 2000] vorkommt, in denen reduktive Aktivitäten gefunden wurden.

Das Prodrug-Prinzip Amidoxime anstelle von Amidinen beruht also auf offenbar vitalen Enzymen, die nicht polymorph sind. Dies ist ein großer Vorteil für das Prodrug-Prinzip, da nicht mit starken individuellen Schwankungen in der Bioaktivierung zu rechnen ist.

Die hier beschriebenen extrahepatischen Reduktionen sind aber nicht nur für die Prodrug-Aktivierung von nicht mutagenen Verbindungen von Bedeutung, sondern auch

für die Entgiftung von mutagenen *N*-hydroxylierten Verbindungen wie das Guanoxabenz. Die enzymatischen Umsetzungen in den verschiedenen Organen dürften den Hauptanteil der Reduktionen ausmachen. Hinzu kommt eine geringe nicht-enzymatische Reduktion, die durch Hämoglobin gefördert wird, wie durch Studien mit Blut und Blutbestandteilen gezeigt wurde. Zukünftige Studien werden sich mit der weiteren, endgültigen Identifizierung der extrahepatischen reductiven Enzymsysteme beschäftigen müssen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ABE, K.; KIMURA, S.; KIZAWA, R.; ANAN, F.K., Sugita, Y.

Amino Acid Sequences of Cytochrome b₅ from Human, Porcine, and Bovine Erythrocytes and Comparison with Liver Microsomal Cytochrome b₅. *J. Biochem.* 97 (1985), S. 1659-1668

ALBERT, A.; GOLDACRE, R.; PHILLIPS, J.

The Strength of Heterocyclic Bases. *J. Chem. Soc.* (1948), S. 2240-2249

AMET, Y.; BERTHOU, F.; FOURNIER, G.; DRÉANO, Y.; BARDOU, L.; CLÈDES, J.; MÉNEZ, J.-F.

Cytochrome P450 4A and 2E1 Expression in Human Kidney Microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997), S. 765-771

ANZENBACHER, P.; SOUCEK, P.; ANZENBACHEROVÁ, E.; GUT, I.; HRUBÝ, K.; SVOBODA, Z.; KVVETINA, J.

Presence and Activity of Cytochrome P450 Isoforms in Minipig Liver Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 26 (1998), Nr. 1, S. 56-59

ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVÁ, E.; ZUBER, R.; SOUCEK, P.; GUENGERICH, F.P.

Letter to the Editor. *Drug Metab. Dispos.* 30 (2002), Nr. 1, S. 100-102

ARINC, E.

Essential Features of NADH Dependent Cytochrome b₅-Reductase and Cytochrome b₅ of Liver and Lung Microsomes. In: ARINC, E.; SCHENKMAN, J.B. und HODGSON, E.: Proceedings of a NATO Advanced Study Institute on Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds. New York: Plenum Press, 1991, S. 149 -170

ARINC, E.; GÜRAY, T.; SAPLAKOGLU, U.; ADALI, O.

Purification and Characterization of two Forms of Soluble NADH Cytochrome b₅ Reductases from Human Erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 101B (1992), Nr. 1/2, S. 235-242

ARKENAU, E.F.

Systematische Einflußfaktoren auf Blutparameter von Sauen unter Stallhaltungsbedingungen mit Stroheinsatz. Dissertation, Kiel 1996

AXÉN, E.

Purification from Pig Kidney of a Microsomal Cytochrome P-450 Catalysing 1 α -Hydroxylation of 25-Hydroxyvitamin D₃. *FEBS Lett.* 375 (1995), S. 277-279

AXÉN, E.; BERGMANN, T.; WIKVALL, K.

Purification and Characterization of a Vitamin D₃ 25-Hydroxylase from Pig Liver Microsomes. *Biochemical J.* 287 (1992), S. 725-731

AXÉN, E.; HARMEYER, J.; WIKVALL, K.

Renal and Hepatic 1 α -Hydroxylation of 25-Hydroxyvitamin D₃ in Piglets Suffering from Pseudo Vitamin D-deficiency Rickets, type I. *Biochim. Biophys. Acta* 1407 (1998), S. 234-242

BALDWIN, E.

Das Wesen der Biochemie 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1968, S. 39 -40

BEHRENS, D.

Reduktion von N-hydroxylierten Verbindungen durch Cytochrom P450 Isoenzyme aus Schweineleber und humaner Leber. Dissertation, Kiel 1999

BERGER, K.

Vergleichende Charakterisierung zweier CYPD-Enzyme. Dissertation, Kiel 2002

BERGMANN, T.; POSTLIND, H.

Characterization of Pig Kidney Microsomal Cytochrome P-450 Catalysing 25-Hydroxylation of Vitamin D₃ and C₂₇ Steroides. *Biochemical J.* 270 (1990), S. 345-350

BEWLEY, M.C.; MAROHNIC, C.C.; BARBER, M.J.

The Structure and Biochemistry of NADH-Dependent Cytochrome b₅ Reductase Are Now Consistent. *Biochemistry* 40 (2001), S. 13574-13582

BHAMRE, S.; ANANDATHEERTHAVARADA, H.K.; SHANKAR, S.K.; RAVINDRANATH, V.

Microsomal Cytochrome P450 in Human Brain Regions. *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992), Nr. 6, S. 1223-1225

BONSE, G.; METZLER, M.

Biotransformation organischer Fremdstoffen 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1976, S. 43-45; 57-59; 99-103

BRICKL, R.; HEINZEL, G.; WEISENBERGER, H.; SCHUBERT, H.; RUTSCH, W.; ROTH, W.

PK/PD Simulations as a Tool for Rational Design of Clinical Dosage Regimes: an Example with Fradafiban. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 35 (1997), S. 475-480

CANNON, C.P.; MCCABE, C.H.; BORZAK, S.; HENRY, T.D.; TISCHLER, M.D.; MUELLER, H.S.; FELDMAN, R.; PALMERI, S.T.; AULT, K.; HAMILTON, S.A.; ROTHMAN, J.M.; NOVOTNY, W.F.; BRAUNWALD, E.; FOR THE TIMI 12 INVESTIGATORS

Randomized trial of an Oral Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Antagonist, Sibrafiban, in Patients After an Acute Coronary Syndrome. *Circulation* 97 (1998), S. 340-349

CHAE, Y.-H.; THOMAS, T.; GUENGERICH, F.P.; FU, P.P.; EL-BAYOUMY, K.

Comparative Metabolism of 1-, 2-, and 4-Nitropyrene by Human Hepatic and Pulmonary Microsomes. *Cancer Res.* 59 (1999), S. 1473-1480

CHEN, Z.; BANERJEE, R.

Purification of Soluble Cytochrome b₅ as a Component of the Reductive Activation of Porcine Methionine Synthase. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), Nr. 40, S. 26248-26255

CHERNITSKY, E.A.; ROZIN, V.V.; SENKOVICH, O.A.

PH-Dependence of Detergent-Induced Hemolysis and Vesiculation of Erythrocytes. *Membr. Cell Biol.* 14 (2001), Nr. 4, S. 529-536

CLEMENT, B.

The N-Oxidation of Benzamidines in vitro. *Xenobiotica* 13 (1983), S. 467-473

CLEMENT, B.

Oxidative und Reduktive Biotransformation Stickstoffhaltiger Funktioneller Gruppen. *Arch. Pharm.* 324 (1991), S. 398

CLEMENT, B.

Methoden zur Behandlung und Prophylaxe der *Pneumocystis carinii* Pneumonie (PCP) und anderen Erkrankungen sowie Verbindungen und Formulierungen zum Gebrauch bei besagten Methoden. Dt. Patentanmeldung (1993), P 4321444.4, PCT/DE 94/00756 (1994), weltweite Anmeldung, Europa ist erteilt (0708640, 16.09.1998), US A ist erteilt (5, 786, 383; 28.06.1998)

CLEMENT, B.

Oxidation and Reduction of Nitrogen via CYP450: Importance of the Reduction of Genotoxic *N*-Hydroxylated Functional Groups. N. GOODERHAM (ED): Drug Metabolism: Towards the Next Millenium. IOS-Press, 1998, S. 59-71

CLEMENT, B.; DEMESMAEKER, M.

Formation of Guanoxabenz from Guanabenz in Human Liver. *Drug Metab. Dispos.* 25 (1997), Nr. 11, S. 1266-1271

CLEMENT, B.; JUNG, F.

N-hydroxylation of the Antiprotozoal Drug Pentamidine Catalysed by Rabbit Liver Cytochrome P-450 2C3 or Human Liver Microsomes, Microsomal Retroreduction, and further Oxidative Transformation of the Formed Amidoximes. *Drug Metab. Dispos.* 22 (1994), Nr. 3, S. 486-497

CLEMENT, B.; WISSEL, S.

Studies on Microsomal *N*-Oxygenation of Isothioureas. *Prog. Pharmacol. Clin. Pharmacol.* 8 (1991), S. 219-227

CLEMENT, B.; ZIMMERMANN, M.

Characteristics of the Microsomal *N*-Hydroxylation of Benzamidine to Benzamidoxime. *Xenobiotica* 17 (1987), S. 659-667

CLEMENT, B.; SCHMEZER, P.; WEBER, H.; SCHLEHOFER, J.R.; SCHMITT, S.; POOL, B.L.

Genotoxic Activities of Benzamidine and its *N*-Hydroxylated Metabolite Benzamidoxime in Salmonella Typhimurium and Mammalian Cells. *J. Canc. Res. Clin. Oncol.* 114 (1988b), S. 363-368

CLEMENT, B.; SCHMITT, S.; ZIMMERMANN, M.

Enzymatic Reduction of Benzamidoxime to Benzamidine. *Arch. Pharm.* 321 (1988a), S. 955-956

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; TERLINDEN, R.; WINGEN, F.-J.

Reduction of Amidoxime Derivatives to Pentamidine in vivo. *Arch. Pharm.* 325 (1992), S. 61-62

CLEMENT, B.; IMMEL, M.; SCHMITT, S.; STEINMANN, U.

Biotransformations of Benzamidine and Benzamidoxime in vivo. *Arch. Pharm.* 326 (1993b), S. 807-812

CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M.H.; WOHLERS, H.

Cytochrome P450 Dependent *N*-Hydroxylation of a Guanidine (Debrisoquine), Microsomal Catalysed Reduction and further Oxidation of the *N*-Hydroxy-Guanidine Metabolite to the Urea Derivative. *Biochem. Pharmacol.* 46 (1993a), S. 2249-2267

CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M.H.; RICHTER, M.H.; BESCH, A.

Cytochrome P450-Dependent *N*-Hydroxylation of an Aminoguanidine (Amidinohydrazone) and Microsomal Retroreduction of the *N*-Hydroxylated Product. *Xenobiotika* 24 (1994), S. 671-688

- CLEMENT, B.; DEMESMAEKER, M.; LINNE, S.
Microsomal Catalyzed *N*-Hydroxylation of Guanabenz and Reduction of the *N*-Hydroxylated Metabolite: Charakterization of the Two Reactions and Genotoxic Potential of Guanoxabenz. *Chem. Res. Toxicol.* 9 (1996), Nr. 4, S. 682-688
- CLEMENT, B.; LOMB, R.; MÖLLER, W.
Isolation and Characterization of the Protein Components of the Liver Microsomal O₂-Insensitive NADH-Benzamidoxime Reductase. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), S. 19615-19620
- COON, M.J.; DING, X.; PERNECKY, S.J.; VAZ, A.D.N.
Cytochrome P-450: Progress and Predictions. *FASEB J.* 6 (1992), S. 669-673
- COUTTS, R.T.; BECKETT, A.H.
Metabolic *N*-Oxidation of Primary and Secondary Aliphatic Medicinal Amines. *Drug Met. Rev.* 6 (1977), S. 51-104
- DAMANI, L.A.: Oxidation at Nitrogen Centers. In: JACOBY, W.B.; BEND, J.R. und CALDWELL, J.: *Metabolic Basis of Detoxication, Metabolism of Functional Groups.* New York: Academic Press, 1982, S. 127-149
- DAMBROVA, M.; UHLÉN, S.; WELCH, C.J.; PRUSIS, P.; WIKBERG, J.E.S.: Charakterization of the Enzymatic Activity for Biphasic Competition by Guanoxabenz (1-(2,6-dichlorobenzylideneamino)-3-hydroxyguanidine) at α_2 -Adrenoceptors. II. Description of a Xanthine-dependent Enzymatic Activity in Spleen Cytosol. *Biochem. Pharmacol.*, 56 (1998a), Nr. 9, S. 1121-1128
- DAMBROVA, M.; UHLÉN, S.; WELCH, C.J.; WIKBERG, J.E.S.: Identification of an *N*-Hydroxyguanidine Reducing Activity of Xanthin Oxidase. *Eur. J. Biochem.*, 257 (1998b), S. 178-184
- DAMBROVA, M.; UHLÉN, S.; WIKBERG, J.E.S.: Charakterization of Guanoxabenz Reducing Activity in Rat Brain. *Pharmacol. Toxicol.*, 83 (1998c), Nr. 4, S. 158-163
- DEMESMAEKER, M.
In Vitro Biotransformation antihypertensiv wirksamer Amidinohydrazone und Guanidine. Dissertation, Kiel 1996
- DETERS, S.
Dissertation in Vorbereitung, Kiel 2002
- DOXEY, J.C.; HERSOM, A.S.
The Relationship between the Selectivity of Agonists for Presynaptic α_2 -Adrenoceptors and their Cardiovascular Responses in the Anesthetized Rat. *Br. J. Pharmacol.* 70 (1980), S. 171-172
- ELLINGER, P.
Über den Mechanismus der Methämoglobinbildung durch Acetanilid und seine Abkömmlinge. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 111 (1920), S. 86-125
- ERIKSSON, B.I.; ARFWIDSSON, A.C.; FRISON, L.; ERIKSSON, U.G.; BYLOCK, A.; KALEBO, P.; FAGER, G.; GUSTAFSSON, D.
A Dose-Ranging Study of the Oral Direct Thrombin Inhibitor, Ximelagatran, and its Subcutaneous Form, Melagatran, Compared with Dalteparin in the Prophylaxis of Thromboembolism after Hip or Knee Replacement: METHRO I. *Thromb. Haemost.* 87 (2002), Nr. 2; S. 231-237

ESTABROOK, R.W.; WERRINGLOER, J.

The Measurement of Difference Spectra: Application to the Cytochromes of Microsomes. *Methods Enzymol.* 52 (1978), S. 212-221

EVELO, C.T.A.; SPOOREN, A.A.M.G.; BISSCHOPS, R.A.G.; BAARS, L.G.M.; NEIS, J.M.

Two Mechanisms for Toxic Effects of Hydroxylamines in Human Erythrocytes: Involvement of Free Radicals and Risk of Potentiation. *Blood Cells Mol. Dis.* 24 (1998), Nr. 13, S. 280-295

FLUCK, E.R.; HOMON, C.A.; KNOWLES, J.A.; RUELIUS, H.W.

Differential Binding of Guanabenz and its Metabolites to Cerebral α_2 -Receptors. The Basis for a Radioligand Assay Specific for the Drug. *Drug Dev. Res.* 3 (1983), S. 91-99

FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W.; STARKE, K.

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 1. überarbeiteter Nachdruck. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1998, S. 24 -25; 35; 40-42; 49-50

FREY, H.-H.

Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie. In: FREY, H.-H. und LÖSCHER, W.: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Stuttgart: Enke, 1996, S. 35 -76

GHERSI-EGEA, J.F.; WALTHER, B.; MINN, A.; SIEST, G.

Quantitative Measurement of Cerebral Cytochrome P-450 by Second Derivative Spectrophotometry. *J. Neurosci. Methods.* 20 (1987), S. 261-269

GHERSI-EGEA, J.-F.; PERRIN, R.; LEININGER-MULLER, B.; GRASSIOT, M.-C.; JEANDEL, C.; FLOQUET, J.; CUNY, G.; SIEST, G.; MINN, A.

Subcellular Localization of Cytochrome P450, and Activities of Several Enzymes Responsible for Drug Metabolism in the Human Brain. *Biochem. Pharmacol.* 45 (1993), Nr. 3, S. 647-658

GHERSI-EGEA, J.F.; LEININGER-MULLER, B.; SULEMAN, G.; SIEST, G.; MINN, A.

Localization of Drug-Metabolizing Enzyme Activities to Blood-Brain Interfaces and Circumventricular Organs. *J. Neurochem.* 62 (1994), Nr. 3, S. 1089-1096

GONZALEZ, F.J.; GELBOIN, H.V.

Role of Human Cytochromes P450 in the Metabolic Activation of Chemical Carcinogens and Toxins. *Drug Metab. Rev.* 26 (1994), Nr. 1&2, S. 165-183

GUENGERICH, F.P.

Enzymology of Rat Liver Cytochromes P-450. In: GUENGERICH, F.P.: Mammalian Cytochromes P-450. Bd. 1. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1987, S. 2ff

GUENGERICH, F.P.

Reactions and Significance of Cytochromes P-450 Enzymes. *J. Biol. Chem.* 266 (1991), S. 10019-10022

GUENGERICH, F.P.

Human Cytochrome P450 Enzymes. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P.R.: Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry (Second Edition). New York: Plenum Press, 1995, S. 473-535

GUSTAFSSON, D.; NYSTRÖM, J.-E.; CARLSSON, S.; BREDBERG, U.; ERIKSSON, U.; GYZANDER, E.; ELG, M.; ANTONSSON, T.; HOFFMANN, K.-J.; UNGELL, A.-L.; SÖRENSEN, H.; NÄGÅRD, S.; ABRAHAMSSON, A.; BYLUND, R.

The Direkt Thrombin Inhibitor Mela gatran and Its Oral Prodrug H 376/95: Intestinal Absorption Properties, Biochemical and Pharmacodynamic Effects. *Thromb. Res.* 101 (2001), Nr. 3, S. 171-181

HAAS, S.

Neue Entwicklungen: Clopidogrel, Tirofiban, Danaparoid und Lepirudin. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 139 (1999), Nr. 4, S. 400-401

HAEHNER, B.D.; GORSKI, J.C.; VANDENBRANDEN, M.; WRIGHTON, S.A.; JANARDAN, S.K.; WATKINS, P.B.; HALL, S.D.

Bimodal Distribution of Renal Cytochrome P450 3A Activity in Humans. *Mol. Pharmacol.* 50 (1996), S. 52-59

HAUPTMANN, J.; PAINTZ, M.; KAISER, B.; RICHTER, M.

Reduction of a Benzamidoxime Derivative to the Corresponding Benzamidine *in vivo* and *in vitro*. *Pharmazie* 43 (1988), S. 559-560

HAUPTMANN, J.

Pharmacokinetics of an Emerging New Class of Antikoagulant/Antithrombotic Drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57 (2002), S. 751-758

HESS, J.R.; RUGG, N.; KNAPP, A.D.; GORMAS, J.F.; HILL, H.R.; OLIVER, C.K.; LIPPERT, L.E.; GREENWALT, T.J.

The Role of Electrolytes and PH in RBC ASs. *Transfusion* 41 (2001), S. 1045-1051

HEWICK, D.S.

Reductive Metabolism of Nitrogen-Containing Functional Groups. In: JACOBY, W.B.; BEND, J.R. und CALDWELL, J.: *Metabolic Basis of Detoxication*. New York: Academic Press, 1982, S. 151 -170

HILDEBRANDT, A.; ESTABROOK, R.W.

Evidence for the Participation of Cytochrome b₅ in Hepatic Microsomal Mixed-Function Oxidation Reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 143 (1971), S. 66-79

HOSSEINPOUR, F.; WIKVALL, K.

Porcine Microsomal Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25). *J. Biol. Chem.* 275 (2000), Nr. 44, S. 34650-34655

HSIEH, M.H.; Chiang, H.-L.; Tsai, L.-C.; Lai, S.-Y.; Huang, N.-E.; Linacre, A.; Lee, J.C.-I.

Cytochrome b₅ Gene for Species Identification of the Conservation Animals. *For. Sci. Int.* (2001), S. 7-18

HULTQUIST, D.E.; PASSON, P.G.

Catalysis of Methemoglobin Reduction by Erythrocyte Cytochrome b₅ and Cytochrome b₅ Reductase. *Nature* 229 (1971), S. 252-254

IJIMA, T.

Thermal Analysis of Cryoprotective Solutions for Red Blood Cells. *Cryobiology* 36 (1998), S. 165-173

IMAOKA, S.; FUNAE, Y.

Purification and Characterization of Rat Pulmonary Cytochrome P-450. *J. Biochem.* 108 (1990), S. 33-36

IMAOKA, S.; NAGASHIMA, K.; FUNAE, Y.

Characterization of Three Cytochrome P-450s Purified from Renal Microsomes of Untreated Male Rats and Comparison with Human Renal Cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* 276 (1990), Nr. 2, S. 473-480

INGELMAN-SUNDBERG, M.; JOHANSSON, I.

Electron Flow and Complex Formation During Cytochrome P-450 Catalyzed Hydroxylation Reactions in Reconstituted Membrane Vesicles. *Acta* 38 (1984), S. 845-851

INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M.; MCLELLAN, R.A.

Polymorphic Human Cytochrome P450 Enzymes: an Opportunity for Individualized Drug Treatment. *TiPS* 20 (1999), S. 342-346

IWATSUBO, T.; HIROTA, N.; OOIE, T.; SUZUKI, H.; SHIMADA, N.; CHIBA, K.; ISHIZAKI, T.; GREEN, C.E.; TYSON, C.A.; SUGIYAMA, Y.

Prediction of *In Vivo* Drug Metabolism in the Human Liver from *In Vitro* Metabolism Data. *Pharmacol. Ther.* 73 (1997), Nr. 2, S. 147-171

JACOBASCH, G.

Biochemical and Genetic Basis of Red Cell Enzyme. *Baill. Clin. Haematol.* 13 (2000), Nr. 1, S. 1-20

JENKINS, M.M.; PRCHAL, J.T.

A High-Frequency Polymorphism of NADH-Cytochrome b₅ Reductase in African-Americans. *Hum. Genet.* 99 (1997), S. 248-250

KADLUBAR, F.F.; ZIEGLER, D.M.

Properties of a NADH-Dependent *N*-Hydroxy Amine Reductase Isolated from Pig Liver Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 162 (1974), S. 83-92

KARHAN, W.

Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehung und Mechanismus eines mikrosomalen, N-reduktiven Biotransformationssystems. Dissertation, Kiel 2002

KARLSON, P.; DOENECKE, D.; KOOLMAN, J.

Kurzes Lehrbuch der Biochemie 14. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1994, S. 47; 514

KAWAJIRI, K.; FUJII-KURIYAMA, Y.

P450 and Human Cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 82 (1991), S. 1325-1335

KEREIAKES, D.J.; KLEIMAN, N.S.; FERGUSON, J.J.; ZAKI MASUD, A.R.; BRODERICK, T.M.; ABBOTTSMITH, C.W.; RUNYON, J.P.; ANERSON, L.C.; ANDERS, R.J.; DREILING, R.J.; HANTSBARGER, G.L.; BRYZINSKI, B.; TOPOL, E.J.

Pharmacodynamic Efficacy, Clinical Safety, and Outcomes after Prolonged Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Blockade with Oral Xemilofiban. *Circulation* 98 (1998), Nr. 13, S. 1268-1278

- KIESE, M.
Oxidation of Aniline to Nitrosobenzene in the Dog. *Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.* 235 (1959), S. 354-359
- KIM, Y.A. ; AKOEV, V.R. ; ELEMESOV, R.E.
Hyperosmotic Hemolysis and Antihemolytic Activity of the Saponin Fraction and Triterpene Glycosides from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Membr. Cell Biol.* 14 (2000), Nr. 2, S. 237-251
- KIMURA, S.; ABE, K.; SUGITA, Y.
Differences in C-Terminal Amino Acid Sequences between Erythrocyte and Liver Cytochrome b₅ Isolated from Pig and Human. *FEBS Lett.* 169 (1984), Nr. 2, S. 143-146
- KITAMURA, S.; SUGIHARA, K.; TATSUMI, K.
A Unique Tertiary Amine *N*-Oxides Reduction System Composed of Quinone Reductase and Heme in Rat Liver Preparations. *Drug Metab. Dispos.* 27 (1999b), S. 92-97
- KITAMURA, S.; TAKAKAWA, K.; SUGIHARA, K.; TATSUMI, K.
Pseudoenzymatic Reduction of *N*-Hydroxy-2-Acetylaminofluorene to 2-Acetylaminofluorene Mediated by Cytochrome P450. *Carcinogenesis* 20 (1999a), S. 347-350
- KITAMURA, S.; SHIMIZU, Y.; SHIRAGA, Y.; YOSHIDA, M.; SUGIHARA, K.; OHTA, S.
Reductive Metabolism of p,p'-DDT and o,p'-DDT by Rat Liver Cytochrome P450. *Drug Metab. Dispos.* 30 (2002), Nr. 2, S. 113-118
- KOLARS, J.C.; LOWN, K.S.; SCHMIEDLIN-REN, P.; GOSH, M.; FANG, C.; WRIGHTON, S.A.; MERION, R.M.; WATKINS, P.B.
CYP 3A Gene Expression in Human Gut Epithelium. *Pharmacogenetics* 4 (1994), S. 247-259
- KONTUSH, A.; BEISIEGEL, U.
Measurement of Oxidizability of Blood Plasma. *Methods Enzymol.* 299 (1999)
- KOSKELA, S.; HAKKOLA, J.; HUKKANEN, J.; PELKONEN, O.; SORRI, M.; SARANEN, A.; ANTTILA, S.; FERNANDEZ-SALGUERO, P.; GONZALEZ, F.; RAUNIO, H.
Expression of CYP2A Genes in Human Liver and Extrahepatic Tissues. *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999), S. 1407-1413
- KRISHNA, D.R.; KLOTZ, U.: Extrahepatic Metabolism of Drugs in Humans. *Clin. Pharmacokinet.* 26 (1994), Nr. 2, S. 144-160
- KROVAT, B.C.; TRACY, J.H.; OMIECINSKI, C.J.
Fingerprinting of Cytochrome P450 and Microsomal Epoxide Hydr olase Gene Expression in Human Blood Cells. *Toxicol. Sci.* 55 (2000), S. 352-360
- KRÜGER, P.
Über Abkömmlinge des Benzenylamidoxims. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 18 (1885), S. 1055-1060
- LAEMMLI, U.K.
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970), S. 680-685
- LEWIS, D.F.V.
Cytochrome P450: Structure, Function and Mechanism. London: Taylor & Francis, 1996, S.80

LINDBERG, R.L.P.; NEGISHI, M.

Alteration of Mouse Cytochrome P450_{coli} Substrate Specificity by Mutation of a Single Amino-Acid Residue. *Nature* 339 (1989), S. 632-634

LINK, M.

Untersuchungen zur Auswirkung der Stall- und Hüttenhaltung von tragenden und säugenden Sauen auf ausgewählte klinische und physiologische Merkmale. Dissertation, Hannover 1993

LOCK, E.A.; REED, C.J.

Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Kidney. *Toxicol. Pathol.* 26 (1998), Nr. 1, S. 18-25

LOEFFLER, K.

Anatomie und Physiologie der Haustiere 9. Aufl. Stuttgart: Ulmer Verlag, 1994

LOHR, J.W.; WILLSKY, G.R.; ACARA, M.A.

Renal Drug Metabolism. *Pharmacol. Rev.* 50 (1998), Nr. 1, S. 107-141

LOMB, R.

Enzymatische Grundlagen der N-reduktiven Biotransformation von N-hydroxylierten Amidinen, Guanidinen und Amidinohydrazonen. Dissertation, Kiel 1995

LOPIAN, K.; CLEMENT, B.

In Vitro Biotransformation of the Amidoxime- and Ester-Prodrug H376/95 to its Active Principle Melagatran. *Drug Met. Rev.* 33 (2001), Suppl. 1, S. 115

LU, X.; Li, C.; Fleisher, D.

Cimetidine Sulfoxidation in Small Intestinal Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 26 (1998), Nr. 9, S. 940-942

LUSTIG, K.

Umsetzungen von Promethazin und seinen Metaboliten mit gereinigter FAD-haltiger Monoxygenase. Dissertation, Marburg 1991

MAY, J.M.; QU, Z.; MORROW, J.D.

Mechanism of Ascorbic Acid Recycling in Human Erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1528 (2001), S. 159-166

MERCER, J.B.; OSTERUD, B.; TVEITA, T.

The Effect of Short-Term Cold Exposure on Risk Factors for Cardiovascular Disease. *Thromb. Res.* 95 (1999), S. 93-104

MIHARA, K.; SATO, R.

Purification and Properties of the Intact Form of NADH-Cytochrome b₅ Reductase from Rabbit Liver Microsomes. *J. Biochem.* 78 (1975), S. 1057-1073

MIHARA, K.; SATO, R.

Detergent-Solubilized NADH-Cytochrome b₅ Reductase. *Methods Enzymol.* 52 (1978), S. 102-108

MÖLLER, W.

Enzymatische Grundlagen der N-reduktiven Biotransformation: Isolierung und Charakterisierung eines mikrosomalen Enzymsystems. Dissertation, Kiel 1997

- MOORE, G.L.; HESS, J.R.; LEDFORD, M.E.
In Vivo Viability Studies of Two Additive Solutions in the Postthaw Preservation of Red Cells Held for 3 Weeks at 4°C. *Transfusion* 33 (1993), S. 709-712
- MORNET, P.; TOURNUT, J.; TOMA, B.
Das Schwein und seine Krankheiten In: TOURNUT, J.; TOMA, B. und BUSSE [BEARB.], H. Hengersberg: Schober, 1989
- MOUSA, S.A.; FORSYTHE, M.S.
Comparison of the Effect of Different Platelet GPIIb/IIIa Antagonists on the Dynamics of Platelet/Fibrin-Mediated Clot Strength Induced Using Thromboelastography. *Thromb. Res.* 104 (2001), S. 49-56
- MOUSA, S.A.; KAPIL, R.; MU, D.-X.
Intavenous and Oral Antithrombotic Efficacy of the Novel Platelet GPIIb/IIIa Antagonist Roxifiban (DMP754) and its Free Acid Form, XV459. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999), Nr. 10, S. 2535-2541
- MUTSCHLER, E.
Arzneimittelwirkungen 7. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1996, S. 20; 29-34; 111; 424; 505; 529
- NEBERT, D.W.; GONZALEZ, F.J.: P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56 (1987), S. 945-993
- NEBERT, D.W.; NELSON, D.R.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; FEYEREISEN, R.; FUJII-KURIYAMA, Y.; GONZALEZ, F.J.; GUENGERICH, F.P.; GUNSALUS, I.C.; JOHNSON, E.F.; LOPER, J.C.; SATO, R.; WATERMAN, M.R.; WAXMAN, D.J.
The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, and Recommended Nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10 (1991), Nr. 1, S. 1-14
- NEDELICHEVA, V.; GUT, I.
P450 in the Rat and Man: Methods of Investigation, Substrate and Relevance to Cancer. *Xenobiotica* 24 (1994), S. 1151-1175
- NELSON, D.R. (2000): [<http://drnelson.utmem.edu/nelsonhomepage.html>].
- NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALUS, I.C.; NEBERT, D.W.
P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature. *Pharmacogenetics* 6 (1996), S. 1-42
- NEWBY, L.K.
Comparison of sibrifiban with aspirin for prevention of cardiovascular events after acute coronary syndromes: a randomised trial. *Lancet* 355 (2000), S. 337-345
- NISSÉN, P.H.; WINTERÖ, A.K.; FREDHOLM, M.
Mapping of Porcine Genes Belonging to Two Different Cytochrome P450 Subfamilies. *Animal Gen.* 29 (1998), S. 7-11
- NOHL, H.; STOLZE, K.
The Effects of Xenobiotics on Erythrocytes. *Gen. Pharmac.* 31 (1998), Nr. 3, S. 343-347

- OBACH, R.S.; ZHANG, Q.-Y.; DUNBAR, D.; KAMINSKY, L.S.
Metabolic Characterization of the Major Human Small Intestinal Cytochrome P450s. *Drug Metab. Dispos.* 29 (2001), S. 347-352
- OMURA, T.; SATO, R.
The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* 239 (1964), Nr. 7, S. 2370-2385
- ORTIZ DE MONTELLANO, P.R.
Oxygen Activation and Transfer. In: ORTIZ DE MONTELLANO, P.R.: Cytochrome P-450. New York: Plenum Press, 1982, S. 217-257
- OSHINO, N.
Cytochrome b₅ and its Physiological Significance. In: SCHENKMAN, J.B. und KUPFER, D.: Hepatic Cytochrome P-450 Monooxygenase System. New York: Pergamon Press, 1982, S. 407-447
- OZOLS, J.; KORZA, G.; HEINEMANN, F.S.; HEDIGER, A.; STRITTMATTER, P.
Complete Amino Acid Sequence of Steer Liver Microsomal NADH-Cytochrome b₅ Reductase. *J. Biol. Chem.* 260 (1985), Nr. 22, S. 11953-11961
- PARK, B.K.; PIRMOHAMED, M.; KITTERINGHAM, N.R.
The Role of Cytochrome P450 Enzymes in Hepatic and Extrahepatic Human Drug Toxicity. *Pharmacol. Ther.* 68 (1995), Nr. 3, S. 385-424
- PASSON, P.G.; REED, D.W.; HULTQUIST, D.E.
Soluble Cytochrome b₅ from Human Erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 275 (1972), S. 51-61
- PEARCE, R.E.; MCINTYRE, C.J.; MADAN, A.; SANZGIRI, U.; DRAPER, A.J.; BULLOCK, P.L.; COOK, D.C.; BURTON, L.A.; LATHAM, J.; NEVINS, C.; PARKINSON, A.
Effect of Freezing, Thawing, and Storing Human Liver Microsomes on Cytochrome P450 Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 331 (1996), Nr. 2, S. 145-169
- PELKONEN, O.; RAUNIO, H.
Metabolic Activation of Toxins: Tissue-specific Expression and Metabolism in Target Organs. *Environ. Health Perspect.* 4 (1997), Nr. 105, S. 767-774
- PFUNDNER, H.
Beteiligung von Cytochrom P-450 an der Biotransformation von Amidinen: Untersuchungen mit gereinigten Enzymen und Antikörpern. Dissertation, Kiel 1991
- POSTLIND, H.; AXÉN, E.; BERGMAN, T.; WIKVALL, K.
Cloning, Structure and Expression of a cDNA Encoding Vitamin D₃ 25-Hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241 (1997), S. 491-497
- PRUEKSARITANONT, T.; GORHAM, L.M.; HOCHMAN, J.H.; TRAN, L.O.; VYAS, K.P.
Comparative Studies of Drug-Metabolizing Enzymes in Dog, Monkey, and Human Small Intestine, and in Caco-2 Cells. *Drug Metab. Dispos.* 24 (1996), Nr. 6, S. 634-42
- RAVINDRANATH, V.; ANANDATHEERTHAVARADA, H.K.
Preparation of Brain Microsomes with Cytochrome P450 Activity Using Calcium Aggregation Method. *Anal. Biochem.* 187 (1990), S. 310-313

- RAVINDRANATH, V.; BOYD, M.R.
Xenobiotic Metabolism in Brain. *Drug Metab. Rev.* 27 (1995), Nr. 3, S. 419-448
- RAVINDRANATH, V.; ANANDATHEERTHAVARADA, H.K.; SHANKAR, S.K.
Xenobiotic Metabolism in Human Brain - Presence of Cytochrome P-450 and Associated Monooxygenases. *Brain Res.* 496 (1989), S. 331-335
- RAVINDRANATH, V.; BHAMRE, S.; BHAGWAT, S.V.; ANANDATHEERTHAVARADA, H.K.; SHANKAR, S.K.; TIRUMALAI, P.S.
Xenobiotic Metabolism in Brain. *Toxicol. Letters* 82/83 (1995), S. 633-638
- REINHARD, E.
Pharmazeutische Biologie I 4. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1990, S. 110
- RICHTER, P.H.; WUNDERLICH, I.; SCHLEUDER, M.; KECKEIS, A.
Amidinothiohydrazone als Gegenstand der Arzneimittelforschung. *Pharmazie* 48 (1993), S. 83-94
- RIECKERT, W.
In vivo und in vitro Biotransformation von Pentamidinderivaten. Dissertation, Kiel 1999
- ROSENBERG, D.W.
Dietary Modulation of Cytochrome P450 in the Small Intestinal Epithelium. *Pharmacology* 43 (1991), Nr. 1, S. 36-46
- RUCKPAUL, K.
Cytochrom P450 abhängige Enzyme -Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung? *Pharm. unserer Zeit* 22 (1993), S. 296-304
- RUCKPAUL, K.; BERNHARDT, R.
Biochemical Aspects of the Monooxygenase System in the Endoplasmatic Reticulum of Mammalian Liver. In: RUCKPAUL, K. und HEIN, H.: Cytochrome P450. Berlin: Akademie Verlag, 1984, S. 9-57
- SCHUETZ, E.G.; SCHUETZ, J.D.; MACLEAN GROGAN, W.; NARAY-FEJES-TOTH, A.; FEJES-TOTH, G.; RAUCY, J.; GUZELIAN, P.; GIONELA, K.; WATLINGTON, C.O.
Expression of Cytochrome P-450 3A in Amphibian, Rat, and Human Kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (1992), Nr. 1, S. 206-214
- SCHWAB, G.E.; JOHNSON, E.F.
Enzymology of Rabbit Cytochromes P-450. In: GUENGERICH, F.P.: Mammalian Cytochromes P-450, Vol. 1. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1987, S. 55-105
- SHEETZ, M.P.; SINGER, S.J.
On the Mechanism of ATP-Induced Shape Changes in Human Erythrocyte Membrane. *J. Cell. Biol.* 73 (1977), S. 638-646
- SHIMADA, T.; YUN, C.-H.; YAMAZAKI, H.; GAUTIER, J.-C.; BEAUNE, P.H.; GUENGERICH, F.P.
Characterization of Human Lung Microsomal Cytochrome P-450 1A1 and Its Role in the Oxidation of Chemical Carcinogens. *Mol. Pharmacol.* 41 (1992), Nr. 5, S. 856-864

SHIMADA, T.; YAMAZAKI, H.; MIMURA, M.; WAKAMIYA, N.; UENG, Y.-F.; GUENGERICH, F.P.; INUI, Y.

Characterization of Microsomal Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Oxidation of Xenobiotic Chemicals in Human Fetal Livers and Adult Lungs. *Drug Metab. Dispos.* 24 (1996), Nr. 5, S. 515-522

SIEBE, J.

Biotransformation des Glyceroltrinitrats und von Amidinen und Guanidinen durch humane Cytochrom P450 Isoenzyme. Dissertation, Kiel 1998

SKAANILD, M.T.; FRIIS, C.

Cytochrome P450 Sex Differences in Minipigs and Conventional Pigs. *Pharmacol. Toxicol.* 85 (1999), S. 174-180

SKAANILD, M.T.; FRIIS, C.

Expression Changes of CYP2A and CYP3A in Microsomes from Pig Liver and Cultured Hepatocytes. *Pharmacol. Toxicol.* 87 (2000), S. 174-178

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MAALIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C.

Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 150 (1985), S. 76-85

SOTTOCASA, G.L., KUYLENSTIERNA, B., ERNSTER, L., BERGSTRAND, A.

An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell. Biol.* 32 (1967), S. 415-438

SOUCEK, P.; ZUBER, R.; ANZENBACHEROVÁ, E.; ANZENBACHER, P.; GUENGERICH, F.P.

Minipig Cytochrome P450 3A, 2A and 2C Enzymes have Similar Properties to Human Analogs. *BMC Pharmacol.* 1 (2001), Nr. 1, S. 11

SPATZ, L.; STRITTMATTER, P.

A Form of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Cytochrome b₅ Reductase Containing Both the Catalytic Site and an Additional Hydrophobic Membrane-binding Segment. *J. Biol. Chem.* 248 (1973), Nr. 3, S. 793-799

SPOOREN, A.A.M.G.; EVELO, C.T.A.

Only the Glutathione Dependent Antioxidant Enzymes are Inhibited by Haematotoxic Hydroxylamines. *Human Exp. Toxicol.* 17 (1998), S. 554-559

STÄRKEL, P.; SEMPOUX, C.; VAN DEN BERGE, V.; STEVENS, M.; DE SAEGER, C.; DASAGER, J.P.; HORSMANS, Y.

CYP 3A Proteins are Expressed in Human Neutrophils and Lymphocytes but are not Induced by Rifampicin. *Life Sci.* 64 (1999), Nr. 8, S. 643-653

STRÖMSTEDT, M.; WARNER, M.; BANNER, C.D.; MACDONALD, P.C.; GUSTAFSSON, J.A.

Role of Brain Cytochrome P-450 in Regulation of the Level of Anesthetic Steroids in the Brain. *Mol. Pharmacol.* 44 (1993), Nr. 5, S. 1077-1083

SUGIHARA, K.; KITAMURA, S.; OHTA, S.

Reductive Dechlorination of DDT to DDD by Rat Blood. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45 (1998), S. 85-91

- SUGIHARA, K.; KITAMURA, S.; OHTA, S.; TATSUMI, K.
Reduction of Hydroxamic Acids to the Corresponding Amides Catalyzed by Rabbit Blood. *Xenobiotica* 30 (2000), Nr. 5, S. 457-467
- TAKEKAWA, K.; SUGIHARA, K.; KITAMURA, S.; OHTA, S.
Enzymatic and Non-Enzymatic Reduction of Brucine -N-Oxide by Aldehyde Oxidase and Catalase. *Xenobiotika* 31 (2001), Nr. 11, S. 769-782
- TESTA, B.
Biochemistry of Redox Reactions in the Metabolism of Drugs and other Xenobiotics In: TESTA, B. und CALDWELL, J. London: Academic Press, 1995, S. 1-2; 71-72; 103-106
- THEWS, G.; MUTSCHLER, E.; VAUPEL, P.
Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen 5. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1999, S. 115-121; 357-359; 407-412
- TIMM, U.; ZUMBRUNNEN, R.; ERDIN, R.; SINGER, M.; STEINER B.
Oral Platelet Aggregation Inhibitor Ro 49-3657: Determination of the Active Metabolite and its Prodrug in Plasma and Urine by High-Performance Liquid Chromatography using Automated Column Switching. *J. Chromatogr. B.* 691 (1997), S. 397-407
- TREFOUEL, J.; TREFOUEL, F.; NITTI, F.; BOVET, D.
Activité du p-Aminophenylsulfamide sur les Infections Streptococciques Expérimentales de la Souris et du Lapin. *C. R. Séances Soc. Biol.* 120 (1935), S. 756-758
- UHLEN, S.; DAMBROVA, M.; TIGER, G.; OLIVER, D.W.; WIKBERG, J.E.S.: Characterization of the Enzymatic Activity for Biphasic Competition by Guanoxabenz (1-(2,6-dichlorobenzylideneamino)-3-hydroxyguanidine) at α_2 -Adrenoceptors. II. Description of an Enzymatic Activity in Spleen Membranes. *Biochem. Pharmacol.*, 56 (1998), Nr. 9, S. 1111-1119
- VAINIO, H.; HIETANEN, E.: Role of Hepatic Metabolism. In: TESTA, B. und JENNER, P.: Concepts in Drug Metabolism. New York: Dekker, 1980, S. 251-284
- VALERI, C.R.; PIVACEK, L.E.; CASSIDY, G.P.; RAGNO, G.
The Survival, Function, and Hemolysis of Human RBCs Stored at 4°C in Additive Solution (AS-1, AS-3, or AS-5) for 42 Days and then Biochemically Modified, Frozen, Thawed, Washed, and Stored at 4°C in Sodium Chloride and Glucose Solution for 24 Hours. *Transfusion* 40 (2000), S. 1341-1345
- WAGNER, G.; VOIGT, B.; VIEWEG, H.
Synthese von N- α -(Arylsulfonylglycyl)aminophenylalaninamidinen als hochreaktive Inhibitoren des Thrombins. *Pharmazie* 39 (1984), S. 226-230
- WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.-A.
Effect of Ethanol on Cytochrome P450 in the Rat Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994), S. 1019-1023
- WARNER, M.; HELLMOLD, J.; YOSHIDA, S.; LIAO, D.; HEDLUND, E.; GUSTAFSSON, J.-A.
Cytochrome P450 in the Breast and Brain: Role in Tissue-Specific Activation of Xenobiotics. *Mutat. Res.* 376 (1997), S. 79-85

WATKINS, P.B.

Drug Metabolism by Cytochromes P450 in the Liver and Small Bowel. *Gastrointestinal Pharmacol.* 21 (1992), Nr. 3, S. 511-526

WEGE, V.

Die Ergebnisse chemischer Blutserum- und plasmauntersuchungen bei klinisch gesunden Schweinen. Dissertation, Hannover 1967

WELLER, T.; ALIG, L.; BERESINI, M.; BLACKBURN, B.; BUNTING, S.; HADVÁRY, P.; HÜRZELER MÜLLER, M.; KNOPP, D.; LEVET-TRAFIT, B.; LIPARI, M.T.; MODI, N.B.; MÜLLER, M.; REFINO, C.F.; SCHMITT, M.; SCHÖNHOLZER, P.; WEISS, S.; STEINER, B.

Orally Active Fibrinogen Receptor Antagonists. 2. Amidoximes as Prodrugs of Amidines. *J. Med. Chem.* 39 (1996), S. 3139-3147

WITTKE, B.; MACKIE, I.J.; MACHIN, S.J.; TIMM, U.; ZELL, M.; GOGGIN, T.

Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ro 44-3888 after Single Ascending Oral Doses of Sibrafiban, an Oral Platelet Aggregation Inhibitor, in Healthy Male Volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 47 (1999), S. 521-530

Westfälisch-Lippischer Landwirtschaftsverband: *Schweine-Lexikon* unter <http://www.bauernhof.net>, © Westfälisch-Lippischer Landwirtschaftsverband e.V. und Bauernhof.net, 1998 -2002

WOHLERS, H.: *Studien zur Biotransformation von Guanidinen und Amidinen mit Hepatozyten und Mikrosomen* Kiel: Dissertation, 1994

YAMAZAKI, H.; NAKANO, M.; GILLAM, E.M.J.; BELL, L.C.; GUENGERICH, F.P.; SHIMADA, T.

Requirements for Cytochrome b₅ in the Oxidation of 7-Ethoxycoumarin, Chlorzoxazone, Aniline, and N-Nitrosodimethylamine by Recombinant Cytochrome P450 2E1 and by Human Liver Microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996), S. 301-309

YASUKOCHI, Y.; MASTERS, B.S.S.

Some Properties of a Detergent-solubilized NADPH-Cytochrome c (Cytochrome P-450) Reductase Purified by Biospecific Affinity Chromatography. *J. Biol. Chem.* 251 (1976), Nr. 17, S. 5337-5344

YUBISUI, T.; TAKESHITA, M.

Purification and Properties of Soluble NADH-Cytochrome b₅ Reductase of Rabbit Erythrocytes. *J. Biochem.* 91 (1982), S. 1467-1477

YUBISUI, T.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; TAMURA, M.; TAKESHITA, M.

Complete Amino Acid Sequence of NADH-Cytochrome b₅ Reductase Purified from Human Erythrocytes. *J. Biochem.* 99 (1986), S. 407-422

YUN, C.-H.; SHIMADA, T.; GUENGERICH, F.P.

Purification and Characterization of Human Liver Microsomal Cytochrome P-450 2A6. *Mol. Pharmacol.* 40 (1991), Nr. 5, S. 679-685

ZABIŃSKI, Z.; DABROWSKI, Z.; MOSZCZYŃSKI, P.; RUTOWSKI, J.

The Activity of Erythrocyte Enzymes and Basic Indices of Peripheral Blood Erythrocytes from Workers Chronically Exposed to Mercury Vapours. *Toxicol. Ind. Health* 16 (2000), S. 58-64

ZHANG, Q.-Y.; DUNBAR, D.; OSTROWSKA, A.; ZEISLOFT, S.; YANG, J.; KAMINSKY, L.S.
Characterization of Human Small Intestinal Cytochromes P -450. *Drug Metab. Dispos.* 27 (1999),
Nr. 7, S. 804-809

ZIEGLER, D.M.
Flavin-Containing Monooxygenases: Catalytic Mechanism and Substrate-Specificities.
Drug Metab. Rev. 19 (1988), S. 1-32

ZIEGLER, D.M.; MITCHELL, C.H.
Microsomal Oxidase IV: Properties of a Mixed-Function Amine Oxidase Isolated from Pig Liver
Microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 150 (1972), S. 116-125

ZIEGLER, D.M.; PETTIT, F.H.
Microsomal Oxidases. I. The Isolation and Dialkylarylamine Oxygenase Activity of Pork Liver
Microsomes. *Biochemistry* 5 (1966), S. 2932-2938

ZOU, C.H.; AGAR, N.S.; JONES, G.L.
Haemolysis of Human and Sheep Red Blood Cells in Glycerol Media: the Effect of PH and the Role
of Band 3. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 127 (2000), S. 347-353

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. B. Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten Themas, die mir in zahlreichen Diskussionen gebotenen Anregungen sowie die mir erwiesene Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater an dieser Stelle herzlich bedanken.

Juliane, Uwe, Sabine, Ilka, Kai, Wolfgang und Dr. Fedders danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des 1. Semesters, in dem wir auch Engpässe hervorragend gemeistert und dabei nicht unseren Humor verloren haben.

Bei Sven möchte ich mich für die geduldige Einarbeitung in die HPLC-Analytik, seine Unterstützung bei praktischen Arbeiten und seine stetige Hilfe bei technischen Problemen jeglicher Art bedanken. Meike danke ich für die Durchführung zahlreicher praktischer Arbeiten, wodurch sie mich besonders in der Endphase sehr entlastet hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen aus dem vierten Stock (Wiebke, Sven, Meike & Gästen) für wertvolle Anregungen, Motivation und die vielen aufmunternden Worte.

Für die großzügige Bereitstellung von Blutproben möchte ich Björn, Florian, Juliane, Meike und Sven danken. Ich weiß dieses „Opfer“ zu schätzen.

Bei Kiki möchte ich mich für die Bereitstellung des Antikörpers (4D12) bedanken.

Für das gründliche Korrekturlesen und die konstruktive Kritik bedanke ich mich herzlich bei Ullvi, Juliane und Gernot.

Arne danke ich für die schnelle Hilfe bei auftretenden Computer-Problemen.

Allen Freunden, Kollegen und Mitarbeitern des Instituts, die mich unterstützt, mit gemeinsamen Unternehmungen auf andere Gedanken gebracht oder in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich recht herzlich danken.

Ferner möchte ich mich bei meiner Familie und ganz besonders bei meinen Eltern für ihr Verständnis und die in jeder Hinsicht erwiesene Unterstützung bedanken.

Zum Schluss möchte ich Gernot für sein Verständnis und seine Geduld (besonders während der letzten Monate) danken.

Persönliche Daten

Vor- und Familienname	Sabine Mau
Geburtsdatum	4. Dezember 1972
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1979 – 1983	Grundschule Malente
1983 – 1992	Carl-Maria-von-Weber-Gymnasium, Eutin
23. Mai 1992	Allgemeine Hochschulreife

Studium

SS 1993 – SS 1997	Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
21. März 1995	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
23. Mai 1997	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juli 1997 – Juni 1998	Praktisches Jahr in der Groß Grönauer Apotheke
8. Juli 1998	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
21. Juli 1998	Approbation als Apothekerin

Anfertigung der Dissertation

Seit August 1998	Pharmazeutisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement
1. August – 14. Oktober 1998	Wissenschaftliche Angestellte der Firma Pharmatech GmbH, Flintbek
Seit 15. Oktober 1998	Wissenschaftliche Angestellte der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel