

PHARMAKOKINETIK UND PHARMAKODYNAMIK VON FUMARSÄUREESTERN



Dissertation

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

vorgelegt von

Martin Rostami Yazdi

Kiel 2007

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

Prof. Dr. U. Mrowietz

Prof. Dr. T. J. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

4. Februar 2008

Zum Druck genehmigt:

Kiel, 6. Februar 2008

Prof. Dr. J. Grotemeyer
(Dekan)

Für meine Eltern

Unter allen Gütern ist die Wissenschaft das höchste Gut, weil sie nicht geraubt, nicht erkaufte und nicht vernichtet werden kann.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	PSORIASIS	1
1.1.1	Klinik, Epidemiologie und Pathogenese	1
1.1.2	Therapie	3
1.2	FUMARSÄUREESTER IN DER THERAPIE DER PSORIASIS.....	3
1.2.1	Historie.....	3
1.2.2	Therapeutische Anwendung und Bedeutung.....	4
1.3	PHARMAKOKINETIK	7
1.3.1	Liberation	7
1.3.2	Absorption	7
1.3.3	Distribution	8
1.3.4	Metabolismus	8
1.3.4.1	Übersicht über Enzymsysteme.....	9
1.3.4.2	Phase-I-Enzyme.....	10
1.3.4.3	Phase-II-Enzyme	10
1.3.4.4	Phase-III-Transporter	11
1.3.5	Exkretion	12
1.4	PHARMAKOKINETIK UND PHARMAKODYNAMIK DER FUMARSÄUREESTER	12
1.4.1	Pharmakokinetik	12
1.4.2	Pharmakodynamik	14
1.5	THEMA UND ZIELSETZUNG	17
2	PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON FUMARSÄUREESTERN	20
2.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	20
2.2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.2.1	pK _a Bestimmung von Fumarsäuremonomethylester.....	22
2.2.1.1	Material	22
2.2.1.2	Bestimmung des pK _a -Wertes mittels HPLC.....	22
2.2.2	<i>In silico</i> Berechnungen	23
2.3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	23
3	BESTIMMUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG VON FUMARSÄURE UND FUMARSÄUREESTERN.....	27
3.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	27
3.2	MATERIAL UND METHODEN	28
3.2.1	Material und Geräte	28
3.2.2	HPLC-Methoden.....	28
3.2.2.1	Probenvorbereitung	28
3.2.2.2	Kalibrierung.....	28
3.2.3	Ultrafiltration	29
3.3	ERGEBNISSE	30
3.3.1	Kalibrierung.....	30
3.3.2	Plasmaproteinbindung.....	31
3.4	DISKUSSION	33

4	<i>IN VITRO</i> STUDIEN ZUR ZYTOTOXIZITÄT VON FUMARSÄUREESTERN	34
4.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	34
4.1.1	Definition der Zytotoxizität	34
4.1.2	Fumarsäureester und Zytotoxizität	34
4.2	MATERIAL UND METHODEN	35
4.2.1	Material und Geräte	35
4.2.2	Zelllinien	36
4.2.3	Modifizierter Neutralrottest nach Borenfreund und Puerner	36
4.2.3.1	Optimierung der Zellzahl für den Neutralrottest	36
4.2.3.2	Durchführung	36
4.2.3.3	Auswertung	38
4.2.4	Bestimmung des Glutathion-Gehaltes nativer Zellen	38
4.2.4.1	Durchführung	38
4.2.4.2	Auswertung	39
4.2.5	Bestimmung des Proteingehaltes	40
4.3	ERGEBNISSE	41
4.3.1	Neutralrottest	41
4.3.2	GSH-Assay	42
4.4	ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION	46
5	<i>IN VITRO</i> STUDIEN ZUM EINFLUSS VON FUMARSÄUREESTERN AUF INTRAZELLULÄRES GLUTATHION	48
5.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	48
5.2	MATERIAL UND METHODEN	49
5.2.1	Material und Geräte	49
5.2.2	Zelllinien	49
5.2.3	Inkubationsexperimente	49
5.2.4	Analytik	50
5.2.4.1	Proteinbestimmung	50
5.2.4.2	LC/MS-Analytik	51
5.2.4.2.1	Kalibrierung und Wiederfindung	51
5.2.4.2.2	Bestimmungsgrenze	51
5.2.4.3	GSH-Assay	51
5.3	ERGEBNISSE	52
5.3.1	Proteinbestimmung	52
5.3.2	Kalibrierung und Wiederfindung	52
5.3.3	Bestimmungsgrenze	52
5.3.4	Inkubationsexperimente	52
5.4	DISKUSSION	57
6	STUDIEN ZU MÖGLICHEN PHARMAKODYNAMISCHEN EFFEKTEN VON GS-DMS UND GS-MMS	60
6.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	60
6.2	MATERIAL UND METHODEN	61
6.2.1	Material und Geräte	61

6.2.2	Versuchsaufbau	62
6.2.2.1	Zelllinien	62
6.2.2.2	Inkubationsexperimente	62
6.2.3	RNA-Isolierung aus HaCaT-Keratinocyten.....	62
6.2.4	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	63
6.2.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	64
6.2.6	Real-time quantitative PCR	64
6.3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	66
7	STUDIEN MIT CACO-2 ZELLEN.....	68
7.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	68
7.1.1	Das CaCo-2 Modell.....	68
7.1.2	Transportstudien mit Fumarsäureestern.....	70
7.2	MATERIAL UND METHODEN	71
7.2.1	Material und Geräte	71
7.2.2	Zelllinie	71
7.2.3	Etablierung des CaCo-2-Transwell®-Systems	72
7.2.3.1	Transepithelialer Widerstand.....	73
7.2.3.2	Optimierung der Zellkulturbedingungen	73
7.2.3.3	Transportstudien	74
7.2.3.4	Luzifer-Gelb.....	74
7.2.3.5	Bestimmung des scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten	75
7.2.4	HPLC-Analytik.....	76
7.2.4.1	Detektion von GS-MMS und GS-DMS.....	76
7.2.4.1.1	Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid	77
7.2.4.1.2	Probenvorbereitung.....	77
7.2.4.1.3	HPLC-Methode.....	78
7.2.4.1.4	Kalibrierung.....	79
7.2.4.2	Detektion von FA, MMF und DMF	81
7.2.4.2.1	Probenvorbereitung.....	81
7.2.4.2.2	Kalibrierung.....	82
7.2.4.3	Bestimmungsgrenzen	82
7.3	ERGEBNISSE	82
7.3.1	Etablierung eines CaCo-2-Transwell®-Systems.....	82
7.3.2	HPLC-Analytik.....	83
7.3.2.1	Detektion von GS-DMS und GS-MMS.....	83
7.3.2.2	Kalibrierung.....	83
7.3.2.3	Detektion von FA, MMF und DMF	84
7.3.2.4	Kalibrierung.....	84
7.3.2.5	Bestimmungsgrenzen	84
7.3.3	Transportstudien	85
7.4	DISKUSSION	92
8	IN VIVO STUDIEN ZUR BIOTRANSFORMATION VON FUMARSÄUREESTERN.....	94
8.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	94
8.2	MATERIAL UND METHODEN	95

8.2.1	Material und Geräte	95
8.2.2	Analytische Methoden	95
8.2.2.1	Einleitung und Zielsetzung	95
8.2.2.2	HPLC-Analytik von Fumarsäureestern	97
8.2.2.2.1	Probenvorbereitung.....	97
8.2.2.2.2	HPLC-Methode.....	98
8.2.2.2.3	Kalibrierung und Wiederfindung	99
8.2.2.2.4	Bestimmungsgrenze	100
8.2.2.3	HPLC-Analytik von Fumarsäure	100
8.2.2.3.1	Probenvorbereitung.....	100
8.2.2.3.2	HPLC-Methoden.....	101
8.2.2.3.3	Kalibrierung und Wiederfindung	102
8.2.2.3.4	Bestimmungsgrenze	102
8.2.2.4	LC/MS-Analytik zur Detektion von GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS	102
8.2.2.4.1	Probenvorbereitung.....	102
8.2.2.4.2	LC/MS-Methode	103
8.2.2.4.3	Kalibrierung und Wiederfindung	104
8.2.2.4.4	Bestimmungsgrenze	104
8.2.2.5	LC/MS-Analytik zur Detektion von NAC-MMS, NAC-MES und NAC-DMS in Urin ...	104
8.2.2.5.1	Probenvorbereitung.....	104
8.2.2.5.2	LC/MS-Methode	104
8.2.2.5.3	Kalibrierung und Wiederfindung	105
8.2.2.5.4	Bestimmungsgrenze	105
8.2.3	<i>In vivo</i> Biotransformationsstudie	106
8.2.3.1	Studienaufbau	106
8.2.3.2	Blutprobengewinnung und -aufarbeitung	107
8.3	ERGEBNISSE	108
8.3.1	HPLC-Analytik von Fumarsäureestern	108
8.3.1.1	Kalibrierung und Wiederfindung	108
8.3.1.2	Bestimmungsgrenze.....	108
8.3.2	HPLC-Analytik von Fumarsäure	109
8.3.2.1	Kalibrierung und Wiederfindung	109
8.3.2.2	Bestimmungsgrenze.....	110
8.3.3	LC/MS-Analytik zur Detektion von GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS	110
8.3.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung	110
8.3.3.2	Bestimmungsgrenze.....	110
8.3.4	LC/MS-Analytik zur Detektion von NAC-MMS, NAC-MES und NAC-DMS in Urin	111
8.3.4.1	Kalibrierung und Wiederfindung	112
8.3.4.2	Bestimmungsgrenze.....	112
8.3.5	Charakteristische Ionenspuren	115
8.3.5.1	GS-MMS und GS-DMS.....	115
8.3.5.2	NAC-MMS.....	117
8.3.5.3	NAC-DMS und NAC-MES	120
8.3.6	<i>In vivo</i> Biotransformationsstudie	126
8.4	DISKUSSION UND POSTULAT DER WIRKUNGSWEISE VON FAE	135

9	EINFLUSS VON GLUTATHION-S-TRANSFERASEN AUF DIE BILDUNG VON GLUTATHION-ADDUKTEN MIT FUMARSÄUREESTERN	138
9.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	138
9.2	MATERIAL UND METHODEN	139
9.2.1	Material und Geräte	139
9.2.2	Inkubationsexperimente	139
9.2.3	HPLC-Analytik.....	140
9.2.4	Kalibrierung und Wiederfindung	140
9.3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	140
9.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung	140
9.3.2	Inkubationsexperimente	141
10	STUDIEN ZUR STABILITÄT VON GS-DMS	144
10.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	144
10.2	MATERIAL UND METHODEN	144
10.2.1	Material und Geräte	144
10.2.2	HPLC-Analytik.....	144
10.2.3	Kalibrierung und Wiederfindung	145
10.2.4	Inkubationsexperimente	145
10.3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	146
10.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung	146
10.3.2	Inkubationsexperimente	148
11	STUDIEN ZUR STABILITÄT VON FUMARSÄUREDIMETHYLESTER.....	150
11.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	150
11.2	MATERIAL UND METHODEN	151
11.2.1	Material und Geräte	151
11.2.2	Gewinnung von Plasma	151
11.2.3	Inkubationsexperimente	151
11.2.4	HPLC-Analytik.....	151
11.3	ERGEBNISSE	152
11.3.1	Stabilität von DMF in Phosphatpuffer pH = 7,4	152
11.3.2	Stabilität von DMF in Plasma	152
11.3.3	Stabilität von DMF in Vollblut	152
11.4	DISKUSSION	154
12	UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHEN KOVALENTEN BINDUNG VON FUMARSÄUREDIMETHYLESTER AN THIOLGRUPPEN VON PLASMAPROTEINEN.....	156
12.1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	156
12.2	MATERIAL UND METHODEN	157
12.2.1	Material und Geräte	157
12.2.2	Synthese von 2,3- ¹³ C-Fumarsäuredimethylester.....	157
12.2.3	Gewinnung von Plasma	158
12.2.4	Inkubationsexperimente	158
12.2.5	HPLC-Analytik.....	158
12.2.6	Massenspektrometrische Analyse	159

12.3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	159
12.3.1	Synthese von 2,3- ¹³ C-Fumarsäuredimethylester.....	159
12.3.2	Inkubationsexperimente.....	160
13	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	163
13.1	MATERIAL UND METHODEN	163
13.1.1	Material und Geräte	163
13.1.2	Zelllinien	163
13.1.3	Kultivierung und Passagierung verschiedener Zellarten.....	163
13.1.4	Einfrieren.....	165
13.1.5	Auftauen.....	165
13.1.6	Zellzahlbestimmung	165
14	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	166
	LITERATURVERZEICHNIS	170
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	186

1 EINLEITUNG

1.1 Psoriasis

1.1.1 Klinik, Epidemiologie und Pathogenese

Die Psoriasis (Schuppenflechte) kommt in den westlichen Industrienationen mit einer Inzidenz von $\sim 2\%$ vor. In Deutschland leiden daher mehr als 1,6 Millionen Menschen an der Erkrankung. Männer und Frauen sind mit gleicher Häufigkeit betroffen (1 - 5). Psoriasis ist nicht lebensbedrohend, geht aber mit großen psychischen Problemen und schweren sozio-ökonomischen Einschränkungen einher. Es handelt sich um eine chronisch-rezidivierende, oft schubförmig auftretende, entzündliche Hauterkrankung. Leiteffloreszenz ist das erhabene, scharf begrenzte Erythem mit geschichteter, silbrig glänzender Schuppung. Die Lokalisation ist besonders an Streckseiten der Extremitäten, Kreuzbein und behaartem Kopf, aber auch eine flächenhafte Ausbreitung über das gesamte Hautorgan ist möglich. Zur Beurteilung der Schwere der Psoriasis wird häufig der „Psoriasis Area and Severity Index“ (PASI) bestimmt, der die Ausprägung der Symptome Erythem (Rötung), Infiltration und Schuppung sowie das Ausmaß der von diesen Symptomen betroffenen Körperoberfläche für die Regionen Kopf, Arme, Rumpf und Beine berücksichtigt.

Die Psoriasis vulgaris stellt mit 97 % die häufigste Form der Schuppenflechte dar. Es werden zwei Typen der Psoriasis unterschieden. Die Typ 1-Psoriasis zeichnet sich durch einen frühen Krankheitsbeginn (Gipfel 2. Lebensjahrzehnt), familiäre Häufung und Assoziation zu Merkmalen des HLA (humanen Leukozyten Antigen)-Systems (HLA-Cw6 und -DR7) aus. Der milder verlaufende Typ 2 tritt meist sporadisch nach dem 40. Lebensjahr auf und besitzt keine HLA-Assoziation (6).

Psoriasis tritt häufig zusammen mit anderen Erkrankungen wie entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn), Diabetes mellitus Typ II, koronarer Herzkrankheit, Hypertonus und Psoriasis-Arthritis auf. Oft geht die Erkrankung mit dem „metabolischem Syndrom“ einher. Daher werden Psoriasis-Patienten häufig

multikausal mit diversen Arzneimitteln therapiert. Einige Medikamente, z.B. Chloroquin, Lithium, Betablocker, ACE-Hemmer sowie Interferon α wiederum können einen Psoriasis-Schub „triggern“ (7; 8). Deshalb ist besonders bei einer systemischen Psoriasis-Therapie auf Arzneimittelinteraktionen zu achten.

Die Pathogenese der Psoriasis ist nicht vollständig geklärt. Es handelt sich um eine komplexe kutane Immunreaktion mit einer entzündlichen Infiltration der Haut sowie erheblich beschleunigter Vermehrung und gestörter Reifung der Keratinozyten. Dabei ist der Zellzyklus der Keratinozyten von 310 h auf 36 h verkürzt (9; 10).

Nach heutiger Auffassung spielt das System der angeborenen Immunität besonders für Erstmanifestation und das Auslösen von Erkrankungsschüben der Psoriasis eine wesentliche Rolle. Dendritische Zellen (DZ) nehmen eine zentrale Rolle ein. Sie kommen entweder als residente Zellen in der Epidermis (Langerhans-Zellen) oder Dermis vor oder differenzieren sich aus Monozyten des peripheren Blutes (11; 12). Bakterielle Produkte, Antigene oder auch bislang allerdings nicht charakterisierte Auto-Antigene werden von dendritischen Zellen aufgenommen. Diese Antigen-präsentierenden Zellen können besondere Zytokine wie die Interleukine 12 und 23, aber auch Tumor-Nekrose-Faktor alpha ($\text{TNF}\alpha$) freisetzen und vermögen T-Zellen spezifisch zu aktivieren, die bevorzugt in die Haut einwandern.

$\text{TNF}\alpha$ führt in T-Zellen über die Aktivierung des nukleären Faktors kappa B ($\text{NF}\kappa\text{B}$) zur Transkription von Genen für pro-entzündliche Mediatoren und zur Stimulation und Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selectin, VCAM-1 (vaskuläres Zelladhäsions-Molekül) und ICAM-1 (intrazelluläres Zelladhäsions-Molekül) auf Gefäß-Endothelzellen. Diese Moleküle sind essentiell für die Migration der T-Zellen aus dem Gefäß in das Hautgewebe.

Die Sekretion pro-entzündlicher Mediatoren durch T-Zellen (insbesondere IL-17) kann die Proliferation von Keratinozyten stimulieren (13). Andere Zytokine (z.B. IL-8) werden für die Einwanderung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten in die Epidermis sowie für die Aktivierung von Mastzellen in der oberen Dermis verantwortlich gemacht. Durch den Erfolg immunsuppressiver Therapien wird bestätigt, dass die Psoriasis eine immunvermittelte Erkrankung ist (14; 15).

Eine weitere Besonderheit der Psoriasis ist die Überexpression von antimikrobiellen Peptiden wie Psoriasin und β -Defensinen, die ebenfalls wichtige Elemente der angeborenen Immunität von Epithelien sind.

1.1.2 Therapie

Die Therapie der Psoriasis erfolgt entsprechend dem Schweregrad bei milden Formen topisch, bei mittelschwerer Erkrankung durch die Kombination von topischer Behandlung mit UV-Bestrahlung und bei schwerer Psoriasis durch systemische Therapie meist in Kombination mit einer topischen Behandlung. Für die systemische Therapie stehen eine Reihe so genannter konventioneller Arzneimittel wie Methotrexat, Acitretin und Ciclosporin sowie die auch als „Biologics“ bezeichneten therapeutischen Antikörper Efalizumab (gegen CD11a) und Infliximab (gegen $\text{TNF}\alpha$) und das $\text{TNF}\alpha$ -Fusionsprotein Etanercept zur Verfügung.

Ausschließlich in Deutschland ist mit den Medikamenten Fumaderm[®] initial und Fumaderm[®] ein Gemisch von Fumarsäureestern für die orale Therapie der schweren Psoriasis zugelassen (16).

1.2 Fumarsäureester in der Therapie der Psoriasis

1.2.1 Historie

Die Wirksamkeit von Fumarsäureestern (FAE) zur Therapie der Psoriasis wurde erstmals 1959 durch Schweckendiek beschrieben (17). Der selbst stark an Psoriasis leidende Chemiker postulierte einen Mangel an Fumarsäure (FA) im Zitratzyklus als Ursache für die Erkrankung. Durch Einnahme hoher oraler Dosen an Fumarsäure versuchte er diesen Mangel zu kompensieren. Dieses Vorgehen war nicht erfolgreich und aufgrund der stark irritierenden Effekte der Fumarsäure von erheblichen gastrointestinalen Beschwerden begleitet. Dies führte zu dem Versuch die Wirksamkeit und die Verträglichkeit durch Einnahme von Estern der Fumarsäure zu verbessern. Tatsächlich gelang es Schweckendiek seine Psoriasis mit Fumarsäureestern erfolgreich zu therapieren. Auch die Nebenwirkungen wurden reduziert, waren aber noch immer vorhanden.

Die zunächst vor allem im süddeutschen Raum verbreiteten Magistralrezepturen von Fumarsäureestern zur oralen Psoriasis-Therapie wurden dann durch die Einführung

eines definierten Gemisches von Fumarsäureestern abgelöst. Seit 1994 sind die Fertigarzneimittel Fumaderm[®] und Fumaderm[®] initial in Deutschland zugelassen.

1.2.2 Therapeutische Anwendung und Bedeutung

Bei Fumaderm[®] handelt es sich um eine magensaftresistente Formulierung einer Mischung aus Fumarsäuredimethylester (DMF) und verschiedenen Salzen des Fumarsäuremonoethylsters (MEF) (Tab. 1.1).

Seit seiner Einführung hat sich Fumaderm[®] zu dem am häufigsten verwendeten Präparat zur systemischen Therapie der Psoriasis etabliert, auf das etwa 70 % aller Verordnungen für diese Indikation entfallen. Es ist fester Bestandteil des kürzlich etablierten Therapiealgorithmus zur Therapie der Psoriasis vulgaris im Rahmen der S3-Leitlinie geworden (Abb. 1.1).

Die Dosierung erfolgt zunächst einschleichend mit Fumaderm[®] initial, das sich von Fumaderm[®] durch insbesondere einen geringeren Gehalt an DMF unterscheidet. Nach drei Wochen wird auf Fumaderm[®] umgestellt und die Therapie bis zu einem ausreichenden Therapieerfolg, aber bis zu einer maximalen Dosis von 3 × 2 Tabletten/Tag in wöchentlichen Intervallen gesteigert (Tab. 1.2). Nach Erreichen eines Therapieerfolges wird in der Regel die Tabletteneinnahme bis hin zu einer individuellen Erhaltungsdosis verringert. Die Therapie mit Fumaderm[®] hat mit einem PASI 75 von 56 % (Anteil der Patienten, die nach 16 Wochen Therapie eine Verbesserung ihrer Psoriasis um mindestens 75 % im Vergleich zum Ausgangsbefund zeigen) eine gute Wirksamkeit (18). Da die Psoriasis eine chronische Erkrankung ist, sind Medikamente, die eine Langzeittherapie erlauben, wünschenswert. In klinischen Studien konnte die Möglichkeit einer Langzeittherapie von zwei bis drei Jahren mit FAE gezeigt werden (19 - 22). In einer in 2003 veröffentlichten Studie wurden zwölf Patienten beschrieben, die bis zu 14 Jahren kontinuierlich mit FAE behandelt wurden. Das Nebenwirkungsprofil entsprach dem einer Kurzzeittherapie. Es gab keine Anzeichen eines erhöhten Infektions- oder Malignomrisikos (23). Insbesondere zu Beginn einer Behandlung treten häufig Nebenwirkungen wie gastro-intestinale Symptome und eine Flush-Symptomatik auf. Ein weiterer Effekt der Therapie mit FAE kann das Absinken der Leukozytenzahlen und hier besonders der Lymphozyten sein

(24 - 26). Nach den heute geltenden Therapieempfehlungen sollte eine Dosisreduktion erfolgen, sobald die Gesamtleukozytenzahl unter $3 \times 10^9/l$ und/oder die Lymphozyten unter $0.5 \times 10^9/l$ fallen (18). Eine weitere offenbar spezifische Nebenwirkung der Fumarsäureestertherapie ist das Auftreten einer Eosinophilie, die vor allem zwischen der vierten und achten Therapiewoche zu beobachten ist. Sehr selten ist eine Proteinurie beschrieben, die auf ein sekundäres Osteomalazie-Syndrom hinweisen kann (27). Auch wurde eine Erhöhung des Leberenzym Alanin-Aminotransferase (ALAT) beobachtet. In den zuvor beschriebenen Fällen wird zunächst die Fumaderm[®]-Dosis reduziert und bei Persistenz der Nebenwirkungen die Therapie beendet. Irreversible Nebenwirkungen durch eine Therapie mit Fumarsäureestern sind bisher nicht beschrieben worden.

	Fumaderm [®] initial	Fumaderm [®]
DMF [mg]	30	120
MEF Ca-Salz [mg]	67	87
MEF Mg-Salz [mg]	5	5
MEF Zn-Salz [mg]	3	3

Tab. 1.1: Zusammensetzung des Fertigarzneimittels Fumaderm[®]

Woche	Fumaderm [®] initial	Fumaderm [®]
1	1-0-0	
2	1-0-1	
3	1-1-1	
4		1-0-0
5		1-0-1
6		1-1-1
7		2-1-1
8		2-1-2
9		2-2-2

Tab. 1.2: Dosierungsschema für die Therapie mit Fumaderm[®]

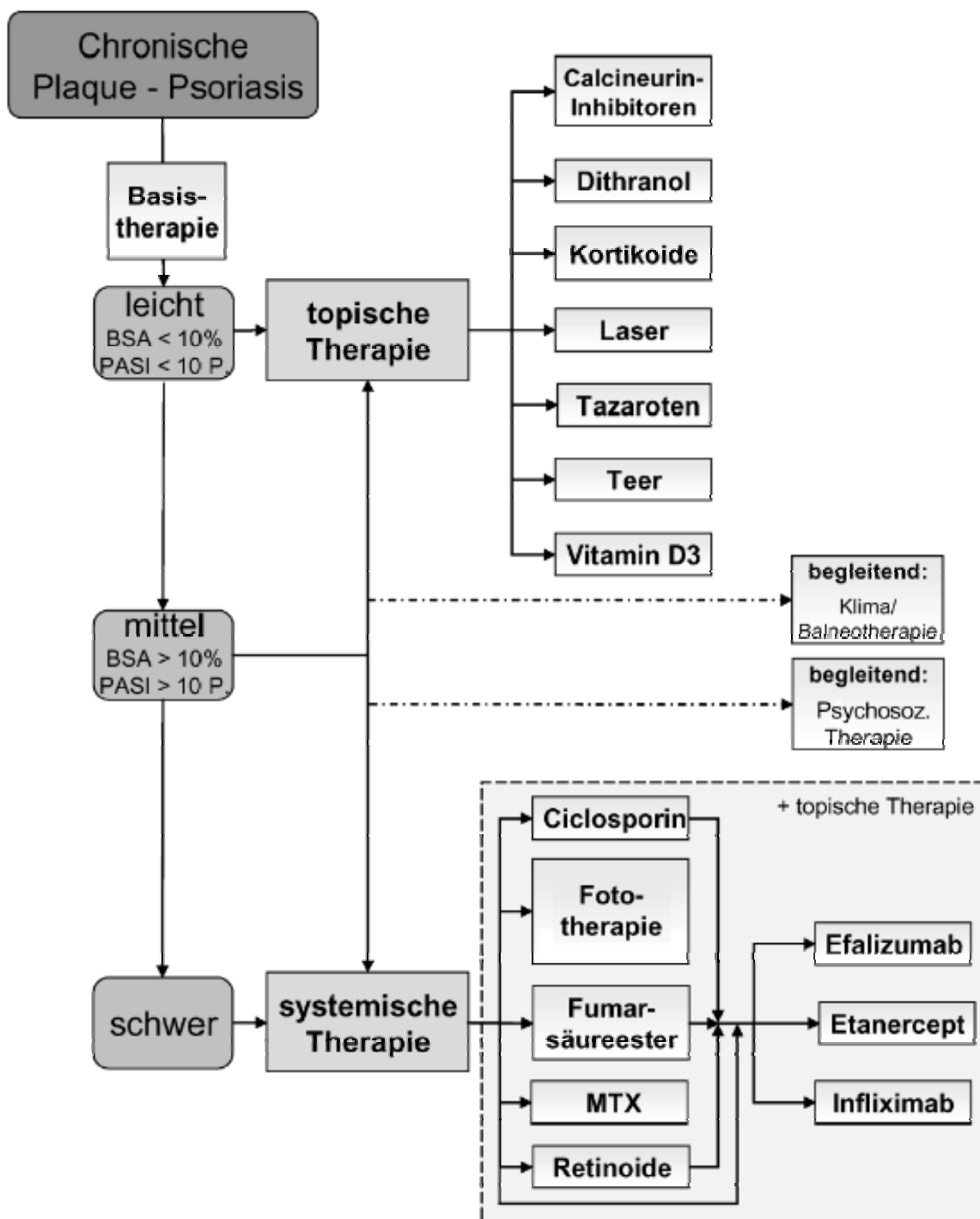


Abb. 1.1: Übersicht der Therapieoptionen bei der chronischen Plaque-Psoriasis (die Anordnung der Therapieoptionen ist alphabetisch und stellt keine Wertung dar). Quelle: S3-Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris 2006 (16)

1.3 Pharmakokinetik

Der von Pharmakon und Kinetik abgeleitete Begriff Pharmakokinetik beschreibt das quantitative Verhalten von Arzneimitteln in den verschiedenen Kompartimenten des Organismus.

Hierzu zählen alle Prozesse, denen ein Wirkstoff im Körper unterliegt, angefangen von der Freisetzung, über die Aufnahme, die Verteilung und den Metabolismus bis zur Ausscheidung. Sie werden mit dem Begriff LADME (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion) zusammengefasst.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem oral zu applizierenden Arzneimittel Fumaderm® (magensaftresistent). Daher werden im Folgenden die grundsätzlichen pharmakokinetischen Parameter für eine magensaftresistente Tablette besprochen.

1.3.1 Liberation

Wird ein Wirkstoff peroral appliziert, muss er aus seiner galenischen Formulierung freigesetzt und gelöst werden. Hierfür ist die Flüssigkeitsmenge im Dünndarm, die sowohl im nüchternen als auch im nicht nüchternen Zustand nur 60-80 ml beträgt, ein limitierender Faktor (28). Nur gelöste Arzneistoffe können absorbiert werden (29). Die Geschwindigkeit, mit der ein Arzneistoff freigesetzt wird, und seine physikochemischen Eigenschaften (z.B. Löslichkeit) beeinflussen die folgenden pharmakokinetischen Parameter entscheidend.

1.3.2 Absorption

Der Arzneistoff muss durch die Darmschleimhaut gelangen, um in die Blutzirkulation aufgenommen zu werden. Der Aufnahme liegen Diffusions- und Transportprozesse zugrunde. Die Möglichkeiten eines transmembranären Transportes werden in Kapitel 7 genauer beschrieben.

Für die Absorption spielen physikochemische Eigenschaften, insbesondere die Molekülgröße und bei Säuren und Basen der Dissoziationsgrad eine große Rolle

(vgl. Kap. 2) (30). Weiterhin beeinflussen der Füllungsstatus des Magens, der pH-Wert im Dünndarm, die Durchblutung des Gastrointestinaltraktes und die Transportgeschwindigkeit des Speisebreis, die die Kontaktzeit des Pharmakons mit der resorbierenden Schleimhaut bestimmt, die pharmakokinetischen Parameter.

1.3.3 Distribution

Zirkuliert der Wirkstoff im Blut, beginnt die Verteilung. Dabei kann er nach seinen Eigenschaften die Blutbahn mehr oder weniger leicht verlassen (Durchdringen des Kapillarendothels) und sich auf die Gewebe und Organe verteilen. Im Blut ist eine mögliche Bindung an Plasmaproteine wichtig (vgl. Kap. 3).

Die Stärke der Wirkung eines Arzneistoffes hängt im Allgemeinen von der Wirkstoffkonzentration am Wirkort ab. Diese Konzentration ist oftmals nicht direkt erfassbar, geht aber häufig mit der Konzentration im Blutplasma einher.

1.3.4 Metabolismus

Der Körper besitzt Enzymsysteme und Mechanismen, um insbesondere lipophile Fremdstoffe (Xenobiotika) durch Einführung hydrophiler Gruppen leichter ausscheidbar zu machen und somit eine Akkumulation z.B. im Fettgewebe zu vermeiden. Diese Biotransformation erfolgt vor allem in der Leber aber auch im Darm, in der Niere, der Lunge, der Milz, der Haut oder im Blut. Neben den Organen leistet auch die Darmflora durch Reduktion und Hydrolyse einen Beitrag zur Biotransformation (31).

Es werden verschiedene Phasen unterschieden: Phase-I, in denen der Arzneistoff oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert wird, Phase-II-Reaktionen, in denen oftmals der in Phase-I entstandene Metabolit an körpereigene Substanzen wie Glucuronsäure, Sulfate, Aminosäuren, Glutathion, Essigsäure oder S-Adenosylmethionin gekoppelt wird, und Phase-III-Prozesse, bei denen ein Phase-II-Metabolit aus der Zelle aktiv ausgeschleust wird.

Die Mechanismen der Biotransformation laufen unabhängig davon ab, ob die

entstehenden Metabolite inaktiv, aktiv oder sogar toxisch sind. Dies wird auch als Bioinaktivierung, Bioaktivierung oder Biotoxifizierung bezeichnet. Eine Bioaktivierung wird bei dem Prodrug-Prinzip ausgenutzt. Dieses wird meist eingesetzt, wenn ein potenter Arzneistoff eine geringe Bioverfügbarkeit, Wasserlöslichkeit oder eine hohe präsystemische Elimination aufweist. Prodrugs selbst sind biologisch weitgehend inaktiv und werden enzymatisch oder nichtenzymatisch in die aktive Form umgewandelt. So kann z.B. durch Veresterung einer Carbonsäure die Lipophilie des Arzneistoffs und damit seine Resorbierbarkeit gesteigert werden. Nach seiner Absorption wird der Ester wieder durch Hydrolyse gespalten.

Der Vorgang, dass ein enteral resorbierter Arzneistoff vor Erreichen des großen Kreislaufs metabolisiert wird, wird als präsystemische Elimination bezeichnet. Schon im intestinalen Milieu und in den Darmzellen kann eine Verstoffwechslung erfolgen. Nach Absorption gelangt der Wirkstoff in das Pfortaderblut und wird zur Leber transportiert. Der „Verlust“ an Arzneistoff nach der ersten Leberpassage wird als First-Pass-Effekt bezeichnet. Anschließend fließt das Blut über das rechte Herz in die Lunge. Hier kann ein Teil der resorbierten Arzneimittelmenge sequestriert werden, zumal die Lunge eine hohe Bindungskapazität für amphiphile und lipophile Substanzen besitzt. Erst dann gelangt das Pharmakon-Molekül über das linke Herz in den großen Kreislauf und kann sich verteilen. So ist auch nach intravenöser, subkutaner, intramuskulärer Injektion aber auch nach bukkaler oder rektaler Resorption eine präsystemische Elimination möglich, da vor Erreichen des großen Blutkreislaufes Metabolisierung im Blut stattfinden kann und die Lunge als Barriere überwunden werden muss (30).

Das Ausmaß des Fremstoffmetabolismus wird von Faktoren wie individueller genetischer Disposition (z.B. in Bezug auf die Menge und Aktivität bestimmter Enzyme), Alter, Geschlecht, Ernährung und Krankheiten beeinflusst.

1.3.4.1 Übersicht über Enzymsysteme

Um die mögliche Toxizität von Fremdstoffen gering zu halten, sind die meisten Gewebe und Organe des Körpers gut mit Phase-I- und Phase-II-Enzymen sowie Phase-III-Transportern ausgestattet (32). Die Substratspezifität der zahlreichen

Enzymsysteme, die an Phase-I- und Phase-II-Reaktionen beteiligt sind, ist im Gegensatz zu Enzymen des Intermediärstoffwechsels gering.

1.3.4.2 Phase-I-Enzyme

Das wichtigste Phase-I-Enzymsystem ist die Cytochrom P450 Superfamilie, die aus Familien und Subfamilien besteht, die nach ihrer Aminosäuresequenz klassifiziert werden. Die höchsten Konzentrationen der Enzyme kommen in der Leber, dem Gastrointestinaltrakt, der Lunge und der Niere vor (32 - 34).

Übersicht der Phase-I-Enzyme:

Oxidoreduktasen:

- Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYP)
- Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO)
- Monoaminoxidasen (MAO)
- Cyclooxygenasen (COX)
- Dihydrodioldehydrogenasen
- DT-Diaphorase (NQOR)
- Alkohol- und Aldehyd-dehydrogenasen (ADH, ALDH)

Hydrolasen:

- Esterasen
- Amidasen
- Glucuronidasen
- Epoxidhydrolasen (EH)

1.3.4.3 Phase-II-Enzyme

Durch Kopplungsreaktionen wird immer eine saure Gruppe in das Molekül eingeführt (Ausnahme: Acetylierung, Methylierung), durch Salzbildung die Hydrophilie stark erhöht und damit eine renale und/oder biliäre Ausscheidung, auch mittels aktiver

Prozesse (Phase-III), erleichtert.

Konjugate sind meist biologisch inaktiv. Es wurden aber schon mehrere aktive Phase-II-Metabolite entdeckt. So hat z.B. Morphin-6-glucuronid eine analgetische Wirkung. Auch können Phase-II-Metabolite eine erhöhte Toxizität aufweisen (35 - 38).

Übersicht der Phase-II-Enzyme:

- Glutathiontransferasen (GST)
- UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT)
- Sulfotransferasen (SULT)
- *N*-Acetyltransferasen (NAT)
- NAD(P)H:Quinone Oxidoreduktasen (NQO)
- Methyltransferasen
- Aminoacyltransferasen

1.3.4.4 Phase-III-Transporter

Phase-III-Transporter sind in vielen Organen expremiert (z.B. Leber, Intestinium, Niere und Gehirn). Sie stellen eine Barriere bei der Arzneistoffpenetration dar und spielen eine zentrale Rolle bei der Absorption, Verteilung und Exkretion von Arzneistoffen (39 - 42).

Übersicht der Phase-III-Transporter:

- Organic Anion Transporter (OATP)
- P-Glykoprotein
- Multi-Drug Resistance Protein (MRP)
- RLIP76

1.3.5 Exkretion

Die Ausscheidung eines Pharmakons bzw. seiner Metabolite erfolgt, in Abhängigkeit der physikochemischen Parameter der auszuscheidenden Substanz, hauptsächlich renal, biliär, intestinal oder pulmonal.

Lipophile genauso wie hydrophile Substanzen werden gleich gut glomerulär filtriert. Da Proteine nicht filtriert werden, zeigen auch Stoffe mit hoher Plasma-Eiweißbindung eine niedrige Filtrationsrate. Lipophile Stoffe werden von der Niere relativ schlecht ausgeschieden, da während der tubulären Passage eine ständige Rückdiffusion erfolgt. Der tubulären Sekretion liegt ein aktiver Prozess zugrunde. So werden viele organische Säuren und Basen entgegen dem Konzentrationsgefälle in den Urin abgegeben.

Mit der Galle werden bevorzugt Stoffe ausgeschieden, die ein Molekulargewicht über 500 g/mol besitzen bzw. dies durch Metabolisierung erlangen. Im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes besteht die Möglichkeit der Rückresorption biliär ausgeschiedener lipophiler Substanzen auch nach Hydrolyse ihrer Konjugate. Bei Konjugaten, die im Urin ausgeschieden werden, ist dies eher die Ausnahme (43; 44).

1.4 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Fumarsäureester

1.4.1 Pharmakokinetik

Die chemischen Strukturen von Fumarsäure und ihren Estern sind in Abb. 1.2 wiedergegeben.

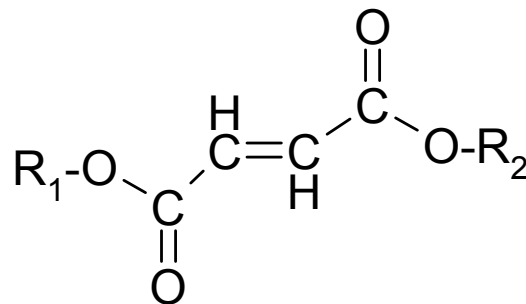
Aus den in Kapitel 1.4.2 aufgeführten Gründen, dass MEF für den antipsoriatischen Effekt der Therapie mit Fumarsäureestern keine Rolle spielt, liegt der Focus im Folgenden auf den pharmakokinetischen Daten von DMF und seinem Hydrolyseprodukt Fumarsäuremonomethylester (MMF). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war hinsichtlich der Pharmakokinetik von Fumarsäureestern bekannt, dass nach oraler Gabe von DMF in Form von magensaftresistenten Tabletten lediglich MMF im Plasma von gesunden Probanden nachgewiesen werden konnte (45 - 47).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass DMF einer sehr ausgeprägten präsystemischen Elimination unterliegt und quantitativ hydrolysiert wird. Für die Hydrolyse wurden hauptsächlich Esterasen verantwortlich gemacht und nur in geringem Ausmaß chemische Hydrolyse, die erst in Darmabschnitten mit einem $\text{pH} > 7,4$ erwähnenswert erfolgt (48; 49). Es gab Hinweise darauf, dass Esterasen, die im Intestinum lokalisiert sind, DMF schon vor einer Absorption stark abbauen können. Zum Beispiel war die Halbwertszeit von DMF im Homogenat von Schweinedünndarm < 3 min (48). Ergebnisse aus Permeationsstudien mit frisch entnommenem Schweinedünndarm („Ussing-chamber“) zeigten, dass DMF während der Passage vollständig metabolisiert wurde. Diese Ergebnisse standen allerdings im Kontrast zu denen, die unter Verwendung eines CaCo-2 Modells erzielt wurden. Hier konnte keine nennenswerte Verstoffwechslung von DMF beobachtet werden. Der ermittelte Permeabilitätskoeffizient von DMF war bei einem pH -Wert von 6,5 ungefähr elf Mal größer als der von MMF. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob DMF unverstoffwechselt die Darmwand passieren kann. Im Falle einer Absorption von DMF wiesen Untersuchungen mit Schweineleber S9 Fraktionen darauf hin, dass DMF im Gegensatz zu MMF während der Leberpassage quantitativ umgesetzt werden müsste ($\text{HWZ}_{\text{DMF}}: < 1\text{min}$; $\text{HWZ}_{\text{MMF}}: 518 \pm 76$ min) (48). Zusätzlich schienen Esterasen im Blutplasma für die Hydrolyse von DMF eine große Rolle zu spielen. Die HWZ von DMF betrug hier 11,6 min, die von MMF ~ 36 h (46). Durch gezieltes Versetzen von humanem Vollblut mit DMF im Vergleich zu Serum und Puffer ($\text{pH} = 7,4$) wurde festgestellt, dass die HWZ von DMF im Vollblut beträchtlich kleiner ist als in Serum oder Puffer. Es wurde daraus geschlossen, dass Blutzellen DMF hydrolysieren können und dieses auch „binden“, da die Abnahme an DMF nicht mit einer Zunahme an MMF korrelierte (49). Auch nach intravenöser Gabe von DMF an Schweinen konnte nur MMF nachgewiesen werden, auch wenn die erste Blutprobe schon nach drei Minuten genommen wurde (50).

Allen *in vivo* Studien war gemeinsam, dass die pharmakokinetischen Parameter für MMF starken interindividuellen Schwankungen unterlagen. Diese Schwankungen waren bei der oralen Gabe von DMF im nicht nüchternen Zustand im Vergleich zur Gabe im nüchternen Zustand am größten. Die MMF Plasmaspiegel waren im nicht nüchternen Zustand am niedrigsten (45). Auch eine eindeutige Zuordnung der MMF

Plasmaspiegel zu einem Ein- oder Zwei-Kompartiment-Modell konnte nicht erfolgen. Ein Grund für die große Variabilität der pharmakokinetischen Parameter könnte die individuell unterschiedliche Ausstattung mit Esterasen sein. Interindividuelle Schwankungen in der Expression von Carboxylesterasen wurden auf „single nucleotide polymorphisms“ (SNP) in diesen Enzymen, Umweltfaktoren und Induktion oder Inhibition durch bestimmte Lebensmittel oder Arzneistoffe zurückgeführt (12; 51 - 53).

Weiterhin ließen sich nach Gabe von Fumaderm[®] keine Veränderungen der Fumarsäure-Plasmaspiegel beobachten (45). Mögliche Interaktionen mit dem Cytochrom P450 Enzymsystem wurden ausgeschlossen (48). Zur Exkretion von FAE gibt es bislang keine publizierten wissenschaftlichen Daten.



	R ₁	R ₂
Fumarsäure (FA)	H	H
Fumarsäuremonomethylester (MMF)	H	CH ₃
Fumarsäuremonoethylester (MEF)*	H	C ₂ H ₅
Fumarsäuredimethylester (DMF)*	CH ₃	CH ₃

Abb. 1.2: Strukturen von Fumarsäure und Fumarsäureestern * Inhaltsstoffe von Fumaderm[®]

1.4.2 Pharmakodynamik

Schon die ersten klinischen Studien in den Jahren 1989 und 1990 zeigten, dass der essentielle Bestandteil von Fumaderm[®] DMF ist. MEF spielt für die Wirkung keine oder nur eine untergeordnete Rolle (54; 55). Dies wird auch dadurch belegt, dass mit einem DMF-Monopräparat eine klinische Prüfung der Phase III bei Psoriasis

erfolgreich abgeschlossen wurde (56).

Im Folgenden werden die wichtigsten pharmakologischen Wirkungen von FAE zusammengefasst. Da dem Wirkmechanismus von FAE immunmodulierende Effekte zugrunde liegen, wird der Focus auf die Arbeiten gelegt, welche im Bezug zu dieser Fragestellung stehen.

Bacharach-Buhles *et al.* untersuchten 1994 das entzündliche Infiltrat in Psoriasis-Läsionen während einer 12-wöchigen Therapie mit FAE. Dabei wurde insbesondere eine Reduktion von T-Helferzellen (Th) um 84,4 % innerhalb der ersten acht Wochen der Behandlung und eine Reduktion der Zahl neutrophiler Granulozyten von 23,4 % auf 0 % innerhalb der ersten zwei Wochen festgestellt. Diese Effekte gingen dem klinischen Heilungsprozess zeitlich voraus (57). Altmeyer *et al.* zeigten, dass bei 94 % der Psoriasis-Patienten nach einer zwölfwöchigen Therapie mit FAE eine Leukopenie im peripheren Blut von durchschnittlich 26,6 % auftrat. Bei der Analyse der Lymphozytensubpopulationen ließ sich eine gleichgroße etwa 45 % Reduktion der zytotoxischen T-Zellen und Th-Zellen feststellen (26). Höxtermann *et al.* bestätigten diese Ergebnisse 1998 in einer 12-monatigen Untersuchung (58). Hier wurde eine Leukopenie von 28,9 % am Studienende festgestellt. Dabei wurden die Lymphozyten am stärksten reduziert, wobei der Effekt schon nach drei Monaten Behandlung fast maximal war (nach drei Monaten 48,7 %; nach 12 Monaten 59,8 %). Vergleichbar zu der Studie von Altmeyer *et al.* (s.o.) konnte auch nach drei Monaten Therapie kein Unterschied im Ausmaß der Reduktion von Th-Zellen und zytotoxischen T-Zellen festgestellt werden. Danach wurde eine Verschiebung dieses Gleichgewichtes auf die Seite der Th-Zellen beobachtet. Es wurde postuliert, dass die abnehmende Zahl an peripheren Lymphozyten mit dem klinischen Effekt einhergeht (58). Aufgrund der genannten Studien ist es wahrscheinlich, dass die Wirkung von FAE auf Immunzellen des peripheren Blutes eine Reduktion von pro-entzündlichen Zellen in psoriatischen Läsionen nach sich zieht.

In *in vitro* Studien konnte nachgewiesen werden, dass MMF die Produktion von sogenannten Th2-Zytokinen (Interleukin 4 und 5) in isolierten T-Zellen induziert, aber keinen Einfluß auf die Produktion pro-entzündlicher Th1-Zytokine (z.B. Interleukin 2) hat. Die EC₅₀ (halbmaximale effektive Konzentration) für MMF betrug 100 µM. Bei Konzentrationen < 200 µM MMF wurde kein Einfluß auf die Zellproliferation von Th-Zellen beobachtet (59).

Dendritische Zellen regulieren die Differenzierung von Th-Zellen in Th1-Zellen und Th2-Zellen. Bei Kokultorexperimenten von T-Zellen und dendritischen Zellen, die mit 100 μM MMF vorbehandelt waren, zeigte sich eine erniedrigte Sekretion des Th1-Zytokins IL-12p70 (60).

Inkubation von Monozyten mit 100 μM MMF zeigte einen hemmenden Einfluß auf die Zytokin-induzierte Differenzierung in dendritische Zellen. Diese Zellen produzierten weniger IL-12p70, IL-10 und $\text{TNF}\alpha$ als nicht behandelte Kontrollen. MMF-behandelte dendritische Zellen unterdrückten die Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$)-Produktion von T-Zellen ohne jedoch die Freisetzung der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 zu verändern (61). Effekte auf die Differenzierung von dendritischen Zellen wurden auch von Zhu und Mrowietz beobachtet. Hier zeigte DMF im Gegensatz zu MMF eine sehr potente Wirkung (62). In PBMC (peripheral blood mononuclear cells) konnte schon mit Konzentrationen von 5 μM DMF die Sekretion von pro-entzündlichen Zytokinen erniedrigt werden (63).

Neben der beschriebenen Hemmung von Th1, der Stimulation von Th2-Zytokinen (sogenannter „Th1-Th2-Shift“) und der Beeinflussung von dendritischen Zellen, die durch die Stimulation mit hohen Konzentrationen an MMF und niedrigen an DMF beobachtet werden konnten, wurden weitere entzündungshemmende Effekte von FAE beschrieben.

Die Behandlung von Zellen verschiedenen Ursprungs mit DMF führte regelmäßig zur Induktion von Apoptose (vgl. Kap. 3). Insbesondere die Induktion der Apoptose in T-Zellen und in Monozyten scheint aus den oben genannten Gründen von pathophysiologischem Interesse zu sein (62; 64).

Die Auswanderung von Entzündungszellen aus Blutgefäßen in die Haut wird über die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen gesteuert. Hierbei werden verschiedene Gruppen von Adhäsionsmolekülen unterschieden, die für die drei wichtigsten Phasen der Leukozytenauswanderung von Bedeutung sind: „rolling“, „tethering“ und „firm adhesion“. Für die Pathogenese der Psoriasis sind besonders die Adhäsionsmoleküle E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1 von Bedeutung.

DMF hemmt die endotheliale, unter anderem durch $\text{TNF}\alpha$ induzierte ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin Expression *in vitro* und könnte dadurch die Adhäsion von Leukozyten und damit deren Einwandern in die Haut verringern (65). Da die Genexpression dieser Adhäsionsmoleküle über $\text{NF}\kappa\text{B}$ reguliert wird, wurde angenommen, dass der

Wirkmechanismus zu einem großen Teil auf der Hemmung dieses Transkriptionsfaktors beruhen könnte. Die Hemmung von NFκB durch DMF wurde weiterhin in humanen mikrovaskulären Endothelzellen, Fibroblasten und isolierten T-Zellen gezeigt (66 - 68). Ergänzend konnte eine Hemmung mit DMF und MMF, aber nicht mit FA, in humanen dendritischen Zellen gezeigt werden. MMF wurde in Konzentrationen von 100 μM eingesetzt (60).

Die Regulation von NFκB *in vivo* durch Behandlung mit DMF wurde von Mrowietz und Asadullah postuliert (69).

1.5 Thema und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Fumarsäureestern.

Durch viele Studien konnte gezeigt werden, dass mit FAE eine effektive und sichere Langzeittherapie der schweren Psoriasis vulgaris durchgeführt werden kann.

Die Pharmakokinetik von FAE ist jedoch noch nicht ausreichend erforscht. Es ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob DMF, sein Hydrolyseprodukt MMF oder ein anderer Metabolit von DMF oder MMF die Wirkform *in vivo* darstellt. Die ursprüngliche Hypothese, dass durch die Gabe von FAE Fumarsäure *in vivo* supplementiert wird, konnte bislang nicht bewiesen werden.

Auch die Daten zur Pharmakodynamik von FAE lassen noch viele Fragen offen. Es besteht eine große Diskrepanz zwischen der Situation *in vivo* und den *in vitro* beobachteten Effekten. *In vivo* sind bei gesunden Probanden keine Blutspiegel von DMF nach Gabe von Fumaderm[®] messbar. Ein An- und Abfluten von MMF im Plasma kann hingegen nachgewiesen werden.

In vitro zeigte aber gerade DMF ausgeprägte Effekte auf z.B. pro-entzündliche Signalkaskaden. Mit MMF ließen sich nur einige dieser Wirkungen hervorrufen, allerdings durch, im Vergleich zu DMF, hohe Konzentrationen, die nach Gabe von zwei Tabletten Fumaderm[®] *in vivo* nicht erzielt werden können. Daher war die Aussagekraft der *in vitro* Ergebnisse für MMF aufgrund der hohen nötigen Konzentrationen und der von DMF aufgrund der fehlenden Plasmaspiegel begrenzt.

Auffällig war weiterhin, dass bestimmte Wirkungen von DMF an vielen Zelltypen

gezeigt wurden (z.B. Hemmung von NFκB, Induktion von Apoptose). Dies ließ vermuten, dass den Effekten ein allgemeiner Mechanismus zugrunde lag.

Bei Untersuchungen zur Wirkung von DMF auf Systeme, die durch oxidativen Stress beeinflusst werden, konnte gezeigt werden, dass DMF *in vitro* den Glutathion (GSH)-Gehalt von Zellen regulierte. Unter Verwendung einer Zelllinie von Retinazellen war nach einer initialen Depletion von intrazellulärem GSH durch Induktion der GSH *de novo* Synthese eine zeitlich versetzte Aufregulierung zu beobachten, wobei die GSH-Konzentrationen nach längerer Kulturzeit über den Ausgangswert hochreguliert wurden (70).

GSH erfüllt viele physiologische Funktionen. Es ist das wichtigste intrazelluläre Antioxidans und reguliert das Redoxpotential der Zelle. Über die intrazellulären GSH-Konzentrationen können viele Signalkaskaden reguliert werden (71). Durch die erwähnte Regulation des intrazellulären GSH-Status mit DMF lassen sich die in Kapitel 1.4.2 beschriebenen *in vitro*-Effekte von FAE erklären:

Es wurde gezeigt, dass die GSH-Konzentrationen in antigenpräsentierenden Zellen die folgende Stimulation von T-Zellen und deren Proliferation regulieren. Erniedrigte intrazelluläre GSH-Konzentrationen wiederum führten zu einer signifikanten Abnahme an pro-entzündlichen Th1-Zytokinen und verringerten die Proliferation von T-Zellen (72).

Auch lässt sich eine eindeutige Korrelation von intrazellulärer GSH-Konzentration und der Induktion von Apoptose herstellen. Diese wird in Kapitel 4 näher beschrieben.

Eine NFκB Hemmung scheint mit einem erhöhtem GSH-Status der Zelle einherzugehen (73). Die Inkubation mit DMF führte zu einer zeitlich versetzten Erhöhung an GSH in der T-Zell-Lymphom-Linie H9 (74). So kann die Hemmung dieses Transkriptionsfaktors durch DMF *in vitro* und damit die Beeinflussung der Expression von Adhäsionsmolekülen erklärt werden.

Zusammengefasst galten zum Zeitpunkt, an dem diese Arbeit begonnen wurde, folgende Hypothesen zur Wirkung von FAE:

1. MMF ist das *in vivo* wirksame Molekül.
2. DMF zeigt nur *in vitro* Aktivität und kann *in vivo* nicht nachgewiesen werden.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es die Wirkform der Fumarsäureester zu identifizieren und damit Hinweise auf den Wirkmechanismus zu erhalten. Hierzu wurden entsprechende *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt.

Dabei sollte insbesondere die Bedeutung der Reaktivität von DMF mit GSH untersucht werden.

Für die jeweilige Fragestellung waren entsprechende Methoden zu etablieren. Ein Schwerpunkt lag auf der Entwicklung geeigneter analytischer Verfahren zur Detektion von FAE und GSH-Addukten, sowie deren nach Metabolisierung resultierenden Mercaptursäuren, in unterschiedlichem Probenmaterial.

2 PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON FUMARSÄUREESTERN

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Physikochemische Eigenschaften spielen eine entscheidende Rolle für die Pharmakokinetik von Arzneistoffen.

Eine gute Annäherung zur Vorhersage der oralen Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes stellen die empirischen Regeln von Lipinski *et al.* (2001) in Kombination mit denen von Veber *et al.* (2002) dar (75; 76).

Nach Lipinski ist die Wahrscheinlichkeit einer oralen Absorption gering, wenn mindestens zwei der Kriterien der „Rule of five“ nicht erfüllt werden:

- Molekulargewicht < 500 g/mol
- logP < 5
- Wasserstoffbrückendonatoren < 5
- Wasserstoffbrückenakzeptoren < 10

Nach Veber *et al.* ist eine orale Bioverfügbarkeit bei Erfüllung folgender Kriterien wahrscheinlich:

- Drehbare Bindungen ≤ 10
- Polare Gesamtoberfläche eines Moleküls (polar surface area, PSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$

Dabei sind alle Einfachbindungen ohne Beteiligung von Wasserstoffatomen, die nicht in einen Ring integriert sind und keine C-N-Bindung darstellen, drehbare Bindungen.

Die polare Gesamtoberfläche ist definiert als die Summe der Oberflächen polarer Atome (Sauerstoff, Stickstoff und hieran gebundene Wasserstoffatome).

Da im Mittel drehbare Bindungen und auch die polare Gesamtoberfläche mit steigendem Molekulargewicht zunehmen, ist diese Definition mit der Regel von Lipinski (MG < 500 g/mol) indirekt verbunden.

Ein idealer Arzneistoff besitzt neben einer ausreichenden Lipophilie, die für eine passive Diffusion durch eine Membran essentiell ist, eine ausreichende Löslichkeit. Nur gelöste Stoffe können absorbiert werden (29).

Handelt es sich bei den zu betrachtenden Substanzen um Säuren, ist ihr pK_a -Wert von Bedeutung. Er lässt unter Einbeziehung der Henderson-Hasselbach-Gleichung eine Abschätzung des Dissoziierungsgrades bei physiologisch vorherrschendem pH-Wert zu. Aufgrund der negativen Ladung einer dissoziierten Säure wird ihr Permeationsvermögen durch eine Membran stark verringert. Demnach sollten oral verfügbare Arzneistoffe einen $\log P$ von 0-3 und einen pK_a -Wert von 6-8 aufweisen.

Im Zwölffingerdarm herrscht ein pH-Wert von 5,5-6,5 und in den nachfolgenden Abschnitten des Dünndarms ein pH-Wert von 6,0-7,4 vor (77).

Fumarsäureester werden in einer magensaftresistenten Formulierung oral verabreicht und im Intestinaltrakt absorbiert. Die Wirksamkeit von FAE wird DMF zugeschrieben. Sein Hydrolysemetabolit ist MMF. Es entsteht im Intestinum eher durch den Einfluß von Esterasen, als durch chemische Hydrolyse (vgl. Kap. 11) (48; 49). In humanem Plasma ist nach oraler Gabe von DMF nur MMF nachweisbar (vgl. Kap. 8) (45).

MEF ist der zweite Inhaltsstoff von Fumaderm[®]. Er spielt für die Wirkung der FAE nach heutiger Auffassung keine Rolle (55).

Eine zentrale Frage in der Aufklärung der Pharmakokinetik und des Wirkmechanismus von FAE ist, ob die MMF Plasmaspiegel durch Absorption von MMF, welches im Intestinum aus DMF gebildet wurde, oder erst nach Absorption von DMF und folgender Metabolisierung resultiert. Da eine Absorption von MMF stark von dem Dissoziationsgrad der Carbonsäure abhängt, war die Bestimmung des pK_a -Wertes von MMF von Bedeutung.

Weiterhin wurden die oben genannten physikochemischen Parameter von FA, MMF, MEF und DMF durch *in silico* Verfahren ermittelt.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 pK_a Bestimmung von Fumarsäuremonomethylester

2.2.1.1 Material

Acetonitril, Aqua bidest. (J.T. Baker, Deventer, Holland); Natriumhydroxid, Phosphorsäure, Salzsäure (Fluka, Buchs, Schweiz); Triethylamin (Merck, Darmstadt); MMF (Sigma-Aldrich, Steinheim).

2.2.1.2 Bestimmung des pK_a-Wertes mittels HPLC

Der Retentionskoeffizient k' von MMF wurde bei verschiedenen pH-Werten (2,0 bis 7,0) und variierendem Acetonitril-Gehalt (5 - 15 %) der mobilen Phase bestimmt. Die Analytik erfolgte in Anlehnung an die Methode von Bartolini *et al.* unter Verwendung eines VWR LaChrom Elite[®] HPLC-Systems.

HPLC-Pumpe	HITACHI L-2130
Detektor	HITACHI L-2485 (UV/VIS)
Autosampler	Gerstel MPS-3
Integrator	EZChrom Elite Chromatographie-Datensystem (Version 3.1.7) (VWR, Darmstadt)
Entgaser	Gilson 864 (Middleton, USA)
Säulenofen	25 °C Jetstream (W.O. Electronics, Langenzersdorf, Österreich)
Stationäre Phase	LiChroCART, LiChrospher 100, RP 18, 5 µm, 250 × 4 mm (Merck) mit Vorsäule 4 × 4 mm
Mobile Phase	A: 50 mM Triethylamin, 50 mM Phosphorsäure; pH 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 oder 7,0 B: Acetonitril 5, 10 oder 15 % (v/v)
Flussrate	1 ml/min
Detektion	$\lambda = 215 \text{ nm}$
Injektionsvolumen	20 µl

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (Filtropur V50 (0,45 μm), Sarstedt, Nümbrecht) von Partikeln befreit. MMF wurde in Acetonitril gelöst.

Für jede Kombination aus den Parametern pH-Wert und Acetonitrilgehalt des Fließmittels wurde die Retentionszeit von MMF dreimal bestimmt.

2.2.2 *In silico* Berechnungen

Die physikochemischen Parameter PSA und logP von FA, MMF, MEF und DMF wurden mit Hilfe der Datenbank „Molinspiration“ (www.molinspiration.com) ermittelt.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

Ziel der Bestimmung der physikochemischen Parameter von FAE war es die Wahrscheinlichkeit einer intestinalen Absorption von MMF im Vergleich zu DMF zu beurteilen.

Die Bestimmung des pK_a -Wertes erfolgte mittels HPLC auf der Grundlage der Methode nach Bartolini *et al.* (2002) (78). Dieser Bestimmung lag zugrunde, dass der Retentionskoeffizient k' für ionisierbare Substanzen pH-abhängig ist.

Es wurde daher k' von MMF bei verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase und variierendem Lösungsmittelgehalt ermittelt. Die Wendepunkte der so erhaltenen sigmoidalen Kurven (Abb. 2.1) wurden durch sigmoidale Regression bestimmt (SigmaPlot SPSS Science Marketing) und gegen die jeweilige Lösungsmittelkonzentration aufgetragen. Danach erfolgte die Extrapolation auf ein rein wässriges Medium. Der Schnittpunkt mit der y-Achse spiegelte den pK_a -Wert von MMF wieder (Abb. 2.2). Es ergab sich Wert von 3,63.

Aus Tabelle 2.1 lässt sich entnehmen, dass sowohl für FA als auch für alle FAE die Regeln nach Lipinski und Veber erfüllt wurden. Entscheidendes Kriterium für eine orale Bioverfügbarkeit ist die Lipophilie der Substanzen. Die Berechnung von logP-Werten mittels der Datenbank „Molinspiration“ beruht auf dem Vergleich von vorhergesagten logP-Werten zu experimentell bestimmten von über 12.000 Strukturen. Vom National Institute of Standards (NIST, Gaithersburg, USA) wurde eine sehr gute Übereinstimmung von den berechneten logP-Werten zu den

experimentell bestimmten bestätigt. Der Ermittlung der PSA liegt die Summierung tabellierter Werte für funktionelle Gruppen zugrunde (79).

Aus Tabelle 2.1 ist ersichtlich, dass MMF bevorzugt in protonierter Form aufgenommen werden kann ($\log P$ A^- -2,78 vs. HA -0,06). Da sich für MMF ein pK_a -Wert von 3,63 ergab (Abb. 2.2) ist nach Henderson und Hasselbach (Gl. 2.1) das Verhältnis von dissoziierter (A^-) zu nicht dissoziierter (HA) Säure für MMF bei einem pH-Wert von 5,5 74:1, bei $pH = 6,0$ 234:1 und bei $pH = 7,4$ 5888:1 (A^-/HA). Das Gleichgewicht liegt im Dünndarm daher auf der Seite von A^- und es ist nur eine geringe Membrangängigkeit für MMF zu erwarten.

DMF hat keine freie Säurefunktion und erfüllt das Kriterium eines $\log P$ -Wertes zwischen 0-3 für einen gut oral verfügbaren Arzneistoff. Seine Aufnahme in die intestinalen Mucosazellen ist daher sehr wahrscheinlich. In welchem Ausmaß die Bioverfügbarkeit von DMF in Darmzellen durch enzymatische Hydrolyse oder durch Addition an intrazelluläres GSH beeinträchtigt wird, wird in Kapitel 7 gezeigt.

Die Betrachtung der physikochemischen Parameter von MMF und DMF lassen jedoch den Schluss zu, dass die MMF-Plasmaspiegel zum größten Teil nach Absorption von DMF und folgender Hydrolyse resultieren.

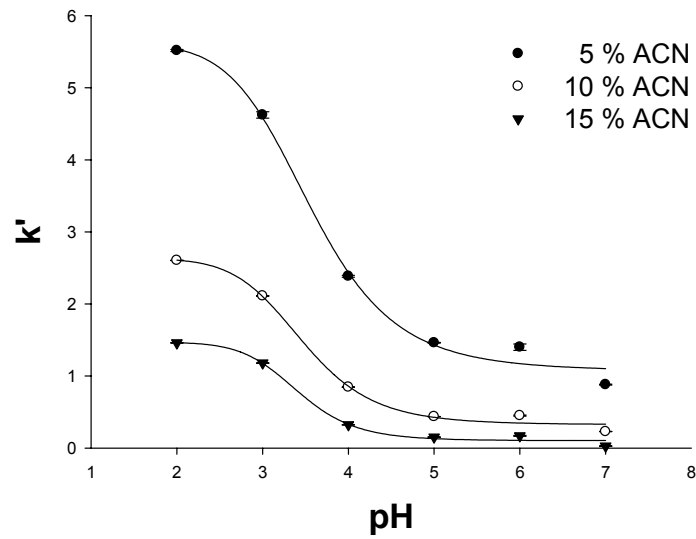


Abb. 2.1: Korrelation der Retentionskoeffizienten k' gegen den pH-Wert für MMF in Acetonitril-Puffer-Mischungen. Die aufgetragenen Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 3$ Messungen.

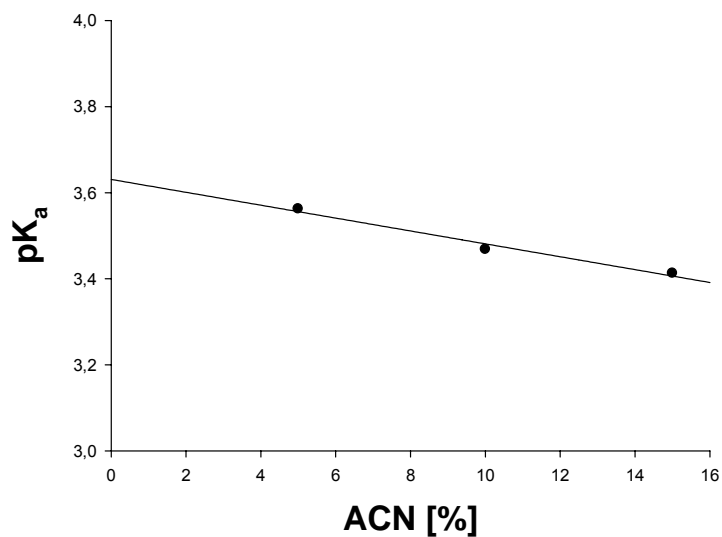


Abb. 2.2: Extrapolation der bei verschiedenen Acetonitrilgehalten ermittelten pK_a -Werte auf ein rein wässriges Medium

$$pH = pK_a + \log \frac{A^-}{HA}$$

$$10^{pH-pK_a} = \frac{A^-}{HA}$$

Gl. 2.1: Henderson-Hasselbach-Gleichung

Substanz	Molekulargewicht [g/mol]		Wasserstoff-donatoren		Wasserstoff-akzeptoren		PSA [Å ²]		Rotierende Bindungen		logP-Wert	
FA	114,1*	116,1 [#]	0*	2 [#]	4*	4 [#]	80,26*	74,60 [#]	2*	2 [#]	-3,24*	-0,67 [#]
MMF	129,1*	130,1 [§]	0*	1 [§]	4*	4 [§]	66,43*	63,60 [§]	3*	3 [§]	-2,78*	-0,06 [§]
MEF	143,1*	144,1 [§]	0*	1 [§]	4*	4 [§]	66,43*	63,60 [§]	4*	4 [§]	-2,40*	0,32 [§]
DMF	144,1		0		4		52,61		4		0,56	

* Die Werte wurden für die unter physiologischen Bedingungen (pH = 7,4) überwiegend dissoziierten Carbonsäuren von FA, MMF und MEF berechnet.

Werte für die vollständig undissoziierte FA

§ Werte für nicht dissoziierte Carbonsäuren von MMF und MEF

Tab. 2.1: In silico bestimmte physikochemische Parameter von FA und FAE

3 BESTIMMUNG DER PLASMAPROTEINBINDUNG VON FUMARSÄURE UND FUMARSÄUREESTERN

3.1 Einleitung und Zielsetzung

Die Plasmaproteinbindung ist ein entscheidender pharmakokinetischer Parameter.

Xenobiotika sind vorwiegend an Serumalbumin gebunden, das mit 60 % auch den größten Anteil der Plasmaproteine darstellt (80; 81).

Die Bindung von Arzneistoffen an Plasmaproteine scheint vorwiegend einen hydrophoben Charakter zu besitzen. Somit wird eine Substanz stärker von Serumalbumin gebunden, je hydrophober sie ist (82 - 84).

Ein Arzneistoff liegt im Blut in gebundener und ungebundener Form vor. Nur der freie Anteil an Arzneistoff kann die Blutbahn verlassen und am Wirkort interagieren (85; 86).

Die Wechselwirkung mit Plasmaproteinen folgt dem Massenwirkungsgesetz (87; 88). Daher dissoziiert der Arzneimittel-Protein-Komplex in dem Maße, wie die freie Substanz aus dem Gleichgewicht abgezogen wird. Der gebundene Anteil hat neben einer Transportfunktion eine Depot- und Pufferfunktion, da durch Nachschub des Arzneimittels aus dem Depot über längere Zeit eine konstante Wirkstoffkonzentration im Blut aufrechterhalten werden kann.

Eine hohe Proteinbindung eines Arzneistoffes geht mit verzögertem Wirkungseintritt, verlängerter Wirkungsdauer, einem kleinerem Verteilungsvolumen und einer langsameren Elimination einher.

Bei Arzneistoffen mit geringer therapeutischer Breite wird eine Plasmaproteinbindung von ≥ 90 % als kritisch bewertet. Bei Gabe mehrerer Arzneistoffe, welche eine große Proteinbindung aufweisen, können diese sich gegenseitig aus der Proteinbindung verdrängen und so Plasmaspiegel in den toxischen Bereich ansteigen.

Die vier wichtigsten Methoden zur quantitativen Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka sind Ultrazentrifugation, Ultrafiltration, Dialyse und Sephadexgelfiltration.

Insbesondere die Tatsache, dass zuvor eine Proteinbindung für DMF von 0,9 %, im Gegensatz zu 3,8 % von FA, 49,2 % von MMF und 62,2 % von MEF, mittels Dialyse

bestimmt wurde, erschien bei der Betrachtung der unterschiedlichen Lipophilie der Substanzen unschlüssig (vgl. Kap. 2), (46). Daher wurde die Plasmaproteinbindung von FAE erneut bestimmt und als Methode die Ultrafiltration verwendet.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Material und Geräte

Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid, humanes Serumalbumin (Fluka); FA, DMF, MEF, MMF, (Sigma-Aldrich).

Eppendorf 5810 R Zentrifuge (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf); Inkubations-/Inaktivierungsbad (GFL, Burgwedel); Centricon centrifugal filter, YM 10 Membran, 10000 Da cut off (Millipore, Schwalbach); Omni pH-Meter (Omnilab, Bremen).

3.2.2 HPLC-Methoden

Die Analytik für MMF, MEF und DMF orientierte sich an der in Kapitel 8.2.2 beschriebenen. Die Proben mussten jedoch keiner Festphasenextraktion unterzogen werden.

Die Analytik für FA wird ebenfalls in Kapitel 8.2.2 beschrieben. Die Proben mussten auch hier keiner Festphasenextraktion unterzogen werden.

3.2.2.1 Probenvorbereitung

Alle MMF-, MEF- und DMF-Proben wurden aus Stabilitätsgründen mit 2,5 µl 1M HCl/100 µl Ultrafiltrat auf pH = 5 angesäuert und dann mittels HPLC vermessen.

3.2.2.2 Kalibrierung

Für jede Substanz wurde zur Quantifizierung eine Sechs-Punkt Kalibrierung (1-50 µM) vorgenommen, in dem definierte Konzentrationen in Sörensenpuffer

hergestellt wurden. Die Stabilisierung der MMF-, MEF- und DMF-Standards erfolgte ebenfalls durch Ansäuern (2,5 μ l 1 M HCl/100 μ l Standard). Anschließend wurden die Proben mittels HPLC vermessen.

3.2.3 Ultrafiltration

Die Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration orientierte sich an der Methode von Benincosa *et al.* (89). Jede Verbindung wurde in den Konzentrationen 5, 20 und 50 μ M getestet. Dazu wurde ein Sörensen Phosphatpuffer (30,4 mM Na₂HPO₄ \times 2 H₂O, 8,7 mM KH₂PO₄, 99,2 mM NaCl) mit einem pH = 7,4 und 4 % humanem Albumin hergestellt.

FA wurde in einem Gemisch von 50 % Aqua bidest./50 % DMSO (v/v) gelöst. Stammlösungen von MMF, MEF und DMF wurden mit DMSO hergestellt. Der Albumin-Puffer wurde im Wasserbad (37 °C) vorgewärmt. Dann wurde er mit den Testsubstanzen versetzt, so dass die gewünschte Endkonzentration entstand. Die DMSO Konzentration war stets \leq 0,5 %.

Nach Inkubation für 30 min bei 37 °C im Wasserbad wurden 1000 μ l des jeweiligen Ansatzes in die Zentrifugationseinheit pipettiert und anschließend bei 693 *g*, 37 °C für 20 min zentrifugiert. So wurden \sim 130 μ l Ultrafiltrat erhalten. Mittels HPLC vermessen ergaben sich die Werte für c_{frei} (Gl. 3.1). Die Ultrafiltrationseinheiten wurden vor Gebrauch mit Aqua bidest. gewaschen (Zentrifugation 1717 *g*, 37 °C, 5 min) um anhaftendes Konservierungsmittel (Glycerin) zu entfernen, das die Analytik stören könnte.

Der Korrekturfaktor K in Gleichung 3.1 wurde bestimmt, indem die jeweilige Konzentration der zu testenden Verbindung in Sörensenpuffer ohne Albumin hergestellt wurde. Ein Teil davon wurde direkt vermessen (c_{tot}). Der andere Teil wurde wie die eigentlichen Proben (s.o.) behandelt. Die Vermessung lieferte die Werte für c_0 . Mit der Berechnung des Korrekturfaktors K wurde einer eventuellen Hydrolyse der Ester von MMF und DMF sowie einer unspezifischen Bindung aller Verbindungen an die Filtrationsmembran Rechnung getragen. K sollte hierbei zwischen 0,7 und 1,0 liegen.

$$\text{Plasmaproteinbindung [\%]} = \left(1 - \frac{c_{\text{frei}}}{c_{\text{tot}} \times k} \right) \times 100$$

$$\text{Korrekturfaktor } K = \frac{c_0}{c_{\text{tot}}}$$

Gl. 3.1: Formeln zur Berechnung der Plasmaproteinbindung von FA, MMF, MEF und DMF

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Kalibrierung

Zur Quantifizierung von FA und FAE wurde mit den in Kapitel 8 beschriebenen Methoden eine Kalibrierung durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfäche des resultierenden Peaks der jeweiligen Substanz. Alle Funktionen der Kalibrierungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb. 3.1).

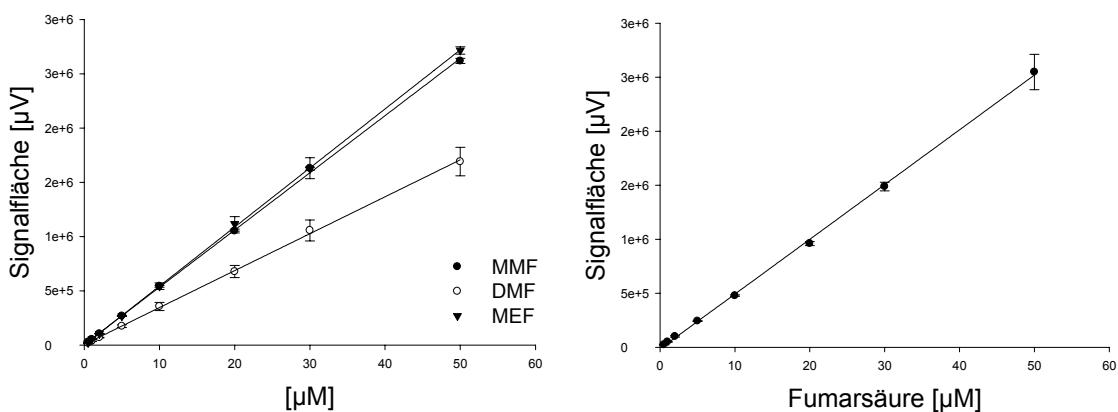


Abb. 3.1: Kalibrierung von FA, MMF, MEF und DMF nach UV-Detektion (FA $r^2 = 0,9994$; MMF $r^2 = 0,9996$; MEF $r^2 = 0,9998$; DMF $r^2 = 0,9994$). Die Signalfächen sind $x \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je dreimal vermessen.

3.3.2 Plasmaproteinbindung

Das Prinzip der Ultrafiltration beruht auf der Inkubation eines Arzneistoffes in einer Albuminlösung und folgender Filtration durch einen Filter, dessen Poren zwar den Arzneistoff, nicht aber die weit größeren Plasmaproteine passieren lassen. Somit kann auch der proteingebundene Arzneistoff nicht den Filter passieren.

Durch die entsprechenden Kontrollen (Kap. 3.2.3) ließ sich auf diese Weise die Plasmaproteinbindung von FA und FAE bestimmen. Dabei wurde beachtet, dass bei der Filtration das Filtrat nicht mehr als 20 % der Inkubationslösung betrug. Damit wurde verhindert, dass sich das Gleichgewicht durch Änderung der Albuminkonzentration zu sehr ändert und sich falsch hohe Plasmaproteinbindungen ergaben.

Die Ergebnisse der Plasmaproteinbindung sind in Tab. 3.1 und Abb. 3.2 zusammengefasst. Für die Monoester MMF und MEF wurden die größten Plasmaproteinbindungen von 45,4 % bzw. 59,2 % bestimmt. Für DMF ergab sich ein Wert von 29,8 % und für Fumarsäure von 2,1 %. Für alle Substanzen war der Korrekturfaktor $K \geq 0,7$ und $\leq 1,0$. Die Ergebnisse lassen sich daher ohne Einschränkungen interpretieren.

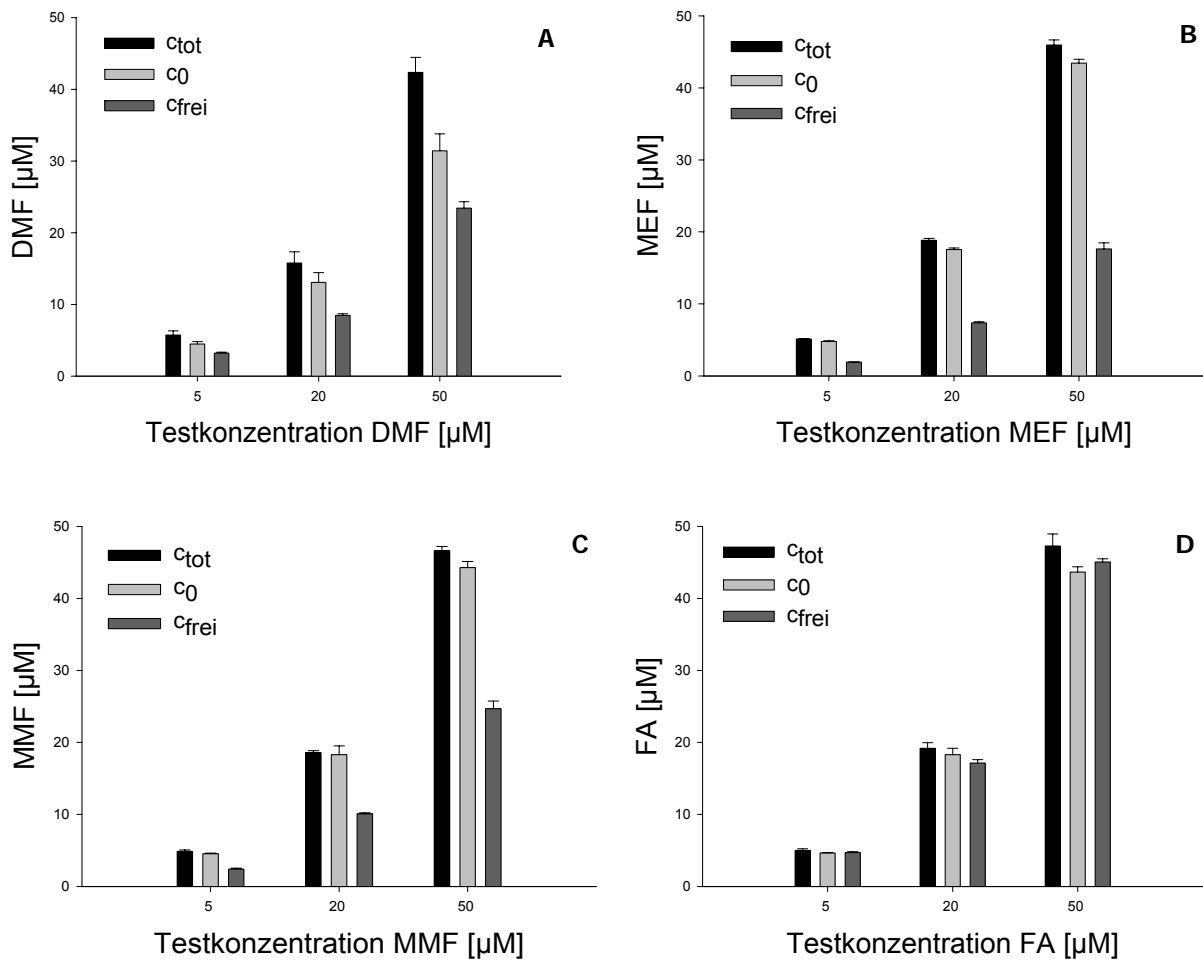


Abb. 3.2: Grafische Darstellung der Bestimmung der Plasmaproteinbindung mittels Ultrafiltration für (A) DMF, (B) MEF, (C) MMF und (D) FA. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen.

Substanz	Korrekturfaktor K	Plasmaproteinbindung [%]
DMF	$0,79 \pm 0,04$	$29,8 \pm 5,1$
MEF	$0,94 \pm 0,01$	$59,2 \pm 1,0$
MMF	$0,95 \pm 0,03$	$45,4 \pm 1,4$
FA	$0,93 \pm 0,02$	$2,1 \pm 3,6$

Tab. 3.1: Korrekturfaktoren und Plasmaproteinbindung für DMF, MEF, MMF und FA. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen.

3.4 Diskussion

Durch Ultrafiltration konnten die Bindung von FA und FAE an humanes Albumin bestimmt werden. Dabei korrelierte im Fall von MEF, MMF und FA das Ausmaß der Proteinbindung mit der Lipophilie der Substanzen, welche in Kapitel 2 (Tab. 2.1) wiedergegeben sind. So nimmt das Ausmaß der Proteinbindung von MEF ($59,2 \pm 1,0 \%$) über MMF ($45,4 \pm 1,4 \%$) zur FA ($2,1 \pm 3,6 \%$) ab. Die Werte entsprachen denen, die von Baumann 1989 und Werdenberg 2003 (Bestimmung mit Schweineplasma nur für MMF (45,1 %) und MEF (51,0 %)) mittels Dialyse ermittelt wurden (46; 50). Für DMF wurde jedoch im Gegensatz zu der von Baumann beschriebenen Proteinbindung von 0,9 % eine Bindung von 29,8 % ermittelt. Dieser Wert korrelierte nicht damit, dass DMF die höchste Lipophilie unter den FAE aufwies, lag aber deutlich über dem der hydrophilen Fumarsäure (vgl. Baumann 1989: DMF 0,9 %; FA 3,8 %).

Eine Plasmaproteinbindung von $\geq 90 \%$ wird, wie zuvor dargestellt, als problematisch angesehen. Dies gilt aber nur mit der Einschränkung, dass gleichzeitig ein geringes Verteilungsvolumen und eine enge therapeutische Breite des Arzneistoffes vorliegen müssen.

Da das Krankheitsbild der Psoriasis oft mit anderen Erkrankungen, die mit diversen Medikamenten therapiert werden, verknüpft ist, wäre ein hohes Interaktionspotential in Bezug auf die Proteinbindung von FAE als kritisch zu bewerten (90). Mit dieser Studie konnte für keinen der untersuchten FAE eine Proteinbindung $\geq 90 \%$ gezeigt werden.

4 *IN VITRO* STUDIEN ZUR ZYTOTOXIZITÄT VON FUMARSÄUREESTERN

4.1 Einleitung und Zielsetzung

4.1.1 Definition der Zytotoxizität

Der Begriff Zytotoxizität fasst alle Effekte zusammen, die eine Substanz auf die Viabilität gesunder Zellen ausübt, die den Zelltod zur Folge haben. Er differenziert nicht zwischen Apoptose und Nekrose.

Unter Nekrose versteht man ein örtlich begrenztes massenhaftes Absterben von Gewebezellen innerhalb des lebenden Organismus. Sie entsteht durch chemische, thermische, mechanische oder strahlenbedingte Zerstörung der Zellstruktur. Die Zellen schwellen aufgrund von Membranschädigungen und resultierender Störung des osmotischen Gleichgewichtes zunächst an und platzen später. Der freigesetzte Zellinhalt verursacht Entzündungen und immunologische Reaktionen im Organismus. Apoptose ist ein physiologisches und phylogenetisch hochkonserviertes Programm des regulierten Zelltodes, charakterisiert durch Kernschrumpfung mit DNA-Fragmentierung, durch Phospholipidveränderungen in der Zellmembran und durch Zellschrumpfung. Von Zellmembranen umgebene apoptotische Zellreste werden weitgehend ohne Entzündungsreaktion phagozytiert. Die Apoptose wird durch eine Kaskade hochspezifischer Caspasen bewerkstelligt, deren Aktivierung durch Komplexierung von Initiatorcaspasen in Signalkomplexen an den Rezeptoren der TNF-Familie und/oder an geschädigten Mitochondrien erfolgt (91).

4.1.2 Fumarsäureester und Zytotoxizität

In vitro Experimente zeigten zytotoxische Effekte von DMF, eingesetzt in höheren mikromolaren Konzentrationen, auf humane T-Zellen, „monocyte-derived dendritic cells“ (MoDC), HaCaT (human adult low calcium high temperature) Keratinozyten und verschiedene Tumorzellen (62; 64; 92; 93). Die Vielfalt der Zelltypen, an denen

zytotoxische Wirkungen von DMF zu beobachten waren, ließ den Schluss zu, dass der Effekt zellunspezifisch ist. Eine plausible Erklärung hierfür wäre, dass eine Behandlung von Zellen mit DMF zu einer konzentrationsabhängigen intrazellulären GSH-Depletion führt (vgl. Kap 5) (70). Eine GSH-Depletion konnte wiederum mit der Induktion von Apoptose verknüpft werden (94 - 98). Dem durch DMF induzierten Zelltod könnte das allgemeine Prinzip einer GSH-Depletion zugrunde liegen.

Unklar war, ob unterschiedliche Zellarten verschieden empfindlich auf eine Veränderung des intrazellulären GSH durch DMF reagieren. Hierzu wurden die EC_{50} -Werte von DMF der im Labor etablierten Zelllinien (humane Fibroblasten, HaCaT-Keratinocyten und normale humane epidermale Keratinocyten (NHEK)) bestimmt. In allen Experimenten wurde MMF mitgetestet. Gleichzeitig wurde der native GSH-Gehalt jeder Zellart ermittelt, um eine mögliche Korrelation zwischen EC_{50} und nativem GSH-Gehalt der Zellen aufzuzeigen. Es ließ sich ebenfalls die maximal tolerierte Konzentration an DMF bestimmen, bei der die Zellen weder Nekrose noch Apoptose zeigten. Dies war für die *in vitro* Versuche in Kapitel 5 essentiell.

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde ein Neutralrottest, welcher auf der Methode von Borenfreund und Puerner basiert, entwickelt (99). Zur Bestimmung des nativen GSH-Gehaltes wurde ein Assay, dem das Messprinzip von Tietze zugrunde liegt, etabliert (100).

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Material und Geräte

Ethanol (J.T.Baker, Griesheim); Glutamin (Biochrom AG, Berlin); Calciumchlorid Formaldehyd (Fluka); Penicillin/Streptomycin und Trypsin (Cell Concepts, Umkirch); 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB), Glutathion red., Glutathion-Reduktase, Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat (NADPH), Essigsäure (Merck); PBS (Phosphate buffer saline), Quantum 263, Quantum 333 (PAA); FCS (fötales Kälberserum (Perbio, Bonn); Keratinocyte Growth Medium 2 (PromoCell, Heidelberg), Neutralrot, DMSO, 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA) (Sigma-Aldrich).

Plattenschüttler WT 16 (Biometra, Göttingen); sterile 6-Loch Platten oder sterile 96-Loch Mikrotiterplatten mit Deckel (Greiner Bio-One, Essen), 0,2 µM Sterilfilter (Schleicher & Schuell, Dassel), Plattenphotometer Sunrise™ (Tecan, Schweiz)

4.2.2 Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um HaCaT-Keratinozyten, NHEK und humane Fibroblasten. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 13 beschrieben, kultiviert.

4.2.3 Modifizierter Neutralrottest nach Borenfreund und Puerner

4.2.3.1 Optimierung der Zellzahl für den Neutralrottest

In Vorversuchen wurden verschiedene Zellzahlen der jeweiligen Zellart in aufsteigender Konzentration (1×10^4 – 5×10^4) in Mikrotiterplatten (MTP) mit flachem Boden ausgesät. Nach 24 h konnte mikroskopisch die Konfluenz der Zellen auf den Böden der Vertiefungen beurteilt werden. Es wurde die Zellzahl zur Aussaat gewählt, bei der sich eine Konfluenz von über 80 % ergab (Tab. 4.1).

4.2.3.2 Durchführung

In MTP wurde für jede Zellart die entsprechende Zellzahl pro Vertiefung in 200 µl des entsprechenden Mediums ausgesät und für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert (Tab. 4.1). In diesem Zeitraum adhärten die Zellen an den Boden der MTP und bildeten einen zu mindestens 80 % konfluenten Monolayer aus. Die Einstellung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer Zählkammer.

Zellart	Zellzahl/Kavität	Zellkulturmedium
humane Fibroblasten	2×10^4	Quantum 333 + 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin
HaCaT-Keratinocyten	3×10^4	Quantum 263 + 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin
NHEK	2×10^4	Keratinocyte Growth Medium 2

Tab. 4.1: Zellkulturbedingungen in MTP für die Durchführung des Neutralrottests

Die Neutralrotfärbelösung wurde aus einer Stammlösung (10 mg NR/ml Aqua bidest.) durch eine 1:100 Verdünnung mit dem jeweiligen Medium hergestellt und über Nacht bei RT vorinkubiert. Das Entfernen feiner Farbstoffkristalle erfolgte am folgenden Tag mittels Filtration durch einen 0,2 µm-Sterilfilter.

DMF und MMF wurden in DMSO gelöst und in dem der Zellart entsprechenden Medium so verdünnt, dass sich Endkonzentrationen von 20 µM – 180 µM mit einem DMSO Anteil von 0,2 % ergaben.

Das „alte“ Medium wurde durch Abdekantieren entfernt und die Zellen wurden mit 200 µl/Vertiefung 37 °C warmen PBS gewaschen. Nach erneutem Abdekantieren wurden die Zellen mit 200 µl der entsprechenden Inkubationslösung versetzt und für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Die Positivproben und Leerwerte wurden nur mit Medium (0,2 % DMSO) versetzt. Alle Werte wurden pro Versuch vierfach bestimmt.

Nach erfolgter Inkubation und Entfernung der Inkubationslösung wurde mit Ausnahme der Leerwerte in alle Vertiefungen 100 µl Neutralrotmedium pipettiert. In die Vertiefungen der Leerwerte wurden 100 µl reines Medium gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 3 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂).

Anschließend wurde die Farbstofflösung entfernt und die gesamte MTP mit einer Lösung von 1 % Formaldehyd/1 % Calciumchlorid gewaschen und wieder abdekantiert.

Durch Zusatz von 100 µl einer 1 % Essigsäure/50 % Ethanol-Lösung unter 10 min Schwenken der MTP bei RT wurde der in intakten Zellen zurückgehaltene Farbstoff extrahiert. Anschließend erfolgte die Vermessung im Sunrise™ Plattenphotometer bei einer Messwellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm.

Zuvor wurde die MTP im Plattenphotometer für 20 s geschüttelt um eine homogene Verteilung des extrahierten NR in jeder Vertiefung zu gewährleisten.

4.2.3.3 Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{Zellvitalität [\%]} = \frac{OD_{Test} - \overline{OD_{LW}}}{\overline{OD_{PK}} - \overline{OD_{LW}}} \times 100$$

OD_{Test} = gemessene Extinktion der Testkavität

$\overline{OD_{LW}}$ = Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Leerwerte

$\overline{OD_{PK}}$ = Mittelwert der gemessenen Extinktionen der Positivkontrollen

Gl. 4.1: Berechnung der Zellvitalität aus den gemessenen Extinktionen des Neutralrottests

Die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei Versuchen für jede Zellart wurden gegen die jeweils getestete Konzentration der jeweiligen Testsubstanz aufgetragen. Hieraus konnte grafisch der EC_{50} -Wert bestimmt werden.

4.2.4 Bestimmung des Glutathion-Gehaltes nativer Zellen

4.2.4.1 Durchführung

In 6-Loch Platten wurden Zellen in entsprechendem Medium (Tab. 4.1) bis zu einer Konfluenz von $\geq 90\%$ kultiviert. Nach Entfernen des Mediums erfolgten zwei Waschschrte mit PBS. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %) und einer Inkubation für ~ 7 min im Brutschrank (NHEK bei RT) abgelöst. Nach Zugabe von 1 ml Medium zur Zellsuspension wurde diese in ein 2 ml Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (246 *g*, 4 °C, 4 min). Das Zellpellet wurde in 2 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend in 100 μ l Aqua

bidest. resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch dreimalige Einfrier-/Auftauzyklen (-70 °C, 10 min/RT). Durch Zentrifugation (10000 *g*, 4 °C, 10 min) konnten größere Zellpartikel abgetrennt werden. Ein Aliquot des Überstandes diente zur Proteinbestimmung mittels des Bicinchoninsäure (BCA)-Assays. Zur Präzipitation der Proteine wurden weitere 30 µl des Überstandes mit 30 µl 10 % 5-Sulfosalicylsäure (5-SSA) versetzt und zentrifugiert (10000 *g*, 4 °C, 10 min). Zu 20 µl des Überstandes wurden 80 µl 5 % 5-SSA gegeben.

Für den GSH-Assay wurden Stammlösungen gemäß Tab. 4.2 hergestellt und gelagert. Der Assay-Puffer für die Messung war, wie in Tab. 4.3 angegebenen, zusammengesetzt.

GSH-Standards wurden aus der GSH-Stammlösung mit 5 % 5-SSA so verdünnt, dass Endkonzentrationen von 0; 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25 und 50 µM resultierten. Zur Vermessung wurden je zwei Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 10 µl eines Standards oder einer Probe beschickt. Vorversuche dienten zur Ermittlung einer geeigneten Verdünnung mit 5 % 5-SSA von zu hoch konzentrierten Proben. Es folgte der Zusatz von 150 µl Assay-Puffer. Nach Start der Reaktion durch Zugabe von 50 µl NADPH (Stammlösung zuvor 1:22 mit Phosphatpuffer verdünnt) wurde nach 5-minütiger Vorinkubation im Plattenreader die Bildung von TNB durch Messung der Absorption bei 405 nm gegen 620 nm alle 2 min für insgesamt 20 min verfolgt. Ein Komplettansatz enthielt 0,6 mM DTNB, 0,5 mM NADPH und 2 U/ml Glutathion-Reduktase.

4.2.4.2 Auswertung

Die Mittelwerte der Absorptionen der Standards wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen der resultierenden Geraden durch lineare Regression bestimmt (i-slope). Diese Steigungen, gegen die Konzentration der Standards aufgetragen, ergaben die Kalibriergerade mit zugehöriger Kalibrierfunktion.

Mit Hilfe der Kalibrierfunktion konnte nach Ermittlung des i-slopes der Probe und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors deren GSH-Gehalt berechnet werden.

Substanz	Konzentration	gelöst in	Lagerung
DTNB	3,8 mM	DMSO	-20 °C für max. 3 Monate
NADPH	48 mM	Aqua bidest.	-20 °C für max. 6 Monate
GSH	10 mM	Aqua bidest.	-20 °C für max. 3 Monate
GSH-Reduktase	6 U/ml	100 mM Phosphatpuffer mit 1 mM EDTA pH = 7,0	-20 °C für max. 3 Monate

Tab. 4.2: Stammlösungen und Lagerungsbedingungen für den Glutathion-Assay

Stammlösung	Volumen [ml]
100 mM Phosphatpuffer mit 1 mM EDTA pH = 7,0	5,25
GSH-Reduktase	7,95
DTNB	3,75

Tab. 4.3 Zusammensetzung des Assay-Puffers zur Messung von 96 Proben

4.2.5 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit von Pierce (Rockford, USA). Diese Methode beruht auf dem kolorimetrischen Nachweis eines BCA/Cu⁺-Farbkomplexes, der durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf Cu²⁺-Ionen und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure entsteht (101). Als Referenzprotein wurde bovines Serumalbumin (BSA, Pierce) im Konzentrationsbereich 0-2000 µg/ml verwendet. Die Bestimmung erfolgte in einer MTP. Die Proben wurden bei Bedarf mit Aqua bidest. verdünnt. 10 µl der Probe wurden mit 200 µl der Reagenzlösung versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Vermessung mit 540 nm im Plattenphotometer.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Neutralrottest

Der Endpunkt Neutralrot (NR) wurde in *in vitro* Zytotoxizitätstests erstmals von Borenfreund & Puerner (1985) an einer Mäusezelllinie beschrieben (99). Der Test beruht auf der Aufnahme des wasserlöslichen, leicht basischen Farbstoffes Neutralrot (2-Amino-3-methyl-8-dimethylaminophenazin) in intakte Zellen. Die Anreicherung des Farbstoffes resultiert aus der Penetration des unprotonierten Neutralrots in die Zelle. Dort folgt die Protonierung des Farbstoffes im sauren Milieu der Lysosomen und/oder durch Bindung an saure Moleküle der lysosomalen Matrix (Abb. 4.1) (102; 103). Die protonierte Form des NR ist wesentlich hydrophiler und kann die Zellmembran durch passive Diffusion nicht mehr überwinden. Der Farbstoff verbleibt somit im Zellinneren einer intakten Zelle. Schädigungen der Zellmembran und der lysosomalen Membran resultieren in einer verringerten Farbstoffretention. Der von den Zellen aufgenommene Farbstoff wird im Rahmen des NR-Tests aus den Zellen extrahiert und die Farbintensität im Photometer bei 540 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt.

Für die adhärennten Zellarten erwies sich der Neutralrottest als geeignetes Testsystem. Die resultierenden Toxizitätsprofile von DMF und MMF sind in Abb. 4.4 dargestellt. In dem getesteten Konzentrationsbereich von 20-180 μM war die Toxizität von MMF bei allen Zellarten nie größer als 25 % in Bezug auf die Kontrolle. Es ließ sich für MMF daher kein EC_{50} -Wert bestimmen. DMF zeigte bei humanen Fibroblasten, HaCaT-Keratinocyten und NHEK eine mehr oder weniger ausgeprägte Toxizität. Der kleinste EC_{50} -Wert für DMF ergab sich für humane Fibroblasten. Er betrug 28,8 μM . Für HaCaT-Keratinocyten ergab sich ein Wert von 88,0 μM und für NHEK von 86,4 μM . Die EC_{50} -Werte konnten mit dem nativen GSH-Gehalt der Zellen korreliert werden (Abb. 4.5). Bis auf humane Fibroblasten war für alle Zellarten eine DMF Konzentration von $\leq 20 \mu\text{M}$ als nicht toxisch anzusehen. Die Dimension dieser Werte stimmte gut mit aus der Literatur bekannten Werten für verschiedene Tumorzelllinien überein. Gu und DeAngelis ermittelten nicht-toxische Konzentrationen von DMF für die Zelllinien T98G, U-87MG, MCF-7 und HCT-8 von 30 μM , für

NCI-H1299, U-138MG und A172 von 20 μM und für HAT-1080 von 10 μM . Hierzu wurde der Sulforhodamine B (SRB) Zytotoxizitätsassay verwendet. Er beruht auf der Anfärbung zellulärer Proteine mit Sulforhodamine B. Die Proteinmenge korreliert dabei mit der Anzahl an vitalen Zellen (93; 104). Ein Zusammenhang mit dem nativen GSH-Gehalt der Zellen wurde dabei nicht untersucht.

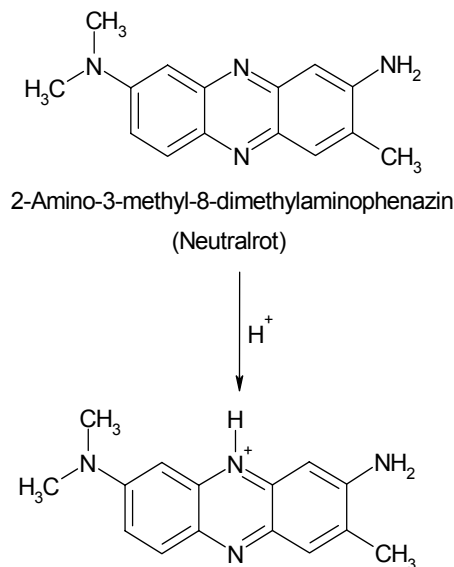


Abb. 4.1: Neutralrot (2-Amino-3-methyl-8-dimethylaminophenazin) wird im sauren Milieu der Lysosomen protoniert

4.3.2 GSH-Assay

Zur Bestimmung des GSH-Gehaltes nativer Zellen diente eine Modifikation der Methode nach Tietze (100). Das Testprinzip beruht auf der Reduktion von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) durch GSH zu 5-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB), dessen Entstehung fotometrisch bei 405 nm verfolgt werden kann (Abb. 4.2). Um diese Nachweisreaktion spezifisch für GSH zu machen, wurden der Reaktionsmischung NADPH und Glutathion-Reduktase (GR) zugesetzt, die entstandenes GSSG wieder zu GSH reduzierte. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass nur die Menge an GSH im Testansatz limitierend für die Reaktionsgeschwindigkeit war. Der Extinktionsanstieg pro Zeiteinheit war somit ein Maß für den Glutathiongehalt einer Probe, der durch den Vergleich mit GSH-Standards berechnet wurde.

Alle Funktionen der Kalibrierungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear. Exemplarisch ist die Kalibrierfunktion des GSH-Assays in Abb. 4.3 dargestellt. Ein spontaner Zerfall von DTNB war unter den gewählten Bedingungen nur in einem sehr geringen Maße zu beobachten. Die Ergebnisse wurden auf den Proteingehalt der Proben bezogen und waren so miteinander vergleichbar. Sie betragen $27,5 \pm 4,9$ nmol GSH/mg Protein für Fibroblasten, $88,7 \pm 8,8$ nmol GSH/mg Protein für NHEK und $62,3 \pm 10,0$ nmol GSH/mg Protein für HaCaT-Keratinocyten.

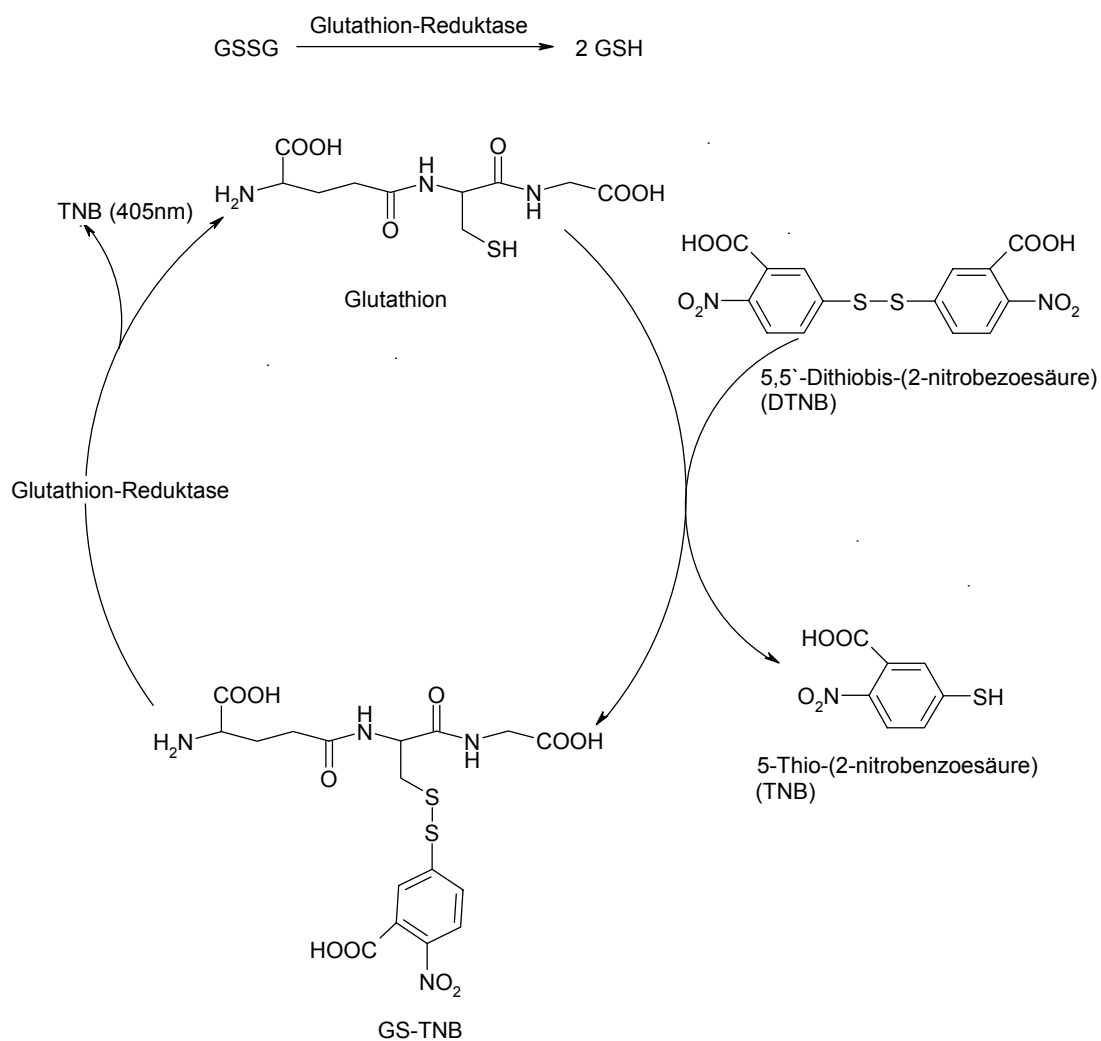


Abb.4.2: Prinzip des GSH-Assays nach Tietze (100)

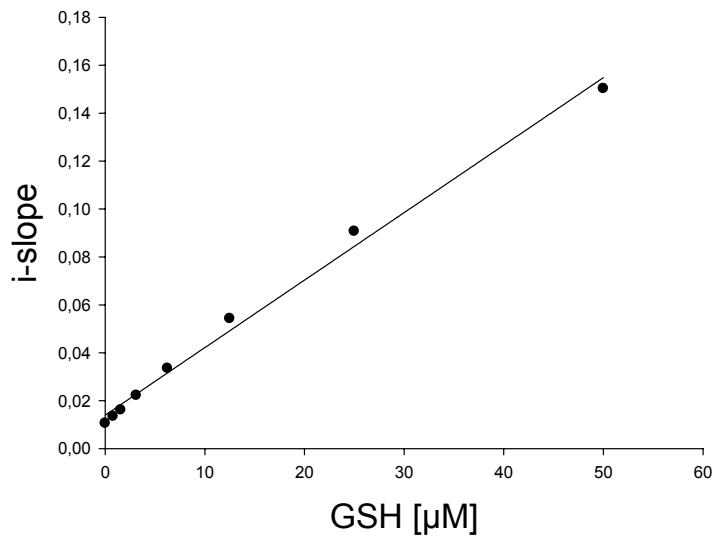
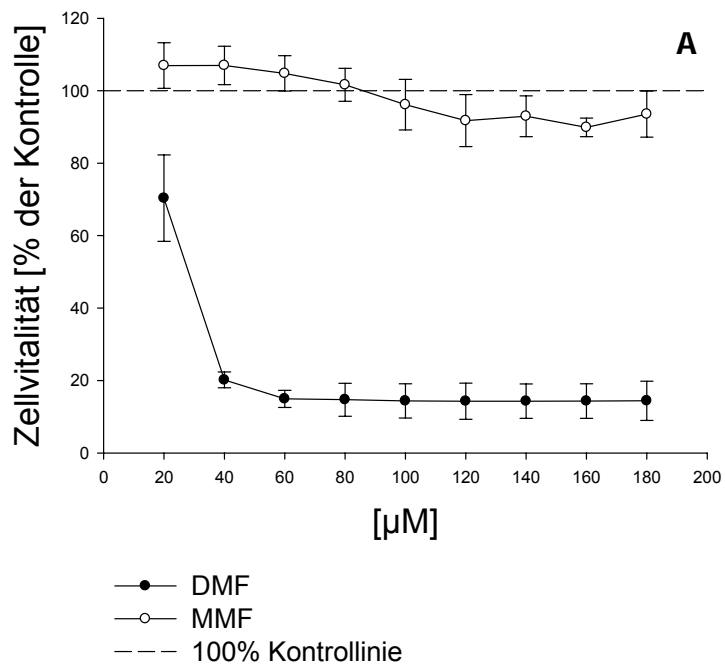


Abb. 4.3: Repräsentative Kalibrierung des GSH-Assays ($r^2 = 0,9932$)



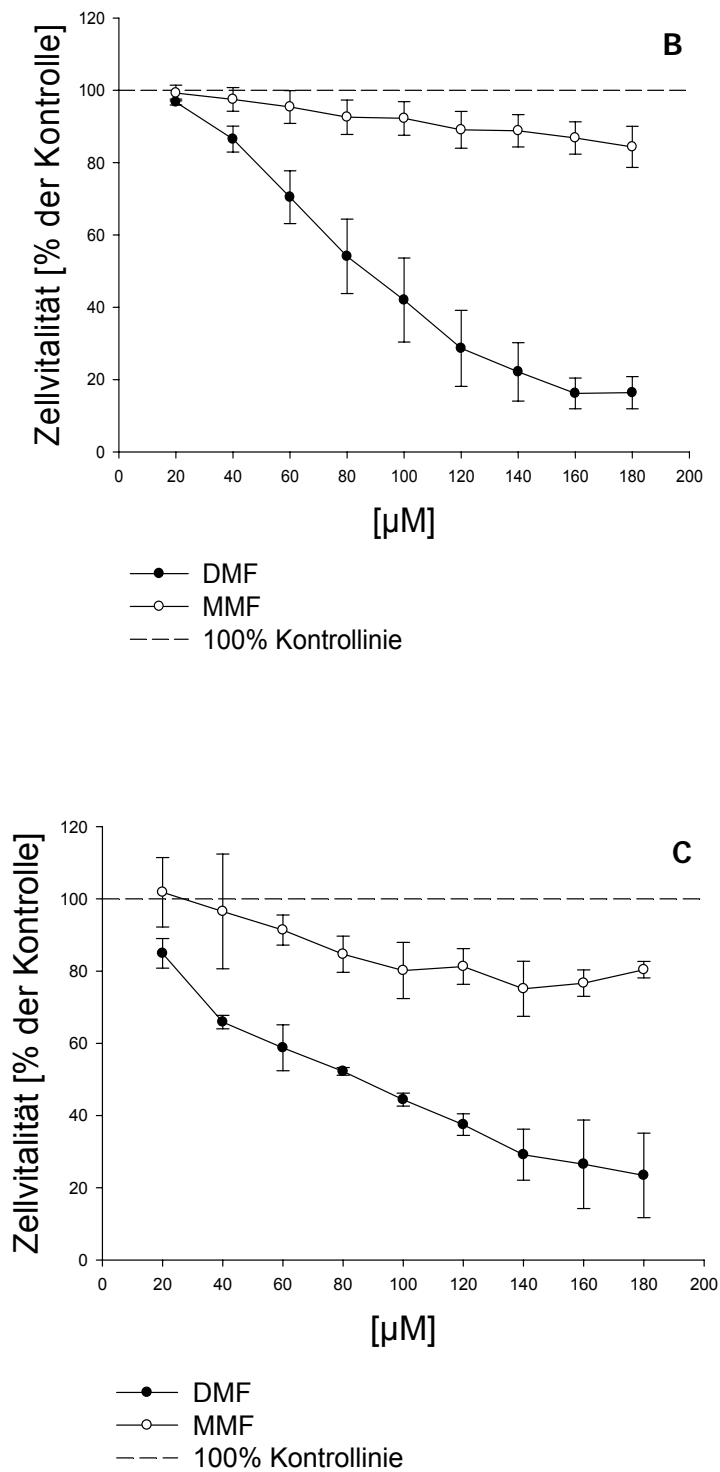


Abb. 4.4: Ergebnisse des Neutralrottests nach Borenfreund und Puerner für (A) humane Fibroblasten (B) HaCaT-Keratinozyten ($n = 6$) (C) NHEK. Die Werte sind $x \pm s$ aus mindestens $n = 3$ Ansätzen in Vierfachbestimmung.

4.4 Zusammenfassung und Diskussion

Die Depletion von GSH durch DMF ist ein nicht zellspezifisches allgemeines Prinzip. Mit den durchgeführten Toxizitätsstudien an humanen Fibroblasten, HaCaT-Keratinocyten und NHEK konnte eine Korrelation der durch DMF induzierten Zytotoxizität mit dem GSH-Status nativer Zellen gezeigt werden. Die beiden getesteten Typen von Keratinocyten weisen einen ähnlich hohen GSH-Gehalt auf. Auch ihre EC₅₀-Werte sind vergleichbar hoch. Humane Fibroblasten hingegen haben einen niedrigeren GSH-Gehalt und reagieren auch wesentlich empfindlicher auf DMF (Abb. 4.5).

In der Chronologie der vorliegenden Arbeit kam es erst später zu der Entdeckung, dass die Mercaptursäure von DMF im Urin von Probanden nach Einnahme von Fumaderm[®] nachzuweisen ist und DMF daher auch *in vivo* als GSH-verbrauchender Arzneistoff angesehen werden kann (vgl. Kap. 8). Da *in vitro* für die Therapie der Psoriasis relevante Effekte fast ausschließlich mit DMF gezeigt werden konnten, sind durch dieses Ergebnis viele zuvor gewonnene *in vitro* Daten wie z.B. die Induktion von Apoptose in T-Zellen durch DMF, in Bezug auf die *in vivo* Situation besser interpretierbar (64). DMF kann nach oraler Gabe von Fumaderm[®] nicht im Plasma nachgewiesen werden (vgl. Kap. 8), (45). Es penetriert sehr gut in Zellen und geht eine schnelle Reaktion mit GSH ein (vgl. Kap. 5), (105). DMF wird eine immunmodulatorische Wirkung zugesprochen (106). Die Induktion von Apoptose in T-Zellen konnte auch *in vivo* nach oraler Behandlung von Multiple-Sklerose-Patienten mit DMF gezeigt werden (107). Diese Befunde machen es wahrscheinlich, dass DMF nach Absorption aus dem Dünndarm in Blutzellen penetriert, mit GSH reagiert und über eine GSH-Depletion z.B. in T-Zellen Apoptose induziert. Nach weiterer Metabolisierung des gebildeten Glutathion-Adduktes wird die Mercaptursäure von DMF renal ausgeschieden.

Im Zusammenhang könnte vermutet werden, dass Blutzellen, insbesondere Leukozyten (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) des peripheren Blutes unterschiedlich empfindlich auf eine Veränderung ihres GSH-Status reagieren. Von Interesse sind hierbei besonders die für die Psoriasis relevanten Zellen wie Lymphozyten und Monozyten als Vorläufer von dendritischen Zellen.

Die hier mit Fibroblasten, HaCaT-Keratinocyten und NHEK durchgeführten *in vitro* Versuche sollten daher in ähnlicher Weise mit allen Blutzelltypen und vor allem mit Leukozyten durchgeführt werden, um zu zeigen, welche Zellen auf eine Änderung ihres GSH-Gehaltes am empfindlichsten reagieren. Indirekt könnten auf diese Weise Leukozyten-Subpopulationen identifiziert werden, denen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Psoriasis zukommt. Diese Information könnte in der Zukunft neuer und noch gezielter wirksamer Therapeutika für die Psoriasis dienen.

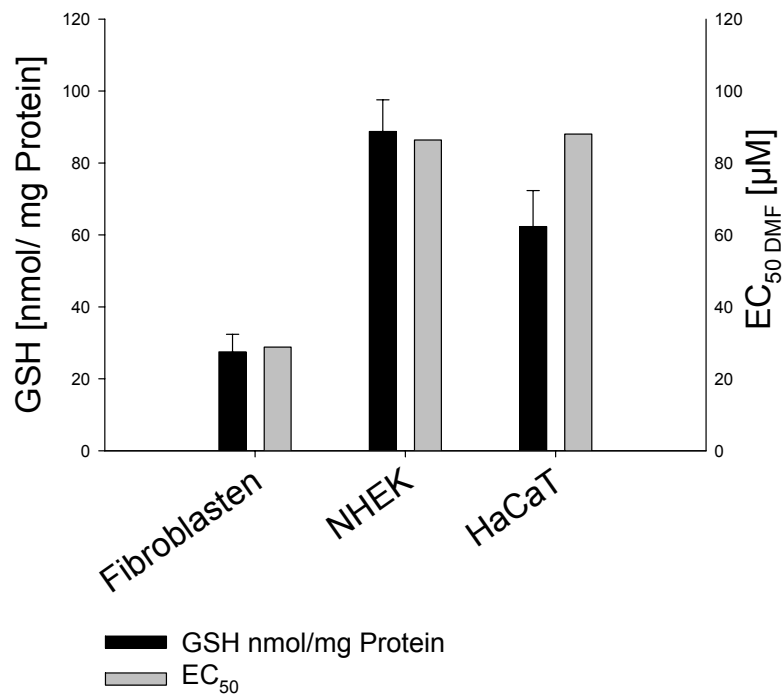


Abb. 4.5: Korrelation zwischen dem nativen Glutathiongehalt verschiedener Zellarten und der EC₅₀ von DMF. Die Werte für GSH sind $\bar{x} \pm s$ aus mind. $n = 6$ Ansätzen.

5 *IN VITRO* STUDIEN ZUM EINFLUSS VON FUMARSÄUREESTERN AUF INTRAZELLULÄRES GLUTATHION

5.1 Einleitung und Zielsetzung

Als elektrophile Substanzen reagieren sowohl DMF als auch MMF mit GSH im Sinne einer Michael-analogen Addition. Dabei reagiert DMF bei einem pH-Wert von 7,4 erheblich schneller und in einem größeren Maße als MMF (ca. Faktor 30) (105). Der Grund hierfür könnte sein, dass MMF nur in der protonierten Form die Reaktion mit GSH eingehen kann (105). Diese liegt wiederum bei einem pH-Wert von 7,4 in sehr geringem Maße vor (vgl. Kap. 2).

Held *et al.* zeigten 1988, dass die Behandlung von „Chinese hamster ovary cells“ mit 500 μ M DMF innerhalb von 10 min bei RT zu einer GSH-Depletion auf weniger als 10 % des Ausgangsniveaus führte (108). Ergänzend wurde gezeigt, dass einer Depletion von GSH durch DMF in einer humanen Zelllinie retinaler pigmentierter Epithelzellen eine zeitversetzte GSH-Überexpression folgte (70). Für eine GSH-Beeinflussung durch MMF gibt es keine Literaturangaben.

Es ist wahrscheinlich, dass DMF im Gegensatz zu MMF aufgrund seiner höheren Lipophilie (vgl. Kap. 2) schneller in Zellen penetriert, aufgrund seiner ausgeprägten Reaktivität nahezu vollständig mit GSH reagiert und so intrazelluläres GSH erniedrigt. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, muss ein solch intrazellulär gebildetes Glutathion-Konjugat aufgrund seiner großen Hydrophilie aktiv aus der Zelle transportiert werden (Phase-III), da eine intrazelluläre Akkumulation zur Zelltoxizität führen könnte.

Das Glutathionkonjugat von DMF und/oder MMF GS-DMS = *S*-(1,2-Dimethoxycarbonylethyl)glutathion bzw. GS-MMS = Isomerengemisch aus *S*-(1-Carboxy-2-methoxycarbonylethyl)glutathion und *S*-(2-Carboxy-1-methoxycarbonylethyl)glutathion wurde bisher noch nicht analytisch erfasst. Mit den folgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob und wie viel GS-DMS bzw. GS-MMS sich im Überstand von Zellkulturen nach Inkubation mit DMF oder MMF nachweisen lässt. Zusätzlich wurde der intrazelluläre GSH-Gehalt bestimmt. Es

wurden HaCaT-Keratinocyten und humane Fibroblasten eingesetzt. Der Grund hierfür war, dass diese Zellen einen unterschiedlichen nativen GSH-Gehalt haben und deutlich verschiedene EC_{50} -Werte für die durch DMF induzierte Zytotoxizität ermittelt wurden (vgl. Kap. 4).

Um sicherzustellen, dass die Adduktbildung intrazellulär erfolgte, wurden nicht toxische Konzentrationen eingesetzt, welche im Neutralrottest zuvor ermittelt wurden (s. Kap. 4). Eine Ausnahme bildete die Inkubation von humanen Fibroblasten mit DMF 20 μ M, die im Neutralrottest eine geringe Toxizität nach 24 h Inkubation zeigte. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass in den verwendeten Zellkulturmedien kein GSH enthalten war.

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Material und Geräte

Penicillin/Streptomycin und Trypsin (Cell Concepts); Glutathion Assay Kit (Cayman Chemical, Michigan, USA); PBS, Quantum 263, Quantum 333 (PAA); DMF, DMSO, Glutathion, MMF (Sigma-Aldrich); Kulturflaschen T75, Zellschaber (Sarstedt). Eppendorf 5810 R Zentrifuge; Biofuge fresco (Heraeus, Hanau), Protein Assay Kit (Pierce), GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS (Arbeitskreis Schmidt, Münster)

5.2.2 Zelllinien

Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um HaCaT-Keratinocyten und humane Fibroblasten. Die Zellen wurden wie in Kapitel 13 beschrieben kultiviert.

5.2.3 Inkubationsexperimente

HaCaT-Keratinocyten und humane Fibroblasten (2-5 Passage) wurden in 75 cm^2 Kulturflaschen kultiviert bis eine Konfluenz ≥ 90 % erreicht wurde.

Stammlösungen von DMF und MMF wurden in DMSO hergestellt und mit Kulturmedium verdünnt, so dass sich Konzentrationen von 10 µM oder 20 µM DMF bzw. MMF mit einem DMSO Anteil von 0,2 % ergaben. Die Zellen wurden nun für 0, 1, 4, 8 und 24 h mit 10 ml der jeweiligen Lösung inkubiert.

Als Kontrollen wurden für jeden Zeitpunkt Zellen mit Medium (0,2 % DMSO) inkubiert (100 % Bezugswerte bei der Bestimmung des prozentualen intrazellulären GSH-Gehaltes).

Um auszuschließen, dass GSH im Medium supplementiert war, wurde Medium mit DMF oder MMF gezielt versetzt und für 1 h und 8 h inkubiert.

Nach Inkubation wurden Aliquots des Kulturmediums bis zur LC/MS-Analyse bei -70 °C gelagert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert (168 *g*, 5 min, 4 °C). Das erhaltene Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden im Sonicator mit 3 × 10 Stößen (Ultraschallbehandlung) lysiert. Nach einem weiterem Zentrifugationsschritt (10000 *g*, 4 °C, 15 min) wurde der Überstand gewonnen. Von einem Teil des Überstandes wurde der Proteingehalt mittels BCA bestimmt. Aus einem anderen Teil wurde der GSH-Gehalt mit dem Glutathion Assay Kit bestimmt.

5.2.4 Analytik

5.2.4.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels der BCA-Methode, wie sie in Kapitel 4.2.5 beschrieben wurde. Die Proben mussten 1:3 mit Aqua bidest. verdünnt werden, um Messwerte im Bereich der Kalibriergeraden (0-2000 µg/ml bovines Serumalbumin) zu erhalten. Um auszuschließen, dass das Tripeptid GSH einen Einfluß auf die Proteinbestimmung hat, wurden GSH-Standards mittels BCA vermessen.

5.2.4.2 LC/MS-Analytik

Die Bestimmung von GS-DMS, GS-MMS und *N*-Acetyl-*S*-(1,2-dimethoxy-carbonylethyl)cystein (NAC-DMS) erfolgte analog der in Kapitel 8.2.2 beschriebenen Methode. Die Probenvorbereitung unterschied sich dahingehend, dass die Proben 1:1 (v/v) mit eiskaltem Acetonitril versetzt wurden, um enthaltene Proteine zu präzipitieren. Der nach einem Zentrifugationsschritt (10000 *g*, 10 min, RT) erhaltene Überstand konnte direkt vermessen werden.

5.2.4.2.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Ermittlung der Wiederfindung wurde Kulturmedium gezielt mit GS-DMS, GS-MMS und NAC-DMS versetzt, so dass Endkonzentrationen von 1, 2, 5, 10 und 20 μM resultierten. Anschließend folgte, wie bei der Probenvorbereitung, der Zusatz von eiskaltem Acetonitril (1:1 (v/v)) und anschließende Zentrifugation (10000 *g*, 10 min, RT). Der Überstand wurde direkt vermessen.

5.2.4.2.2 Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurde Kulturmedium mit den Analyten gezielt versetzt, so dass immer kleiner werdende Endkonzentrationen resultierten. Die Konzentration des jeweiligen Analyten, die noch ein Signal-Rausch Verhältnis von $\sim 5:1$ aufwies, war die Bestimmungsgrenze.

5.2.4.3 GSH-Assay

Der intrazelluläre GSH-Gehalt wurde mittels des Glutathion Kits von Cayman Chemical bestimmt. Der Assay beruhte auf dem gleichen Prinzip, das in Kapitel 4.2.4 beschrieben wurde. Der in Kapitel 4.2.4 beschriebene Assay wurde chronologisch später etabliert und war bei gleichbleibender Qualität kostengünstiger. Die Probenvorbereitung folgte dem Protokoll des Herstellers. Der gemessene GSH-Gehalt wurde auf den Proteingehalt der Probe bezogen.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Proteinbestimmung

Da durch die Behandlung von Zellen mit FAE deren intrazellulärer GSH-Gehalt beeinflusst wird, wurde getestet, ob GSH die zu messenden Proteingehälter beeinflusst. Durch Vermessung von GSH-Standards konnte gezeigt werden, dass Tripeptide wie GSH nicht vom BCA-Assay erfasst werden und so ein variierender GSH-Gehalt der Proben keinen Einfluß auf das Ergebnis hatte.

5.3.2 Kalibrierung und Wiederfindung

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass der Zusatz von Acetonitril zur Probe keinen Einfluß auf die Analytik und kein Verlust an Analyt nach sich zieht. Alle Funktionen der Wiederfindungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb. 5.1).

5.3.3 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze lag für alle Analyten bei 1 µM.

5.3.4 Inkubationsexperimente

In den Kontrollansätzen (Medium + DMF oder MMF) konnte kein GSH-Addukt nachgewiesen werden. Die Kulturmedien waren daher frei von GSH.

Eine Metabolisierung von GS-DMS zu NAC-DMS konnte weder bei Inkubation von HaCaT-Keratinocyten noch bei humanen Fibroblasten beobachtet werden (vgl. Abb. 8.21). Nach Inkubation von HaCaT-Keratinocyten mit DMF konnte GS-DMS im Medium nachgewiesen werden. Es wurde die dem Medium zugegebene Stoffmenge an DMF quantitativ mit intrazellulärem GSH zu GS-DMS umgewandelt. Diese Reaktion und der Transport von GS-DMS aus der Zelle waren innerhalb von 1 h abgelaufen (Abb. 5.2 B). Die intrazelluläre GSH-Konzentration war korrelierend zu

dem Anfluten von GS-DMS im Medium der Zellen nach 1 h am niedrigsten. Sie nahm im weiteren Zeitverlauf wieder zu. Bei der Behandlung von HaCaT-Keratinocyten mit 20 μM DMF war eine Depletion von maximal $\sim 50\%$ nach 1 h zu beobachten. Nach 24 h war der GSH-Gehalt nahezu auf dem unbehandelten Zellen (95 % der Kontrolle). Bei einer Stimulation mit 10 μM DMF konnten nach 24 h GSH-Werte über denen unbehandelten Zellen (135 % der Kontrolle) bestimmt werden (Abb. 5.2 A).

Inkubationen von HaCaT-Keratinocyten mit MMF führten in den eingesetzten Konzentrationen zu keinen nennenswerten Veränderungen des intrazellulären GSH-Gehaltes (Abb. 5.2 A).

Im Überstand konnte, nach 4 h Stimulation mit 20 μM MMF, GS-MMS nachgewiesen werden; ein Maximum von $\sim 1\ \mu\text{M}$ GS-MMS war nach 24 h festzustellen.

Bei humanen Fibroblasten ergab eine Behandlung mit 20 μM DMF eine Depletion von intrazellulärem GSH von im Mittel 70 % nach 1 h. Diese nahm nach 8 h Inkubation auf 75 % zu. Der GSH-Gehalt war nach 24 h wieder auf dem unbehandelten Zellen (94 % der Kontrolle). Eine Behandlung der Zellen mit 10 μM DMF führte nach ≤ 1 h zu einer maximalen GSH-Depletion von 55 %. Nach 24 h war der GSH-Gehalt gleich der unbehandelten Kontrollen (Abb. 5.2 D). Im Medium der humanen Fibroblasten konnte GS-DMS nach Inkubation mit DMF nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit von 8 h betrug die Konzentration 5,3 μM GS-DMS (Inkubation mit 20 μM DMF) und 2,1 μM GS-DMS (Inkubation mit 10 μM DMF) (Abb. 5.2 E). Der intrazelluläre GSH-Gehalt unterlag nach Inkubation mit MMF keinen nennenswerten Veränderungen. Im Medium lag die GS-MMS Konzentration unter der Nachweisgrenze.

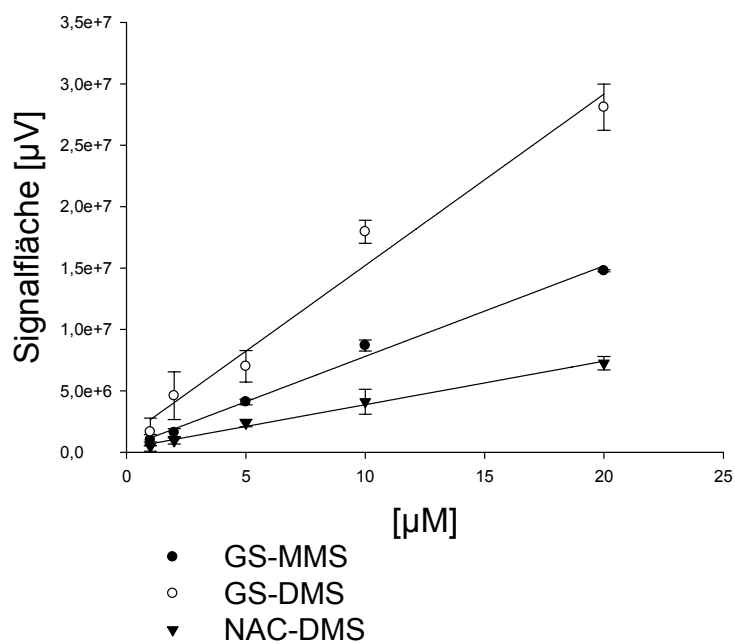
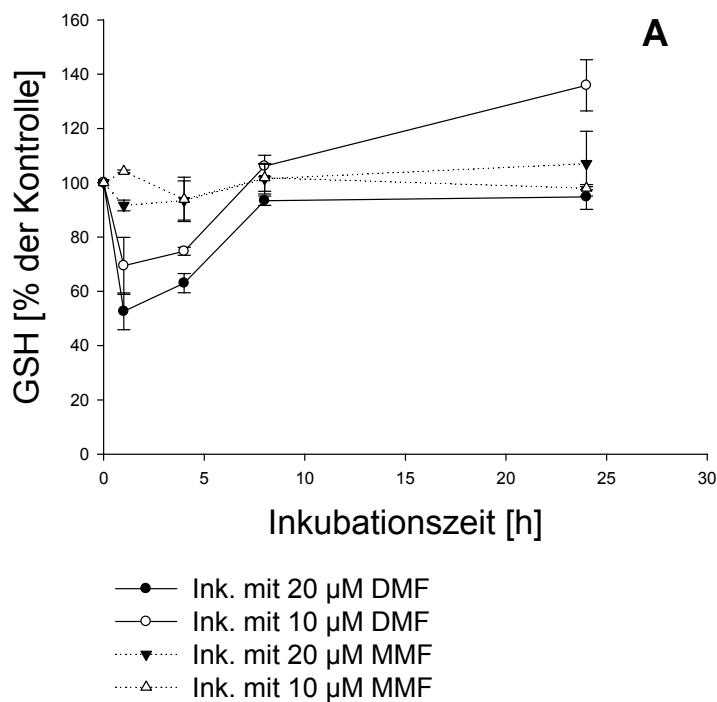
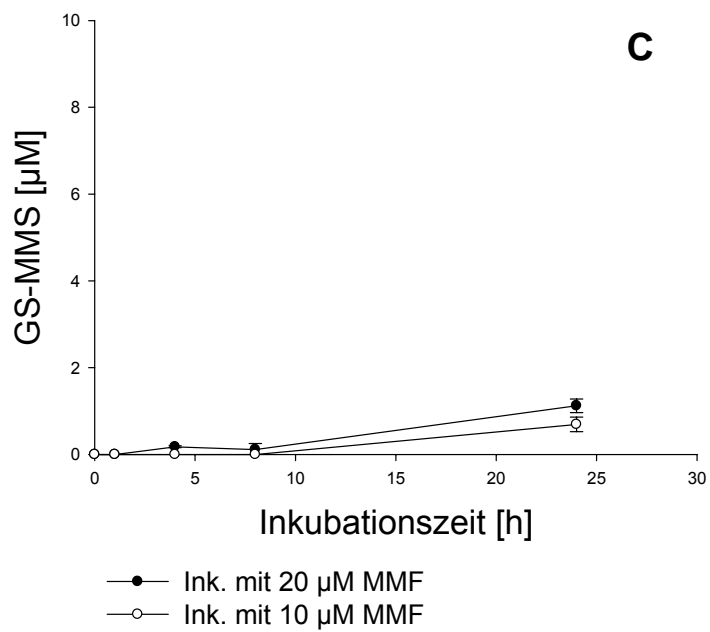
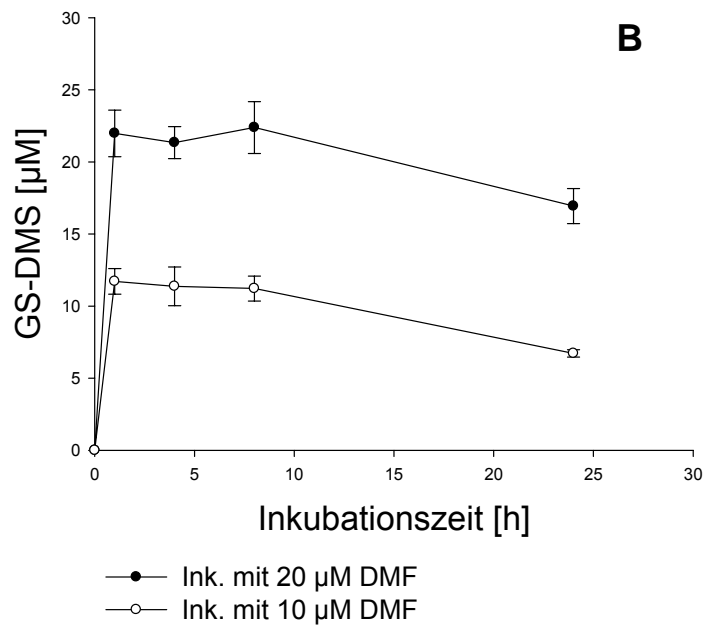


Abb. 5.1: Wiederfindung von GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS nach massenspektrometrischer Detektion. Die Signalfächen sind $x \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen (GS-DMS $r^2 = 0,9789$; GS-MMS $r^2 = 0,9917$; NAC-DMS $r^2 = 0,9928$)





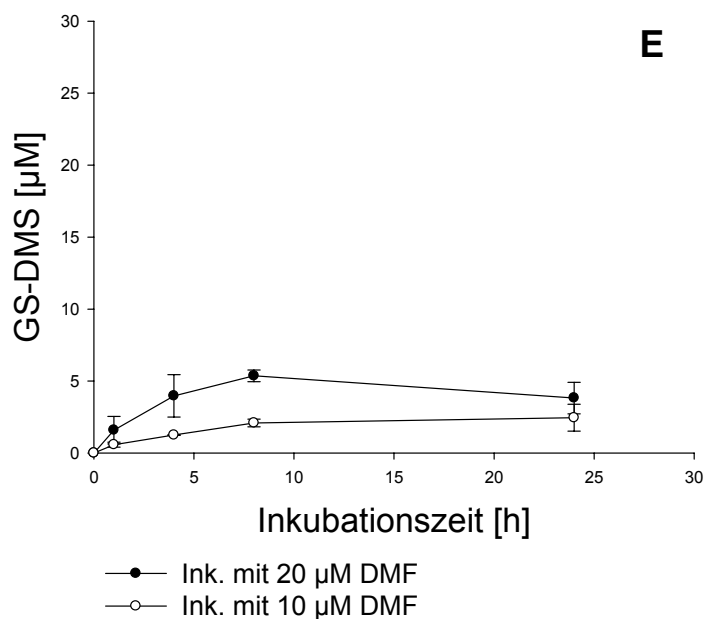
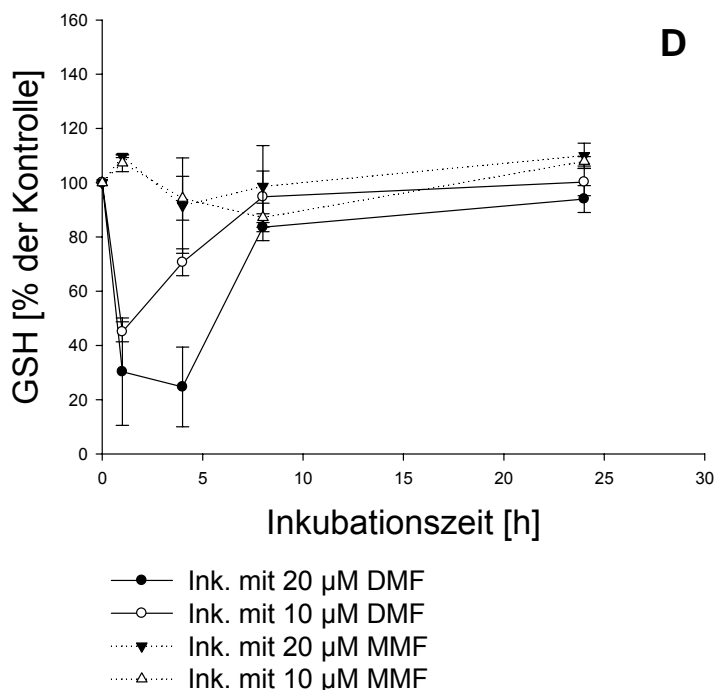


Abb. 5.2: (A) Intrazellulärer GSH-Gehalt von HaCaT-Keratinocyten nach Inkubation mit DMF (20 µM oder 10 µM) bzw. MMF (20 µM oder 10 µM), (B) GS-DMS im Medium von HaCaT-Keratinocyten nach Inkubation mit DMF (20 µM oder 10 µM), (C) GS-MMS im Medium von HaCaT-Keratinocyten nach Inkubation mit MMF (20 µM oder 10 µM), (D) Intrazellulärer GSH-Gehalt von humanen Fibroblasten nach Inkubation mit DMF (20 µM oder 10 µM) bzw. MMF (20 µM oder 10 µM), (E) GS-DMS im Medium von humanen Fibroblasten nach Inkubation mit DMF (20 µM oder 10 µM). Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 3$ Ansätzen je zweimal vermessen.

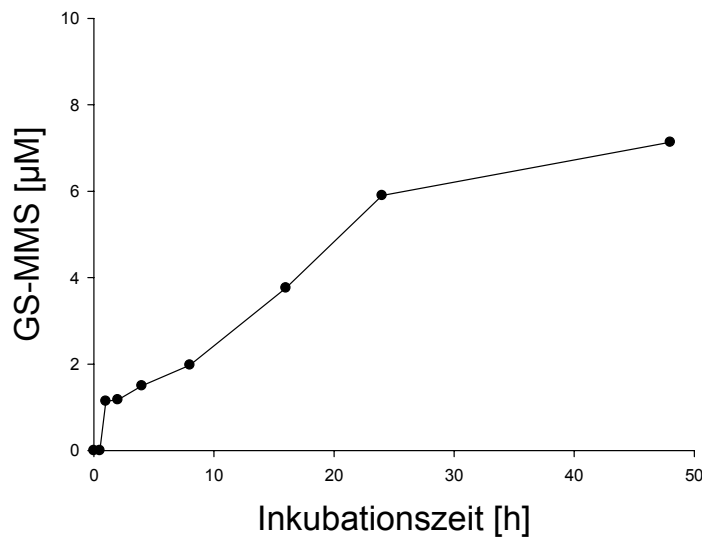


Abb. 5.3: GS-MMS im Medium von HaCaT-Keratinocyten nach Inkubation mit MMF 50 µM.

5.4 Diskussion

Die Ergebnisse machen den großen Einfluß von DMF auf den intrazellulären GSH-Gehalt deutlich und belegen, dass auch MMF mit intrazellulärem GSH reagiert. Sie zeigen ferner, dass intrazellulär gebildete GSH-Addukte mit DMF und MMF in das Kulturmedium abgegeben werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Inkubation beider verwendeter Zellarten mit DMF und anschließend die für MMF besprochen. In Versuchen mit HaCaT-Keratinocyten war nach einer Inkubation mit DMF (20 µM oder 10 µM) für 1 h der intrazelluläre GSH-Gehalt maximal depletiert und GS-DMS vollständig aus den Zellen in das Medium transportiert.

Die Depletion an intrazellulärem GSH erfolgte auch in humanen Fibroblasten sehr schnell. Aufgrund des niedrigeren GSH-Gehaltes von nativen Fibroblasten (vgl. Abb. 4.5) war hier auch eine wesentlich größere prozentuale Erniedrigung des intrazellulären GSH-Gehaltes als bei HaCaT-Keratinocyten festzustellen. Die Inkubation von Fibroblasten mit DMF führte nicht zum Nachweis äquimolarer Mengen von GS-DMS im Medium. Bei Inkubation mit DMF 20 µM war im Medium eine Konzentration von 5,3 µM GS-DMS und bei einer Inkubation mit DMF 10 µM eine von

2,5 μM nachzuweisen. Gründe hierfür könnten der niedrigere GSH-Gehalt der humanen Fibroblasten und eine eventuelle intrazelluläre Akkumulation von GS-DMS sein. Für eine Akkumulation spricht, dass der Transport des GSH-Adduktes aus humanen Fibroblasten langsamer abläuft als aus HaCaT-Keratinocyten (Abb. 5.2 B und E). Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Ausstattung der Zellen mit Phase-III-Transportern zurückzuführen.

Da zur Bildung eines Moleküls GS-DMS je ein Molekül DMF und GSH verbraucht werden, ist die Stoffmenge an DMF im Verhältnis zur Stoffmenge an intrazellulärem GSH für die prozentuale Depletion von GSH und die Verstoffwechslung von DMF entscheidend. Allgemein wird sich in einer Zelle mit niedrigem GSH-Gehalt, bedingt durch eine verhältnismäßig starke GSH-Depletion, auch das Redoxpotential stark verändern. Dies wiederum kann verschiedene Signalkaskaden beeinflussen (109; 110). Die Ergebnisse der unterschiedlich ausgeprägten GSH-Depletion bei HaCaT-Keratinocyten und humanen Fibroblasten bestätigen die Resultate aus Kapitel 4, wo gezeigt wurde, dass die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber DMF mit dem GSH-Gehalt nativer Zellen korreliert.

Die Konzentration von MMF in humanem Plasma nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm[®] kann bis zu $\sim 14 \mu\text{M}$ betragen (vgl. Kap. 8). In den hier durchgeführten Studien wurde mit 10 μM und 20 μM MMF inkubiert. Mit diesen Konzentrationen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des intrazellulären GSH-Gehaltes in HaCaT-Keratinocyten oder humanen Fibroblasten. In den Versuchen mit HaCaT-Keratinocyten ließ sich aber GS-MMS nach 4 h nachweisen und sein Gehalt im Zellkulturmedium nahm bis zu einer Inkubationszeit von 24 h zu. Dies zeigte, dass MMF in die Zellen penetrierte, mit GSH reagierte und aus der Zelle ausgeschleust wurde, allerdings in einem deutlich weniger ausgeprägten und langsameren Ausmaß als mit DMF. Der Grund hierfür ist, dass MMF nicht gut in Zellen penetriert und nicht so gut wie DMF mit GSH reagiert. (vgl. Kap. 1), (105).

Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, wurden mit MMF, eingesetzt in höheren Konzentrationen, ebenfalls pharmakodynamische Effekte *in vitro* beobachtet. Da auch 50 μM MMF nicht toxisch auf HaCaT-Keratinocyten wirkten (vgl. Kap. 4), wurde ein Versuch, analog den oben beschriebenen, nur mit einem zusätzlichen Inkubationszeitpunkt von 48 h durchgeführt, und GS-MMS im Überstand gemessen (Abb. 5.3). Nach 48 h konnten 7,1 μM GS-MMS nachgewiesen werden.

Konzentrations- und zeitabhängig kann daher mit MMF ebenfalls eine Veränderung der intrazellulären GSH-Konzentration bewirkt werden. Dies macht plausibel, dass *in vitro* Effekte von MMF nur mit hohen eingesetzten Konzentrationen zu beobachten waren.

Die hier dargestellten Experimente haben gezeigt, dass mit MMF in Konzentrationen, wie sie im Plasma nach Einnahme von Fumaderm[®] vorkommen, nur eine geringe Beeinflussung der intrazellulären GSH-Spiegel möglich ist. DMF hingegen kann als eine sehr potente Substanz zur Erniedrigung von intrazellulärem GSH angesehen werden, wie es auch schon von Nelson *et al.* gezeigt wurde. Sollte dem Wirkmechanismus der FAE eine Regulation von intrazellulärem GSH z.B. in Immunzellen zugrunde liegen (vgl. Kapitel 8), wäre DMF als die Wirkform der FAE anzusehen.

6 STUDIEN ZU MÖGLICHEN PHARMAKODYNAMISCHEN EFFEKTEN VON GS-DMS UND GS-MMS

6.1 Einleitung und Zielsetzung

Für Phase-II-Metabolite konnte in einigen Fällen ein pharmakodynamischer Effekt nachgewiesen werden.

So wurde gezeigt, dass Morphin-6-glucuronid (M6G) eine vergleichbare oder sogar höhere analgetische Wirkung im Vergleich zu Morphin aufweist (111; 112). Die Glucuronidierung von Morphin findet in den Hepatozyten statt und dient eigentlich der renalen Ausscheidung. Um diese hydrophile Substanz aus den Hepatozyten in den Blutstrom zu befördern und anschließend zu eliminieren ist ein aktiver Transport notwendig (Phase-III). Als Transporter von M6G wurde das „multi drug resistance protein 3“ (MRP3) identifiziert (113).

Anstatt eliminiert zu werden, kann M6G die Blut-Hirn-Schranke, trotz ausgeprägter Hydrophilie, überwinden und dann zentral analgetisch wirken (114). Dies lässt auf einen aktiven Transport schließen (115).

Zusammengefasst zeigt das Beispiel der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Morphin, dass:

1. Phase-II-Metabolite einen pharmakodynamischen Effekt aufweisen können.
2. Phase-II-Metabolite nicht nur durch aktiven Transport ausgeschieden, sondern auch aktiv absorbiert werden können.

Zum Zeitpunkt der im Folgenden beschriebenen Versuche war der Nachweis der Mercaptursäure von DMF (NAC-DMS) im Urin von Psoriasis-Patienten nach Einnahme von Fumaderm[®] noch nicht erbracht und es konnte daher noch nicht auf den in Kapitel 8 postulierten Wirkmechanismus geschlossen werden. In Vorversuchen wurde aber GS-MMS *in vivo* nachgewiesen (vgl. Kap. 8). Weiterhin war gezeigt worden, dass DMF und MMF *in vitro* mit intrazellulärem Glutathion Addukte bilden können. Insbesondere bei der Inkubation von HaCaT-Keratinocyten mit DMF ließen sich hohe

Konzentrationen an GS-DMS kurze Zeit nach Inkubation im Medium der Zellen nachweisen. Geringe Mengen an GS-MMS ließen sich nach Inkubation mit MMF detektieren (vgl. Kap. 5).

Da es ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkform der FAE *in vivo* zu identifizieren, konnte aufgrund der oben aufgeführten Gründe eine pharmakologische Wirkung von GS-MMS und/oder GS-DMS nicht ausgeschlossen werden.

Um Hinweise auf mögliche pharmakodynamische Effekte von GS-DMS und/oder GS-MMS zu bekommen, musste ein geeignetes Testsystem gewählt werden. Dieses wird im Folgenden beschrieben.

In Vorversuchen konnte mittels „Real-time quantitative polymerase chain reaction“ (RTQ-PCR) die Verminderung der Interleukin 8 (IL-8)-mRNA Expression in TNF α -stimulierten HaCaT-Keratinocyten durch Inkubation der Zellen mit DMF gezeigt werden. Dieser Effekt konnte durch Inkubation mit MMF nicht erzielt werden.

Interleukin 8 ist ein Chemokin der CXC-Familie. Wichtige Wirkungen von IL-8 sind die Förderung der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und die Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen. Es wird deutlich vermehrt in Schuppen und der Epidermis von Psoriasis-Patienten gefunden. Eine Korrelation der Konzentration von IL-8 im Serum geht aber nicht mit dem Krankheitsverlauf der Psoriasis einher (116; 117). Daher wäre für eine Therapie der Psoriasis insbesondere die Möglichkeit einer Erniedrigung der IL-8-Produktion in den hyperproliferierenden Keratinocyten von Interesse.

Es wurde die Behandlung von HaCaT-Keratinocyten mit GS-DMS oder GS-MMS im Vergleich zu DMF und MMF und anschließender Bestimmung der IL-8-mRNA Expression als Testsystem gewählt.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Material und Geräte

MgCl₂, dNTPs, DTT, Reaktionspuffer, Reverse Transkriptase (Superscript-II), Trizol™ (Invitrogen, Karlsruhe); GS-DMS, GS-MMS (Arbeitskreis Schmidt); Chloroform, DMF, DMSO, Ethanol, Formamid, Isopropanol, MMF, TNF α (Sigma-Aldrich); oligo(dt), PCR-

Wasser, Primer: GAPDH 3', GAPDH 5', IL-8 3', IL-8 5' (Sigma Genosys).

Biophotometer (Eppendorf, Hamburg), Light-Cycler (Roche, Mannheim)

6.2.2 Versuchsaufbau

6.2.2.1 Zelllinien

Es wurden HaCaT-Keratinocyten verwendet. Die Zellen wurden wie in Kapitel 13 beschrieben kultiviert. 7×10^5 Zellen wurden in 6-Loch Platten mit 2 ml Kulturmedium gegeben. Nach 24 h resultierte ein Monolayer mit einer Konfluenz $\geq 90\%$.

6.2.2.2 Inkubationsexperimente

DMF und MMF wurden in DMSO gelöst. Kulturmedium wurde mit DMF oder MMF gezielt versetzt, so dass Endkonzentrationen von 50 μM resultierten und der DMSO Gehalt 0,2 % betrug. GS-DMS und GS-MMS wurden in Aqua bidest. gelöst. Durch entsprechende Verdünnungen der Stammlösungen mit Medium wurden Endkonzentrationen von 50 μM und 100 μM erzielt. Die Zellen wurden mit 2 ml des entsprechenden Mediums für 4 h inkubiert. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass 0,2 % DMSO keinen Einfluß auf die IL-8-mRNA Expression hatten.

Nach der Inkubation erfolgte der Zusatz von 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ für 30 min, um die IL-8-mRNA Expression zu stimulieren. Die Konzentration von $\text{TNF}\alpha$ und die Inkubationszeit wurden in Vorversuchen optimiert.

6.2.3 RNA-Isolierung aus HaCaT-Keratinocyten

Die Gesamt-RNA (primär ribosomale, messenger und transfer-RNA) wurde aus HaCaT-Keratinocyten nach der Single-Step Methode isoliert. Nach entsprechender Inkubation der HaCaT-Keratinocyten wurde das Kulturmedium verworfen und die

Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 1 ml Trizol™ (Phenol-Guanidinisothiocyanat (GTC)-Gemisch) pro Vertiefung der 6-Loch Platten. GTC ist ein Salz, das Proteine denaturiert und inaktiviert. Auch RNAsen werden inhibiert, wodurch die Stabilität der RNA gewährleistet wird. Das Phenol senkt den pH, so dass sich kleinere DNA-Fragmente anlösen. Nach Zusatz von 200 µl Chloroform zum Zelllysate, intensiver Durchmischung und anschließender Zentrifugation (10000 *g*, 15 min, 4 °C) wurde die organische von der wässrigen und einer Interphase abgeschieden. Die RNA befand sich nach dieser Auftrennung in der wässrigen, größere DNA-Fragmente in der Interphase, während andere Proteine und kleine DNA-Fragmente der Probe in der organischen Phenol-Chloroform-Phase vorlagen. Nach Abtrennung der wässrigen Phase wurde die RNA durch Zusatz von 500 µl Isopropanol präzipitiert. Das durch Zentrifugation (10000 *g*, 10 min, 4 °C) gewonnene RNA-Pellet wurde anschließend mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (7500 *g*, 5 min, 4 °C), getrocknet und in 10-25 µl 25 % Formamid gelöst. Zum vollständigen Lösen der RNA wurde für 10 min bei 56 °C inkubiert. Die isolierte RNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

6.2.4 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA-Lösung erfolgte photometrisch über Absorptionsmessung bei 260 nm (A_{260}) in einem UV-Photometer mit automatischer Quantifizierung. Die Verdünnung der Proben wurde so gewählt, dass Absorptionen zwischen 0,1 und 1 resultierten. Eine A_{260} -Extinktion von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 41,2 µg/ml (118). Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wird unter anderem über ihren Gehalt an Proteinverunreinigungen bestimmt. Das charakteristische Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt sich die Reinheit der Nukleinsäureprobe bestimmen; er sollte stets zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

6.2.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die RNA wurde durch das Enzym Reverse Transkriptase in die stabilere komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Reverse Transkriptase benötigt zum Synthesestart ein Starteroligonukleotid (Primer), d.h. einen kurzen einzelsträngigen Nukleinsäure-Abschnitt. Es wurde ein Oligo (dT)-Primer eingesetzt, der sich an der terminalen Poly-A Sequenz der mRNA anlagerte. Vom Oligo (dT)-Primer ausgehend wurde dann cDNA enzymatisch synthetisiert. Hierzu wurden 1 µg RNA mit 1,5 µl 20 µM Oligo (dT)-Primer (18 × T) gemischt und das Volumen mit Aqua bidest. auf 12,5 µl ergänzt. Der Ansatz wurde für 10 min auf 70 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen, und langsam auf RT abgekühlt, damit die Primer hybridisieren konnten. Danach wurden 4 µl Puffer (5 ×), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl Nucleotide (dNTPs) und 0,35 µl Reverse Transkriptase zugegeben und für 1 h bei 42 °C, dem Temperaturoptimum der Reversen Transkriptase, inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch eine Inkubation bei 90 °C für 5 min. Nach Zugabe von 80 µl Aqua bidest. konnte die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

6.2.6 Real-time quantitative PCR

Zur Quantifizierung von mRNA mittels RTQ-PCR wurde jedem Ansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I zugesetzt, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Das Ausmaß der Fluoreszenz korreliert dabei mit der Menge an doppelsträngiger DNA. Kommt es während der PCR zu einer Vervielfältigung (Amplifizierung) spezifischer DNA, so nimmt dementsprechend auch die Fluoreszenzintensität zu. Um den DNA-Gehalt verschiedener Proben vergleichbar zu machen, wurden die Ergebnisse der IL-8 cDNA Messung einer Probe immer auf ihren Gehalt an Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) cDNA bezogen. Da die GAPDH in Epithelzellen konstitutiv expremiert und nicht reguliert wird, diente sie als interner Standard. Durch zuvor erstellte Standardkurven für IL-8 und GAPDH konnte die relative mRNA-Expression in den Proben ermittelt werden.

Nach der Umschreibung der mRNA in komplementäre DNA mittels Reverser

Transkriptase wurde diese in einer PCR mit genspezifischen Primern amplifiziert.

Es wurden Intron-überspannende Primer eingesetzt, um cDNA sicher von genomischer DNA unterscheiden zu können.

Zu 10 ng cDNA wurden 5,8 µl PCR-H₂O, 1,2 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl einer Lösung mit Taq-DNA-Polymerase und SYBR Green I und je 0,5 µl der genspezifischen Primer (Tab. 6.2) gegeben. Die PCR-Reaktionen wurden im Light-Cycler mit den in Tabelle 6.1 aufgeführten Einstellungen durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde am Ende jedes Amplifikations-Zyklus gemessen. Nach der PCR wurde eine Schmelzkurve aufgenommen. Dies ermöglichte die Überprüfung der Spezifität der während der PCR entstandenen Produkte.

Analyse-Modus	Teilschritt	IL-8		GAPDH	
		Temp. [°C]	Zeit [s]	Temp. [°C]	Zeit [s]
		Initialdenaturierung (1 Zyklus)			
		95	600	95	600
		Amplifikation (45 Zyklen)			
Quantifizierung	Denaturierung	95	10	95	10
	Anlagerung	66	5	69	5
	Verlängerung	72	15	72	15
		Schmelzkurve (1 Zyklus)			
Schmelzkurven	Denaturierung	95	0	95	0
	Anlagerung	65	15	65	15
	Verlängerung	95	0	95	0
		Kühlung (1 Zyklus)			
		40	30	40	30

Tab. 6.1: Einstellungen des Light-Cyclers für IL-8 und GAPDH

Produkt	Primerbezeichnung	Sequenz 5' → 3'
GAPDH	GA fwd	CCAGCCGAGCCACATGGCTC
	GA rev	ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
IL-8	IL-8 fwd	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGC
	IL-8 rev	TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTC

Tab. 6.2: Verwendete Primer für die entsprechenden Oligonukleotidprodukte und ihre Nukleotidsequenzen

6.3 Ergebnisse und Diskussion

Mit den Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von TNF α -stimulierten HaCaT-Keratinocyten mit DMF zu einer signifikanten ($p \leq 0,01$) Reduktion der IL-8-mRNA Expression führte. Durch Verwendung der gleichen Konzentration an MMF oder den Glutathion-Addukten GS-MMS und GS-DMS (50 μ M und 100 μ M) konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden.

Da DMF *in vivo* nach peroraler Gabe einer hundertprozentigen präsystemischen Elimination unterliegt, ist es unwahrscheinlich, dass es die hyperproliferierenden Keratinocyten in der Epidermis psoriatischer Läsionen unverstoffwechselt erreicht und dort den oben beschriebenen Effekt der Erniedrigung der IL-8 Produktion auf diese Zellen ausüben kann.

Durch eine lokale Applikation von DMF auf die Haut, in einer geeigneten galenischen Formulierung, könnte es direkt auf die Keratinocyten wirken. Das Nutzen/Risiko Verhältnis einer lokalen Therapie müsste geprüft werden. Dabei wäre zu beachten, dass Versuche der lokalen Applikation mit verhältnismäßig hohen Konzentrationen von DMF (2 mM) in 70 % Ethanol zur Irritation der Haut führten (119). Aus der Beschreibung dieser Beobachtung ging nicht hervor, welches Volumen der Lösung und daher welche Stoffmenge DMF pro Quadratzentimeter Haut letztendlich aufgetragen wurde. Daher müssten, wie auch für die orale Therapie bereits geschehen, geeignete Konzentrationen empirisch ermittelt werden.

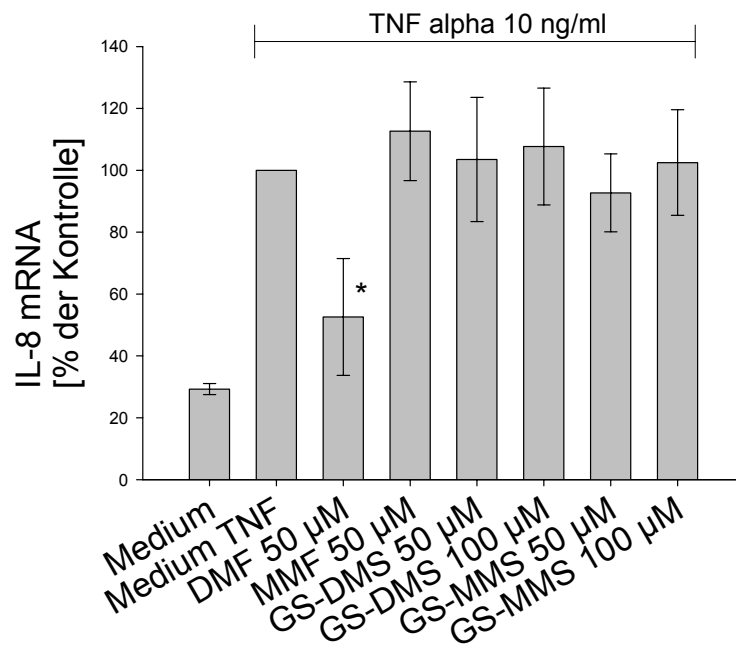


Abb. 6.1: IL-8-mRNA Expression nach Inkubation von HaCaT-Keratinocyten mit DMF 50 µM, MMF 50 µM, GS-DMS 50 µM oder 100 µM und GS-MMS 50 µM oder 100 µM für 4 h und anschließender Stimulation mit 10 ng/ml TNF α für 30 min. Die Ergebnisse sind $x \pm s$ aus $n = 4$ Versuchen im doppelten Ansatz. * $p \leq 0,01$

7 STUDIEN MIT CACO-2 ZELLEN

7.1 Einleitung und Zielsetzung

7.1.1 Das CaCo-2 Modell

Die Oberfläche des Dünndarms ist von einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel bedeckt. Dieses besitzt eine relativ große Oberfläche von circa 140 m² und dient hauptsächlich der Aufnahme von Nährstoffen. Es besteht aus Enterozyten, Becherzellen, Paneth-Körnerzellen, endokrinen Zellen, intraepithelialen Lymphozyten und M-Zellen (membranösen Zellen). Enterozyten sind resorbierende Zellen und die am häufigsten vorkommende Zellart im Oberflächenepithel des Dünndarms (120).

Die überwiegende Resorption von oral applizierten Pharmaka erfolgt über das Epithel des Dünndarms. Alle wesentlichen Transportwege zwischen der apikalen (dem Darmlumen zugewandten) und der basalen (der Serosa bzw. den Blutgefäßen zugewandten) Seite einer solchen biologischen Barriere sind in Abb. 7.1 dargestellt. Die meisten Arzneistoffe werden durch passive transzelluläre Diffusion [1] absorbiert. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichend hohe Lipophilie und gleichzeitig gute Wasserlöslichkeit des Arzneistoffes. Der parazelluläre Weg zwischen benachbarten Epithelzellen hindurch [2] wird vor allem von hydrophilen Substanzen bevorzugt. Allerdings begrenzen die im oberen Bereich der Epithelzellen vorhandenen „tight junctions“ die Durchlässigkeit des Zellverbandes (121). Auch die geringe Oberfläche des parazellulären Weges, welche um den Faktor 1000 geringer ist als die der luminalen Zellmembran, ist ein limitierender Faktor für diesen Diffusionsweg (122). Eine weitere Möglichkeit ist der aktive Transport von relativ hydrophilen Arzneistoffen, die aufgrund der Ähnlichkeit ihrer chemischen Struktur mit Nährstoffen, von Transportern als Substrat akzeptiert werden [3]. Auch existieren Transporter, welche einen Arzneistofftransport von der basolateralen zur apikalen Seite bewerkstelligen [3] (123 - 125). Der Absorptionsweg eines vesikulären Transportes hat nur eine geringe Kapazität [4].

Neben ihrer Wirkung als physikalische Diffusionsbarriere wirken epitheliale Monolayer aber auch als metabolische Barriere. Vor einer Metabolisierung in der Leber

(First-Pass-Effekt) kann eine Verstoffwechslung bereits in der Darmwand selbst erfolgen. Metabolische Enzyme der Cytochrom P450-Klasse (z.B. Cyp3A4), deren Vorkommen in der Leber schon lange bekannt ist, finden sich auch in der Darmmukosa (126). Ebenfalls sind Esterasen in der Darmmukosa vorhanden (127).

CaCo-2 Zellen stellen eine permanente humane Zelllinie dar, die ihren Ursprung in einem Colon-Adenokarzinom eines 72-jährigen kaukasischen Mannes hat. Sie werden vor allem wegen ihrer Ähnlichkeit mit Dünndarmenterozyten als *in vitro* Modell genutzt. Ihre Besonderheit beruht hierbei darauf, dass sie während der Kultur auf Membranen einen ausdifferenzierten Monolayer bilden, der typische Charakteristika der humanen Dünndarmmukosa aufweist (128). Differenzierte CaCo-2-Zellen zeigen eine für Dünndarmenterozyten typische morphologische Polarisation mit ausgeprägtem Bürstensaum und tight junctions. Die Aktivität von Glutathion-S-Transferasen sowie der Phenol-Sulfotransferase (SULT1A1) konnte in CaCo-2-Zellen gemessen werden (129). An der apikalen Seite wird unter anderem P-Glykoprotein sowie „multidrug resistance protein“ MRP1 und MRP2 expremiert (124; 130).

Der CaCo-2 Assay hat sich während der letzten Jahre als *in vitro* Modell für die intestinale Resorption von oral applizierten Pharmaka etabliert. Die Permeabilität von Arzneistoffen durch einen CaCo-2 Monolayer korreliert gut mit den *in vivo* Verhältnissen (131 - 133). Diese Zelllinie gewinnt auch zunehmende Bedeutung in der pharmazeutischen Forschung. Im August 2000 verabschiedete die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) eine Industrierichtlinie, welche ein Klassifizierungssystem für pharmazeutische Wirkstoffe aus schnell freisetzenden, festen, oral verabreichten Formulierungen propagiert. Das so genannte Biopharmaceutics Classification System (BCS) teilt Arzneistoffe anhand ihrer Löslichkeit und ihrer Permeabilität über die Darmschleimhaut ein. Unter der Voraussetzung einer schnellen Löslichkeit und einer hinreichenden Stabilität der Arzneiform kann für Vertreter der Wirkstoffklasse I (hohe Permeabilität, hohe Löslichkeit) ein Biowaiver, d.h. ein Verzicht auf *in vivo* Bioverfügbarkeitsstudien beantragt werden.

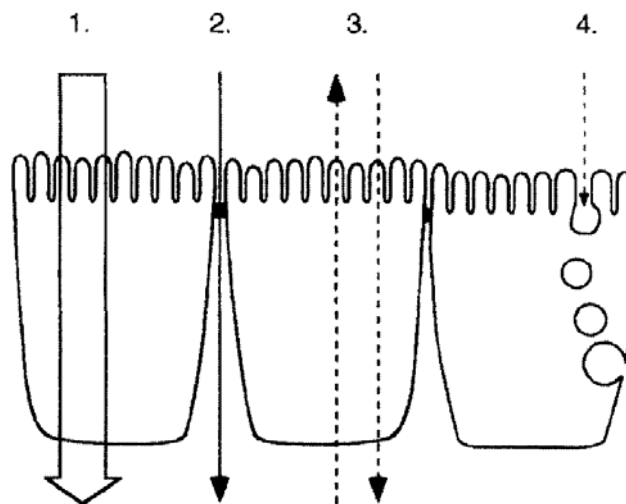


Abb. 7.1: Transportwege an einer epithelialen Barriere 1. passiv transzellulär, 2. passiv parazellulär, 3. aktiv carriervermittelt, transzellulär, 4. vesikulär (134)

7.1.2 Transportstudien mit Fumarsäureestern

Nach Applikation der magensaftresistenten Formulierung Fumaderm[®] erfolgt die Freisetzung von DMF und MMF im Dünndarm. Zu dem Zeitpunkt der Durchführung der unten beschriebenen CaCo-2-Versuche war Folgendes bekannt:

Aufgrund eines fehlenden Nachweises von DMF-Blutspiegeln nach oraler oder intravenöser Gabe von DMF wurde angenommen, dass DMF selbst nicht bioverfügbar ist. Inkubationsstudien mit Esterasen und Untersuchungen der Stabilität von DMF bei alkalischen pH-Werten ließen vermuten, dass DMF schon durch das intestinale Milieu vollständig zu MMF abgebaut wurde (48; 49).

Von Werdenberg *et al.* wurden in 2003 Absorptionsstudien mit FAE unter Verwendung des Caco-2-Modells und des „Ussing-Chamber“ Modells durchgeführt. Bei letzterem Modell wurde ein frischer Schweinedünndarm zwischen ein apikales und basolaterales Kompartiment gespannt.

DMF penetrierte im Gegensatz zu MMF gut durch einen CaCo-2-Monolayer. Bei diesen Versuchen konnte keine nennenswerte Hydrolyse von DMF zu MMF festgestellt werden. Im Widerspruch hierzu standen die Ergebnisse mit dem Schweinedünndarm-Modell. Hier wurde DMF innerhalb von 10 min zu MMF hydrolysiert und es konnte kein DMF im basalen Kompartiment detektiert werden.

Angaben über die absoluten Verhältnisse der apikal applizierten Konzentrationen von DMF zu basal gefundenen an MMF und/oder DMF bzw. Glutathion-Addukten von FAE, wie z.B. GS-DMS wurden in der Arbeit nicht angegeben. Weiterhin konnte eine Verstoffwechslung von DMF oder MMF zu Fumarsäure nicht ausgeschlossen werden, da eine entsprechende Analytik nicht etabliert war. Die Versuche wurden mit 100 μM oder 500 μM (entspricht 50 nmol bzw. 250 nmol DMF bzw. MMF bezogen auf das applizierte Volumen von 0,5 ml) Inkubationslösungen von DMF oder MMF durchgeführt. Die Ergebnisse ließen auf keine aktive Aufnahme von FAE, sondern auf eine Absorption durch passive Diffusion schließen (48).

Ziel der unten beschriebenen CaCo-2-Studien war es, Versuche mit niedriger konzentrierten Inkubationslösungen durchzuführen und insbesondere die Verhältnisse von DMF zu seinen eventuellen Metaboliten FA, MMF, GS-MMS und GS-DMS nach Inkubation eines CaCo-2-Monolayers mit DMF zu untersuchen. Hierzu war die CaCo-2-Zelllinie nebst dem Transwell[®]-System zu etablieren. Eine HPLC-Analytik zur Detektion der Glutathion-Addukte musste entwickelt werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob GS-MMS und GS-DMS aktiv durch einen CaCo-2-Layer transportiert werden.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Material und Geräte

DMF, DMSO, HBSS, Luzifer Gelb, MEF, MMF (Sigma-Aldrich); GS-DMS, GS-MMS (Arbeitskreis Schmidt).

Weiterhin verwendete Materialien und Geräte werden in den folgenden Unterkapiteln aufgeführt.

7.2.2 Zelllinie

Die verwendete CaCo-2-Zelllinie wurde vom DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) in Braunschweig bezogen und wie in Kapitel 13 beschrieben kultiviert.

7.2.3 Etablierung des CaCo-2-Transwell®-Systems

Bei dem verwendeten Transwell®-System der Firma Corning Costar (New York, USA) handelt es sich um 12-Loch-Platten mit entsprechenden Transwell®-Einsätzen (TE). Das Prinzip ist, dass die Vertiefungen der Mikrotiterplatten durch die TE in ein apikales und ein basales Kompartiment geteilt werden. CaCo-2-Zellen werden auf der permeablen Polycarbonatmembran der TE bis zur Bildung eines konfluenten Monolayers kultiviert. Durch Zugabe des zu untersuchenden Arzneistoffes in eines der beiden Kompartimente und Messung des Stoffes im jeweils anderen Kompartiment nach definierten Zeitpunkten kann das Ausmaß ermittelt werden, in dem der Arzneistoff das Epithel überwinden kann.

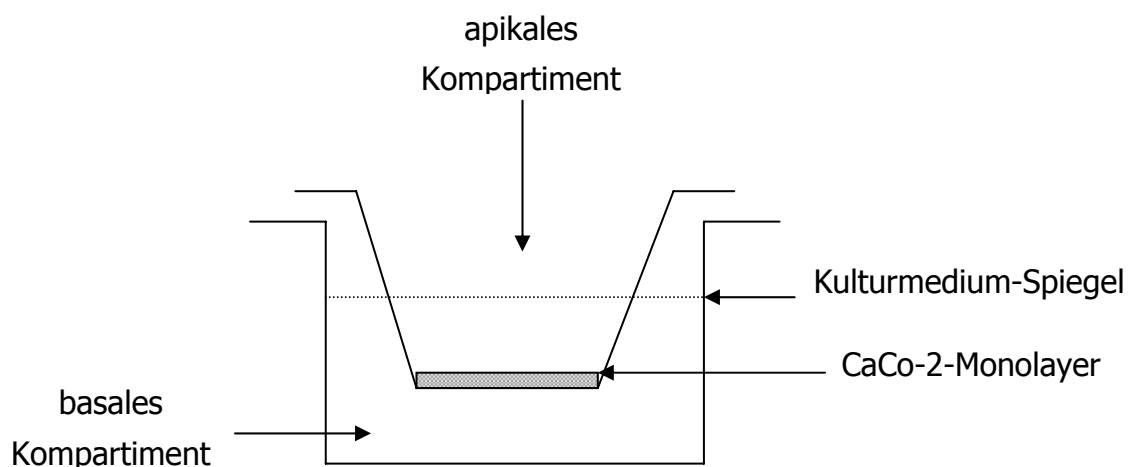


Abb. 7.2: Schema des Transwell®-Systems

7.2.3.1 Transepithelialer Widerstand

Bei Transportstudien mit CaCo-2-Zellen muss sichergestellt werden, dass der Monolayer intakt ist und damit die geschwindigkeitsbestimmende Barriere während des Experiments darstellt. Zur Überprüfung der Integrität des Monolayers wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER-Wert) mit dem „Epithelial Voltohmmeter“ (EVOM, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) vor Aussaat der Zellen (Leerwert) und dann jeden zweiten Tag gemessen. Um den Temperatureinfluss bei den Widerstandsmessungen zu minimieren, wurde die Platte vorher für 10 min bei RT abgekühlt. Bei Werten von $\geq 300 \Omega \times \text{cm}^2$ (abzüglich des Leerwertes) wurde von einem intakten Monolayer ausgegangen (135).

7.2.3.2 Optimierung der Zellkulturbedingungen

Für Permeationsstudien unter Verwendung des Transwell[®]-Systems wurde in Untersuchungen 6-9 Tage alte CaCo-2-Monolayer verwendet (136). Sie zeigten eine enge Korrelation zu den Standardmodellen, welche 21 Tage nach der Aussaat der Zellen benutzt werden. Diese Kurzzeitmodelle sind besonders geeignet, wenn passive Transportwege untersucht werden sollen. Auch sind diese Modelle auf das BCS-System anwendbar. Für FAE wurde ein aktiver Transport ausgeschlossen (48). Für die Transportstudien mit MMF, MEF und DMF kamen 10-12 Tage alte CaCo-2-Monolayer zum Einsatz. Um zu prüfen, ob GS-MMS und GS-DMS aktiv transportiert werden, wurden 21 Tage alte Monolayer angezchtet.

Fötale Kälberserum (FCS) enthält verschiedene, z.T. noch unbekannte Wachstumsfaktoren, die nachweislich die Zelladhärenz sowie die Ausbildung von tight junctions und verschiedenen Transportsystemen begünstigen. In Vorversuchen erwies sich der Zusatz von 20 % im Vergleich zu 10 % FCS zum Kulturmedium (DMEM+ 2 mM L-Glutamin + 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin) als vorteilhaft. Dies war an der schnelleren Zunahme der TEER-Werte bei Zugabe von 20 % FCS im Vergleich zu 10 % FCS festzustellen. Auch waren diese Werte bei Zusatz von 20 % FCS im Gegensatz zu 10 % FCS nach längerer Kulturdauer (≥ 14 Tage) stabiler.

Vor Aussaat der Zellen auf die 1,1 cm² großen permeablen Polycarbonatmembranen

(Porengröße 0,4 μM) der TE wurden diese für 1 h mit Medium (0,5 ml apikal, 1,5 ml basal) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) vorinkubiert. Nach dem Abdekantieren des apikalen Mediums wurden zur Anzucht eines 10-12 Tage CaCo-2-Monolayers 5×10^5 Zellen pro 0,5 ml Medium auf die Membran gegeben. Für eine 21-Tage-Kultur wurden 1×10^5 Zellen ausgesät. Das Kulturmedium wurde jeden Tag gewechselt.

7.2.3.3 Transportstudien

Für die durchgeführten Transportstudien kamen nur Transwell[®]-Systeme mit einem CaCo-2-Monolayer zum Einsatz, der einen TEER-Wert $\geq 300 \Omega \times \text{cm}^2$ aufwies. Für alle Transportstudien mit DMF, MMF und MEF wurde HBSS-Puffer (pH = 7,4) eingesetzt. Stammlösungen von DMF, MEF und MMF wurden mit DMSO hergestellt. Zur Herstellung von Inkubationslösungen wurden diese mit HBSS-Puffer verdünnt, so dass die gewünschte Endkonzentration mit einem DMSO-Gehalt von 0,2 % resultierte. Vor der Inkubation mit der jeweiligen Substanz wurde der apikale Teil vorsichtig mit 0,5 ml vorgewärmten HBSS-Puffer gespült. Nach Zugabe von 0,5 ml der entsprechenden Inkubationslösung in den apikalen Teil wurde dieser in die jeweilige Vertiefung der 12-Loch-Platte gesetzt, in der 1,5 ml warmer HBSS-Puffer vorgelegt waren. Nach 30, 60 und 90 min wurden Proben des basalen Kompartiments und zusätzlich nach 90 min des apikalen Kompartiments gewonnen. In weiteren Versuchsreihen wurde ein Transwell[®] pro Zeitpunkt genutzt, um auch die Veränderung der Stoffmengen der Analyten im apikalen Kompartiment verfolgen zu können.

Die Transportstudien mit GS-DMS und GS-MMS wurden analog durchgeführt. Um die Aktivität ATP-abhängiger Glutathion-Konjugat Transporter (z.B. RLIP76 (137)) zu gewährleisten, wurde dem HBSS-Puffer 4 mM ATP zugesetzt. Die Proben und Inkubationslösungen wurden bis zur Vermessung bei -70 °C gelagert.

7.2.3.4 Luzifer-Gelb

Bei Luzifer-Gelb (6-Amino-2,3-dihydro-1,3-dioxo-2-hydrazinocarbonylamino-1*H*-benz[d,e]isochinolin-5,8-disulfonsäure Dilithium Salz) handelt es sich um einen

Fluoreszenzfarbstoff, der durch passive parazelluläre Diffusion nur in einem sehr geringen Maße einen intakten CaCo-2-Monolayer durchdringen kann (138).

Um sicherzustellen, dass die Integrität des Monolayers während des Versuches gegeben war, wurden nach den entsprechenden Inkubationen 0,5 ml einer 100 μM Lösung von Luzifer-Gelb (LY) in HBSS in den apikalen und 1,5 ml frischer HBSS-Puffer in den basalen Teil gegeben und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Die basalen Proben wurden bis zu ihrer Vermessung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zur Bestimmung der LY-Passage wurden 90 μl der Proben des basalen Kompartiments in schwarzen 96-Loch-Mikrotiterplatten (FluoroNuncTM, Nunc, Wiesbaden) mit dem Fluoreszenz-Plattenreader FLUOstar Optima (BMG Labtech GmbH, Offenburg) vermessen. Bei jeder Messung wurde eine Kalibriergerade (0,1 - 100 μM LY in HBSS) ermittelt. Die Messungen erfolgten mit einer Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 490\text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 535\text{ nm}$. Der Versuch galt als valide, wenn $\leq 1\%$ LY den CaCo-2-Monolayer passiert hatten.

7.2.3.5 Bestimmung des scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten

Eine Möglichkeit zur Beschreibung der Permeabilität eines Zellmonolayers für eine bestimmte Substanz ist der so genannte „scheinbare Permeabilitätskoeffizient“ (apparent permeability coefficient, P_{app}). Der P_{app} kann aus den Daten der Transportstudien mittels der Formel 7.1 berechnet werden.

Im quasi-stationären Zustand des Systems, unter so genannten „sink“-Bedingungen (Donorkonzentration $> 90\%$ von c_0), kann der Substanzfluss über den Monolayer aus der Steigung der Regressionsgeraden bei Auftragung der transportierten Menge über die Zeit entnommen werden. Von den ermittelten P_{app} -Werten kann auf die wahrscheinliche Absorption der Substanz nach oraler Gabe geschlossen werden (Tab. 7.1).

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{A \times c_0} \left[\frac{cm}{s} \right]$$

P_{app} = Permeabilitätskoeffizient

dQ/dt = Änderung der Konzentration im basalem Kompartiment pro Zeiteinheit [nmol/s]

c_0 = Anfangskonzentration im apikalen Kompartiment [nmol/ml]

A = Oberfläche der Filtermembran [cm²]

Formel 7.1: Berechnung des scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten P_{app}

P_{app} [cm/s]	wahrscheinliche <i>in vivo</i> Absorption [%]
$P_{app} \leq 1 \times 10^{-6}$	0-20
$1 \times 10^{-6} < P_{app} \leq 10 \times 10^{-6}$	20-70
$P_{app} \geq 10 \times 10^{-6}$	70-100

Tab. 7.1: Vorhersage der oralen Absorption eines Arzneistoffs aus dem im CaCo-2-Modell ermittelten P_{app} -Wert

7.2.4 HPLC-Analytik

7.2.4.1 Detektion von GS-MMS und GS-DMS

Als Alternative zur Detektion von GS-MMS und GS-DMS mittels LC/MS (vgl. Kap. 8) mit manueller Injektion der Proben sollte eine vollautomatisierte HPLC-Methode entwickelt werden. Da beide Glutathionaddukte kein chromophores System hatten und eine Detektion auch im niedrigen UV-Bereich zu unempfindlich war, erwies sich eine Derivatisierung als notwendig. Dabei bot sich, wie auch bei der klassischen Aminosäureanalytik genutzt, die primäre Aminogruppe des Glutathions für eine Derivatisierungsreaktion an. Es wurden verschiedene Derivatisierungsreagenzien getestet. Dansylchlorid oder Fluor-2,4-dinitrobenzol eigneten sich nicht zur Umsetzung. Mit ortho-Phthalaldehyd (OPA) war eine Derivatisierung und folgende HPLC-Trennung der beiden Analyten möglich, nur ergaben sich aufgrund der

alkalischen Derivatisierungsbedingungen (pH = 9,5) Stabilitätsprobleme für GS-DMS. Das beste Ergebnis ließ sich durch den Einsatz von 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC) und folgender Fluoreszenzdetektion erzielen. Die Derivatisierung konnte bei einem pH von 7,6 durchgeführt werden. Die Stabilität von GS-DMS für die Standzeit der Proben im automatischen Probengeber war gewährleistet (Abb. 7.6).

7.2.4.1.1 Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid

Alle Schritte der FMOC-Derivatisierung erfolgten automatisiert im Probengeber. Nach der Festphasenextraktion und Einstellung des Eluats auf pH = 7,6 (Kap. 7.2.4.1.2) folgte die Zugabe von 50 µl einer 10 mM FMOC-Lösung in Acetonitril zu 60 µl der Probe. Nach zwei Minuten Reaktionszeit wurden zum Abstoppen der Reaktion 25 µl einer 20 mM Lösung von Admantylhydrochlorid in Acetonitril/H₂O 2:1 (v/v) zugesetzt. Nach weiteren 30 Sekunden wurden 20 µl der derivatisierten Probe injiziert. Die Reaktionsgleichung in Abb. 7.3 spiegelt den Derivatisierungsprozeß wieder. Dabei erfolgt ein nucleophiler Angriff der primären Aminogruppe von GS-MMS bzw. GS-DMS an dem Kohlenstoff des Säurechlorids von 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid unter Ausbildung eines Amids (Addition-Eliminations-Mechanismus).

7.2.4.1.2 Probenvorbereitung

Die direkte Vermessung von Null-Proben aus den CaCo-2-Transwells nach Derivatisierung mit FMOC mittels der mit der in Kapitel 7.2.4.1.3 beschriebenen Methode führte zu erheblichen Störsignalen, die eine Quantifizierung von GS-DMS unmöglich machten (Abb. 7.4 A). Um dieses Problem zu umgehen, war die Entwicklung einer Festphasenextraktions-Methode notwendig. Die Optimierung dieser Methode fand schrittweise statt. Verschiedene Festphasenkartuschen, Konditionierungslösungen, Waschlösungen und -volumina sowie unterschiedliche Elutionsmittel und -volumina wurden erprobt. Als geeignete Festphase zur Extraktion der beiden Glutathionaddukte GS-MMS und GS-DMS erwies sich ein Material (p-[2-(*N*-aminoethyl)aminomethyl]polystyrol), das eine Kombination aus Umkehrphase und schwachem Anionenaustauscher darstellte (Strata-X-AW,

Phenomenex, Aschaffenburg), Abb. 7.5).

Jeweils 500 µl der basalen Proben bzw. 250 µl der apikalen Proben wurden mit 1500 µl 25 mM Acetatpuffer pH = 4,6 versetzt.

Die Konditionierung der 30 mg Strata-X-AW Festphasenkartuschen erfolgte mit 1 ml Methanol gefolgt von 1 ml 5 mM Acetatpuffer pH = 4,6. Die Säule wurde für 30 Sekunden unter Vakuum getrocknet. Nach Aufgabe von 2 ml Probe bestand der Waschschrift in der Zugabe von 1 ml 5 mM Acetatpuffer pH = 4,6/Methanol 95:5 (v/v). Hierauf folgte ein weiterer Trocknungsschritt für zwei Minuten. Die Probe wurde mit 1 ml 100 mM Boratpuffer pH = 9,0/Acetonitril 70:30 (v/v) eluiert. Die Stärke und der pH des verwendeten Boratpuffers erwiesen sich als notwendig, um die Analyten wieder vollständig von dem Festphasenmaterial zu eluieren. Da das Volumen der apikalen Proben 250 µl betrug, unterlagen sie durch die Festphasenextraktion einer Verdünnung von 1:4 im Gegensatz zu den basalen Proben (1:2). Der Faktor 2 wurde bei der Berechnung der Ergebnisse der apikalen Proben in Bezug auf die Kalibrierung (Kap. 7.2.4.1.4) berücksichtigt.

50 µl der Eluate nach Festphasenextraktion wurden mit 10 µl einer 1 M Borsäure auf pH = 7,6 eingestellt, derivatisiert und mittels HPLC vermessen.

7.2.4.1.3 HPLC-Methode

Ein Gradient, der bis auf 100 % Acetonitril anstieg, erwies sich als notwendig, um überschüssiges Derivatisierungsreagenz in einer akzeptablen Laufzeit von der Säule zu eluieren (139).

HPLC-Pumpe	HITACHI L-2130
Detektor	Fluoreszenz HITACHI L-2485
Autosampler	Gerstel MPS-3
Integrator	EZChrom Elite Chromatographie-Datensystem (Version 3.1.7) (VWR, Darmstadt)
Entgaser	Gilson 864 (Middleton, USA)
Säulenofen	25 °C Jetstream (W.O. Electronics, Langenzersdorf, Österreich)

Stationäre Phase	Reprosil Pur C8, 5 μm , 250 \times 4 mm mit Phenomenex Vorsäule C8 (Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch)			
Mobile Phase	A: 100 mM Acetatpuffer pH = 4,6 B: Acetonitril			
Gradient	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	A [%]	B [%]
	0-0,5	0,8	87	13
	0,5-6	0,8	65	35
	6-10	0,8	65	35
	10-15	0,8	0	100
	15-25	0,8	0	100
	25-30	0,8	13	87
	30-37	0,8	13	87
Detektion	$\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 313 \text{ nm}$			
Injektionsvolumen	20 μl			
Retentionszeit	GS-MMS: 10,5 \pm 0,5 min GS-DMS: 13,2 \pm 0,5 min			

7.2.4.1.4 Kalibrierung

Für GS-MMS und GS-DMS wurde zur Quantifizierung eine 6-Punkt-Kalibrierung (0,1 μM – 4 μM) durchgeführt, in dem definierte Konzentrationen in HBSS-Puffer hergestellt wurden. 500 μl der Standards wurden wie in Kapitel 7.2.4.1.2 aufgearbeitet. Bedingt durch die hohe Detektorempfindlichkeit konnten Standards von maximal 4 μM direkt vermessen werden.

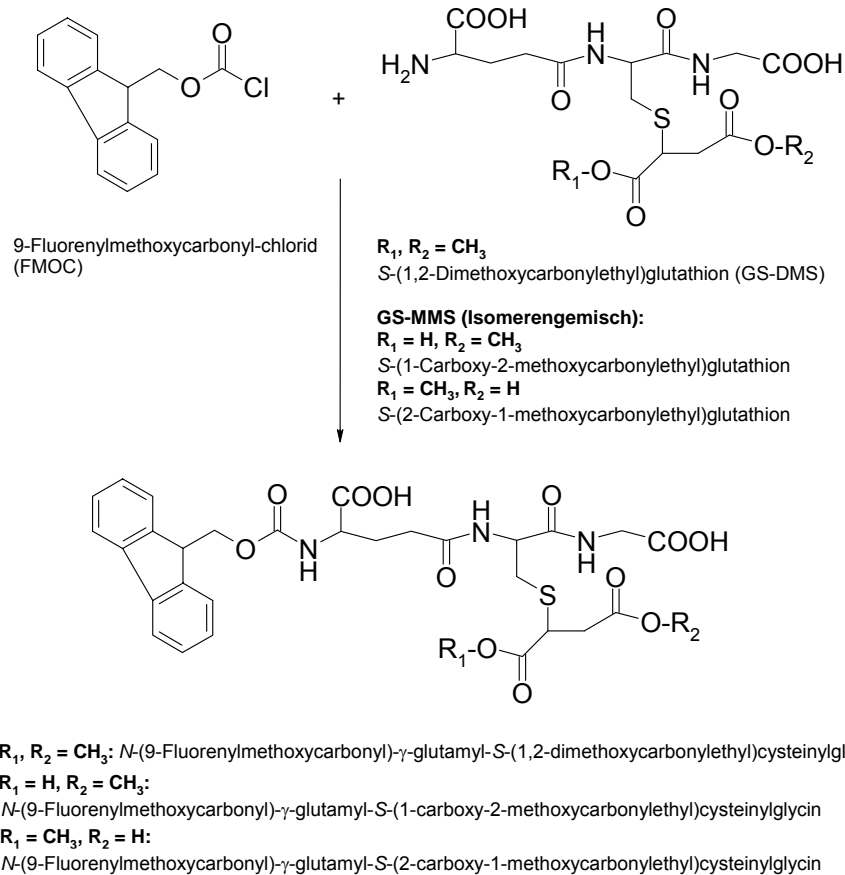


Abb. 7.3: Derivatisierung von GS-DMS und GS-MMS mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid

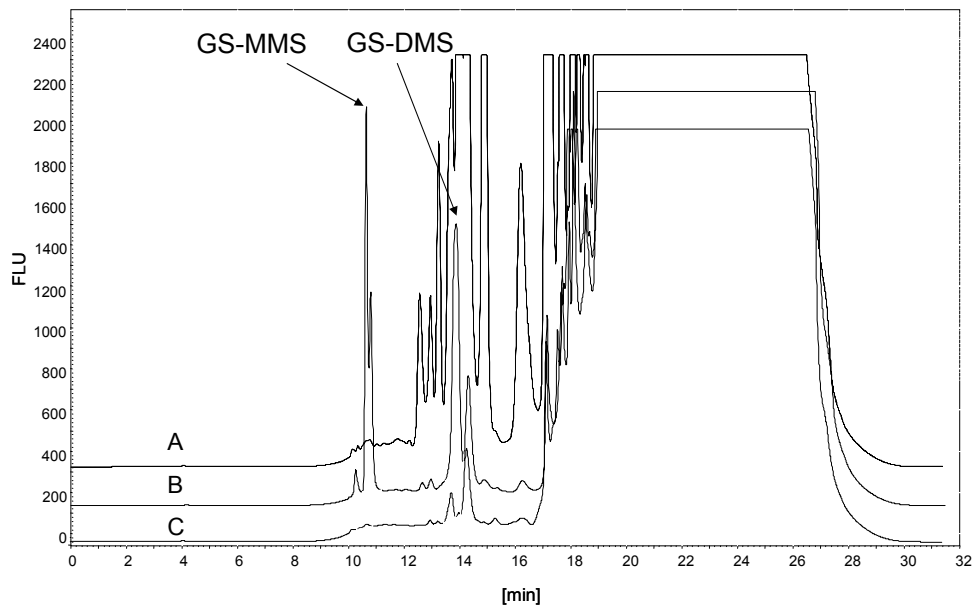


Abb. 7.4: Effizienz der etablierten SPE-Methode für GS-MMS und GS-DMS (A) Vermessung einer Probe des basalen Kompartiments nach Inkubation eines CaCo-2-Transwells mit HBSS-Puffer für 90 min, (B) Standard von GS-MMS und GS-DMS, (C) Vermessung der Probe von (A) nach Festphasenextraktion

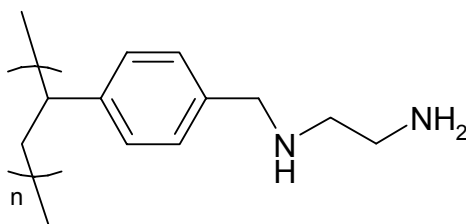


Abb. 7.5: Struktur des Festphasen-Materials von Strata-X-AW:
p-[2-(*N*-Aminoethyl)aminomethyl]polystyrol

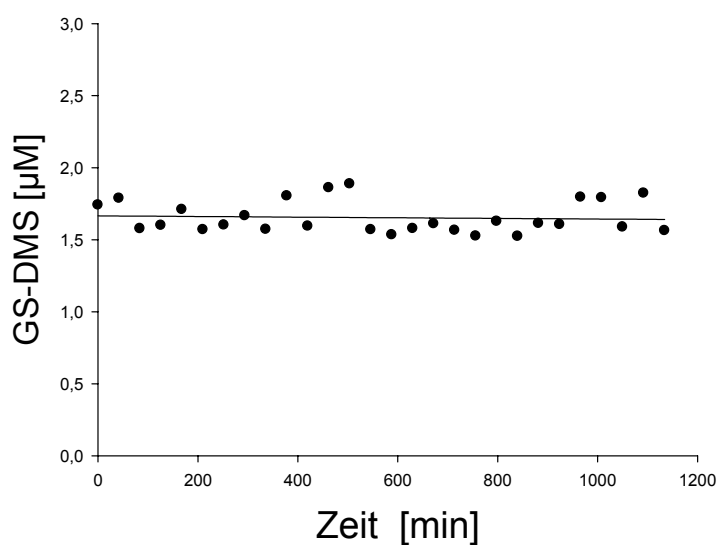


Abb. 7.6: Stabilität von GS-DMS nach Festphasenextraktion und Einstellen der Probe auf pH = 7,6

7.2.4.2 Detektion von FA, MMF und DMF

Sowohl die Analytik für FA als auch die für MMF, DMF und MEF war analog den in Kapitel 8.2.2 beschriebenen. Jedoch mussten die Proben keiner Festphasenextraktion unterzogen werden, sondern konnten direkt vermessen werden.

7.2.4.2.1 Probenvorbereitung

Um die Stabilität von MMF, MEF und DMF während der Standzeit im automatischen Probengeber zu gewährleisten, wurde durch Zugabe von 3 µl 0,2 M HCl zu 100 µl Probe der pH-Wert des HBSS-Puffers auf pH = 4 eingestellt.

7.2.4.2.2 Kalibrierung

Zur Quantifizierung von FA wurde eine 5-Punkt- (0,5 μM – 10 μM), von MEF eine 7-Punkt- (1 μM – 50 μM) und von MMF und DMF eine 9-Punkt-Kalibrierung (1 μM - 200 μM) durchgeführt, wobei definierte Stoffmengen in dem für die Transportstudien genutzten HBSS-Puffer gelöst und gleich der Proben mit 3 μl 0,2 M HCl pro 100 μl Standard angesäuert wurden.

7.2.4.3 Bestimmungsgrenzen

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze für FA, MMF, MEF, DMF GS-MMS, und GS-DMS wurde HBSS-Puffer mit den Analyten gezielt versetzt, so dass immer kleiner werdende Endkonzentrationen resultierten. Die Standards von FA und den FAE wurden gleich den Proben mit 3 μl 0,2 M HCl pro 100 μl Probe angesäuert.

Die Proben der Glutathionaddukte wurden der Festphasenextraktion unterzogen und mit 10 μl 1 M Borsäure auf pH = 7,6 eingestellt und anschließend vermessen. Die Konzentration des jeweiligen Analyten, die noch ein Signal-Rausch Verhältnis von \sim 5:1 aufwies, war die Bestimmungsgrenze.

7.3 Ergebnisse

7.3.1 Etablierung eines CaCo-2-Transwell[®]-Systems

Mit den in Kapitel 7.2.3.2 beschriebenen optimierten Zellkulturbedingungen konnten sowohl nach einer Kulturdauer von 10-12 Tagen als auch nach 21 Tagen CaCo-2-Monolayer, die einen TEER-Wert von $\geq 300 \Omega \times \text{cm}^2$ aufwiesen, angezüchtet werden.

Bei der Bestimmung der LY-Passage mittels Fluoreszenzmessung waren alle Kalibrierfunktionen im untersuchten Konzentrationsbereich linear. Exemplarisch ist eine Kalibriergerade in Abb. 7.7 dargestellt. Die Versuche waren valide, wenn $\leq 1 \%$ LY den CaCo-2-Layer passieren konnte.

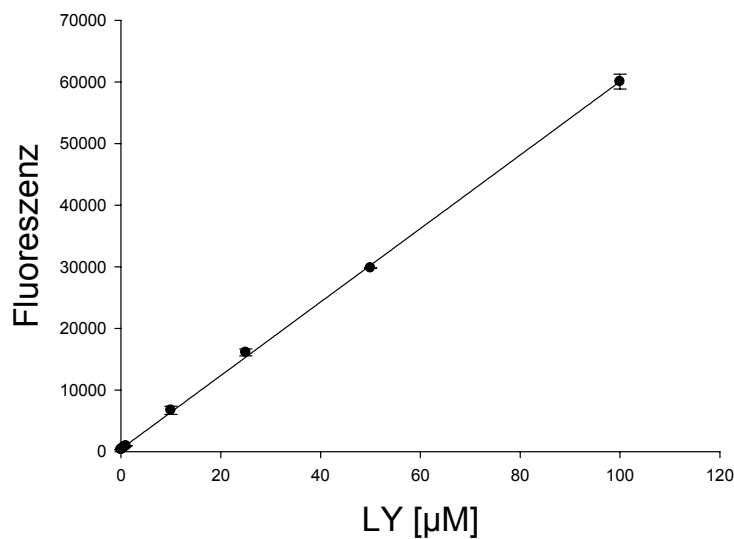


Abb. 7.7: Repräsentative Kalibrierung der Bestimmung von Luzifer Gelb ($r^2 = 0,9997$)

7.3.2 HPLC-Analytik

7.3.2.1 Detektion von GS-DMS und GS-MMS

Durch Derivatisierung mit FMOc gefolgt von einer chromatographischen Trennung mittels HPLC war eine fluorimetrische Detektion von derivatisiertem GS-MMS und GS-DMS möglich. Aus dem Festphasenmaterial einer Strata-X-AW Kartusche wurde durch die gewählten Extraktionsbedingungen eine Substanz koeluiert, die mit dem Peak von GS-DMS interferierte. Die Fläche des Störsignals erwies sich als reproduzierbar.

7.3.2.2 Kalibrierung

Zur Quantifizierung von GS-MMS und GS-DMS wurde mit den in Kapitel 7.2.4.1.4 beschriebenen Methoden eine Kalibrierung durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfäche des resultierenden Peaks der jeweiligen Substanz. Alle Funktionen der Kalibrierungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (GS-MMS $r^2 = 0,9996$; GS-DMS $r^2 = 0,9289$).

7.3.2.3 Detektion von FA, MMF, MMF und DMF

7.3.2.4 Kalibrierung

Zur Quantifizierung von FA, MMF, MEF und DMF wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfäche des resultierenden Peaks der jeweiligen Substanz. Alle Funktionen der Kalibrierungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb. 7.8).

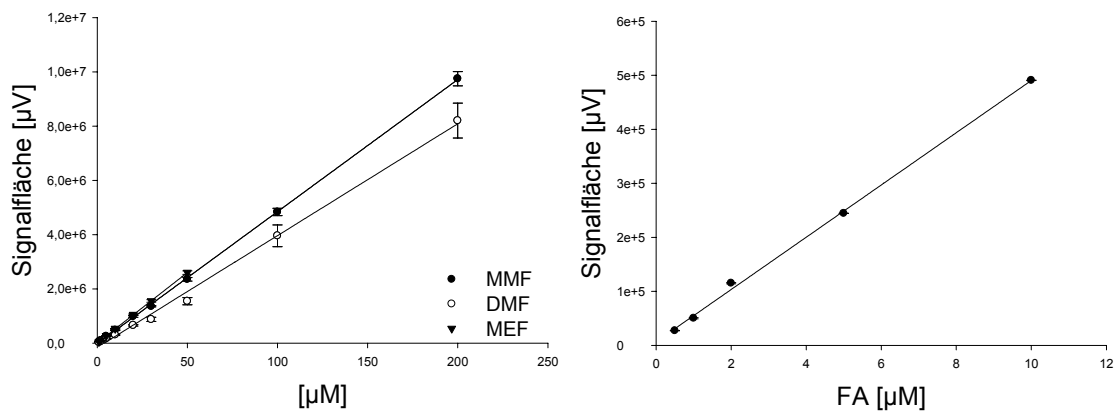


Abb. 7.8: Kalibrierung von FA, MMF, MEF und DMF in HBSS-Puffer (pH = 4) (FA $r^2 = 0,9987$; MMF $r^2 = 0,9988$; MEF $r^2 = 1$; DMF $r^2 = 0,9978$). Die Signalfächen sind $x \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen.

7.3.2.5 Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmungsgrenze für FA lag bei 0,1 µM. Die Bestimmungsgrenzen für MMF, MEF und DMF lagen bei je 0,25 µM. Für GS-MMS konnte eine Bestimmungsgrenze von 0,05 µM und GS-DMS von 0,5 µM ermittelt werden.

7.3.3 Transportstudien

Wie in Abb. 7.9 am Beispiel von MEF dargestellt, ergab sich bei den Transportstudien mit MEF und MMF eine gleichmäßige Zunahme der Stoffe pro Zeiteinheit im basalen Kompartiment nach Inkubation des apikalen Kompartiments. Aus der Steigung der resultierenden Geraden, die den Wert dQ/dt darstellte, ließen sich die P_{app} -Werte mittels der Formel 7.1 berechnen. Bei Inkubation mit MEF 50 μM ergab sich ein Permeabilitätskoeffizient von $17,7 \pm 6,3 \times 10^6 \text{ cm s}^{-1}$; mit MEF 20 μM betrug dieser $5,5 \pm 1,7 \times 10^6 \text{ cm s}^{-1}$. Bei der Vermessung der basalen Proben nach Inkubation mit 50 μM MMF ließ sich ein P_{app} -Wert von $2,8 \pm 1,3 \times 10^6 \text{ cm s}^{-1}$ bestimmen. Inkubationen mit MMF 20 μM führten zu Konzentrationen im basalem Kompartiment, die nicht mehr quantifizierbar waren, da sie unter der Bestimmungsgrenze von 0,5 μM lagen. Der P_{app} -Wert war daher nicht bestimmbar (Tab. 7.2).

In den Abbildungen 7.10 – 7.15 wurden auf der X-Achse der Diagramme stets die aus den gemessenen Konzentrationen der apikalen und basalen Proben berechnete Stoffmenge des jeweiligen Analyten angegeben. Dies begründete sich darin, dass das Volumen im apikalen Kompartiment des verwendeten Transwell®-Systems 0,5 ml beträgt und das basale 1,5 ml. Die Konzentration der Analyten, die den CaCo-2-Layer von der apikalen zur basalen Seite überwinden, unterliegt daher auch einer Verdünnung. Um die Verhältnisse in einem Transwell eindeutig wiederzugeben, war die Betrachtung der Stoffmengen von Vorteil. In einer ersten Versuchsreihe wurden 0,5 ml 50 μM oder 20 μM DMF (entspricht 25 nmol bzw. 10 nmol DMF) auf den CaCo-2-Monolayer gegeben; nach 30 und 60 min wurden jeweils 500 μl Probe aus dem basalen Teil des Transwells gewonnen und durch 500 μl frischen vorgewärmten HBSS-Puffer ersetzt. Nach 90 min wurden dann Proben aus den apikalen und basalen Kompartimenten gewonnen. Der resultierende Verdünnungsfaktor für die Proben des basalen Kompartiments wurde in der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt. Im basalen Kompartiment konnte DMF nicht nachgewiesen werden, da die Konzentration unter der Bestimmungsgrenze lag. Auch im apikalen Teil wurde nach 90 min Inkubation nur eine geringe Menge an DMF detektiert (0,2 nmol von ursprünglich 26 nmol). DMF wurde in großem Ausmaß zu MMF hydrolysiert, welches im basalen und apikalen Teil nachweisbar war (Abb. 7.10). Sowohl im apikalen als auch im

basalen Kompartiment lagen die Konzentrationen von GS-DMS oder GS-MMS unter der Bestimmungsgrenze. Nur sehr geringe Stoffmengen von FA waren im apikalen Teil des Transwells nachzuweisen. Es ist ersichtlich, dass eine Differenz zwischen der Summe aus allen ermittelten apikalen und basalen Stoffmengen von FA, MMF, DMF, GS-DMS, GS-MMS („Summe“ in Abb. 7.10) und der initialen Stoffmenge an DMF besteht.

In Abbildung 7.11 ist das Anfluten von MMF im basalen Kompartiment nach apikaler Applikation von DMF in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der größte Teil dieses Prozesses schon innerhalb von 30 min abgelaufen war. Um auch die Verhältnisse im apikalen Teil untersuchen zu können, wurde in einer weiteren Versuchsreihe ein CaCo-2-Transwell[®] pro Zeitpunkt mit DMF inkubiert und apikale als auch basale Proben vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7.12 wiedergegeben. Hier ist zu erkennen, dass DMF innerhalb einer halben Stunde fast vollständig aus dem apikalen Kompartiment verschwindet. Nur geringe Mengen ließen sich im basalen Kompartiment nach 30 min nachweisen und nahmen bis zum Endpunkt des Versuches nach 90 min nicht weiter zu. Auch hier war MMF apikal und basal zu detektieren, wobei der größte Teil korrelierend zu der Abnahme an DMF innerhalb der ersten 30 min gebildet wurde. Untersuchungen der Proben auf FA ließen nur die Bestimmung geringer Mengen im apikalen, nicht aber im basalen Kompartiment zu.

Experimente mit 100 nmol DMF, in denen pro Transwell[®] nach 30, 60 und 90 min basale Proben gewonnen wurden (s.o.), ließen den Nachweis von DMF im basalen Kompartiment in größeren Stoffmengen zu (Abb. 7.13).

Es zeigte sich, dass DMF schon nach 30 min maximal im basalen Kompartiment angeflutet war (Abb. 7.14). Wie für z.B. MEF konnte keine lineare Zunahme des Stoffes pro Zeiteinheit im basalen Kompartiment beobachtet werden. Wird der P_{app} -Wert für DMF aus dem 30 min Wert berechnet, so beträgt dieser $56,4 \pm 9,2 \times 10^6$ cm/s und ist mit den aus der Literatur bekannten Werten ($DMF_{50\text{ nmol}}: 54,3 \pm 4,6 \times 10^6$ cm/s und $DMF_{250\text{ nmol}}: 64,8 \pm 4,7 \times 10^6$ cm/s) gut vergleichbar (48).

In sehr geringen Mengen konnten auch GS-DMS und GS-MMS apikal und basal nachgewiesen werden (Abb. 7.13). Das Anfluten von GS-DMS im basalen Kompartiment ist in Abb. 7.15 dargestellt.

Zur Überprüfung, ob GS-DMS oder GS-MMS aktiv einen CaCo-2-Layer passieren kann, erfolgte die Inkubation eines 21-Tage Monolayers mit 200 μM (100 nmol) GS-MMS oder GS-DMS. Es konnte auch nach Zusatz von ATP, um ATP-abhängige Transporter zu aktivieren, kein GS-MMS oder GS-DMS im basalen Kompartiment nachgewiesen werden.

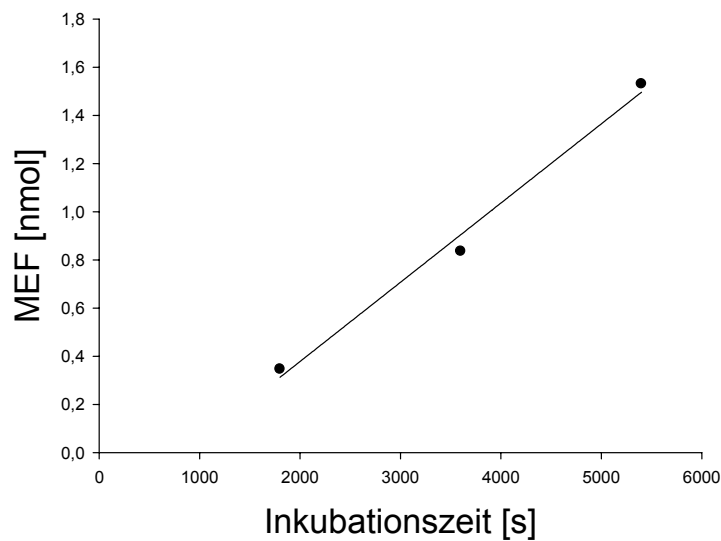


Abb. 7.9: Anfluten von MEF im basalen Kompartiment nach Inkubation des apikalen Kompartiments mit 0,5 ml einer Lösung von 50 μM MEF. $r^2 = 0.9899$

Substanz	c_0 apikal [nmol]	$P_{\text{app}} \times 10^6 \frac{\text{cm}}{\text{s}}$	Anzahl der Versuche
MEF	25	$17,7 \pm 6,3$	n = 4
	10	$5,5 \pm 1,7$	n = 2
MMF	25	$2,8 \pm 1,3$	n = 4
	10	nicht bestimmbar	n = 2

Tab. 7.2: Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) in HBSS (pH = 7,4) von MMF und MEF

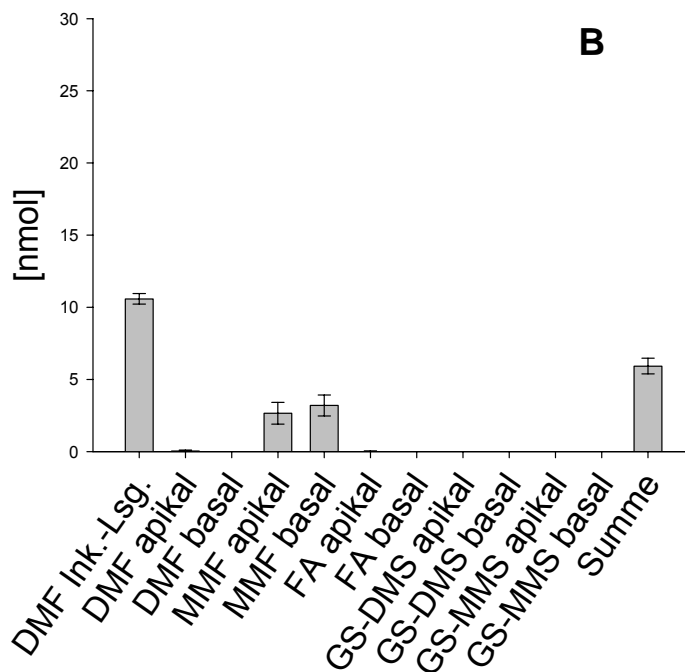
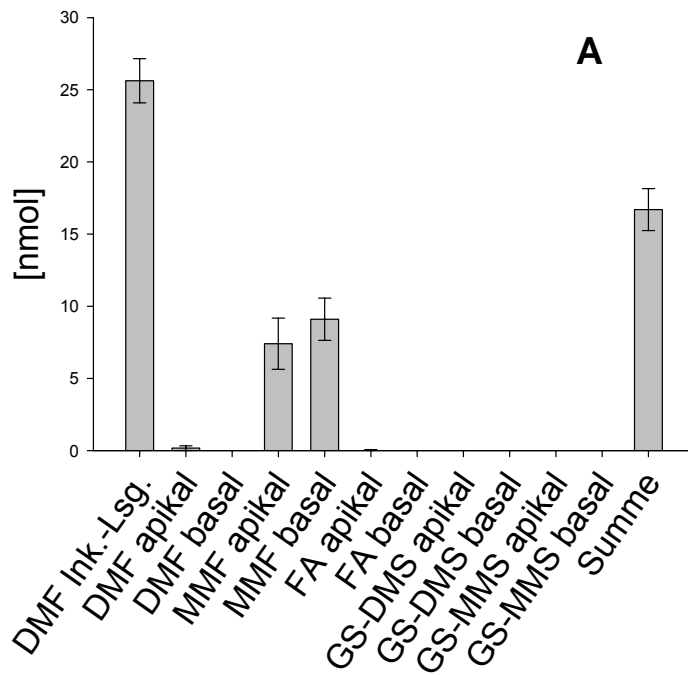


Abb. 7.10: Stoffmengen von DMF und MMF nach 90 min Inkubation von CaCo-2-Transwells mit (A) 25 nmol DMF oder (B) 10 nmol DMF. Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 6$ Versuchen.

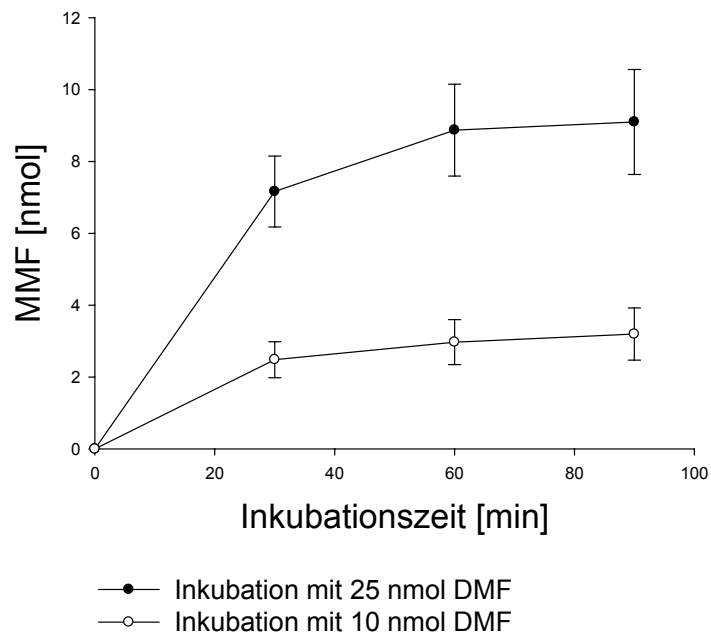
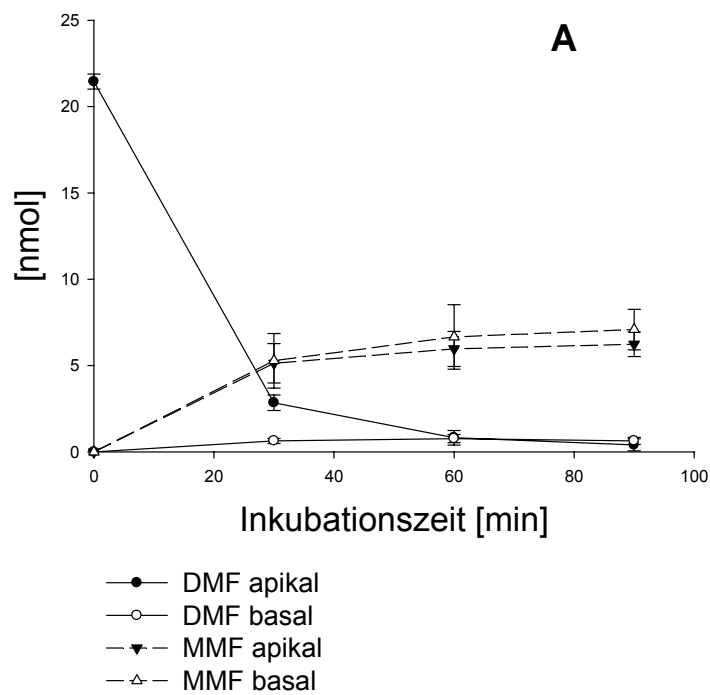


Abb. 7.11: Anfluten von MMF nach Inkubation des apikalen Kompartiments eines CaCo-2-Transwell® Systems mit 25 nmol DMF oder 10 nmol DMF. Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 6$ Versuchen.



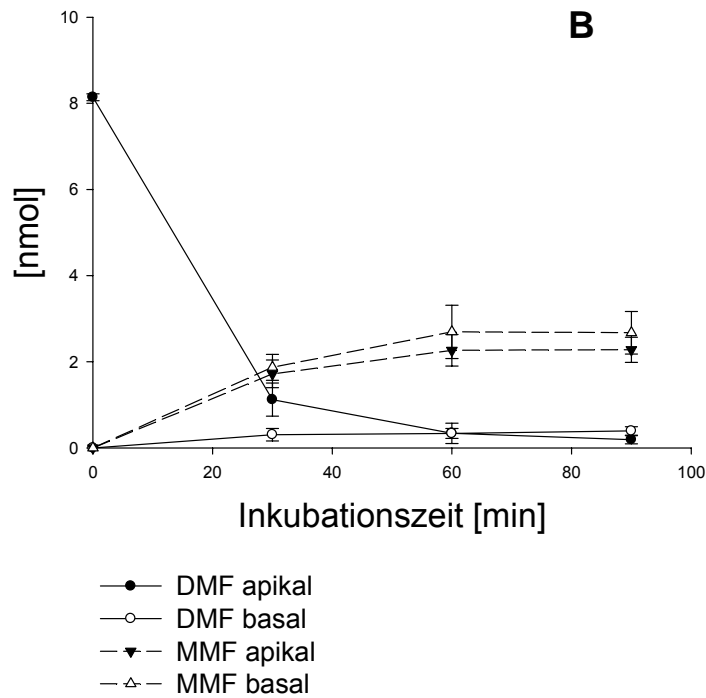


Abb. 7.12: Inkubation des apikalen Kompartiments von CaCo-2-Transwells[®] mit (A) 25 nmol DMF und (B) 10 nmol DMF für 30, 60 oder 90 min. Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 4$ Versuchen

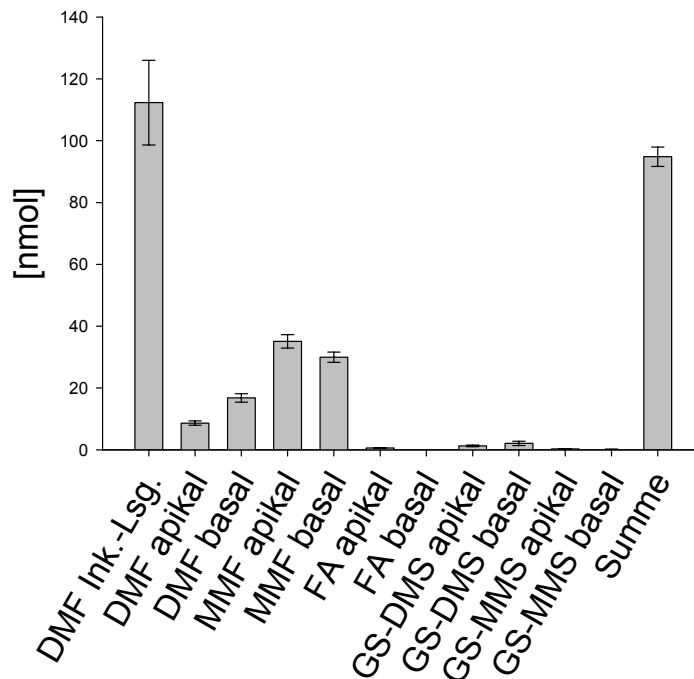


Abb. 7.13: Stoffmengen von DMF, MMF, GS-DMS und GS-MMS nach 90 min Inkubation von CaCo-2-Transwells mit 100 nmol DMF. Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 5$ Versuchen.

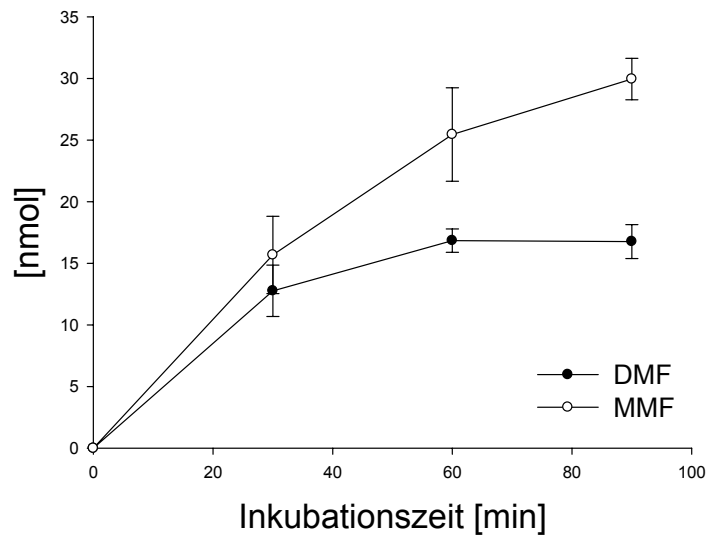


Abb. 7.14: Anfluten von DMF und MMF im basalen Kompartiment nach Inkubation des apikalen Kompartiments eines CaCo-2-Transwell® Systems mit 100 nmol DMF. Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 5$ Versuchen.

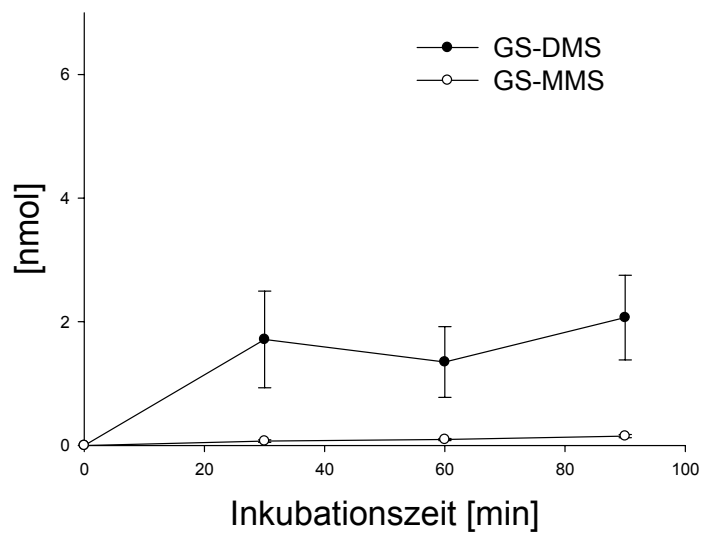


Abb. 7.15: Anfluten von GS-DMS im basalem Kompartiment nach Inkubation von CaCo-2-Transwells mit 100 nmol DMF. Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 5$ Versuchen.

7.4 Diskussion

Mit den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von CaCo-2-Monolayern mit DMF (25 nmol bzw. 10 nmol) im Vergleich zu MMF in gleichen Konzentrationen zu einem schnellen Anfluten von MMF im basalen Kompartiment führt. Dies ist auf die unterschiedliche Lipophilie der beiden Substanzen und daher ihr Vermögen, Zellmembranen zu durchdringen, zurückzuführen (vgl. Kapitel 2). Auch im apikalen Kompartiment war MMF, nach voriger Inkubation der CaCo-2-Zellen mit DMF, zu detektieren. Korrelierend hierzu wurde eine schnelle Abnahme von DMF im apikalen Teil des Transwells beobachtet. DMF flutete aber nur in sehr geringen Mengen im basalen Teil an. Die Hydrolyse von DMF zu MMF ist auf die in CaCo-2-Zellen exprimierten Esterasen zurückzuführen. Erst die Inkubation mit einer höheren DMF-Stoffmenge (100 nmol) führte zu einem schnellen und ausgeprägtem Anfluten von DMF im basalen Kompartiment. Der aus diesen Daten errechnete P_{app} -Wert beträgt $56,4 \pm 9,2 \times 10^6$ cm/s und sagt eine hohe Absorption für DMF voraus. Das Anfluten von DMF im basalen Kompartiment ist also abhängig von der initialen Stoffmenge an DMF pro Quadratzentimeter eines CaCo-2-Monolayers. Dies lässt sich mit der begrenzten Kapazität von Esterasen erklären, die nur eine bestimmte Anzahl an DMF-Molekülen pro Zeiteinheit umsetzen können. Wird diese Kapazität durch das Anfluten zu vieler Moleküle überschritten, kann DMF den Monolayer in einem größerem Maße durchdringen ohne verstoffwechselt zu werden.

GS-DMS wurde nur nach Inkubation mit 100 nmol DMF in sehr geringen Mengen sowohl im basalem als auch im apikalen Kompartiment detektiert. Auch GS-MMS, welches durch chemische Hydrolyse aus GS-DMS entstanden war, da GS-DMS kein Substrat für Esterasen darstellt (vgl. Kap. 10), konnte in geringsten Mengen nachgewiesen werden.

Wie schon in Kapitel 1.3.4 und 5 besprochen, muss die Ausschleusung eines Glutathion-Adduktes aktiv erfolgen. Die Überprüfung, ob Transporter auch GS-DMS oder GS-MMS aktiv in die Zelle aufnehmen können, konnte durch Inkubation von CaCo-2-Zellen mit diesen GSH-Addukten ausgeschlossen werden, da sie nicht im basalen Kompartiment anfluteten.

Zusammengefasst ergibt sich folgendes Bild:

1. DMF dringt sehr schnell in CaCo-2-Zellen ein, wird intrazellulär z.T. zu MMF hydrolysiert, das dann wiederum in Richtung des basalen oder apikalen Teils des Transwells aus der Zelle austritt. Bei genügend hoher lokaler Konzentration von DMF kann es unverstoffwechselt den Monolayer passieren.
2. MMF selbst kann einen CaCo-2-Layer verhältnismäßig schlecht passieren. DMF stellt in diesem Zusammenhang ein Prodrug für MMF dar, da durch Applikation von DMF im apikalen Kompartiment MMF schneller und in größerem Ausmaß im basalen Kompartiment anflutet als wenn mit MMF inkubiert wird. Eine weitere Hydrolyse von MMF zu FA erfolgt nur in sehr geringem Ausmaß.
3. Ein sehr kleiner Teil von DMF addiert an intrazelluläres GSH von Zellen eines CaCo-2-Monolayers und wird als GS-DMS in das apikale oder basale Kompartiment ausgeschleust. Das sowohl im basalen als auch im apikalen Teil bestimmte GS-MMS entsteht durch chemische Hydrolyse, da GS-DMS kein Substrat für Esterasen darstellt (vgl. Kap. 10).
4. Einmal intrazellulär gebildetes und aus den Zellen heraustransportiertes GS-DMS und dessen Hydrolyseprodukt GS-MMS kann einen CaCo-2-Layer nicht wieder durch aktiven Transport überwinden.

Da *in vivo* NAC-DMS in höheren Konzentrationen im Urin nachgewiesen werden konnte, muss nicht metabolisiertes DMF die Darmmukosa überwunden haben und in den Blutkreislauf gelangt sein (vgl. Kapitel 8). Aus den durchgeführten Experimenten geht hervor, dass ein großer Teil von DMF aber schon in der Mukosa zu MMF umgewandelt wird, das dann zu einem Teil in die systemische Zirkulation, zum anderen Teil wieder in das Darmlumen übergeht. Aus dem Darmlumen wird MMF nur gering absorbiert werden. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass eine lokale Mindeststoffmenge an DMF notwendig ist, damit dieses die Darmmukosa passieren kann. Dies wird durch das Fertigarzneimittel Fumaderm[®], bei dem es sich um schnell freisetzende, magensaftresistente Tabletten mit je 120 mg DMF handelt, gewährleistet.

8 *IN VIVO* STUDIEN ZUR BIOTRANSFORMATION VON FUMARSÄUREESTERN

8.1 Einleitung und Zielsetzung

Die anti-entzündlichen Effekte von DMF, die in zahlreichen *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden konnten, ließen den Schluss zu, dass DMF, nicht aber sein Metabolit MMF, die Wirkform in der Therapie mit Fumarsäureestern darstellt. MEF, das ebenfalls ein Bestandteil von Fumaderm[®] ist, spielt für die klinische Wirkung keine Rolle (vgl. Kapitel 1.4.2).

In einer *in vivo* Studie wurde gesunden Probanden eine Tablette bestehend aus 120 mg DMF und 95 mg MEF in nüchternem und nicht nüchternem Zustand verabreicht (45). Nach definierten Zeitpunkten wurde Blutplasma gewonnen und analysiert. Es konnte zu keinem Zeitpunkt DMF, jedoch dessen Metabolit MMF, im Plasma nachgewiesen werden. Weiterhin waren die Konzentrationen von Fumarsäure im Plasma zu jedem Zeitpunkt unterhalb der Nachweisgrenze.

Auch nach intravenöser Gabe von DMF an Schweinen gelang ein Nachweis von DMF nicht, obwohl die Blutproben nach Injektion in engen Zeitintervallen, nämlich nach 3, 5, 10 und 20 min, gewonnen wurden (50).

Aufgrund der fehlenden Plasmaspiegel von DMF und der geringen Potenz von MMF anti-entzündlichen Effekte *in vitro* zu zeigen, war die *in vitro* – *in vivo* Korrelation bezüglich der Wirkform der FAE nicht gegeben und damit der Wirkmechanismus unklar. Auch die ursprüngliche Hypothese von Schweckendiek, dass DMF ein Prodrug von FA sei, konnte aufgrund fehlender Plasmaspiegel von FA nach Gabe von Fumaderm[®] nicht nachvollzogen werden (vgl. Kap. 1.2.1).

Die hier beschriebene *in vivo* Studie wurde erstmals mit Psoriasis-Patienten, die mit Fumaderm[®] therapiert wurden, durchgeführt. Es sollte geprüft werden, ob auch *in vivo* Glutathionaddukte im Metabolismus von FAE eine Rolle spielen. Da DMF sehr schnell in Zellen penetriert (vgl. Kap. 5, 7), sollten Blutzellen und Plasmaproben auf FA, MMF, DMF, GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS untersucht werden. Hierzu waren analytische Verfahren zur Detektion der Substanzen in Plasma und Blutzellen zu

etablieren. Weiterhin wurden Urinproben gewonnen, in denen NAC-MMS, NAC-MES und NAC-DMS bestimmt werden mussten.

8.2 Material und Methoden

8.2.1 Material und Geräte

Zur Blutabnahme wurden 10 ml EDTA-Monovetten mit Monovetten-Kanüle (Sarstedt) verwendet.

Acetonitril (J.T.Baker); isotone Kochsalzlösung (Braun, Melsungen); Ameisensäure, Kaliumdihydrogenphosphat, Tetrabutylammonium-hydrogensulfat, (Fluka); Ammoniumacetat, Essigsäure, Natriumhydroxid (Merck); Strata-X, Strata-SAX (Phenomenex); GS-DMS, GS-MMS, NAC-DMS, NAC-MES (Isomerengemisch aus *N*-Acetyl-*S*-(1-carboxy-2-ethoxycarbonylethyl)cystein und *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxy-1-ethoxycarbonylethyl)cystein, NAC-MMS (Isomerengemisch aus *N*-Acetyl-*S*-(1-carboxy-2-methoxycarbonylethyl)cystein und *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxy-1-methoxycarbonylethyl)cystein (Arbeitskreis Schmidt); FA, DMF, MEF, MMF (Sigma-Aldrich);.

Gefriertrockner Alpha 2-4 (Christ, Osterode); Eppendorf Centrifuge 5810 R; Biofuge fresco (Heraeus).

8.2.2 Analytische Methoden

8.2.2.1 Einleitung und Zielsetzung

Eine ausreichend empfindliche Detektion von FA, MMF, MEF und DMF lässt sich nur im niedrigen UV-Bereich (200 – 230 nm) erzielen, bei dem auch viele Bestandteile von biologischen Proben absorbieren. Essentiell für die Analytik von Fumarsäure und Fumarsäureestern in biologischem Material war die Probenvorbereitung. In vorherigen Arbeiten, die sich mit der Entwicklung geeigneter analytischer Verfahren beschäftigten, und in der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche HPLC-Säulen (RP-18, RP-8, Hydro-RP) und Reversed-Phase-Bedingungen (isokratisch oder verschiedene Gradienten mit ACN oder Methanol in Kombination mit

unterschiedlichen Puffersystemen und pH-Werten) getestet. Unabhängig von den chromatographischen Bedingungen und der Probenvorbereitung (Präzipitation der Proteine durch Zugabe von eiskaltem Acetonitril, Methanol oder Trifluoressigsäure) ergab sich immer das Problem, dass Probenbestandteile, die im niedrigen UV-Bereich eine hohe Absorption zeigten, nicht von den Analyten chromatographisch abgetrennt oder durch die Probenvorbereitung eliminiert werden konnten und unter allen getesteten Bedingungen mit FA und MMF koeluierten, so dass eine Quantifizierung mit einer ausreichenden Empfindlichkeit unmöglich war. Als wesentlich für die Analytik von FA, MMF und MEF stellte sich die Verwendung des Ionenpaarbildners Tetrabutylammonium-hydrogensulfat heraus. Durch dessen Einsatz wurden die Retentionszeiten von FA und den Monoestern unter RP-Bedingungen erhöht. Diese wären ansonsten auch nach der von Reddingius optimierten Probenvorbereitung mit nicht eliminierten Verunreinigungen der Probe koeluiert (47). Allerdings war die Probenvorbereitung recht langwierig und erforderte die exakte Einhaltung der in Abb. 8.1 angegebenen Bedingungen. Insbesondere das Abdampfen der Etherphase nach erfolgter Flüssig-Flüssig-Extraktion war ein fehleranfälliger Schritt. DMF aber auch die Monoester sind flüchtig. Eine akzeptable Wiederfindung für die Monoester konnte nur unter Einsatz eines sehr geringen Luftstroms (5 l/min) erzielt werden. DMF war so leicht flüchtig, dass es durch diese Probenvorbereitung nahezu vollständig aus der Probe entfernt wurde. Mit der beschriebenen Probenvorbereitung ließen sich daher nur FA, MMF und MEF extrahieren und anschließend analysieren. DMF musste aus einem weiteren Teil der Probe nach Präzipitation der Proteine mit Acetonitril unter Verwendung einer weiteren RP-Analytik (isokratisch, Fließmittel: Wasser/MeOH) bestimmt werden.

Das Ziel der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Methodenentwicklung war es eine einfach zu handhabende und robuste Probenvorbereitung zu etablieren und die chromatographischen Bedingungen zu optimieren.

Aufgrund dessen, dass GS-MMS, GS-DMS, NAC-MMS, NAC-MES und NAC-DMS kein chromophores System besitzen, und der komplexen Matrix der Proben wurden zur Bestimmung dieser Analyten analytische Verfahren entwickelt, die auf der Detektion mit einem Massenspektrometer nach Auftrennung mittels HPLC basierten (LC/MS-Analytik).

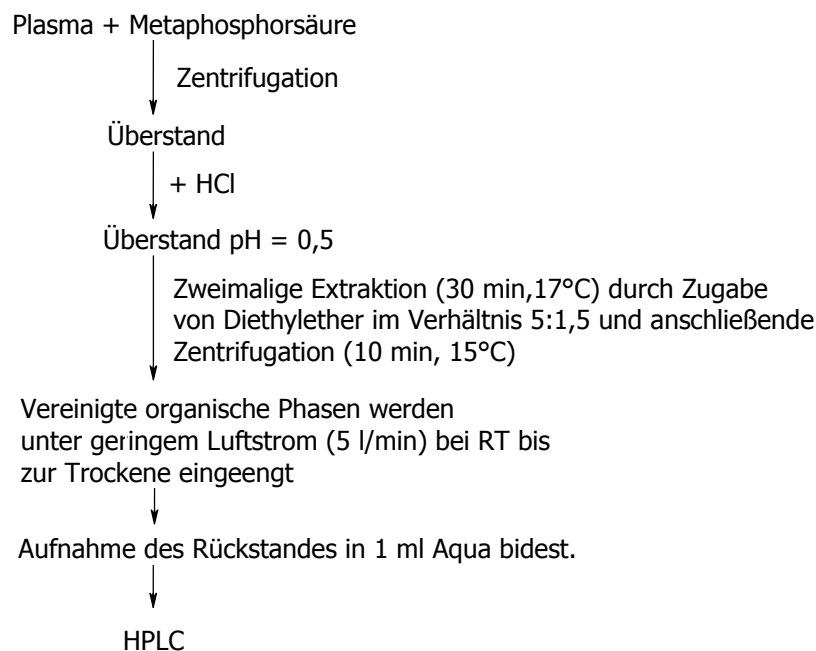


Abb. 8.1: Probenvorbereitung zur Extraktion von FA, MMF und MEF aus humanem Plasma nach Reddingius (47).

8.2.2.2 HPLC-Analytik von Fumarsäureestern

8.2.2.2.1 Probenvorbereitung

Die Festphasenextraktion stellte sich als geeignete Methode zur Probenvorbereitung heraus. Die Optimierung der Bedingungen für die Festphasenextraktion fand schrittweise statt. Verschiedene Festphasenkartuschen wurden erprobt. Insbesondere die geringe Lipophilie von FA im Vergleich zu den anderen Analyten erlaubte keine gleichzeitige Extraktion von FA, MMF, MEF und DMF aus den Proben. Auf Festphasen wie z.B. Strata-SAX (Anionenaustauscher-Material), an denen FA gebunden werden konnte ließ sich DMF nicht retinieren. Auch ließ sich FA in der protonierten Form nicht an RP-Material binden. Mit einer Mischphase bestehend aus schwachem Anionenaustauscher- und RP-Material (Strata-X-AW) waren ebenfalls keine befriedigenden Ergebnisse zu erzielen. Als geeignete Festphase zur Extraktion von MMF, MEF und DMF erwies sich ein RP-Sorbens (p-(2-oxo-pyrrolidinomethyl)-polystyrol, Strata-X; Abb. 8.2). Konditionierungslösungen, Waschlösungen und -volumina sowie unterschiedliche Elutionsmittel und -volumina wurden getestet.

HPLC-Pumpe	HITACHI L-2130
Detektor	HITACHI L-2400 (UV/VIS)
Autosampler	Gerstel MPS-3
Integrator	EZChrom Elite Chromatographie-Datensystem (Version 3.1.7; VWR)
Entgaser	Gilson 864 (Middleton, USA)
Säulenofen	25 °C Jetstream (W.O. Electronics)
Stationäre Phase	LiChrospher 60 RP Select B, 5 µM, 250 × 4 mm (Merck) mit Vorsäule 4 × 4 mm
Mobile Phase	A: 50 mM Phosphatpuffer mit 25 mM Tetrabutylammonium-hydrogensulfat pH = 5,5 B: Acetonitril 80:20 (v/v), isokratisch
Flussrate	1 ml/min
Detektion	$\lambda = 215 \text{ nm}$
Injektionsvolumen	20 µl
Retentionszeiten	MMF 7,0 ± 0,5 min DMF 10,2 ± 0,5 min MEF 12,0 ± 0,5 min

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (Filtropur V50 (0,45 µm), Sarstedt) von Partikeln befreit.

8.2.2.2.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Für jede Substanz wurde zur Quantifizierung eine Sechs-Punkt Kalibrierung und Wiederfindung in Plasma oder Blutzelllysat durchgeführt (1 – 30 µM), indem definierte Konzentrationen in Aqua bidest. bzw. eiskaltem (Minimierung der Esteraseaktivität bis zur Zugabe von 0,2 M HCl) Plasma oder Blutzelllysat hergestellt und mittels SPE aufgearbeitet wurden (vgl. Kap. 8.2.2.2.1). Zusätzlich wurde eine Kalibrierung durchgeführt, indem entsprechende Konzentrationen der FAE in Aqua bidest./ACN (70:30 (v/v)) hergestellt, anschließend 1:3 mit Aqua bidest. verdünnt und vermessen wurden.

8.2.2.2.4 Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurde eiskaltes Plasma oder Blutzelllysat gezielt mit den Analyten versetzt, so dass immer kleiner werdende Endkonzentrationen resultierten. Die Konzentration des jeweiligen Analyten, die noch ein Signal-Rausch Verhältnis von $\sim 5:1$ aufwies, war die Bestimmungsgrenze.

8.2.2.3 HPLC-Analytik von Fumarsäure

Die Analytik für Fumarsäure musste unabhängig von den FAE erfolgen, da eine gleichzeitige Extraktion nicht möglich war.

8.2.2.3.1 Probenvorbereitung

Als geeignete Festphase für die Extraktion von Fumarsäure aus EDTA-Plasma oder Blutzelllysat erwies sich ein Anionenaustauscher-Material (quartäre Ammoniumgruppen; Strata-SAX). Konditionierungslösungen, Waschlösungen und -volumina sowie unterschiedliche Elutionsmittel und -volumina wurden getestet. Ein Volumen von 1000 μl EDTA-Plasma konnte ohne weitere Vorbehandlung der Festphasenextraktion zugeführt werden. Da Proben der Blutzellfraktion zu viskos waren, musste ein Teil der Proteine vor der Extraktion präzipitiert werden. Dazu wurde zu einem gefrorenen 500 μl Aliquot der Blutzellen 500 μl MeOH gegeben und die Probe auf Eis aufgetaut. Auf diese Weise konnte einer Gelbildung nach Zugabe des organischen Lösungsmittels vorgebeugt werden. Die Proben wurden zusätzlich mit dem Sonicator lysiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (10000 g , 4 $^{\circ}\text{C}$, 15 min). Der Überstand konnte der Festphasenextraktion unterzogen werden. Die Konditionierung der 100 mg Strata-SAX Festphasenkartuschen erfolgte mit 1 ml Methanol gefolgt von 1 ml Aqua bidest. Die Kartusche wurde für 30 s unter Vakuum getrocknet. Nach Aufgabe der Probe bestand der Waschschrift in der Zugabe von 1 ml 25 mM Phosphatpuffer (pH = 7,0)/Methanol 90:10 (v/v). Hierauf folgte ein weiterer Trocknungsschritt für zwei Minuten. Die Fumarsäure wurde mit 1 ml einer 4 % Ammoniak-Lösung eluiert. 100 μl des Eluats wurden mit 1 μl konz. Phosphorsäure auf pH = 7 eingestellt.

8.2.2.3.2 HPLC-Methoden

Der pH-Wert des Fließmittels wurde auf 7,0 eingestellt (pK_{a2} -Wert von FA = 4,49). Für die chromatographische Trennung erwies sich eine LiChrospher 60 RP Select B, 5 μ M, 250 \times 4 mm HPLC-Säule als geeignet. Aufgrund von interferierenden Peaks der Probenmatrix des Blutzelllysats musste ein Gradient entwickelt werden um FA von störenden Substanzen abzutrennen.

HPLC-Pumpe	HITACHI L-2130			
Detektor	HITACHI L-2400 (UV/VIS)			
Autosampler	Gerstel MPS-3			
Integrator	EZChrom Elite Chromatographie-Datensystem (Version 3.1.7; VWR)			
Entgaser	Gilson 864 (Middleton, USA)			
Säulenofen	25 °C Jetstream (W.O. Electronics)			
Stationäre Phase	LiChrospher 60 RP Select B, 5 μ M, 250 \times 4 mm (Merck) mit Vorsäule 4 \times 4 mm			
Mobile Phase	A: 50 mM Phosphatpuffer mit 25 mM Tetrabutylammonium-hydrogensulfat pH = 7,0 B: Acetonitril			
Plasmaproben:	90:10 (v/v), isokratisch			
Blutzelllysatsproben:				
Gradient	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	A [%]	B [%]
	0 – 9	1,0	93	7
	9 – 10	1,0	88	12
	10 – 25	1,0	88	12
	25 - 26	1,0	93	7
	26 - 35	1,0	93	7
Flussrate	1 ml/min			
Detektion	$\lambda = 215$ nm			
Injektionsvolumen	20 μ l			
Retentionszeiten	FA Plasmaproben: 5,9 \pm 0,2 min			
	FA Blutzelllysats: 6,8 \pm 0,2 min			

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch Vakuumfiltration (Filtropur V50 (0,45 µm), Sarstedt) von Partikeln befreit.

8.2.2.3.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Für Fumarsäure wurde zur Quantifizierung im Plasma eine Fünf-Punkt-Kalibrierung und Wiederfindung (1–20 µM) und zur Bestimmung im Blutzelllysat eine Drei-Punkt-Kalibrierung und Wiederfindung (1–10 µM) durchgeführt, indem definierte Konzentrationen in Aqua bidest. bzw. Plasma oder Blutzelllysat hergestellt und mittels SPE aufgearbeitet und vermessen wurden. Standards in Aqua bidest. wurden zusätzlich ohne Aufarbeitung mittels SPE analysiert.

8.2.2.3.4 Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurde Plasma oder Blutzelllysat gezielt mit Fumarsäure versetzt, so dass immer kleiner werdende Endkonzentrationen resultierten. Die Konzentration, die noch ein Signal-Rausch Verhältnis von ~ 5:1 aufwies, war die Bestimmungsgrenze.

8.2.2.4 LC/MS-Analytik zur Detektion von GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS

Im ersten Abschnitt (s. Kapitel 8.2.3) der *in vivo* Studien standen die Standards GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS zur Verfügung, für die eine LC/MS-Analytik entwickelt wurde.

8.2.2.4.1 Probenvorbereitung

Jeweils 500 µl Plasma oder Blutzelllysat wurden mit 500 µl einer eiskalten 16 % Trifluoressigsäure (TFA)-Lösung versetzt und für 5 min auf Eis gelagert. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (10000 *g*, 10 min, RT) abgetrennt. Der Überstand konnte direkt vermessen werden. Von den Urinproben wurden 10 ml gefriergetrocknet, das Lyophilisat in 1 ml 8 % TFA-Lösung

aufgenommen, für 15 min auf Eis gelagert und die präzipitierten Proteine mittels Zentrifugation abgetrennt.

8.2.2.4.2 LC/MS-Methode

HPLC-Pumpe	Series 1100 Binary Pump			
Detektor	Massenspektrometer Esquire LC (Bruker, Bremen)			
Injektor	Rheodyne 50 µl Probenschleife, manuell			
Integrator	HPChemStation for LC A.06.01 Datensystem (Bruker Daltronics)			
Entgaser	Series 1100 Degasser			
Interface	ESI+, 360 °C			
Trockengas	8 l/min			
Kapillarspannung	-5000 V			
Stationäre Phase	Synergi 4 µm Fusion-RP (250 × 4 mm) mit Vorsäule (Phenomenex)			
Mobile Phase	A: 0,1 % Ameisensäure in Aqua bidest. B: Acetonitril			
Gradient	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	A [%]	B [%]
	0-5	1,0	100	0
	5-11	1,0	50	50
	11-13	1,0	50	50
	13-14	1,0	100	0
	14-22	1,0	100	0
Split	1:8			
Retentionszeiten	GS-MMS	11,9 ± 0,2 min		
	GS-DMS	12,6 ± 0,2 min		
	NAC-DMS	14,2 ± 0,2 min		

Der wässrige Anteil der mobilen Phase wurde durch einen Sartorius Membranfilter filtriert und im Ultraschallbad für 15 min entgast.

8.2.2.4.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Für GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS wurde zur Quantifizierung eine Vier-Punkt-Kalibrierung und Wiederfindung durchgeführt (1 – 10 μM), indem definierte Konzentrationen in Aqua bidest. bzw. Plasma oder Blutzelllysate hergestellt wurden. 500 μl dieser Lösungen wurden 1:1 (v/v) mit einer eiskalten 16 % TFA-Lösung versetzt. Der nach Zentrifugation (10000 g , 10 min, RT) gewonnene Überstand konnte direkt vermessen werden.

8.2.2.4.4 Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen wurde Plasma oder Blutzelllysate gezielt mit GS-DMS, GS-MMS und NAC-DMS versetzt, so dass immer kleiner werdende Endkonzentrationen resultierten. Anschließend erfolgte die Probenvorbereitung wie in Kapitel 8.2.2.4.3. Die Konzentration, die noch ein Signal-Rausch Verhältnis von $\sim 5:1$ aufwies, war die Bestimmungsgrenze.

8.2.2.5 LC/MS-Analytik zur Detektion von NAC-MMS, NAC-MES und NAC-DMS in Urin

8.2.2.5.1 Probenvorbereitung

Von den Urinproben wurden 10 ml gefriergetrocknet und das Lyophilisat in 1 ml eiskalter 8 % TFA in Aqua bidest. gelöst. Die Proben wurden abzentrifugiert (10000 g , 10 min, RT). Der Überstand wurde der LC/MS-Analytik zugeführt.

8.2.2.5.2 LC/MS-Methode

Die verwendete LC/MS-Methode war gleich der in Kap. 8.2.2.4.2 beschriebenen. Die Retentionszeit für NAC-MMS betrug $13,5 \pm 0,2$ min und für NAC-DMS $14,6 \pm 0,2$ min. NAC-MES hat das gleiche Molekulargewicht wie NAC-DMS

(307 g/mol). Es wurde unter den chromatographischen Bedingungen nicht von NAC-DMS Basislinien getrennt (vgl. Kap. 8.3.4).

Zur chromatographischen Trennung von NAC-MES und NAC-DMS wurde anstatt der 0,1 % Ameisensäure als Fließmittel A ein 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH = 4,7) unter sonst gleichen Bedingungen wie in Kapitel 8.2.2.4.2 eingesetzt. Die Retentionszeit von NAC-MMS betrug hier $7,0 \pm 0,2$ min, die von NAC-MES $12,2 \pm 0,2$ min und die von NAC-DMS $13,1 \pm 0,2$ min.

8.2.2.5.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Für NAC-MMS und NAC-DMS wurde eine Drei-Punkt-Kalibrierung und Wiederfindung mit der in Kapitel 8.2.2.4.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Für die Wiederfindung wurden 10 ml Urin gezielt mit den Analyten versetzt, so dass Konzentrationen von 10 μ M, 20 μ M oder 50 mM resultierten. Diese Standards wurden wie die eigentlichen Proben aufgearbeitet (vgl. Kap. 8.2.2.5.1) und vermessen. Da die Proben der Wiederfindung durch die Aufarbeitung um den Faktor 10 aufkonzentriert wurden, dienten 10-fach höhere Konzentrationen der Analyten in einer 8 % TFA-Lösung als Proben für die Kalibrierung.

8.2.2.5.4 Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen wurde Urin gezielt mit NAC-MMS und NAC-DMS versetzt, so dass immer kleiner werdende Endkonzentrationen resultierten. Anschließend erfolgte die Probenvorbereitung wie in Kapitel 8.2.2.5.1. Die Konzentration, die noch ein Signal-Rausch Verhältnis von $\sim 5:1$ aufwies, war die Bestimmungsgrenze des jeweiligen Analyten.

8.2.3 *In vivo* Biotransformationsstudie

8.2.3.1 Studienaufbau

Alle sieben Probanden wurden über das Wesen, die Bedeutung und Tragweite der Studie von einem Arzt aufgeklärt. Ein schriftliches Einverständnis von jedem Probanden lag vor.

Bei allen Probanden handelte es sich um Psoriasis-Patienten, die mit Fumaderm[®] therapiert wurden. Es wurden der Body-Mass-Index (BMI) und das Alter der Probanden erfasst.

Die Studie ist chronologisch gesehen in zwei Abschnitte zu gliedern. Am ersten Abschnitt nahmen drei Probanden teil. Sie waren zwischen 43 und 55 Jahren alt und hatten einen BMI zwischen 24,6 und 32,9 kg/m². Die Probanden setzten vor Versuchsbeginn ihre Fumaderm[®]-Medikation für mindestens 24 h aus, damit Fumarsäureester und ihre Metabolite zu Versuchsbeginn vollständig aus dem Körper ausgeschieden waren. Zusätzlich nahmen alle Probanden für mindestens 10 h vor Versuchsbeginn keine Nahrung zu sich um die Studie unter nüchternen Bedingungen durchführen zu können. Vor Einnahme der Tabletten wurden Nullproben von Blut und Urin gewonnen. Danach nahmen die Probanden zwei Tabletten Fumaderm[®] mit 250 ml Wasser ein. Die erste Mahlzeit wurde 4 h nach Versuchsbeginn eingenommen, um eine vollständige Resorption der Inhaltsstoffe im nüchternen Zustand zu gewährleisten. Während des Versuches wurde nur Wasser getrunken.

Blutproben wurden in 15 min Intervallen während der ersten 90 min, in 30 min Intervallen während der folgenden 150 min und in 60 min Intervallen bis zum Versuchsende nach 360 min genommen. Eine erste Urinprobe wurde zwischen 210 min und 240 min, eine zweite nach 360 min erhalten.

An dem zweiten Abschnitt der Studie nahmen vier Probanden teil. Sie waren zwischen 34 und 68 Jahren alt und hatten einen BMI zwischen 26,7 und 35,2 kg/m². Das Ziel war es 24 h Sammelurin nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm[®] zu gewinnen. Aufgrund der Versuchsdauer von 24 h wurde der Versuch selbständig von den Probanden durchgeführt. Sie erhielten zuvor eine detaillierte mündliche und schriftliche Einweisung in die Versuchsdurchführung. Die Probanden setzten vor Versuchsbeginn ihre Fumaderm[®]-Medikation für mindestens 24 h aus und fasteten

für mindestens 10 h. Vor Einnahme der Tabletten am morgen wurde eine Nullprobe Urin abgegeben und kühl gelagert. Nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm® mit einem Glas Wasser erfolgte die erste Nahrungsaufnahme nach 2 h. Die Probanden sammelten den Urin der nächsten 24 h in mitgegebenen Behältern und waren aufgefordert, diese kühl zu lagern. Von den nach Versuchsende mitgebrachten Urinproben wurde das Volumen bestimmt, ein Teil zu je 10 ml aliquotiert und bis zur Analyse bei -70 °C gelagert.

8.2.3.2 Blutprobengewinnung und -aufarbeitung

Zur Blutentnahme wurde bei allen Probanden am Unterarm eine Braunüle gelegt. Die Braunüle wurde in regelmäßigen Abständen mit steriler isotoner Kochsalzlösung gespült, um ein Verschließen zu vermeiden. Mit EDTA-Monovetten wurden pro Zeitpunkt 7-9 ml Blut entnommen, sofort für fünf Minuten auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (1717 *g*, 15 min, 4 °C). Das so gewonnene Plasma wurde zu 500 µl aliquotiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70 °C gelagert. Aliquots, die der Bestimmung von MMF, MEF und DMF dienten, wurden zuvor mit 0,2 M HCl versetzt, um eine Hydrolyse durch Esterasen zu vermeiden. Die gewonnene Blutzellfraktion (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) wurde drei Mal mit 5 ml isotoner Kochsalzlösung gewaschen (1717 *g*, 10 min, 4 °C). Der Überstand nach jedem Zentrifugationsschritt war klar und somit keine ausgeprägte Hämolyse zu erkennen. Von der gewaschenen Zellfraktion wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. Um die Zellen auszählen zu können war eine Verdünnung der Zellsuspension von 1:10000 mit isotoner Kochsalzlösung notwendig. Anschließend wurde die Blutzellsuspension zu 500 µl aliquotiert und bei -70 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

8.3 Ergebnisse

8.3.1 HPLC-Analytik von Fumarsäureestern

Mit der etablierten SPE-Methode und der optimierten HPLC-Methode stand erstmals eine robuste, leicht zu handhabende Methode zur Verfügung, die eine gleichzeitige Analyse von MMF, MEF und DMF in biologischen Proben zuließ.

8.3.1.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung von MMF, MEF und DMF wurden Kalibrierungen und eine Wiederfindung (mit Plasma und Blutzelllysate) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfläche des resultierenden Peaks der jeweiligen Substanz. Der Vergleich der direkt vermessenen Standards zu denen, die mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet wurden (Kalibrierung mit SPE), zeigte kaum einen Unterschied für MMF sowie DMF und nur einen geringen für MEF. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb. 8.3). Die Wiederfindungsrate wurden in Bezug auf die Kalibrierung ohne SPE berechnet und betrug in Plasma für MMF $96 \pm 13 \%$, für MEF $66 \pm 5 \%$ und für DMF $109 \pm 10 \%$. Ein repräsentatives Chromatogramm nach Extraktion der FAE aus humanem Plasma ist in Abb. 8.6 dargestellt.

Da Blutzelllysate eine hohe Konzentration von GSH aufwies, war die Wiederfindung von insbesondere DMF aber auch MMF und MEF im Blutzelllysate naturgemäß sehr niedrig, da die Substanzen spontan mit GSH reagierten.

Die Wiederfindungsrate im Blutzelllysate belief sich für MMF auf $71 \pm 5 \%$, für MEF auf $56 \pm 2 \%$ und für DMF auf $47 \pm 6 \%$.

8.3.1.2 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze von MMF, MEF und DMF im Plasma und Blutzelllysate lag jeweils bei $1,0 \mu\text{M}$.

8.3.2 HPLC-Analytik von Fumarsäure

Nach Festphasenextraktion waren im Eluat noch Substanzen der Probenmatrix, die mit dem Totvolumen eluiert wurden und zu Störsignalen führten. Da auch Fumarsäure bei einem Acetonitrilanteil von 20 % kaum auf der RP-Phase retinierte, wurde zur Analyse der Plasmaproben ein isokratisches System mit einem Acetonitrilgehalt von 10 % gewählt. Unter den optimierten Bedingungen der Festphasenextraktion wurden MMF, MEF und DMF aus der Probe eliminiert, da sie nicht auf dem Festphasenmaterial der Strata-SAX-Kartusche retinierten. Dies war von Vorteil, da auf diese Weise eine Messung in 13 min durchzuführen war. Wären die FAE nach erfolgter Festphasenextraktion noch in der Probe, hätte die Laufzeit der chromatographischen Trennung deutlich erhöht werden oder ein Gradient genutzt werden müssen, um die FAE zu eluieren.

Für die sehr komplexe Matrix des Blutzelllysats musste ein Gradient entwickelt werden um nicht eliminierte Substanzen der Matrix wieder von der HPLC-Säule zu eluieren bzw. von der FA trennen zu können. Trotz des Gradienten konnte ein Störsignal, das bei der Retentionszeit von FA auftrat, nicht vermieden werden. Die Fläche des Signals erwies sich als reproduzierbar.

8.3.2.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung von FA wurde eine Kalibrierung und Wiederfindung (in Plasma und Blutzelllysate) durchgeführt. Der Vergleich der direkt vermessenen Standards zu denen, die mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet wurden (Kalibrierung mit SPE), zeigte, dass durch die Probenvorbereitung keine FA verloren ging (Abb. 8.4). Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfläche des resultierenden Peaks. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb. 8.4). Die Wiederfindungsrate wurde in Bezug auf die Kalibrierung ohne SPE berechnet und betrug in Plasma 89 ± 14 %. Aufgrund des Störsignals, das aus der Matrix des Blutzelllysats stammte, konnten Kalibrierung und Wiederfindung nicht direkt verglichen werden.

8.3.2.2 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze von FA in Plasma lag bei 0,5 μM . Für Blutzelllysate betrug diese 1 μM .

8.3.3 LC/MS-Analytik zur Detektion von GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS

Zur Detektion von GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS wurde eine LC/MS-Methode entwickelt, da die Analyten kein chromophores System aufwiesen und es sich mit Plasma und Blutzelllysate um komplexe Matrices handelt. Als bessere Ionisationsmethode erwies sich ESI im Vergleich zu APCI (Atmospheric pressure chemical ionisation). Die Ionenausbeute und damit die Empfindlichkeit war für NAC-DMS am geringsten.

8.3.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung von GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS wurde eine Kalibrierung und Wiederfindung (in Plasma und Blutzelllysate) durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfläche der Ionenspur des jeweiligen Molekülpeaks $[\text{M}+\text{H}]^+$. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb. 8.5). Die Wiederfindungsrate im Plasma für GS-MMS betrug $98 \pm 13 \%$, für GS-DMS $96 \pm 11 \%$ und für NAC-DMS $120 \pm 20 \%$. Im Blutzelllysate betrug diese für GS-MMS $82 \pm 20 \%$, für GS-DMS $71 \pm 19 \%$ und für NAC-DMS $60 \pm 10 \%$.

8.3.3.2 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze im Plasma war für GS-MMS und GS-DMS 1 μM und für NAC-DMS 2 μM . Im Blutzelllysate betrug diese für GS-MMS und GS-DMS ebenfalls 1 μM und für NAC-DMS 3 μM .

8.3.4 LC/MS-Analytik zur Detektion von NAC-MMS, NAC-MES und NAC-DMS in Urin

Im ersten Abschnitt (Kap. 8.2.3) der durchgeführten *in vivo* Versuche standen nur die Standards von GS-MMS, GS-DMS und NAC-DMS zur Verfügung. Für diese wurde die in Kapitel 8.2.2.4 beschriebene Analytik entwickelt. Mit dieser Analytik konnte NAC-DMS im Urin von Psoriasis-Patienten nach Einnahme von Fumaderm[®] identifiziert werden. Problematisch war die Tatsache, dass die Mercaptursäure von MEF wie die von DMF ein Molekulargewicht von 307 g/mol aufwies und sich nach Erhalt des Standards NAC-MES vom Arbeitskreis Schmidt herausstellte, dass NAC-MES und NAC-DMS unter den chromatographischen Bedingungen (Kap. 8.2.2.4.2) nicht Basislinien getrennt wurden.

Die Identität von NAC-DMS in den Urinproben wurde vor Erhalt des NAC-MES Standards wie folgt abgesichert:

1. Das Fragmentierungsmuster der Substanz aus der Urinprobe mit der Ionenspur 308 Th entsprach dem des NAC-DMS Standards (vgl. Abb. 8.10 mit 8.18)
2. Es wurde ein weiterer *in vivo* Versuch durchgeführt, in dem nur DMF und kein MEF oral verabreicht wurde. Auch in den Urinproben dieses Versuches konnte NAC-DMS im Urin identifiziert werden.

Nach Erhalt des NAC-MES Standards:

1. Das Fragmentierungsmuster des NAC-MES Standards entsprach nicht dem der Substanz aus der Urinprobe.
2. Durch den Einsatz eines 50 mM Ammoniumacetatpuffers (pH = 4,7) als Fließmittel A (FM A) anstatt der 0,1 % Ameisensäure unter ansonsten gleichen chromatographischen Bedingungen, wie in Kapitel 8.2.2.4 beschrieben, konnte eine chromatographische Trennung von NAC-MES und NAC-DMS erreicht werden. Die Retentionszeit der Substanz aus der Urinprobe entsprach der des Standards. Bei der Retentionszeit von NAC-MES konnte kein Signal beobachtet werden.

Auf diese Weise konnte die Identität der Ionenspur 308 Th, die nach Einnahme von Fumaderm[®] im Urin auftrat, geklärt werden. Es handelte sich um NAC-DMS.

Auch ein Vorkommen der Mercaptursäuren von MMF im Urin war theoretisch nicht auszuschließen. Die Nutzung der LC/MS-Analytik erlaubte es Chromatogramme auf diesen möglichen Metaboliten zu untersuchen ohne über einen entsprechenden Standard zu verfügen. So wurden über die Ionenspur 294 Th für NAC-MMS erste Hinweise auf dessen Vorkommen in den Urinproben erhalten. Nach Erhalt des Standards konnten Retentionszeit und Fragmentierungsmuster verglichen werden. Diese bestätigten das Auftreten von NAC-MMS nach Einnahme von Fumaderm[®] (vgl. Abb. 8.8 mit 8.19).

Durch den Einsatz des Ammoniumacetatpuffers (pH = 4,7), der zu einer Basislinientrennung von NAC-MES und NAC-DMS führte, konnten die Analyten aber weniger empfindlich detektiert werden. Die Nachweisgrenze für NAC-MES betrug 5 µM. Alle Urinproben wurden erst auf NAC-MES vermessen. Nachdem NAC-MES im Urin nicht nachgewiesen werden konnte, wurden NAC-MMS und NAC-DMS quantitativ mit der in Kapitel 8.2.2.4.2 beschriebenen Methode bestimmt.

8.3.4.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung von NAC-MMS und NAC-DMS wurde eine Kalibrierung und Wiederfindung durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalfäche der Ionenspuren 294 Th + 252 Th für NAC-MMS und 308 Th für NAC-DMS. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (NAC-MMS _{Kalibrierung} $r^2 = 0,9969$; NAC-MMS _{Wiederfindung} $r^2 = 1$; NAC-DMS _{Kalibrierung} $r^2 = 0,9988$; NAC-DMS _{Wiederfindung} $r^2 = 0,9979$).

Die Wiederfindungsrate für NAC-MMS betrug $52 \pm 5 \%$ und für NAC-DMS $74 \pm 1 \%$.

8.3.4.2 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze für NAC-MMS betrug 2 µM, die für NAC-DMS 0,5 µM

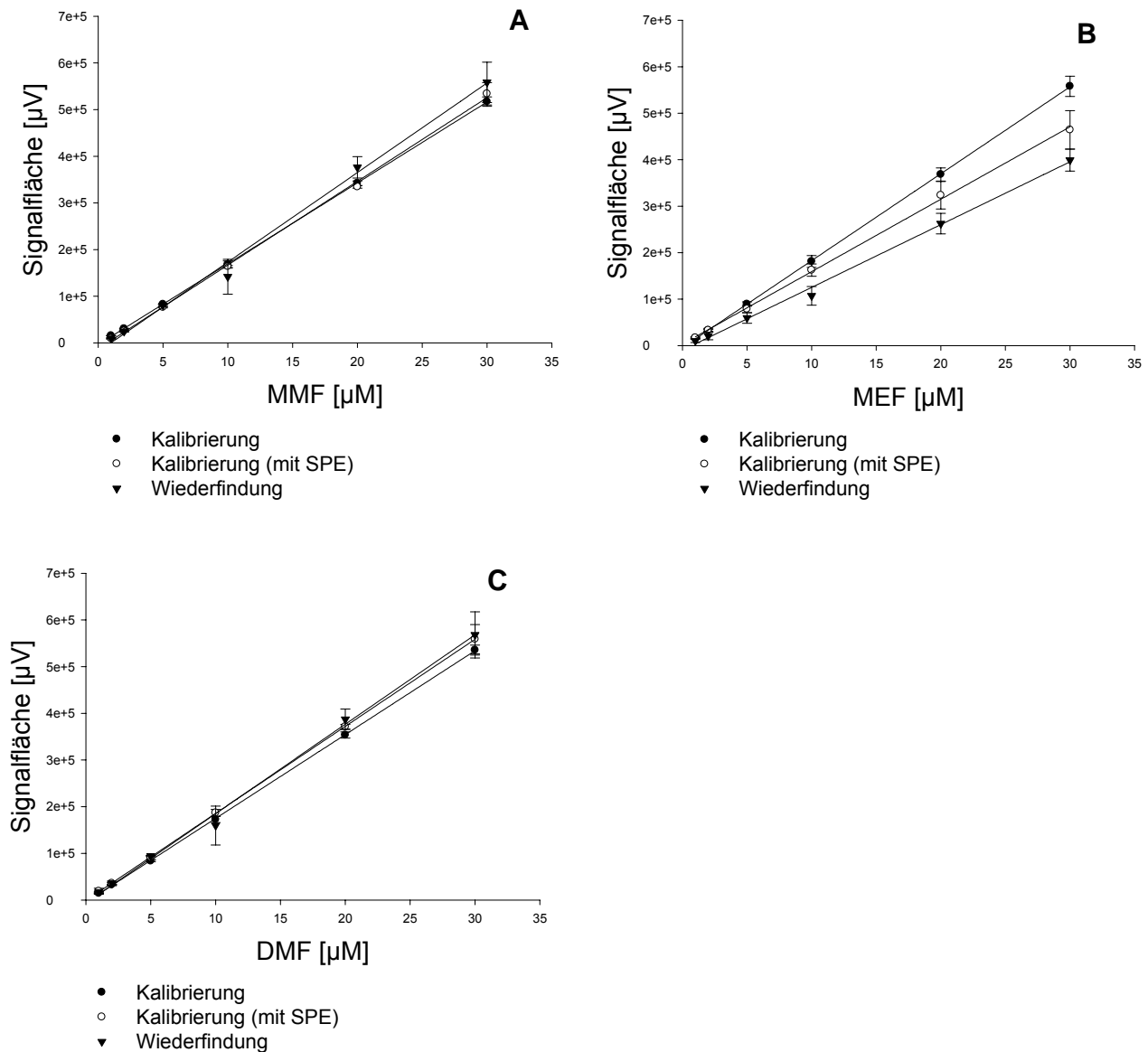


Abb. 8.3: Kalibrierung und Wiederfindung in Plasma von (A) MMF $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 1$, $r^2_{\text{Kalibrierung (mit SPE)}} = 0,9989$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 0,9950$; (B) MEF $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 1$, $r^2_{\text{Kalibrierung (mit SPE)}} = 0,9991$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 0,9967$ und (C) DMF $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 0,9999$, $r^2_{\text{Kalibrierung (mit SPE)}} = 0,9999$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 0,9966$. Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen.

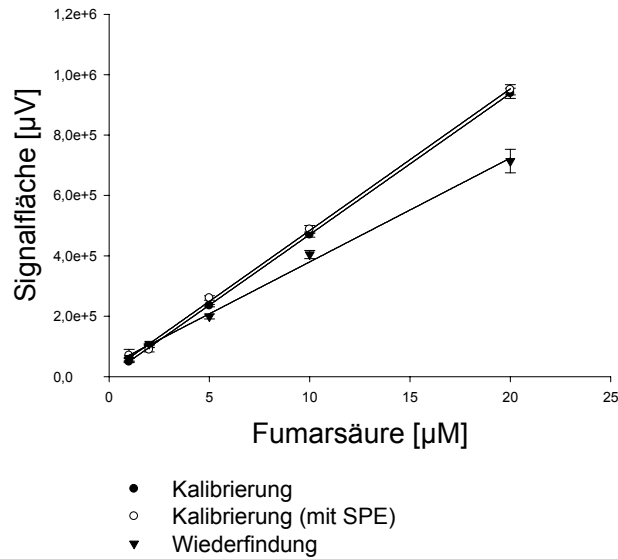


Abb. 8.4: Kalibrierung und Wiederfindung von Fumarsäure in Plasma $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 1$, $r^2_{\text{Kalibrierung (mit SPE)}} = 0,9990$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 0,9970$. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen.

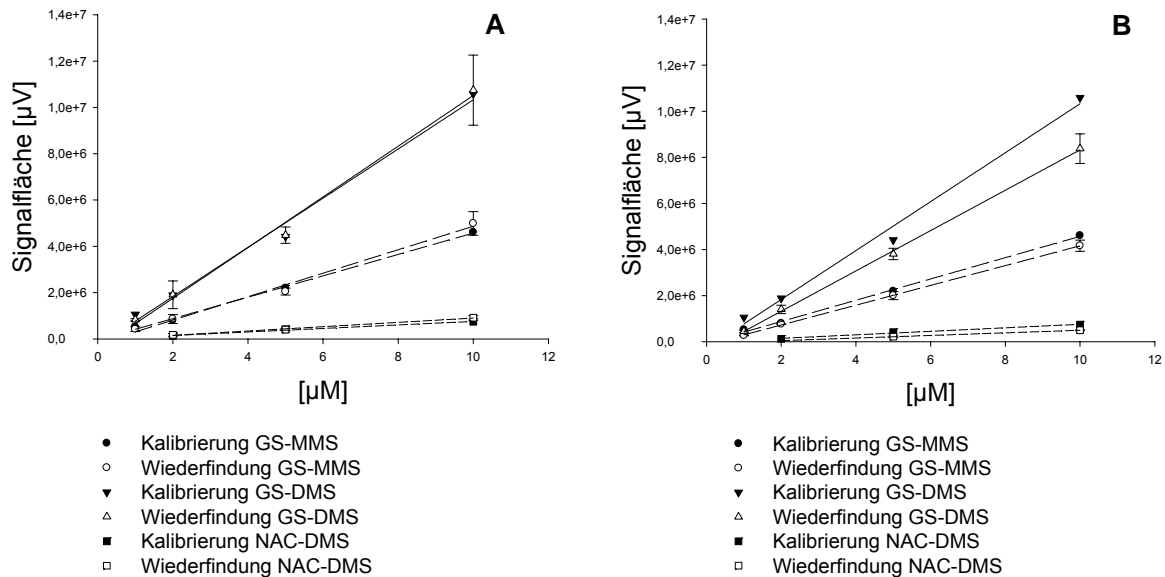


Abb. 8.5: (A) Kalibrierung und Wiederfindung in Plasma: GS-MMS $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 0,9978$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 0,9911$; GS-DMS $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 0,9907$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 0,9929$; NAC-DMS $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 0,9888$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 0,9952$, (B) Kalibrierung und Wiederfindung im Blutzelllysate: GS-MMS $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 0,9978$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 0,9997$; GS-DMS $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 0,9907$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 0,9992$; NAC-DMS $r^2_{\text{Kalibrierung}} = 1$, $r^2_{\text{Wiederfindung}} = 1$. Die Werte der Kalibrierung sind die Mittelwerte aus einem Ansatz, zweimal vermessen. Die Werte der Wiederfindung sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen.

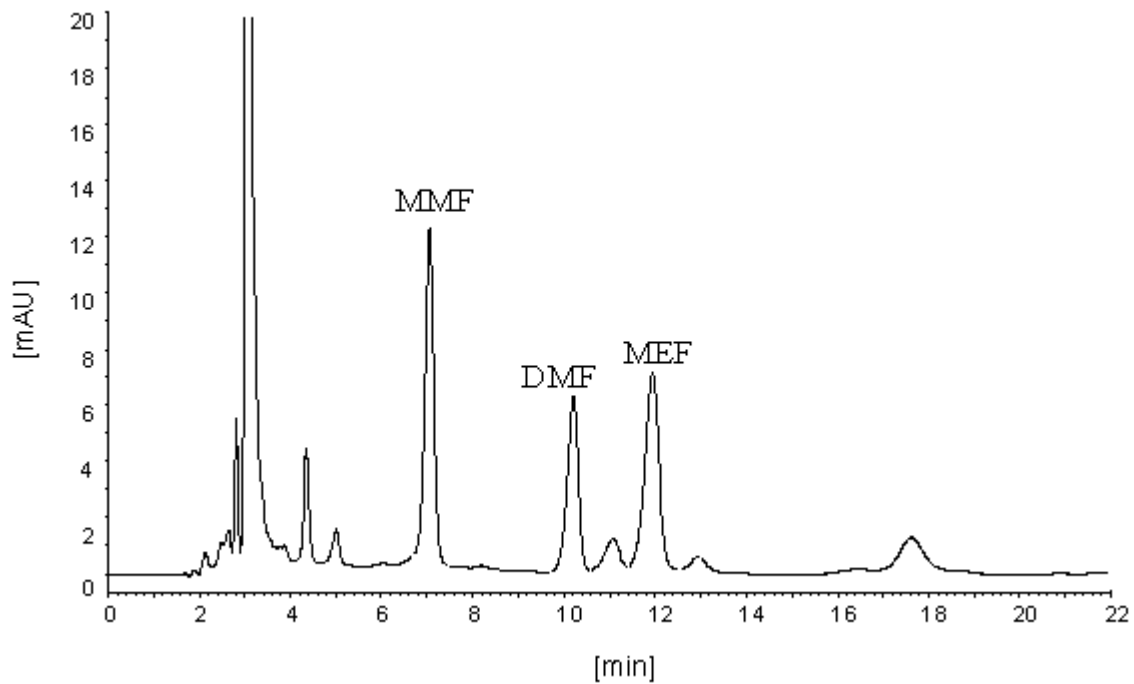


Abb. 8.6: Repräsentatives Chromatogramm von MMF, MEF und DMF nach Festphasenextraktion aus zuvor mit den Analyten versetztem Plasma

8.3.5 Charakteristische Ionenspuren

Neben der für den jeweiligen Analyten typischen Retentionszeit dienen unter Verwendung einer LC/MS-Analytik zusätzlich die charakteristischen Fragmentierungsmuster der Analyten zu deren eindeutigen Identifizierung.

8.3.5.1 GS-MMS und GS-DMS

Die dominierenden Ionen von GS-MMS sind 438 Th, 363 Th und 309 Th, die von GS-DMS 452 Th, 377 Th und 323 Th (Abb. 8.7).

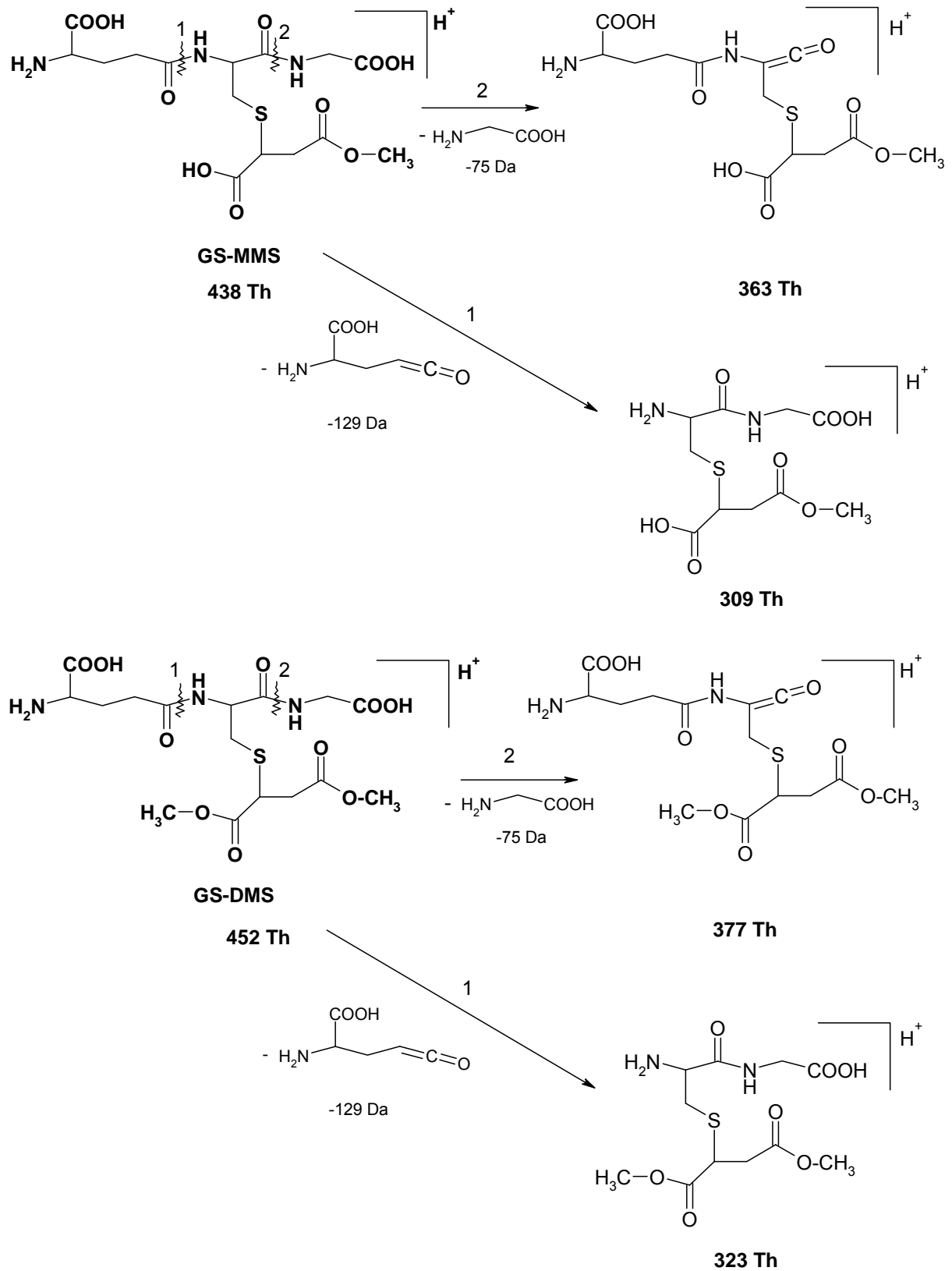


Abb. 8.7: Fragmentierungsmuster von GS-MMS und GS-DMS; Ionenquelle: ESI+

8.3.5.2 NAC-MMS

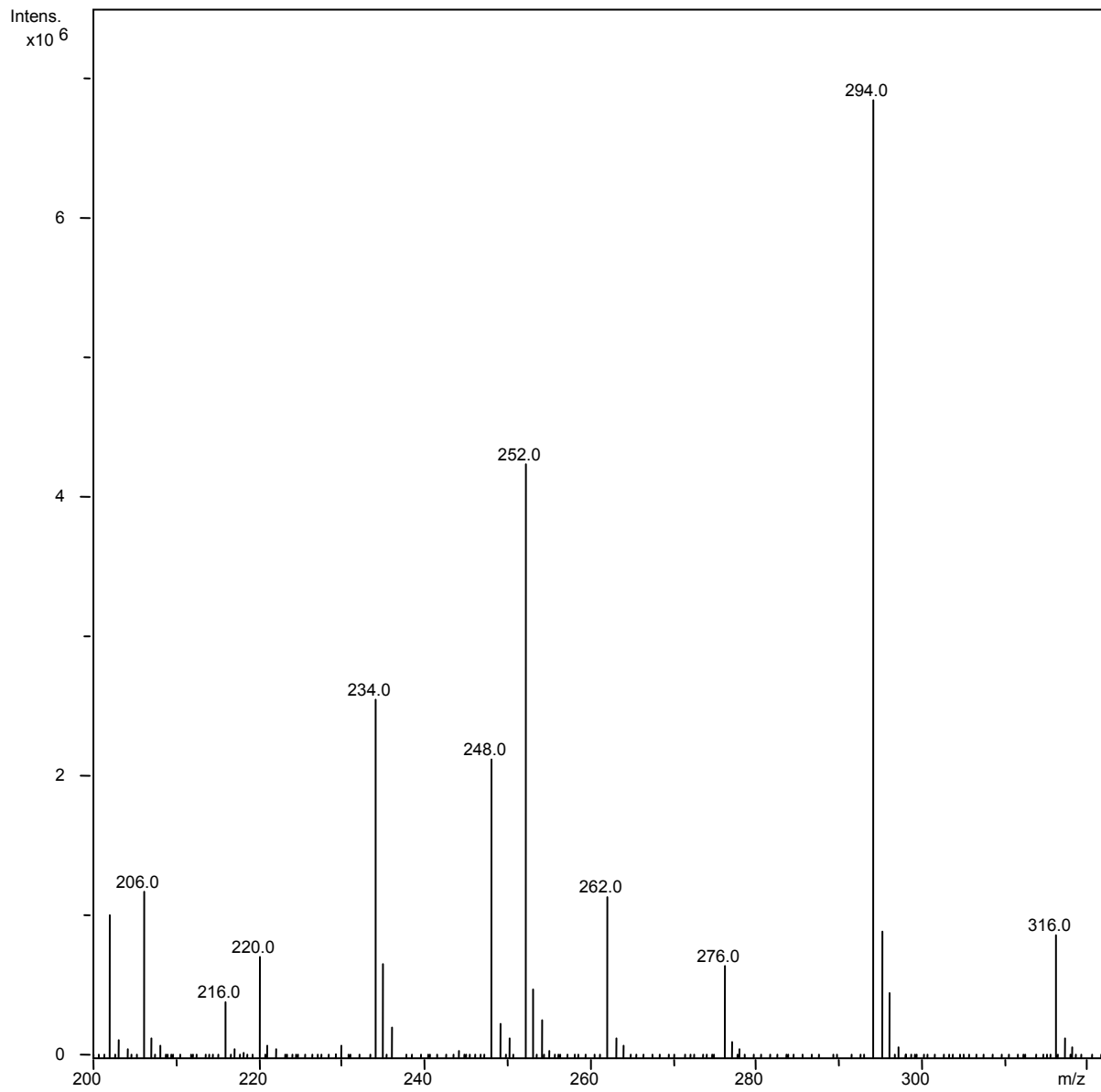
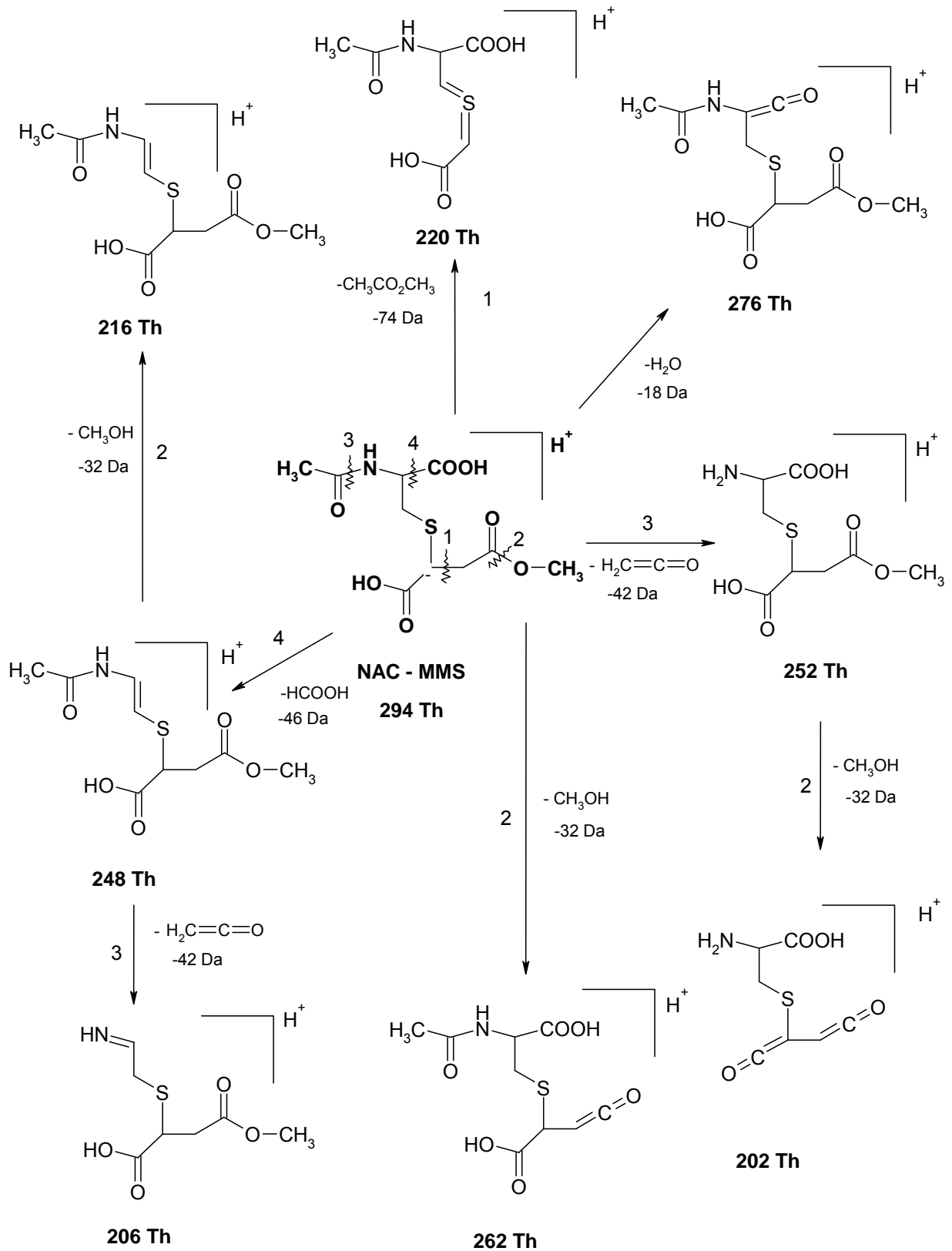


Abb. 8.8: Repräsentatives Massenspektrum von NAC-MMS; Ionenquelle: ESI+



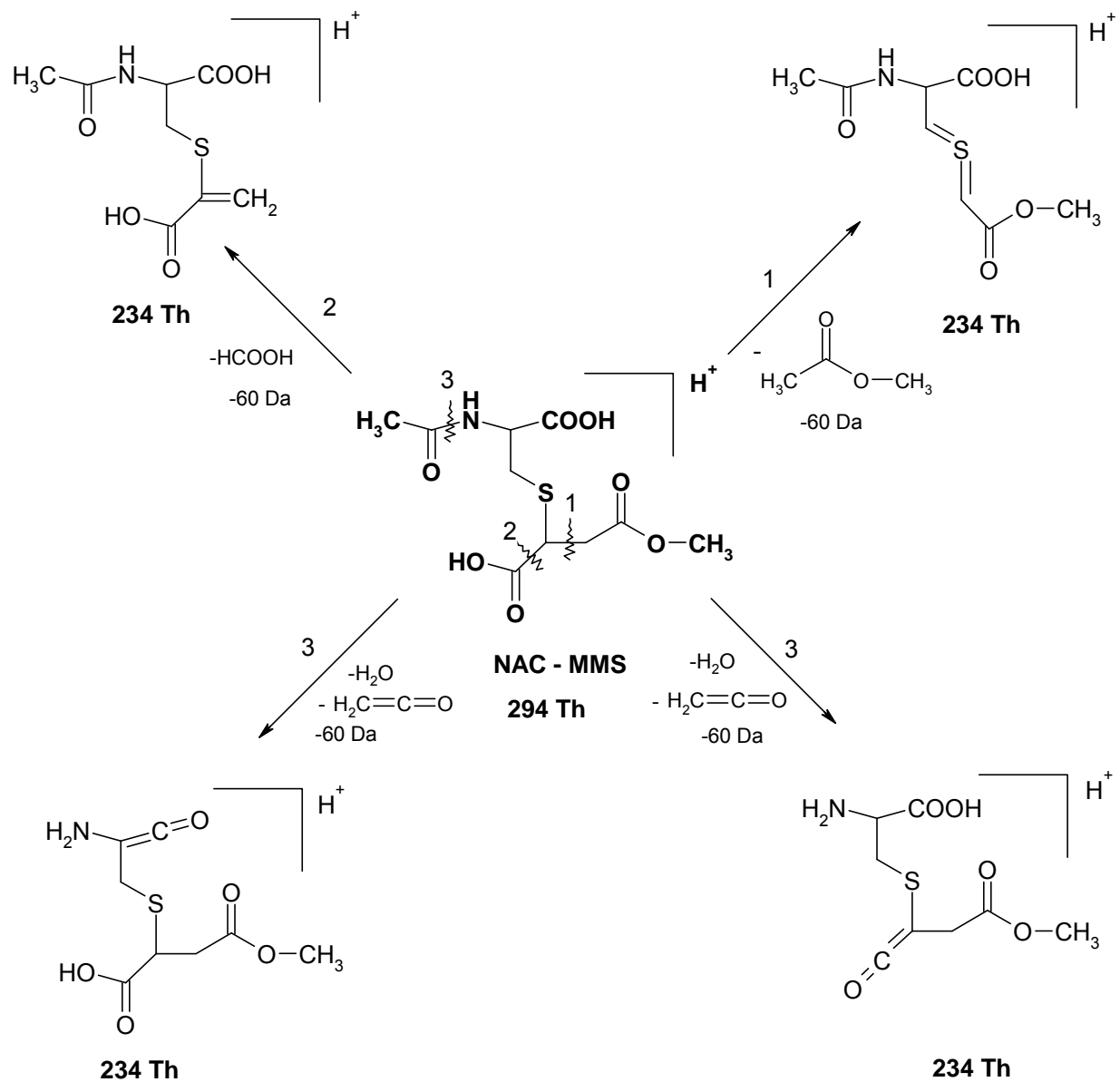


Abb. 8.9: Fragmentierungsmuster von NAC-MMS; Ionenquelle ESI+

8.3.5.3 NAC-DMS und NAC-MES

NAC-DMS hat genau wie NAC-MES ein Molekulargewicht von 307 g/mol. Zur Unterscheidung der beiden Analyten voneinander diene neben den unterschiedlichen Retentionszeiten (vgl. 8.3.4) das typische Fragmentierungsmuster des jeweiligen Analyten. Das Ion mit 276 Th ist bei NAC-MES nicht zu beobachten, da hier im Gegensatz zu NAC-DMS kein Methanol abgespalten werden kann (Abb. 8.11 und 8.13). Weiterhin unterscheiden sich die beiden Muster durch das Verhältnis der Intensitäten der Ionen 266 Th zu 262 Th zueinander. Aus NAC-DMS werden diese etwa in einem Verhältnis von 2:1 gebildet; bei NAC-MES beträgt das Verhältnis ungefähr 1:1. Dies erklärt sich daraus, dass das Ion 262 Th aus NAC-MES durch Abspaltung von Ameisensäure oder Ethanol gebildet werden kann, während es aus NAC-DMS nur durch Abspaltung von Ameisensäure entstehen kann. Ein weiterer Unterschied ist die Bildung des Ions 234 Th, das eine deutlich höhere Intensität bei NAC-DMS zeigt. Aus NAC-MES kann es nur durch Abspaltung von Ameisensäureethylester gebildet werden. Aus NAC-DMS hingegen kann es auf drei verschiedenen Wegen entstehen, die in Abb. 8.11 zusammengefasst sind. Als letztes Kriterium zur Unterscheidung von NAC-DMS und NAC-MES dient das Ion 206 Th, das nur aus NAC-DMS gebildet werden kann (Abb. 8.11). Repräsentative Massenspektren und die Erklärung der auftretenden Ionen sind in den Abbildungen 8.10 – 8.13 wiedergegeben.

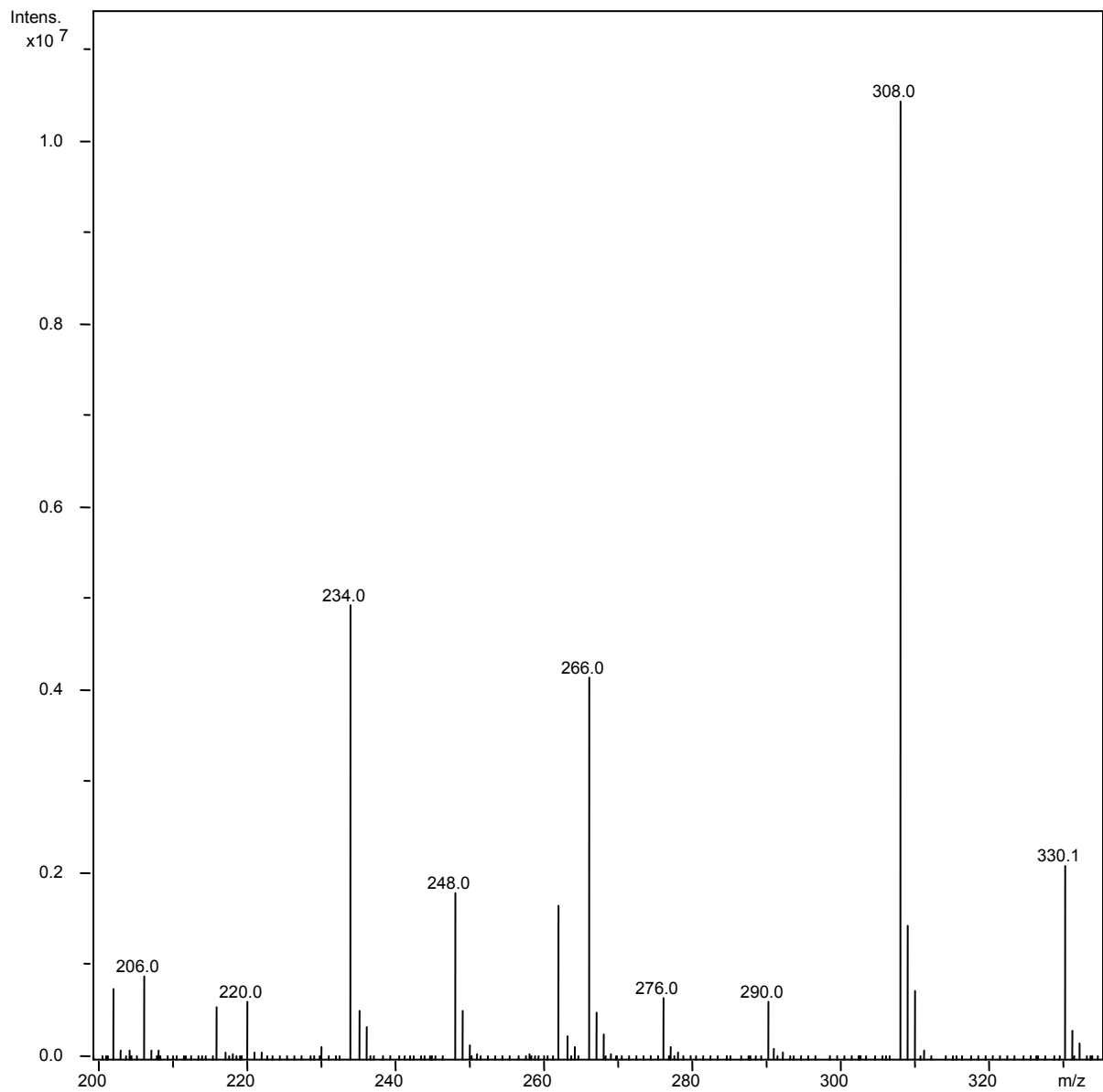
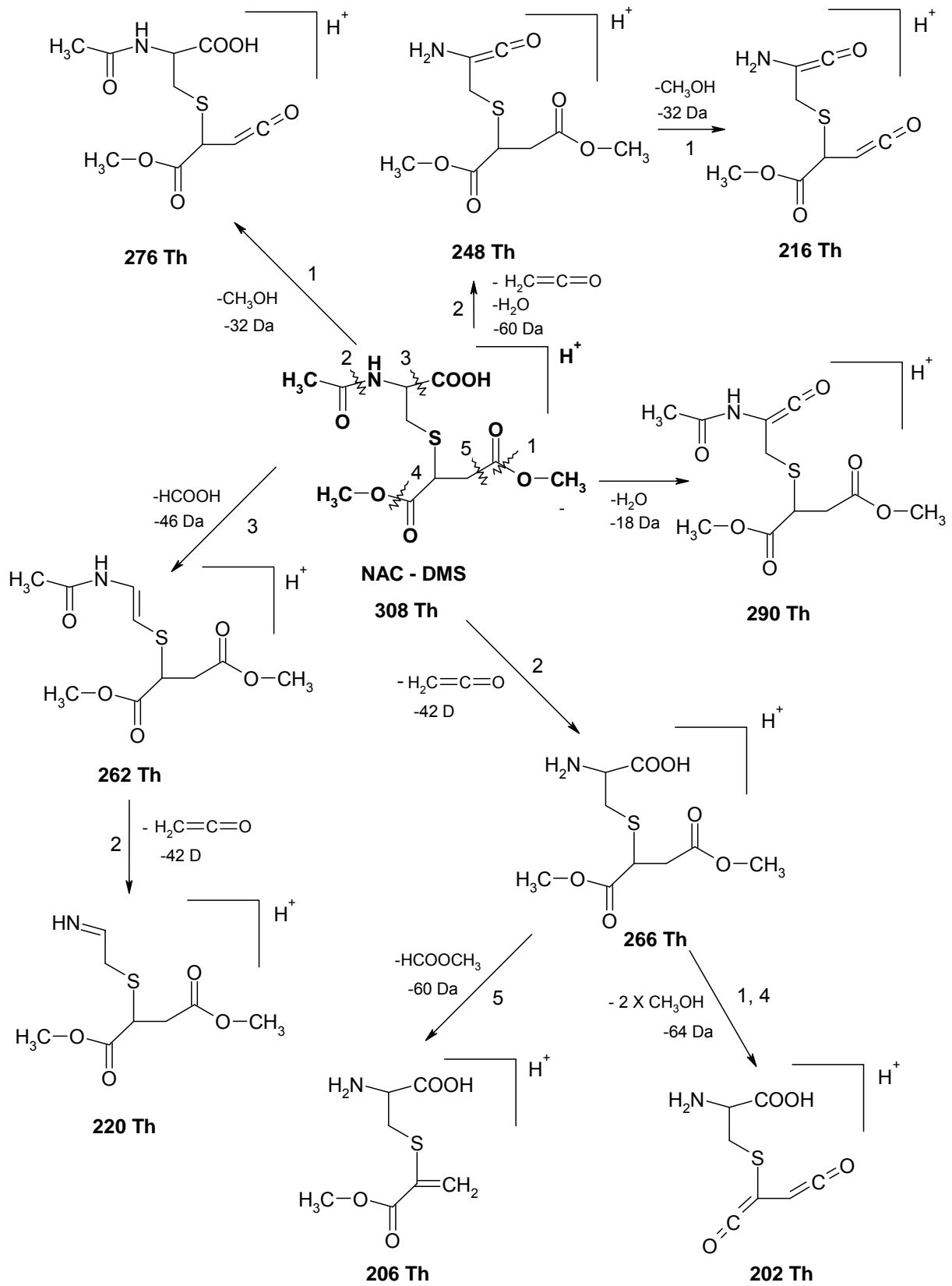


Abb. 8.10: Repräsentatives Massenspektrum von NAC-DMS; Ionenquelle: ESI+



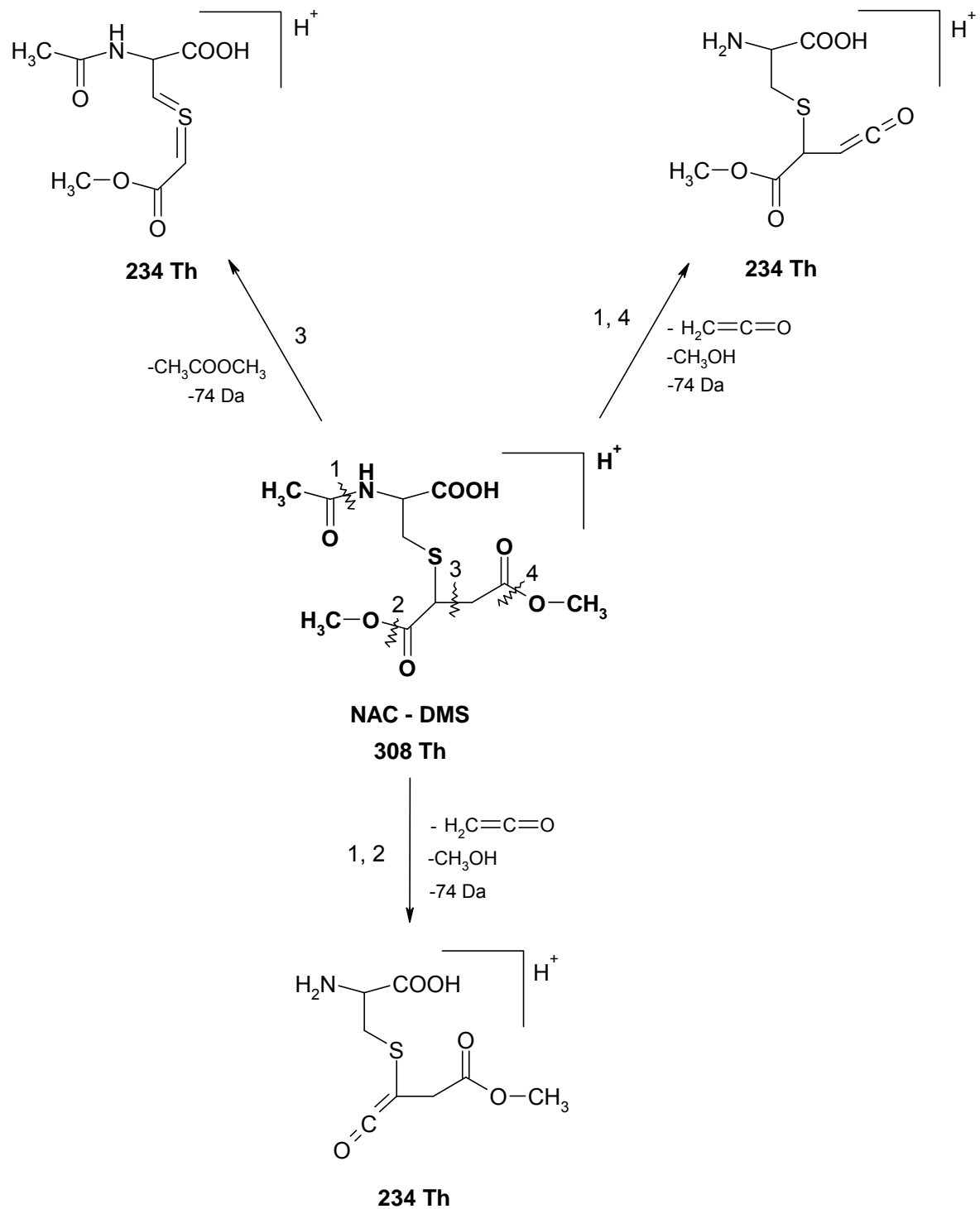


Abb. 8.11: Fragmentierungsmuster von NAC-DMS; Ionenquelle ESI+

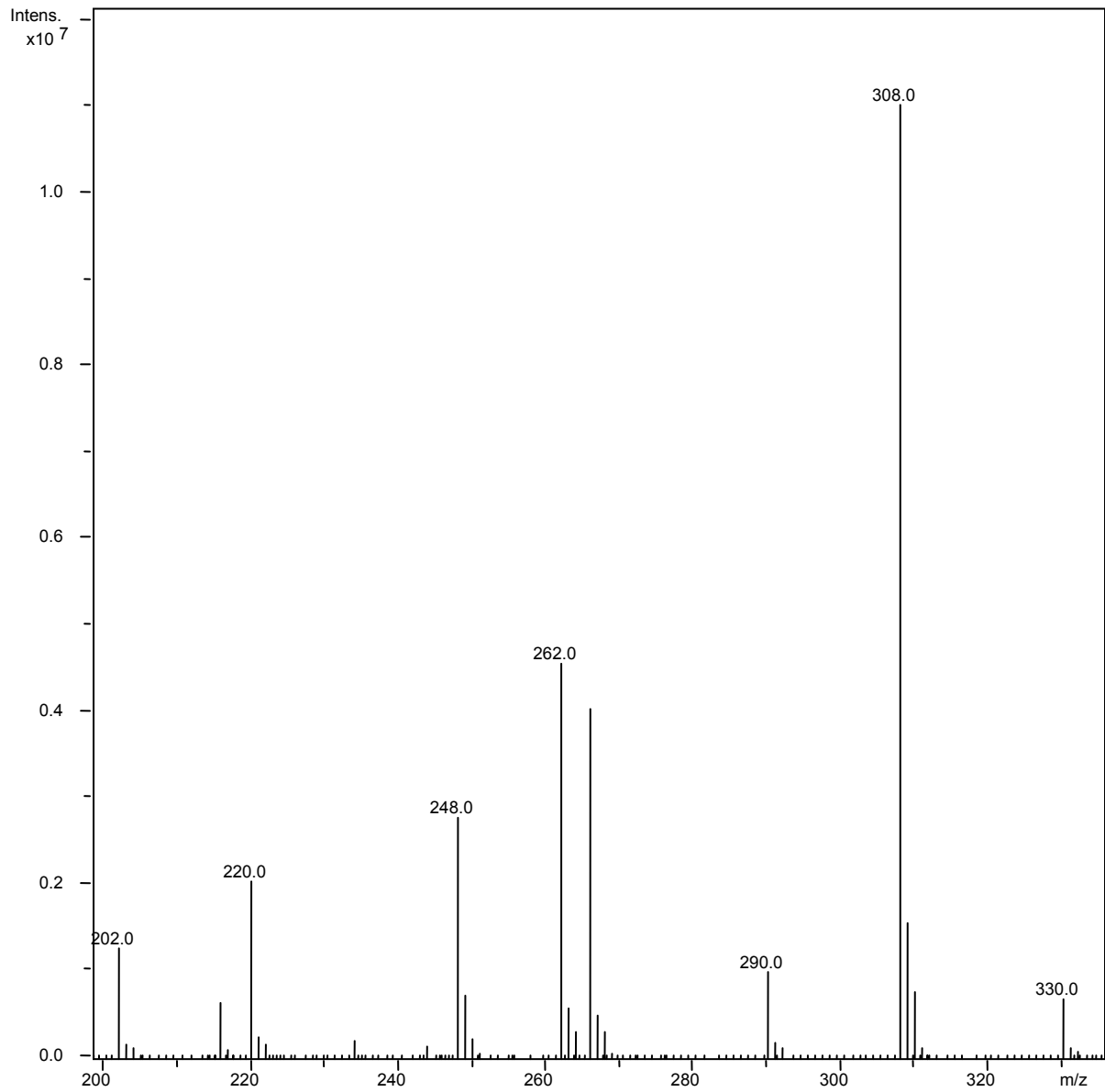


Abb. 8.12: Repräsentatives Messenspektrum von NAC-MES; Ionenquelle: ESI+

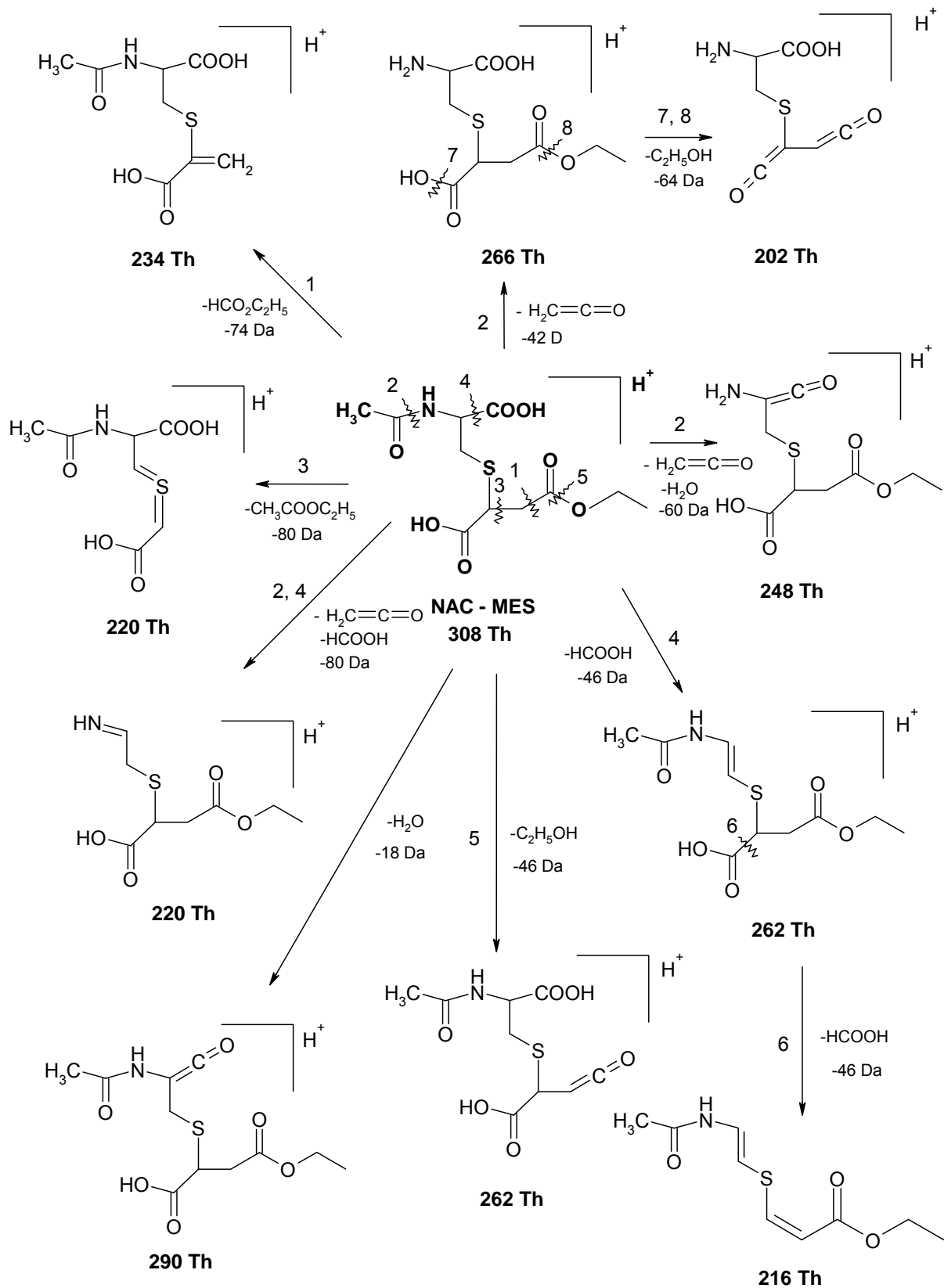


Abb. 8.13: Fragmentierungsmuster von NAC-MES; Ionenquelle: ESI+

8.3.6 *In vivo* Biotransformationsstudie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine *in vivo* Biotransformationsstudie mit Fumaderm® an Psoriasis-Patienten durchgeführt.

Da die Probanden schon mit FAE therapiert wurden, war es entscheidend, dass vor Versuchsbeginn die Medikation für mindestens 24 h ausgesetzt wurden, damit alle FAE und ihre Metabolite eliminiert waren. Dies wurde durch Nullproben, welche vor Versuchsbeginn gewonnen wurden, kontrolliert. In allen Nullproben (Blut- und Urinproben) der Probanden war keiner der Analyten nachzuweisen. FAE und ihre Metabolite waren zu Beginn der Versuche also vollständig aus dem Körper ausgeschieden.

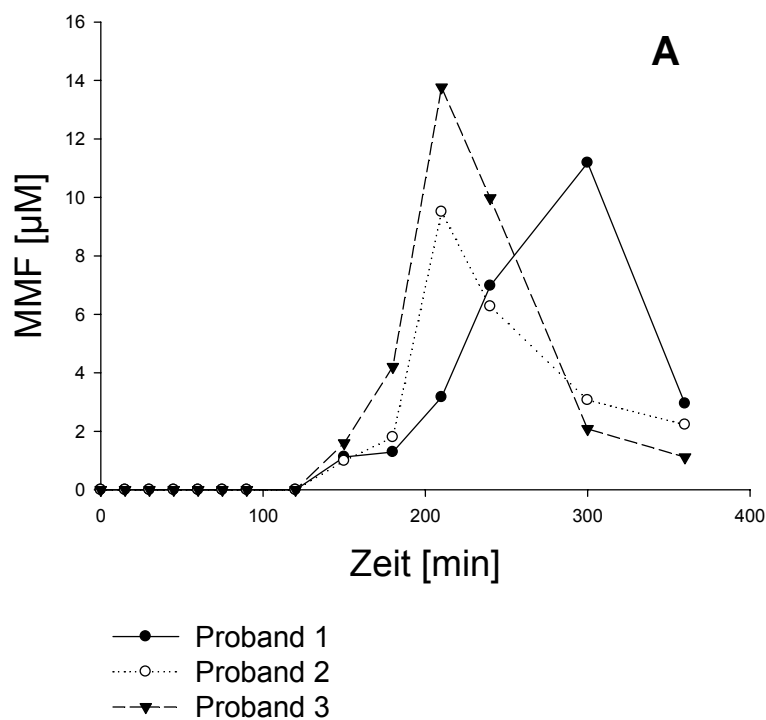
In dem ersten Abschnitt der Studie wurden Blut- und Urinproben gewonnen. Es konnten die Plasmaspiegelkurven von MMF und MEF, die sich nach der Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm® ergaben, bestimmt werden (Abb. 8.15). Aus den Daten wurden mittels der Software WinNonlin® (Pharsight, Mountain View, Kalifornien) die pharmakokinetischen Parameter für MMF und MEF nach einem Nicht-Kompartiment-Modell ermittelt. Sie sind in Tab. 8.1 und 8.2 zusammengefasst. MMF und MEF konnten nicht in der Blutzellfraktion nachgewiesen werden. DMF war zu keinem Zeitpunkt in den Plasmaproben oder im Blutzelllysat zu detektieren. Die Konzentration von FA lag in allen Blutproben unter der Bestimmungsgrenze. Das Glutathion-Addukt von MMF ließ sich in der Zellfraktion des Blutes detektieren (Abb. 8.16). GS-DMS und NAC-DMS konnten in den Blutproben nicht nachgewiesen werden.

Im Urin der Probanden konnte erstmals der Nachweis von NAC-DMS und NAC-MMS in relativ hohen Konzentrationen erbracht werden (Abb. 8.17). Die Identität der Substanzen konnte eindeutig bestimmt werden (vgl. Kap. 8.3.4). NAC-MES, sowie GS-DMS und GS-MMS waren nicht im Urin zu detektieren.

Um die Gesamtmenge an NAC-MMS und NAC-DMS zu bestimmen, die nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm® mit dem Urin ausgeschieden wurden, wurde der zweite Teil der *in vivo* Studie initiiert. Auch hier waren alle abgegebenen Nullproben frei von Analyten. Die Volumina der 24 h Urine variierten zwischen 985 ml und 3200 ml. Es wurden im Mittel $12,4 \pm 3,3$ mg NAC-MMS und $5,4 \pm 4,4$ mg NAC-DMS in den Urinen bestimmt. Aus den im Urin gefundenen Mengen von

NAC-MMS und NAC-DMS wurde der Anteil von DMF und MMF berechnet und auf die applizierte Dosis von 240 mg DMF bezogen. Es ließen sich im Mittel $3,3 \pm 1,1$ % der Dosis in Form der Mercaptursäuren NAC-MMS und NAC-DMS im Urin wieder finden (Tab. 8.3). Dieser Wert ist schwierig zu beurteilen, da die Bioverfügbarkeit von DMF noch nie bestimmt werden konnte.

Bei dem NAC-MMS Standard handelt es sich um ein Isomergemisch aus *N*-Acetyl-*S*-(1-carboxy-2-methoxycarbonylethyl)cystein und *N*-Acetyl-*S*-(2-carboxy-1-methoxycarbonylethyl)cystein. Die beiden Isomere wurden unter den chromatographischen Bedingungen leicht voneinander getrennt. Dies spiegelte sich in dem Doppelpeak wieder, der nach Vermessung eines Standards von NAC-MMS resultierte. Hingegen bildete im Urin detektiertes NAC-MMS nur einen symmetrischen Peak, welcher in etwa die erste Hälfte des Doppelpeaks eines Standards vergleichbarer Konzentration ausmachte (Abb. 8.20). Dies ließ vermuten, dass *in vivo* gebildetes NAC-MMS nur ein Isomer darstellte.



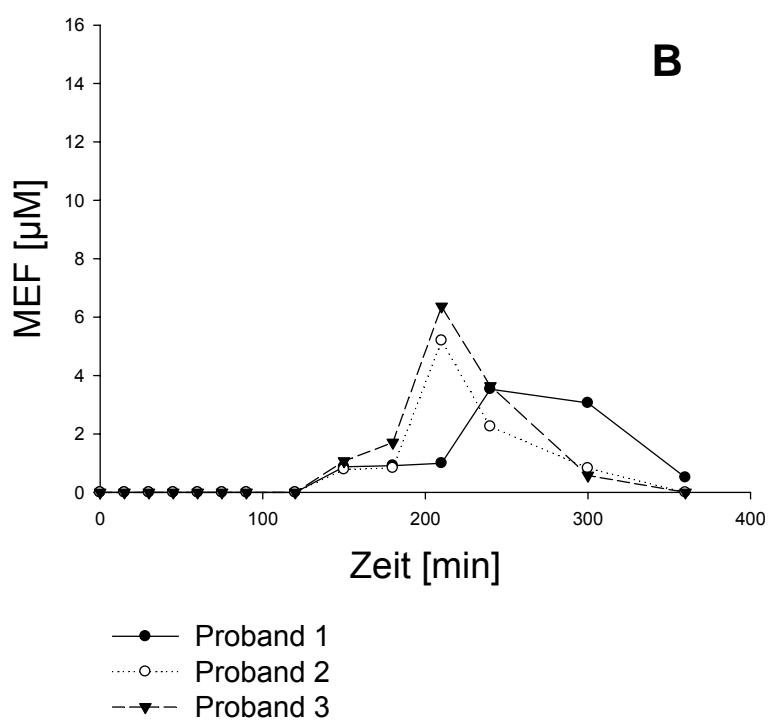


Abb. 8.15: Plasmaspiegel von (A) MMF und (B) MEF nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm[®] im nüchternen Zustand

Probant	t_{lag} [min]	t_{max} [min]	$t_{1/2}$ [min]	C_{max} [μM]	Cl [$\frac{\text{ml}}{\text{min} \times \text{kg}}$]	V [$\frac{\text{ml}}{\text{kg}}$]	$\text{AUC}_{0-\infty}$ [$\frac{\text{min} \times \mu\text{g}}{\text{ml}}$]
1	120	300	31,2	11,2	14,3	642,7	178,6
2	120	210	70,9	9,5	13,4	1373,7	129,8
3	120	210	38,7	13,7	15,4	860,9	172,0
MW	120	240	46,9	11,5	14,4	959,1	160,1
SD	0	52	21,1	2,1	1,0	375,3	26,5

Tab. 8.1: Pharmakokinetische Parameter (Nicht-Kompartiment-Modell) von MMF nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm[®] im nüchternen Zustand

Proband	t_{lag} [min]	t_{max} [min]	$t_{1/2}$ [min]	C_{max} [μM]	Cl [$\frac{ml}{min \times kg}$]	V [$\frac{ml}{kg}$]	$AUC_{0-\infty}$ [$\frac{min \times \mu g}{ml}$]
1	120	240	23,2	3,5	16,9	566,5	63,6
2	120	210	34,8	5,2	16,1	810,1	51,1
3	120	210	25,4	6,4	16,1	589,6	68,1
MW	120	220	27,8	5,0	16,4	655,4	60,9
SD	0	17	6,2	1,5	0,5	134,5	8,8

Tab. 8.2: Pharmakokinetische Parameter (Nicht-Kompartiment-Modell) im Plasma von MEF nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm® im nüchternen Zustand

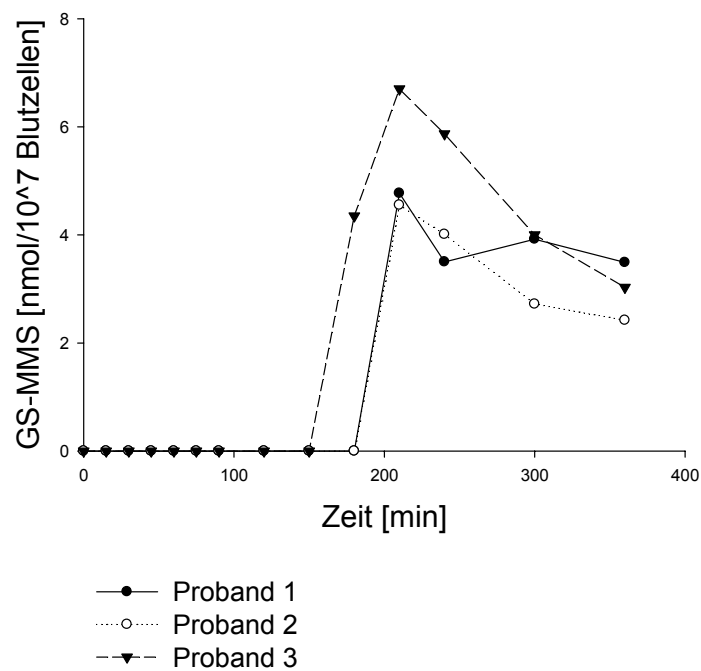


Abb. 8.16: GS-MMS in der Blutzellfraktion nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm® im nüchternen Zustand

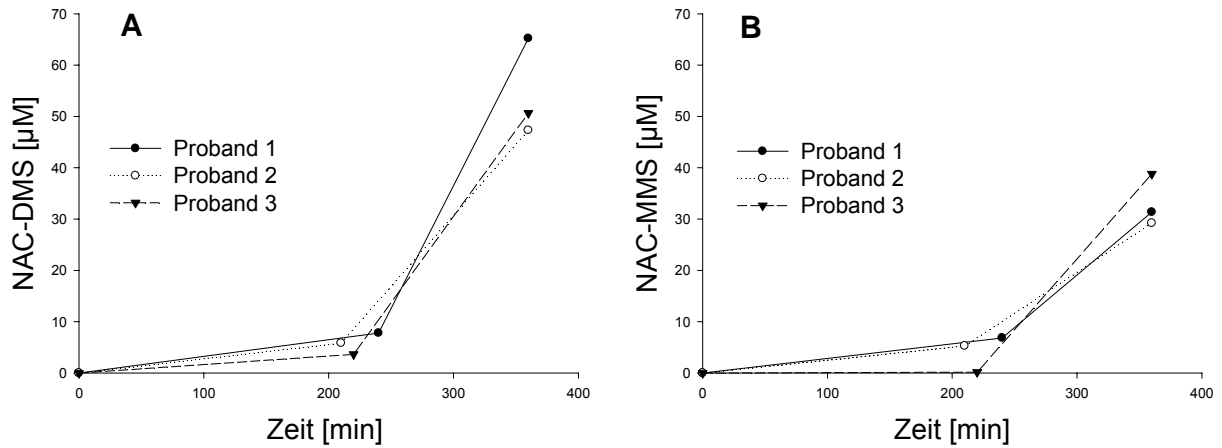


Abb. 8.17: Nachweis von (A) NAC-DMS und (B) NAC-MMS im Urin von Psoriasis-Patienten nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm® im ersten Abschnitt der in vivo Biotransformationsstudie

Proband	24 h Urin [ml]	NAC-MMS [μ M]	NAC-DMS [μ M]	NAC-MMS [mg]	NAC-DMS [mg]	Σ NAC-MMS, NAC-DMS [mg]	Σ MMF, DMF ber. aus Σ NAC-MMS, NAC-DMS in Bezug auf die appl. Dosis v. 240 mg DMF [%]
1	985	32,6	7,0	9,4	2,1	11,5	2,2
2	2400	22,1	1,8	15,6	1,3	16,9	3,1
3	3200	15,7	10,7	14,7	10,5	25,2	4,8
4	1350	24,3	18,0	9,6	7,5	17,1	3,2
MW				12,4	5,4	17,7	3,3
STABW				3,3	4,4	5,6	1,1

Tab. 8.3: NAC-DMS und NAC-MMS im 24 h Urin von Psoriasis-Patienten nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm®.

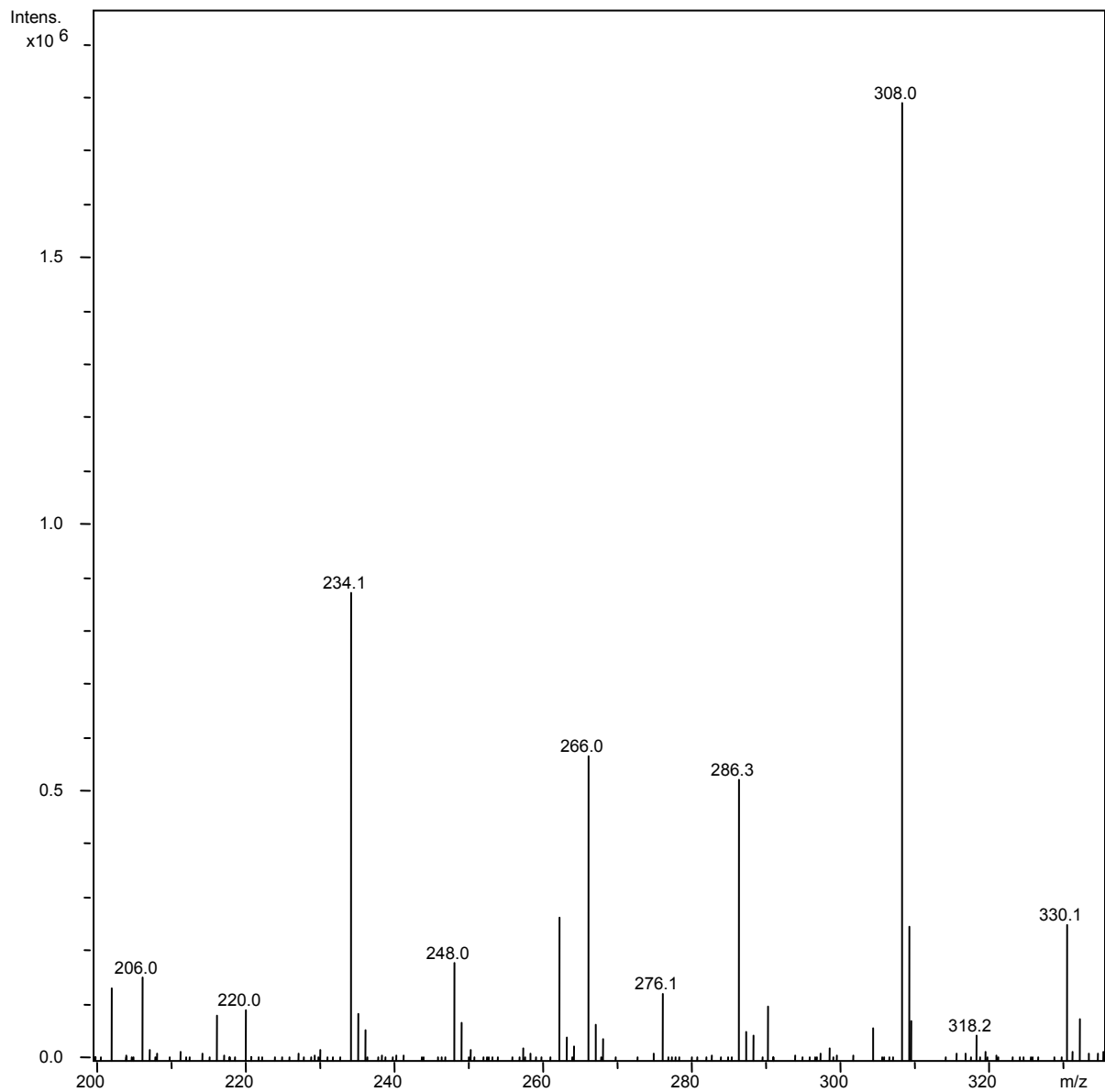


Abb. 8.18: Repräsentatives Massenspektrum von NAC-DMS detektiert im Urin von Psoriasis-Patienten nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm[®]; Ionenquelle: ESI+

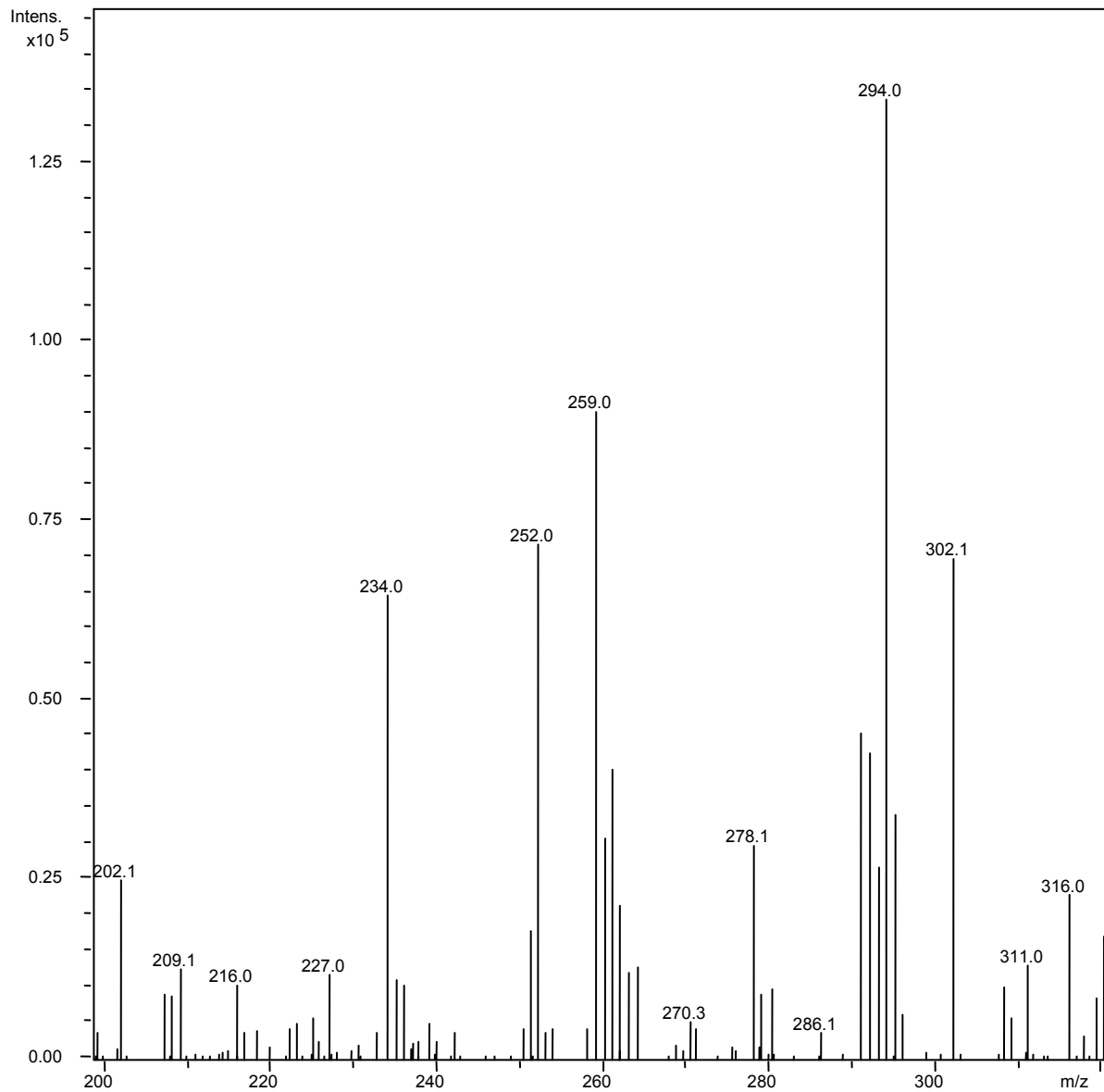


Abb. 8.19: Repräsentatives Massenspektrum von NAC-MMS detektiert im Urin von Psoriasis-Patienten nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm®; Ionenquelle: ESI+

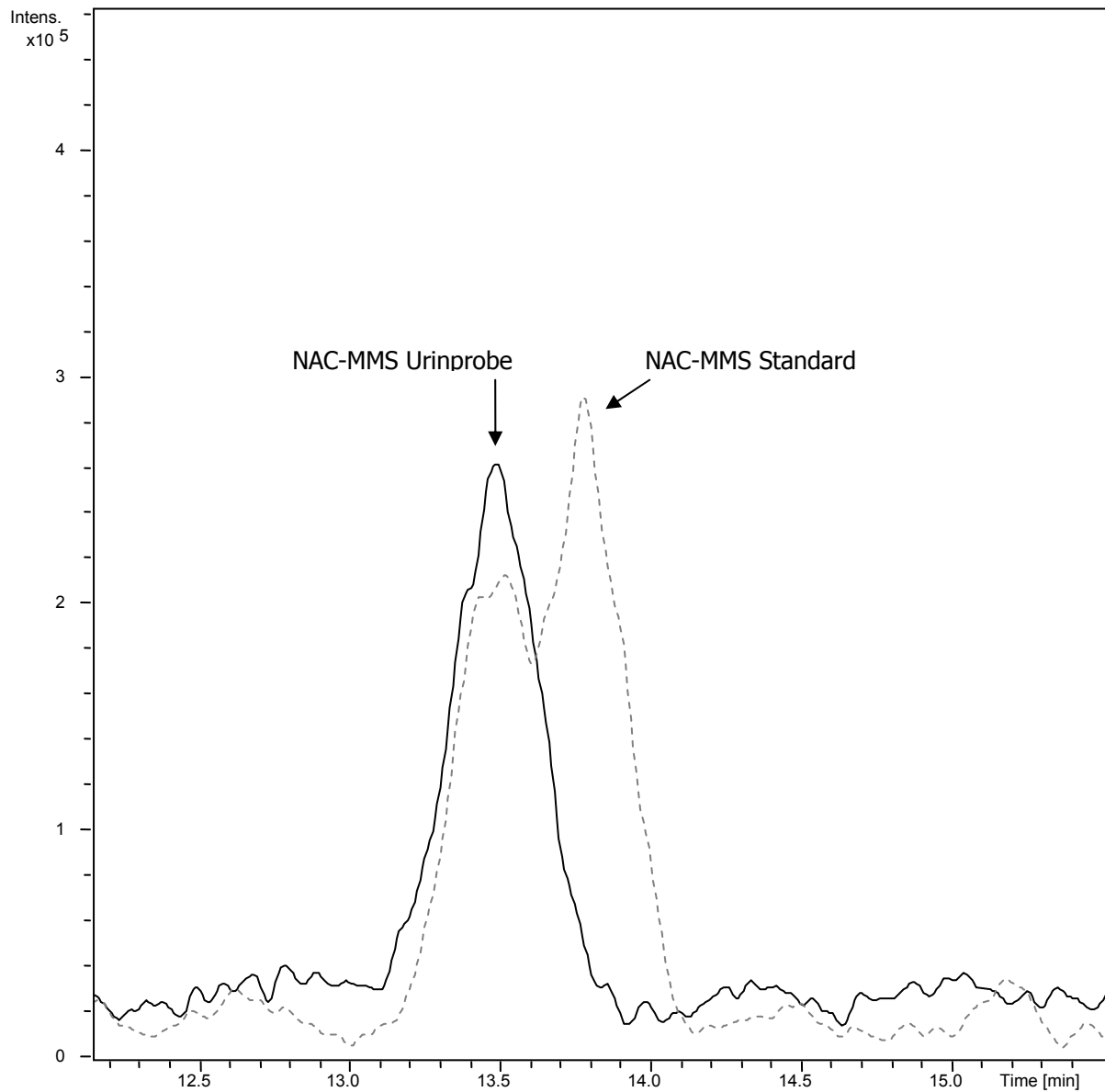


Abb. 8.20: Repräsentatives Chromatogramm von NAC-MMS detektiert im Urin von Psoriasis-Patienten nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm[®] im Vergleich zum NAC-MMS Standard.

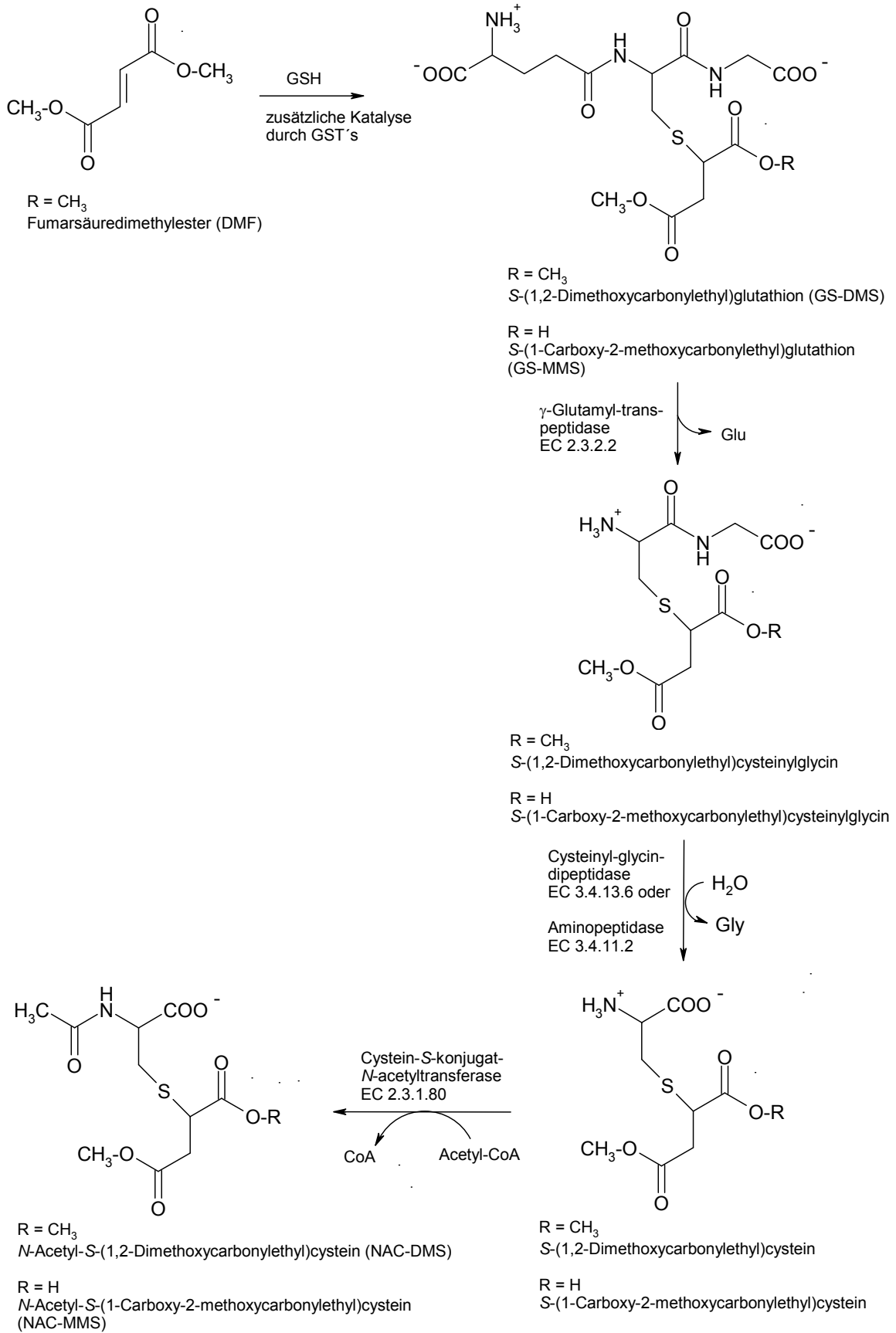


Abb. 8.21: Biotransformation von GS-DMS nach Addition von DMF an GSH. Eine Esterfunktion von GS-DMS, NAC-DMS oder der Zwischenstufen kann hydrolytisch gespalten werden.

8.4 Diskussion und Postulat der Wirkungsweise von FAE

Mit der Entwicklung der SPE-Methode zur Extraktion von MMF, MEF und DMF aus biologischem Material und anschließender Quantifizierung mittels HPLC steht eine leicht zu handhabende Methode zur gleichzeitigen Detektion von MMF, MEF und DMF in biologischem Material mittels HPLC zur Verfügung. Auch für FA wurde eine Analytik etabliert. Die Glutathion-Addukte GS-MMS und GS-DMS, sowie die Mercaptursäuren NAC-MMS, NAC-MES und NAC-DMS wurden mittels einer LC/MS-Analytik erfasst. Die typischen Fragmente der einzelnen Substanzen, die bei der Verwendung einer ESI-Ionenquelle zu beobachten waren, wurden erklärt. Diese dienten der eindeutigen Identifizierung der Analyten.

Die AUC (area under the curve) ist ein Maß für die aufgenommene Substanzmenge. Eine Tablette Fumaderm[®] enthält 120 mg DMF und 95 mg MEF (vgl. Tab. 1.1). Die Substanzmengen pro Tablette stehen daher in einem Verhältnis von DMF 1 zu 1,26 MEF. Der Vergleich der mittleren AUC-Werte der beiden Substanzen, die sich nach Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm[®] ergaben (MEF $60,9 \text{ min} \times \mu\text{g ml}^{-1}$, MMF $160,1 \text{ min} \times \mu\text{g ml}^{-1}$), zeigten, dass die AUC-Werte für MMF ungefähr doppelt so groß sind wie für MEF. Hierbei wurden die unterschiedlichen Mengen an applizierter Substanz berücksichtigt. Dies lässt sich mit der besseren Bioverfügbarkeit von DMF, dessen Hydrolyseprodukt MMF ist, im Vergleich zu MEF aufgrund der unterschiedlichen Lipophilie der Substanzen erklären. Nur im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit von MMF kann DMF als Prodrug angesehen werden. Der Begriff Prodrug ist an dieser Stelle nur eingeschränkt zu gebrauchen, da MMF in dem postulierten Wirkmechanismus (s.u.) nicht als Wirkform von FAE angesehen wird.

Auch in dieser *in vivo* Studie ließen sich weder Veränderungen der Fumarsäurekonzentration im Plasma noch in den Blutzellen beobachten. Die ursprüngliche Hypothese von Schweckendiek, dass FAE Prodrugs für die Fumarsäure darstellen, scheint daher nicht zuzutreffen. Den ersten Hinweis, dass auch Glutathionaddukte von FAE *in vivo* von Bedeutung sind, wurde mit dem Nachweis von GS-MMS in der Blutzellfraktion des Blutes erbracht.

Im Urin wurde NAC-DMS und NAC-MMS erstmals in relativ hohen Konzentrationen nachgewiesen (Abb. 8.17, Tab. 8.3).

Bei MMF und MEF handelt es sich um Monoester, die nur in geringem Maße eine spontane Reaktion mit GSH eingehen. Eine Katalyse dieser Reaktion durch GST`s kann für MMF ausgeschlossen werden (vgl. Kap. 9). Im Gegensatz zu relativ hohen Konzentrationen an NAC-MMS ließ sich NAC-MES nicht detektieren bzw. die Konzentration lag unter der Nachweisgrenze von 5 μM . Die hohen Konzentrationen von NAC-MMS stammen wahrscheinlich weniger aus NAC-MMS, das direkt aus GS-MMS gebildet wurde, sondern zum größten Teil aus der hydrolytischen Spaltung eines Carbonsäureesters von GS-DMS oder eines seiner Zwischenstufen (vgl. Abb. 8.21). Die Hydrolyse erfolgt im Falle von GS-DMS nicht enzymatisch (vgl. Kap. 10). Entscheidend für das Verständnis des Wirkmechanismus von FAE war, dass die Mercaptursäure von DMF im Urin in größeren Mengen nachgewiesen werden konnte. Die Vorstufe eines Mercaptursäure-Derivates ist immer ein zuvor gebildetes Glutathion-Addukt. In diesem Fall musste DMF daher ein Glutathion-Addukt *in vivo* gebildet haben, das über mehrere durch Enzyme katalysierte Schritte zur Mercaptursäure verstoffwechselt und renal ausgeschieden wurde (Abb. 8.21). Entscheidend für das Verständnis des Wirkmechanismus von FAE ist es, in welchem Kompartiment des Körpers die Addition von DMF an GSH erfolgt. Der Nachweis von NAC-DMS im Urin war ein Hinweis dafür, dass ein Teil der applizierten Dosis von DMF im Pfortaderblut nach oraler Gabe von Fumaderm[®] unverstoffwechselt anflutete. Da DMF zu keinem Zeitpunkt im Plasma nachweisbar war, musste es bis nach der ersten Leberpassage quantitativ metabolisiert worden sein. DMF unterliegt im Blut wahrscheinlich zwei konkurrierenden Reaktionen (vgl. Kap. 11). Es penetriert schnell in Zellen und reagiert dort mit GSH in einem ausgeprägtem Maße (vgl. Kap. 5). Weiterhin ist es ein gutes Substrat für Esterasen. Es ist also wahrscheinlich, dass DMF zum einen mit intrazellulärem GSH der Blutzellen reagiert und zum anderen durch Esterasen hydrolytisch gespalten wird. Der Teil an DMF, der eventuell unverstoffwechselt die Leber erreicht, wird spätestens hier an GSH konjugiert oder hydrolytisch gespalten. Die Annahme, dass die Reaktion von DMF mit GSH schon zum größten Teil im Blut stattfindet, wird durch die Tatsache gestützt, dass DMF auch nach intravenöser Gabe zu keinem Zeitpunkt im Plasma nachweisbar war (50). Auch die Versuche in Kapitel 11 deuten darauf hin, dass DMF schon im Blut sehr schnell an GSH addiert wird. Hinweise auf ein „Binden“ von GSH durch Blutzellen gibt auch die Arbeit von Litjens (49).

Das Immunsystem spielt in der Pathogenese der Psoriasis eine entscheidende Rolle. Insbesondere die Sekretion bestimmter Zytokine von T-Zellen fördert das entzündliche Geschehen in der Haut (vgl. Kap. 1.1). Es konnte gezeigt werden, dass der Erfolg einer Therapie mit Fumaderm[®] auf eine immunmodulierende Wirkung zurückzuführen ist. Insbesondere war eine Verminderung der Zahl von T-Zellen unter Therapie mit Fumaderm[®] zu beobachten und ging dem klinischen Heilungsprozess voraus (26; 57; 58). Weiterhin konnte die Erniedrigung von intrazellulärem GSH eindeutig mit der Induktion von Apoptose in Zellen korreliert werden (vgl. Kap. 4). Auch wurde bedingt durch eine GSH-Depletion *in vivo* die Produktion anti-entzündlicher Zytokine induziert (140).

Der postulierte Wirkmechanismus der immunmodulierenden Wirkung der FAE beruht im Wesentlichen auf der Fähigkeit von DMF in Immunzellen intrazellulär GSH zu erniedrigen und so entscheidende anti-entzündliche Effekte auszulösen. Dieses Postulat der Wirkungsweise von FAE wird durch die Tatsache unterstützt, dass sich ein Monopräparat mit DMF zurzeit erfolgreich in der Phase III der klinischen Prüfung zur Behandlung der Multiplen Sklerose befindet. Wie bei Psoriasis spielt auch in der Pathogenese der Multiplen Sklerose das Immunsystem (insbesondere Th-Zellen) eine zentrale Rolle. Die Erhaltung der Immunhomöostase (Veränderung des Zytokinprofils und/oder Induktion von Apoptose in aktivierten Immunzellen, insbesondere Th-Zellen) zur Begrenzung der Entzündung durch Depletion von GSH in diesen Zellen durch DMF würde die positive Wirkung von DMF sowohl beim Krankheitsbild der Psoriasis als auch der Multiplen Sklerose erklären.

9 EINFLUSS VON GLUTATHION-S-TRANSFERASEN AUF DIE BILDUNG VON GLUTATHION-ADDUKTEN MIT FUMARSÄUREESTERN

9.1 Einleitung und Zielsetzung

Glutathion-S-Transferasen (GST's) sind Enzyme des Phase-II Metabolismus, die eine Addition von Glutathion an ein elektrophiles Akzeptormolekül katalysieren können. Das resultierende GSH-Konjugat (Thioether) ist das Endprodukt dieser Reaktion. Die Hauptfunktion von GST's ist die Metabolisierung und damit Detoxifizierung von endogenen und exogenen Elektrophilen.

In der Literatur ist beschrieben, dass DMF *in vitro* GST's induzieren kann (93; 141). Weiterhin wurden mit dem Ziel Arzneistoffe zu finden, die in unterschiedlichen Geweben GST's induzieren können, um so einen effizienten Schutz gegen Karzinogene aufzubauen und damit ein Krebsrisiko zu mindern, verschiedene Substanzen, u.a. DMF, auf ihre Fähigkeit GST's zu induzieren am Tiermodell getestet. Hierzu wurde Ratten DMF oral verabreicht und anschließend verschiedene Gewebe auf die Aktivität von GST's untersucht. Es konnte eine signifikante Erhöhung der GST's nur in der Leber festgestellt werden (142; 143).

In Kapitel 8 wurde *in vivo* GS-MMS in der Zellfraktion des Blutes und NAC-MMS sowie NAC-DMS, welche die Abbauprodukte von GS-MMS bzw. GS-DMS darstellen, im Urin von Psoriasis-Patienten nach Einnahme von Fumaderm[®] nachgewiesen. DMF und MMF können spontan mit GSH reagieren und GS-DMS bzw. GS-MMS bilden. MMF geht die Reaktion mit GSH aber wesentlich langsamer und in geringerem Maße als DMF ein (105). Neben dieser spontanen Reaktion von MMF und DMF wäre auch eine zusätzliche Katalyse durch GST's möglich. Aufgrund der Tatsache, dass GST's oftmals durch ihre eigenen Substrate induziert werden sowie der Beobachtung, dass DMF sowohl *in vivo* als auch *in vitro* GST's induzieren kann und des Nachweises von GS-MMS, NAC-MMS und NAC-DMS *in vivo* (vgl. Kap. 8), sollte getestet werden, ob GST's die Reaktion von DMF und/oder MMF mit GSH katalysieren.

9.2 Material und Methoden

9.2.1 Material und Geräte

EDTA, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumhydroxid (Merck); Strata-X (Phenomenex), DMF, Glutathion (red.), Glutathion-S-Transferasen aus humaner Plazenta, MMF (Sigma-Aldrich).

Inkubations-/Inaktivierungsbad (GFL).

9.2.2 Inkubationsexperimente

Das Lyophilisat der humanen GST's wurde in einem Volumen 100 mM Phosphatpuffer + 1 mM EDTA (pH = 7,4) gelöst, so dass die Stammlösung eine Aktivität von 100 U/ml aufwies. Das Lyophilisat der GST's enthielt lt. Herstellerauskunft 19 % GSH. Eine 50 mM Lösung von GSH wurde frisch mit o.g. Phosphatpuffer hergestellt. DMF und MMF wurden in DMSO gelöst, so dass sich eine Konzentration von 100 mM ergab. Für den Versuch wurde aus dieser Lösung durch Verdünnung mit o.g. Phosphatpuffer eine 10 mM Lösung hergestellt.

Für einen Ansatz wurden 485 µl 100 mM Phosphatpuffer + 1 mM EDTA (pH = 7,4) im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl der 100 U/ml GST- und 5 µl der 50 mM GSH-Stammlösung. Die Reaktion fand unter aeroben Bedingungen im Schüttelwasserbad bei 37 °C statt und wurde durch Zugabe von entweder 5 µl 10 mM DMF- oder 10 mM MMF-Stammlösung gestartet. Die Endkonzentrationen in einem Ansatz betragen 100 µM DMF bzw. MMF, 0,1 % DMSO, 513 µM GSH und 1 U/ml GST's. Als Kontrolle diente ein gleichzeitig pipettierter Ansatz mit 513 µM GSH aber ohne GST's. Nach 15 min wurde durch Zusatz von 500 µl 0,2 M HCl zu 500 µl der jeweiligen Probe die Reaktion beendet. Die Proben wurden auf Eis gestellt, der Festphasenextraktion unterzogen und mittels HPLC vermessen.

9.2.3 HPLC-Analytik

Die Analytik für MMF und DMF erfolgte analog der in Kapitel 8.2.2.2 beschriebenen Methode.

9.2.4 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung von DMF und MMF wurde eine 5-Punkt Kalibrierung mit einem Kalibrierbereich von 1-100 μM , wobei definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Phosphatpuffer gelöst wurden. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen verwendet. Diesen Ansätzen wurden hitzedenaturierte GST's (1 U/ml) zugesetzt. Die Proben der Wiederfindung enthielten kein GSH. Alle Proben wurden mittels der in Kapitel 8.2.2.2.1 beschriebenen Festphasenextraktion aufgearbeitet und mittels HPLC vermessen.

9.3 Ergebnisse und Diskussion

9.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung von DMF und MMF wurde eine Kalibrierung und Wiederfindung durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalflächen des resultierenden Peaks des jeweiligen Analyten. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb. 9.1). Die Wiederfindungsrate für MMF betrug $103 \pm 5 \%$ und für DMF $92 \pm 8 \%$. Es ließen sich keine nennenswerten Absorptionsphänomene am biologischen Material beobachten. Die Wiederfindung, insbesondere von DMF, wurde durch das im Lyophilisat enthaltene GSH nicht beeinträchtigt, da dieses während der Hitzedenaturierung (30 min, 100 °C) der GST's zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wurde und eine spontane Reaktion mit DMF daher nicht mehr möglich war.

9.3.2 Inkubationsexperimente

Mit den durchgeführten Experimenten sollte geprüft werden, ob GST's die auch spontan verlaufende Reaktion von DMF oder MMF mit GSH zusätzlich katalysieren. Das Prinzip beruhte auf der Messung von freiem DMF bzw. MMF, das nach Inkubation von DMF oder MMF mit GSH und GST's im Vergleich zur Kontrolle (ohne GST's) zu detektieren war. In einem Kontrollansatz konnten die FAE nur spontan mit GSH reagieren. Bei einer zusätzlichen Katalyse dieser Reaktion durch GST's müsste in einem Ansatz daher eine signifikant niedrigere Konzentration an DMF bzw. MMF als in der Kontrolle resultieren. Da insbesondere DMF spontan mit GSH reagiert, war das Abstoppen der Reaktion nach Inkubation der Ansätze und Kontrollen entscheidend, damit durch z.B. verzögertes Aufarbeiten von Kontrolle und Ansatz keine falsch positiven oder negativen Ergebnisse resultierten. Dies konnte durch Zusatz des gleichen Volumens von 0,2 M HCl zu den Proben erzielt werden. Von Schmidt *et al.* wurde zuvor gezeigt, dass GSH, um mit FAE reagieren zu können, deprotoniert vorliegen muss und die Reaktion schon bei einem pH-Wert von 6 nur langsam verläuft (105). Da GSH durch das starke Ansäuern mit 0,2 M HCl überwiegend protoniert vorliegt und auch GST's bei dem niedrigen pH-Wert nicht mehr aktiv sind, konnten die Inkubationen zuverlässig abgestoppt werden. Die Proben waren so auch der in Kapitel 8.2.2.2.1 beschriebenen SPE-Methode zugänglich. Durch die Festphasenextraktion (RP-Material) wurde GSH aus den Proben eliminiert, so dass keine Reaktion von GSH mit FAE während eines HPLC-Laufes (Fließmittel pH = 5,5) stattfinden konnte.

Mit den gewählten Bedingungen konnte für die Reaktion von MMF mit GSH keine Katalyse durch GST's festgestellt werden (Abb. 9.2).

Für DMF konnte mit dem gepaarten T-Test eine hohe Signifikanz für den Einfluß von GST's auf die Bildung von GS-DMS festgestellt werden (Abb. 9.3 (A)). Die Hydrolyse von DMF zu MMF unter den gewählten Inkubationsbedingungen war vernachlässigbar gering. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Ansätze ist jeweils ein deutlicher Unterschied von Kontrolle und Komplettansatz zu erkennen. Allerdings sind die absoluten Werte des dritten Ansatzes im Vergleich zu den anderen vier größer. Dies führt zu keiner Signifikanz bei Verwendung des ungepaarten T-Tests.

Zusammenfassend wird die Reaktion von MMF mit GSH nicht von GST's katalysiert. Für die auch spontan in einem großen Ausmaß ablaufende Reaktion von DMF und GSH war hingegen eine deutliche Tendenz der zusätzlichen Katalyse durch GST's erkennbar. Dies könnte auch die literaturbekannte Induktion von GST's *in vivo* und *in vitro* durch DMF erklären (vgl. Kapitel 9.1).

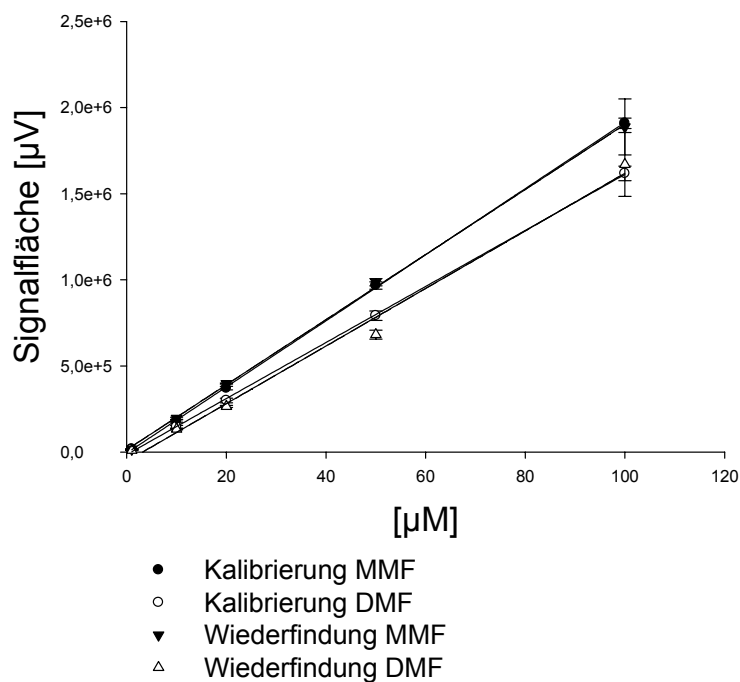


Abb. 9.1: Kalibrierung und Wiederfindung von DMF und MMF nach UV-Detektion. Die Signalfächen sind $x \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen (Kalibrierung: $r^2_{(DMF)} = 0,9998$; $r^2_{(MMF)} = 0,9999$, Wiederfindung: $r^2_{(DMF)} = 0,9915$; $r^2_{(MMF)} = 0,9994$)

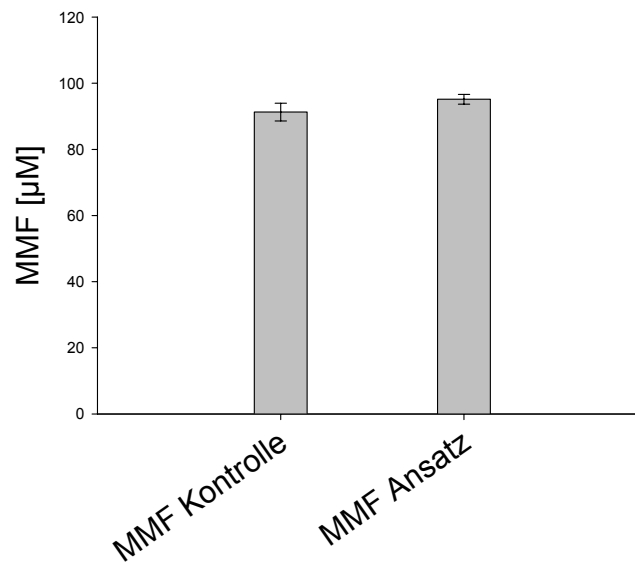


Abb. 9.2: Einfluß von GST's auf die Bildung von GS-MMS. Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 3$ Ansätzen.

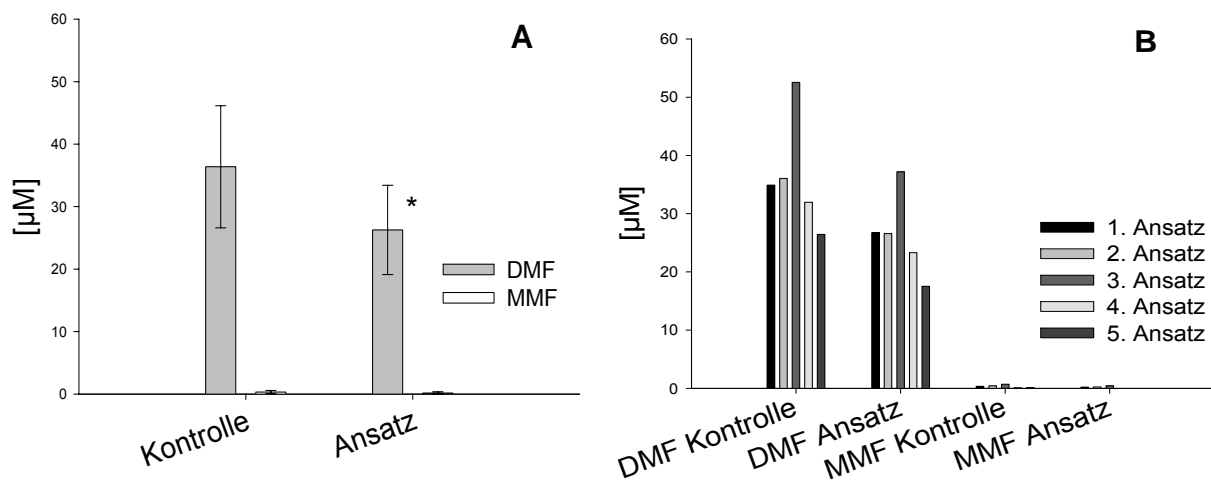


Abb. 9.3: Einfluß von GST's auf die Bildung von GS-DMS. (A) Die Werte sind $x \pm s$ aus $n = 5$ Ansätzen * $p_{\text{gepaart}} \leq 0,01$ (B) Separate Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Ansätze.

10 STUDIEN ZUR STABILITÄT VON GS-DMS

10.1 Einleitung und Zielsetzung

In Kapitel 8 wurde der Nachweis von und NAC-DMS im Urin von Psoriasis-Patienten nach Einnahme von Fumaderm[®] beschrieben. Demnach bildete ein Teil von DMF mit GSH *in vivo* GS-DMS, das nach Metabolisierung zu seiner korrespondierenden Mercaptursäure NAC-DMS renal ausgeschieden wurde. Dies bedeutete, dass die Carbonsäureester von GS-DMS und deren beim enzymatischen Abbau zu NAC-DMS gebildeten Zwischenstufen von Esterasen nicht hydrolysiert wurden. Hingegen wird DMF sehr effizient von Esterasen unter Bildung von MMF umgesetzt (Abb. 10.1) (48). Um den Effekt der anscheinend unterschiedlichen Stabilität der Carbonsäureester von DMF und GS-DMS genauer zu untersuchen, wurden sie *in vitro* mit Esterasen inkubiert.

10.2 Material und Methoden

10.2.1 Material und Geräte

STRATA-X, STRATA-X-AW (Phenomenex); GS-DMS, GS-MMS (Arbeitskreis Schmidt); DMF, MMF, Schweineleberesterasen (Sigma-Aldrich).
Inkubations-/Inaktivierungsbad (GFL).

10.2.2 HPLC-Analytik

Die Analytik für DMF und MMF orientierte sich an der in Kapitel 8.2.2.2 beschriebenen. Die Detektion von GS-DMS folgte der in Kapitel 7.2.4.1 dargestellten Methode. Aufgrund der relativ hohen Konzentration von GS-DMS, die zur Inkubation eingesetzt wurde, und der hohen Empfindlichkeit der Methode musste das Eluat nach Festphasenextraktion 1:50 mit Aqua bidest. verdünnt werden. Hiervon wurden 50 µl

mit 10 µl 200 mM Boratpuffer pH = 7,6 versetzt und so auf einen für die Stabilität von GS-DMS notwendigen und für Derivatisierung mit FMOC optimalen pH-Wert von 7,6 eingestellt.

10.2.3 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung von DMF und MMF wurde eine 5-Punkt Kalibrierung mit einem Kalibrierbereich von 1-100 µM bzw. eine von GS-DMS und GS-MMS im Bereich von 10-100 µM erstellt, wobei definierte Stoffmengen in dem für die Inkubation verwendeten Boratpuffer gelöst wurden. Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen verwendet. Diesen Ansätzen wurden hitzedenaturierte Esterasen (5 U/ml) zugesetzt. Alle Proben wurden mittels der in Kapitel 8.2.2.2.1 zur Analyse von MMF und DMF bzw. 7.2.4.2.1 zur Bestimmung von GS-MMS und GS-DMS beschriebenen Festphasenextraktion aufgearbeitet. Bei der Vermessung der GS-DMS Ansätze musste aufgrund der Empfindlichkeit der Methode das Eluat nach Festphasenextraktion 1:50 mit Aqua bidest. verdünnt werden. Hiervon wurden 50 µl mit 10 µl 200 mM Boratpuffer pH = 7,6 versetzt und anschließend mittels HPLC vermessen.

10.2.4 Inkubationsexperimente

Die lyophilisierten Schweineleberesterasen wurden in 10 mM Boratpuffer pH = 8 gelöst, so dass sich eine Aktivität von 50 U/100 µl ergab. DMF wurde in DMSO und GS-DMS in Aqua bidest. gelöst. Ein Inkubationsansatz zur Überprüfung des Einflusses von Esterasen auf DMF und GS-DMS setzte sich wie in Tab. 10.1 angegeben zusammen. Die Endkonzentrationen betragen 100 µM DMF (1 % DMSO) oder GS-DMS und 5 U/ml Esterasen in 10 mM Boratpuffer pH = 8. Die Inkubationen wurden unter aeroben Bedingungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen im Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt. Der Puffer mit Enzym wurde für fünf Minuten vorinkubiert, anschließend wurde das Substrat zugegeben und der Ansatz für weitere 15 min inkubiert. Die Inkubation der Ansätze mit DMF als Substrat wurde

durch Zugabe von 500 µl 0,2 M HCl zu 500 µl der Probe abgestoppt. Die Proben wurden gleich den Proben der Kalibrierung und Wiederfindung aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert. Zum Abstoppen der Inkubationsansätze mit GS-DMS wurden die Proben auf Eis gelagert und zu 500 µl Probe 1500 µl 25 mM Acetatpuffer pH = 4,6 gegeben. Nach Festphasenextraktion wurde das Eluat, wie auch bei den Proben der Kalibrierung und Wiederfindung, 1:50 mit Aqua bidest. verdünnt und mit 10 µl 200 mM Boratpuffer (pH = 7,6) pro 50 µl Verdünnung auf pH = 7,6 eingestellt. Anschließend erfolgte die Vermessung mittels HPLC. Um das Ausmaß der nicht-enzymatischen Hydrolyse zu erfassen, wurden jeweils Kontrollen ohne Enzym inkubiert (K II). Als Bezugswert wurden weitere Kontrollen ohne Enzym und ohne Inkubation (K I) aufgearbeitet und vermessen.

	10 mM Stammlösung von DMF oder GS-DMS [µl]	50 U/ml Esterase- Stammlösung [µl]	10 mM Boratpuffer pH = 8 [µl]
K I	10	-	990
K II	10	-	990
Ansatz	10	100	890

Tab. 10.1: Ansätze zur Überprüfung des Einflusses von Esterasen auf die Stabilität von DMF und GS-DMS

10.3 Ergebnisse und Diskussion

10.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung von DMF und GS-DMS, sowie MMF und GS-MMS wurde eine Kalibrierung und Wiederfindung durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte über die Signalflächen des resultierenden Peaks des jeweiligen Analyten. Es ließen sich keine nennenswerten Adsorptionsphänomene der Substanzen am biologischen Material beobachten. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren im untersuchten Konzentrationsbereich linear (Abb. 10.1 und 10.2). Die Wiederfindungsrate betrug für DMF $92 \pm 5 \%$, MMF $97 \pm 4 \%$, GS-DMS $98 \pm 11 \%$ und für GS-MMS $97 \pm 7 \%$.

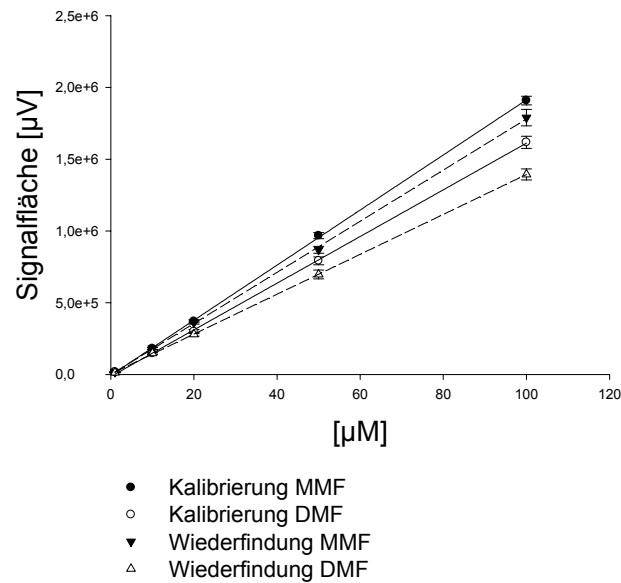


Abb. 10.1: Kalibrierung und Wiederfindung von DMF und MMF nach UV-Detektion. Die Signalfächen sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen (Kalibrierung: $r^2_{(DMF)} = 0,9998$; $r^2_{(MMF)} = 0,9999$, Wiederfindung: $r^2_{(DMF)} = 1$; $r^2_{(MMF)} = 0,9997$)

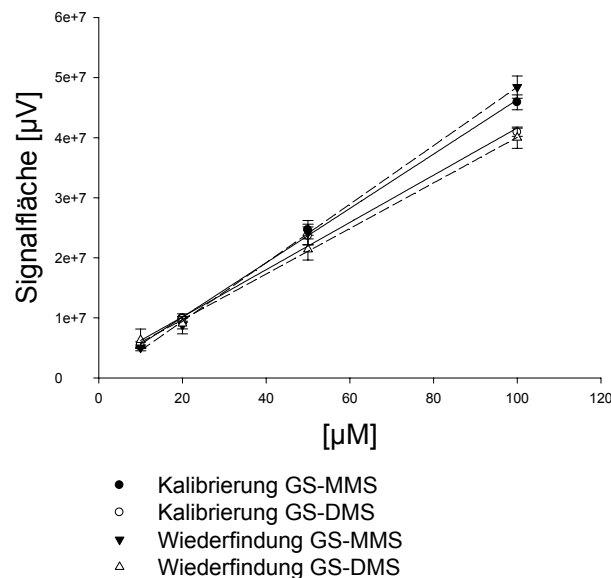


Abb. 10.2: Kalibrierung und Wiederfindung von GS-DMS und GS-MMS nach Fluoreszenzdetektion. Die Signalfächen sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen (Kalibrierung $r^2_{(GS-DMS)} = 0,9949$; $r^2_{(GS-MMS)} = 0,9987$, Wiederfindung: $r^2_{(GS-DMS)} = 0,9994$; $r^2_{(GS-MMS)} = 0,9990$)

10.3.2 Inkubationsexperimente

Die Inkubation von DMF mit Esterasen zeigte den deutlichen Einfluss dieser Enzyme auf die Stabilität der Substanz (Abb. 10.3 (A)). Im Komplettansatz wurde das gesamte DMF quantitativ zu MMF umgesetzt. Durch chemische Hydrolyse wurden dagegen nur ~ 28 % des DMF in MMF umgewandelt. Die Ergebnisse der Inkubationsexperimente mit DMF wiesen nach, dass eine enzymatische Esterhydrolyse unter den gewählten Bedingungen erfolgte, und somit die Ergebnisse der Experimente mit GS-DMS uneingeschränkt interpretierbar waren.

Die Ergebnisse der Inkubationen von GS-DMS mit Esterasen verdeutlichen, dass keine der beiden Esterfunktionen von GS-DMS durch Esterasen gespalten wurde (Abb. 10.3 (B)). Durch chemische Hydrolyse entstand, aus GS-DMS ~ 6 % GS-MMS. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Carbonsäureester von DMF vor einem Angriff von Esterasen „geschützt“ sind, sobald DMF an GSH addiert ist. Dies ist wahrscheinlich durch die Ladungen bedingt, die die funktionellen Gruppen von GSH bei physiologischem pH-Wert aufweisen. Auch alle bei der Metabolisierung von GS-DMS zu NAC-DMS auftretenden Zwischenprodukte sind bei physiologischem pH-Wert geladen. Dies macht auch plausibel, dass NAC-DMS im Urin nach Einnahme von Fumaderm[®] nachgewiesen werden kann.

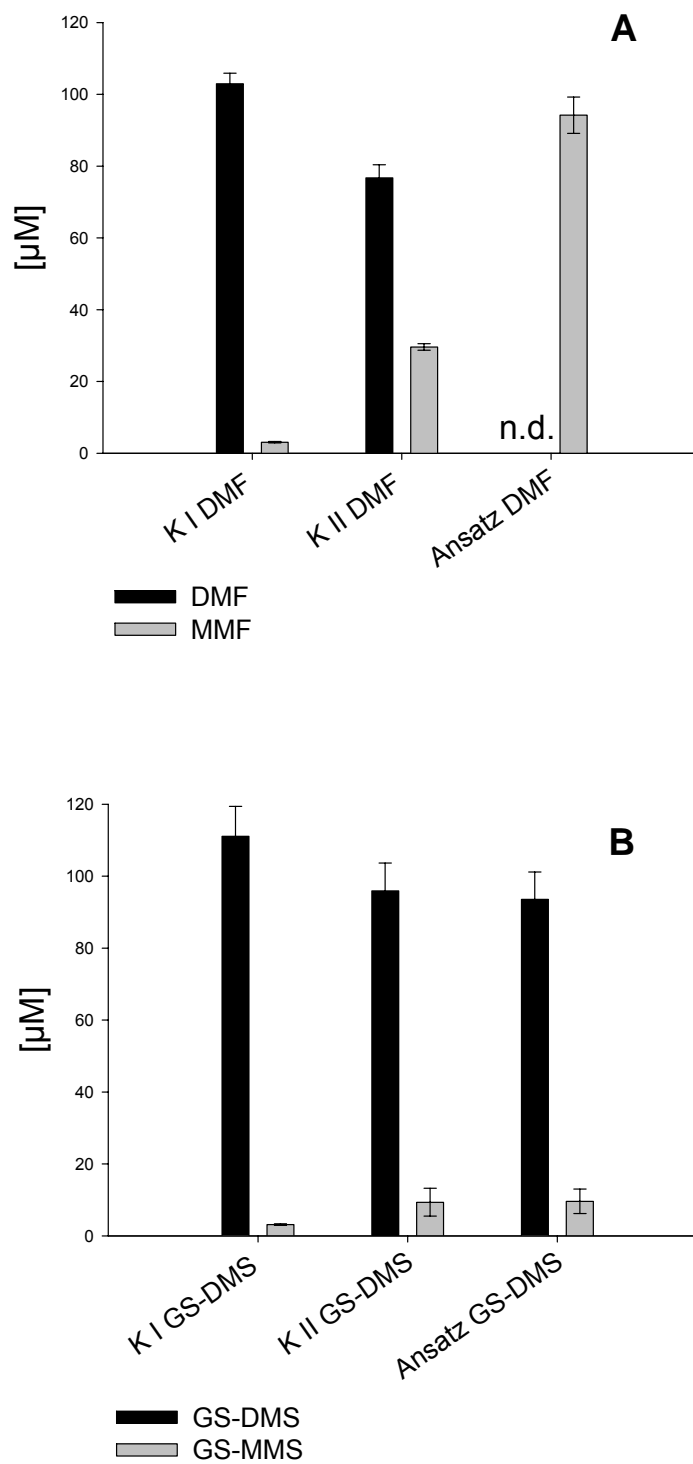


Abb. 10.3: (A) Stabilität von DMF und (B) Stabilität von GS-DMS gegenüber Esterasen; K I = Kontrolle ohne Enzym, die nicht inkubiert wurde; K II = Kontrolle ohne Enzym, die inkubiert wurde. Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus (A) $n = 2$ und (B) $n = 3$ Versuchen, je dreimal vermessen.

11 STUDIEN ZUR STABILITÄT VON FUMARSÄUREDIMETHYLESTER

11.1 Einleitung und Zielsetzung

Durch *in vivo* Versuche wurde gezeigt, dass nur MMF im Plasma von Psoriasis-Patienten nach oraler Gabe von Fumaderm[®] nachzuweisen war (Kap. 8, (45)). Auch nach intravenöser Applikation an Schweinen konnte kein DMF im Plasma gemessen werden (50).

Erst durch den Nachweis von NAC-DMS im Urin von Psoriasis Patienten wurde klar, dass DMF in die systemische Blutzirkulation gelangte (vgl. Kap. 8). Nach enteraler Absorption unterliegt DMF wahrscheinlich hauptsächlich zwei konkurrierenden Reaktionen im Pfortaderblut:

1. chemische und enzymatische Hydrolyse
2. Reaktion mit intrazellulärem GSH der Blutzellen

Diese Reaktionen verbrauchen DMF quantitativ und verlaufen so schnell, dass DMF im Plasma nicht nachzuweisen ist. Um die Verhältnisse und Geschwindigkeit dieser Reaktionen im Blut zu bestimmen, wurden vergleichend die Stabilität von DMF in PBS (pH = 7,4), humanem Plasma und humanem Vollblut bestimmt. Um die Kurzlebigkeit von DMF aufzuzeigen, wurden im Vergleich zu der Arbeit von Litjens *et al.* in 2004 (kürzeste Inkubationszeit 30 min) deutlich kürzere Inkubationszeiten und Inkubationsintervalle gewählt (49).

11.2 Material und Methoden

11.2.1 Material und Geräte

Zur Blutabnahme wurden 10 ml EDTA-Monovetten mit Monovetten-Kanüle (Sarstedt) verwendet.

PBS (PAA); DMSO, DMF, MMF (Sigma-Aldrich).

Eppendorf Zentrifuge 5810 R; Inkubations-/Inaktivierungsbad (GFL); Biofuge fresco (Heraeus).

11.2.2 Gewinnung von Plasma

Aus einem Teil frischen humanen EDTA-Blutes wurde Plasma durch Zentrifugation (1717 *g*, 4 °C, 5 min) gewonnen.

11.2.3 Inkubationsexperimente

PBS, Plasma und Vollblut wurden für 10 min bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert. Hiernach wurden die unterschiedlichen Medien mit DMF (gelöst in DMSO) gezielt versetzt, so dass eine Endkonzentration von 30 µM und 0,2 % DMSO resultierte. Es folgte eine Inkubation im 37 °C warmen Schüttelwasserbad für 0, 2, 5, 10 und 20 min. Zu 500 µl PBS und Plasmaproben erfolgte nach Inkubation die Zugabe von 500 µl 0,2 M HCl. Die Vollblutproben wurden nach Inkubation sofort zentrifugiert (1717 *g*, 4 °C, 5 min), um Plasma zu gewinnen. Anschließend wurde dem Plasma ebenfalls 500 µl 0,2 M HCl zugesetzt.

11.2.4 HPLC-Analytik

Die Probenvorbereitung und Analytik mit entsprechender Kalibrierung und Wiederfindung entsprach der in Kapitel 8.2.2.2.1 beschriebenen.

11.3 Ergebnisse

11.3.1 Stabilität von DMF in Phosphatpuffer pH = 7,4

In einem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 wurde DMF nur in sehr geringem Maße hydrolysiert. Eine HWZ für den betrachteten Zeitraum von 20 min war nicht zu ermitteln (Abb. 11.1).

11.3.2 Stabilität von DMF in Plasma

Die Abb. 11.2 zeigt eine Konzentrationsabnahme von DMF und eine dazu korrelierende Zunahme an MMF, dem Hydrolyseprodukt von DMF. Im Plasma ließ sich eine HWZ von 13,4 min für DMF ermitteln.

11.3.3 Stabilität von DMF in Vollblut

Die Abb. 11.3 zeigt, dass sofort nach Zugabe von DMF etwa 50 % verstoffwechselt werden. Daher ergab sich eine theoretische HWZ von 0 min. Bereits nach 5 min war DMF nahezu quantitativ umgesetzt. Eine Zunahme der MMF Konzentration konnte nur in den ersten 5 min beobachtet werden. Im weiteren Verlauf nahm diese wieder leicht ab. Die Menge an gebildetem MMF korrelierte nicht mit der Abnahme der DMF Konzentration. Das Verhältnis war $\sim 1:2$.

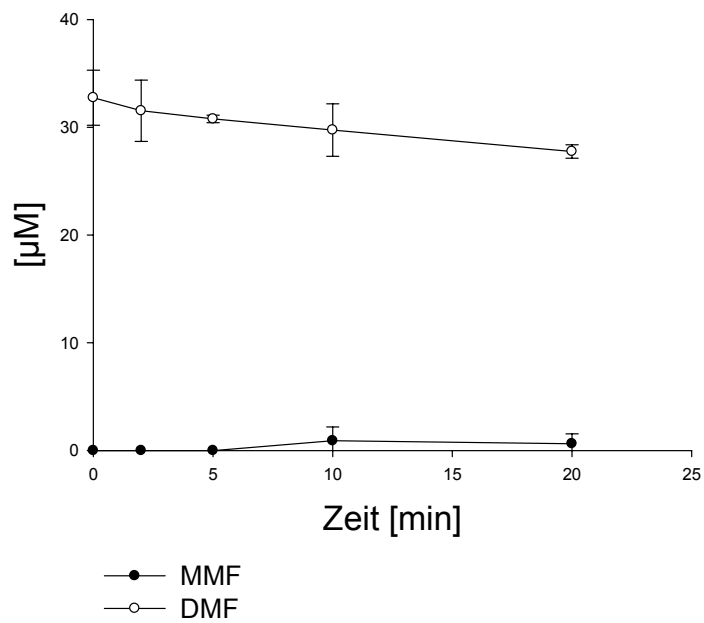


Abb 11.1: Stabilität von DMF in PBS ($\text{pH} = 7,4$; $37\text{ }^\circ\text{C}$). Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen.

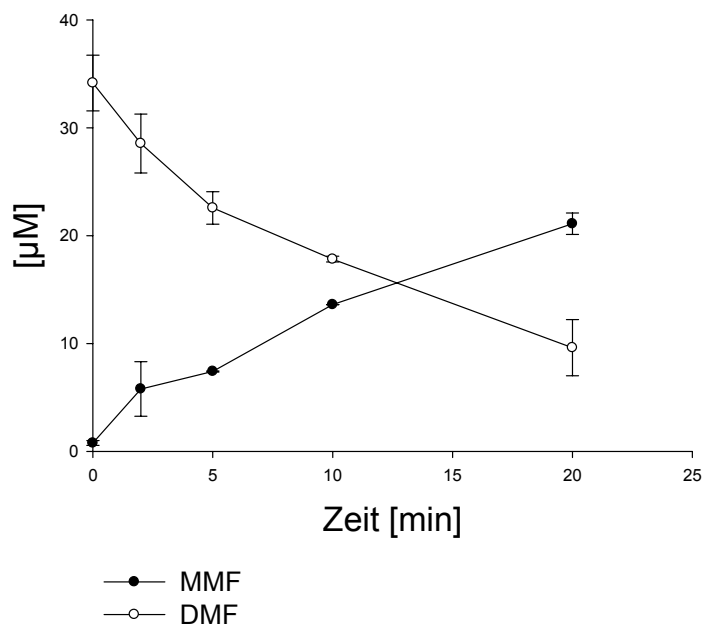


Abb. 11.2: Stabilität von DMF in EDTA-Plasma ($37\text{ }^\circ\text{C}$). Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen.

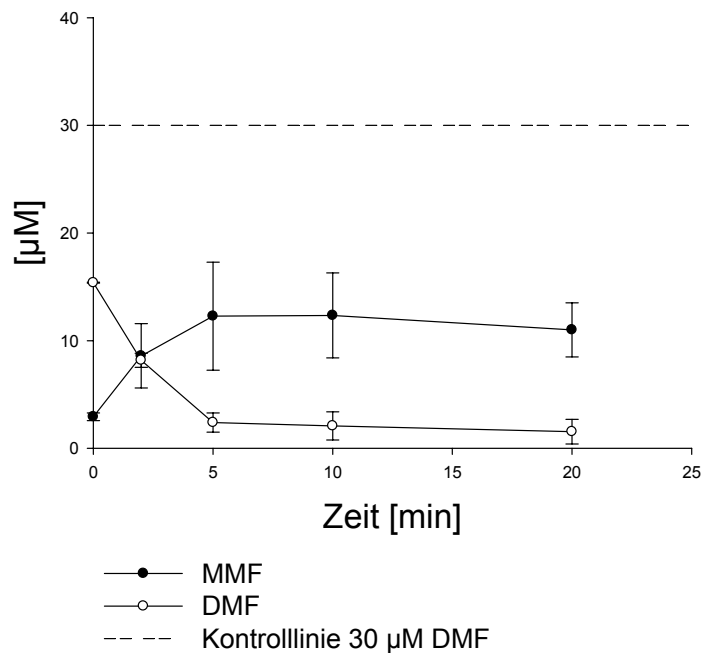


Abb. 11.3: Stabilität von DMF in EDTA-Vollblut (37 °C). Die Werte sind $\bar{x} \pm s$ aus $n = 2$ Ansätzen, je zweimal vermessen.

11.4 Diskussion

DMF ist im Plasma von Menschen nach Gabe von Fumaderm[®] nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu lassen sich Blutspiegel von seinem Hydrolyseprodukt MMF bestimmen. Im Urin wiederum lässt sich die Mercaptursäure von DMF nachweisen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass DMF zwar absorbiert wird, dann aber wahrscheinlich hauptsächlich durch zwei konkurrierende Reaktionen sehr schnell metabolisiert wird. Bei den Reaktionen handelt es sich um chemische bzw. enzymatische Hydrolyse und die Reaktion mit intrazellulärem GSH der Blutzellen des Pfortaderblutes.

Die physiologisch relevanten Zeiträume für die Metabolisierung von im Pfortaderblut anflutendem DMF sind sehr kurz. Für die Inkubationsversuche wurde daher ein Beobachtungszeitraum von maximal 20 min gewählt. Für diesen Zeitraum lässt sich in einem Puffer mit physiologischem pH-Wert (Abb. 11.1) keine HWZ für DMF bestimmen, da eine chemische Hydrolyse wenig ausgeprägt ist.

DMF ist ein gutes Substrat für Esterasen. Die Enzyme kommen vermehrt im Intestinum, im Plasma und in der Leber vor (48). Bei der Inkubation im Plasma lässt sich beobachten, dass MMF in dem Maße gebildet wurde, wie die Konzentration an DMF abnimmt (Abb. 11.2). Der Plasma pH-Wert von 7,4 hat einen vernachlässigbaren Einfluß auf die Stabilität von DMF (vgl. Stabilität im Phosphatpuffer pH = 7,4). Da die physiologische Konzentration an GSH im Plasma nur sehr gering ist und die Zunahme an MMF mit der Abnahme an DMF korreliert, ist auch die Konkurrenzreaktion mit GSH im Plasma vernachlässigbar (71). Die Stabilität von DMF im Plasma ist daher ausschließlich abhängig von dem Ausmaß der Hydrolyse durch Esterasen. Die HWZ für DMF im Plasma beträgt 13,4 min. Von Reddingius wurde eine Plasmahalbwertszeit von 11,6 min bestimmt (47).

Die Inkubationsexperimente im Vollblut (Abb. 11.3) zeigen, dass 50 % des zugesetzten DMF gleich nach Zugabe metabolisiert wurden. Innerhalb von 5 min wird nahezu alles DMF umgesetzt. Die Konzentration von MMF stieg hier nicht korrelierend zum Verbrauch von DMF an, sondern erreichte ihr Maximum nach 5 min. Der Versuch veranschaulicht die Verhältnisse der beiden Konkurrenzreaktionen. DMF, welches im Blut anflutet, wird zu $\sim 1/3$ zu MMF hydrolysiert und reagiert zu $\sim 2/3$ mit intrazellulärem GSH. Die Tatsache, dass DMF im Gegensatz zu MMF sehr schnell in Zellen penetriert, wurde schon in Kapitel 5 dargelegt.

Die leichte Abnahme von MMF über die Zeit könnte daher mit einer langsamen Penetration von MMF in die Zellen und einer Reaktion mit GSH erklärt werden. Dies wird durch den Nachweis von GS-MMS *in vivo* (Kapitel 8) und die in Kapitel 5 dargestellten Ergebnisse unterstützt.

Bei den hier durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass anflutendes DMF schon im Blut zum größten Teil metabolisiert wird. Neben diesen Reaktionen, trägt wahrscheinlich der Metabolismus, z.B. in Leber und Lunge, zur vollständigen präsystemischen Elimination von DMF bei. Für den in Kapitel 8 postulierten Wirkmechanismus der FAE spielen aber die Verhältnisse der Hydrolyse von DMF zur Bindung an GSH im Blut eine entscheidende Rolle.

12 UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHEN KOVALENTEN BINDUNG VON FUMARSÄUREDIMETHYLESTER AN THIOLGRUPPEN VON PLASMAPROTEINEN

12.1 Einleitung und Zielsetzung

Nucleophile Thiolgruppen cysteinhaltiger Peptide z.B. GSH oder N-Acetylcystein können im Sinne einer Michael-analogen Reaktion an die Doppelbindung von Fumarsäuredimethylester addieren. Eine Addition von DMF an cysteinhaltige synthetische Polypeptide konnte von Fryčák *et al.* in 2005 gezeigt werden (144).

Da DMF nach oraler Gabe von Fumaderm[®] wahrscheinlich im Pfortaderblut anflutet, kommt es zuerst mit Peptiden und Proteinen des Plasmas (im Folgenden nur als Proteine bezeichnet) in Kontakt. Weisen Proteine des Plasmas eine freie Thiolgruppe auf, die zusätzlich sterisch für DMF zugänglich ist, wäre eine kovalente Bindung von DMF theoretisch möglich.

Zum eindeutigen Nachweis einer Bindung von DMF an ein solches Protein sollten neben einer Kontrolle parallel Inkubationen von Plasma mit DMF und 2,3-¹³C-DMF durchgeführt werden. Bei ¹³C handelt es sich um ein stabiles Isotop des Kohlenstoffes. 2,3-¹³C-DMF weist ein um zwei Dalton größeres Molekulargewicht als DMF auf. Im Falle einer kovalenten Bindung von DMF an ein Protein müsste nach Fraktionierung der Proben mittels HPLC und massenspektrometrischer Analyse vergleichbarer Fraktionen der einzelnen Ansätze in der mit DMF inkubierten Probe eine Masse, die 144 Dalton größer ist als die Masse des Proteins in der Kontrolle, erkennbar sein. Weiterhin müsste in der entsprechenden Fraktion des Inkubationsansatzes mit 2,3-¹³C-DMF eine um 2 Dalton größere Masse im Vergleich zum Ansatz mit DMF beobachtbar sein. Auf diese Weise ließe sich eine kovalente Bindung von DMF an ein Protein nachvollziehen. Über das Molekulargewicht des Proteins könnten über Protein-Datenbanken Rückschlüsse auf seine Identität gezogen werden.

2,3-¹³C-DMF musste hierzu aus kommerziell erhältlichem 2,3-¹³C-FA dargestellt werden.

12.2 Material und Methoden

12.2.1 Material und Geräte

Zur Blutabnahme wurden 10 ml EDTA-Monovetten mit Monovetten-Kanüle (Sarstedt) verwendet.

Bortrifluorid-Etherat (Fluka); Methanol (Merck); DMSO, DMF, 2,3-¹³C-Fumarsäure (Sigma-Aldrich), EDTA-Monovetten (Sarstedt).

Gefriertrockner Alpha 2-4 (Christ); Eppendorf Zentrifuge 5810 R; Inkubations-/Inaktivierungsbad (GFL); Biofuge fresco (Heraeus); Kernresonanzspektrometer Bruker ARX 300 (¹H-NMR: 300,13 MHz, ¹³C-NMR: 75,47 MHz); Massenspektrometer Bruker Esquire-LC mit Elektro-Spray-Ionisation (ESI); Q-TOF II Massenspektrometer mit ESI (Waters, Eschborn).

12.2.2 Synthese von 2,3-¹³C-Fumarsäuredimethylester

Die Synthese von 2,3-¹³C-Fumarsäuredimethylester erfolgte in Anlehnung an Kadaba (145). Es wurden 6,85 mmol 2,3-¹³C-Fumarsäure zusammen mit 13,7 mmol Bortrifluorid-Etherat und 137 mmol Methanol für 20 h bei 65 °C unter Rückfluss gerührt. Beim Erkalten des Ansatzes fiel das Produkt aus. Dieses wurde abfiltriert, einmal mit Isopropanol umkristallisiert und getrocknet. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H-NMR, ¹³C-NMR, Massenspektrometrie, Schmelzpunkt und Elementaranalyse.

Gesamtausbeute: 79 % der Theorie

Schmelzpunkt: 106 °C (weißes Pulver)

Elementaranalyse:

¹³ C ₂ C ₄ H ₈ O ₄ (146,11 g/mol)	ber.: C 50,69 % H 5,52 %
	gef.: C 50,48 % H 5,79 %

ESI-MS: 147 Th

Die ¹³C- und ¹H-NMR-Daten werden in Kapitel 12.3.1 beschrieben.

12.2.3 Gewinnung von Plasma

EDTA-Plasma wurde durch Zentrifugation (1717 *g*, 4 °C, 10 min) aus humanem EDTA-Blut gewonnen.

12.2.4 Inkubationsexperimente

Stammlösungen (333 mM) von 2,3-¹³C-DMF und DMF wurden in DMSO hergestellt. 18 µl dieser Stammlösungen wurden zu 582 µl frischem auf 37 °C vorgewärmten EDTA-Plasma gegeben, so dass eine Endkonzentration von 10 mM 2,3-¹³C-DMF bzw. DMF und 3 % DMSO im Plasma resultierte. Als Kontrolle diente 582 µl Plasma, das mit 18 µl DMSO versetzt wurde.

Danach wurden die Proben für 30 min im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte der Zusatz von 600 µl eiskaltem Acetonitril, um Makroproteine zu präzipitieren. Die Proben wurden zusätzlich für ca. 30 min bei -70 °C gefroren und bei RT aufgetaut. Der nach Zentrifugation gewonnene Überstand wurde lyophilisiert und in 500 µl 0,1 % Trifluoressigsäure aufgenommen.

12.2.5 HPLC-Analytik

Die Proben wurden mittels der im Arbeitskreis Prof. Schröder etablierten HPLC-Methode fraktioniert.

HPLC-Pumpe	Pharmacia LKB µPrecision Pump
Detektor	Pharmacia LKB µPeak Monitor
Autosampler	Pharmacia LKB µSeparation Unit
Stationäre Phase	µRPC C2/C18 SC 2.1/10, 2,1 × 100 mm, 120 Å, 3 µM
Mobile Phase	A: 0,1 % TFA in Aqua bidest. B: Acetonitril/0,1 % TFA in Aqua bidest.

Gradient	Zeit [min]	Fluss [ml/min]	A [%]	B [%]
	0	0,1	100	0
	0 - 10	0,1	75	25
	10 - 40	0,1	30	70
	40 - 50	0,1	0	100
Detektion	$\lambda = 215 \text{ nm}, 256 \text{ nm und } 280 \text{ nm}$			
Injektionsvolumen	50 μl			

12.2.6 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse der Proteine in den erhaltenen Fraktionen erfolgte mit einem Q-TOF II (Quadrupol time of flight) Massenspektrometer mit einer ESI-Ionenquelle. 2 μl der Probe wurden mit 100 μl eines Gemisches aus 50 % Aqua bidest., 50 % Acetonitril und 0,2 % Ameisensäure (v/v) versetzt und mit 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ in das Massenspektrometer injiziert. Die Funktion MaxEnt1 der Software MassLynx™ (Waters) wurde genutzt, um aus den Rohdaten das Molekulargewicht der Proteine in der jeweiligen Probe zu berechnen.

12.3 Ergebnisse und Diskussion

12.3.1 Synthese von 2,3-¹³C-Fumarsäuredimethylester

Aus 2,3-¹³C-Fumarsäure wurde 2,3-¹³C-Fumarsäuredimethylester dargestellt und charakterisiert. (Abb. 12.1).

Das Isotop ¹³C weist eine natürliche Häufigkeit von 1,1 % auf. Da es in 2,3-¹³C-Fumarsäuredimethylester zu ≥ 99 % angereichert war, ergaben sich sowohl im ¹³C-NMR- als auch im ¹H-NMR-Spektrum Besonderheiten. Im ¹H-NMR-Spektrum bildeten die Kerne der olefinischen Protonen zusammen mit den ¹³C-Atomen ein AA'XX'-System höherer Ordnung, das nicht nach einfachen Multiplizitätsregeln ausgewertet werden kann (Abb. 12.2 und 12.3). Von den bei einem AA'XX'-System zu erwartenden 20 Linien sieht man 10 Linien des AA'-Teils im ¹H-NMR-Spektrum. Der XX'-Teil war im ¹³C-NMR-Spektrum nicht zu beobachten. Die Kerne der sechs

Protonen der Methoxygruppen bildeten ein Singulett bei 3,81 ppm. Bei 7,26 ppm ist das Lösungsmittel (CDCl₃)-Signal zu erkennen.

Im ¹³C-NMR-Spektrum liegt bei 133,40 ppm das Signal der ¹³C-Kerne. Seine hohe Intensität überlagerte das bei 165,9 zu erwartende Signal der Carbonylgruppen, so dass dieses vom Grundrauschen nicht zu unterscheiden war. Das Signal der Methoxygruppen war bei 52,31 ppm zu sehen (Abb.: 12.4).

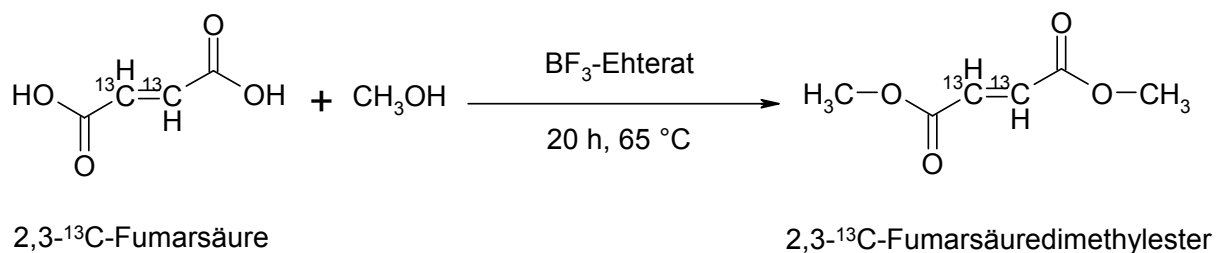


Abb. 12.1: Umsetzung von 2,3-¹³C-Fumarsäure zu 2,3-¹³C-Fumarsäuredimethylester

12.3.2 Inkubationsexperimente

Die Analyse von Plasmaproteinen, an die DMF eventuell binden konnte, sollte sich aufgrund der komplexen Proben auf kleine Proteine beschränken. Aus dem humanen Plasma wurden daher nach entsprechender Inkubation durch Zusatz von Acetonitril die Makroproteine ausgefällt.

Die Proben wurden zweimal aufgearbeitet (Abb. 12.5). Alle erhaltenen Fraktionen wurden massenspektrometrisch vermessen und mit der Software MassLynx™ ausgewertet. Die entsprechenden Fraktionen der Nullprobe wurden mit denen des mit DMF oder 2,3-¹³C-DMF inkubierten Plasmas verglichen. Es ließ sich in keinem Fall reproduzierbar ein um 144 Dalton größeres Protein in der DMF-Probe bzw. um 146 Dalton in der 2,3-¹³C-DMF-Probe als in der Nullprobe beobachten.

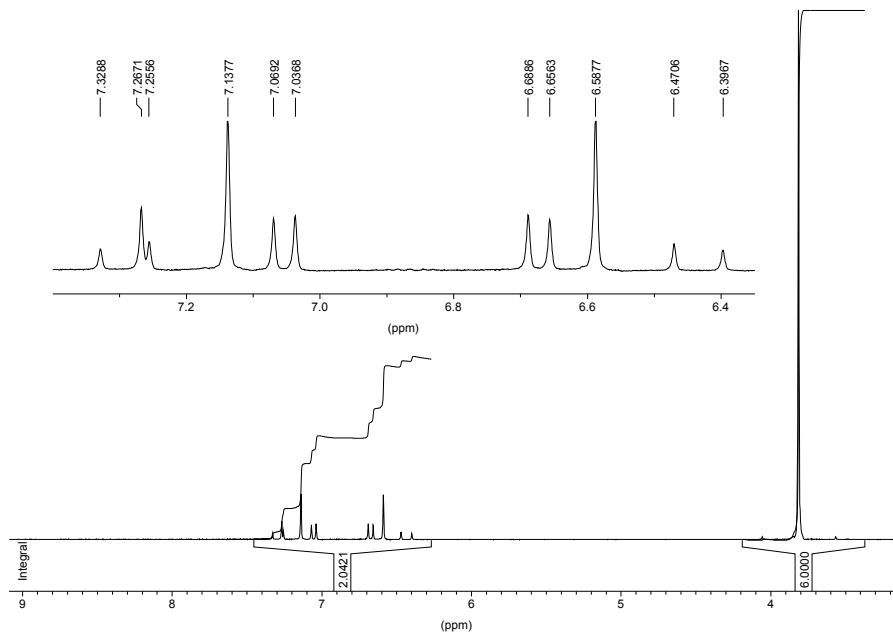


Abb. 12.2: ^1H -NMR Spektrum (CDCl_3 , 300 MHz) von $2,3\text{-}^{13}\text{C}$ -Fumarsäuredimethylester

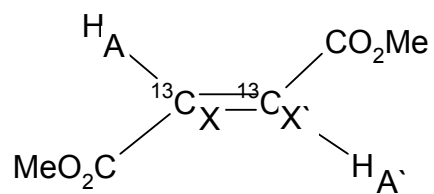


Abb. 12.3: AA 'XX'-System von $2,3\text{-}^{13}\text{C}$ -Fumarsäuredimethylester

12 UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHEN KOVALENTEN BINDUNG VON FUMARSÄUREDIMETHYLESTER AN THIOLGRUPPEN VON PLASMAPROTEINEN

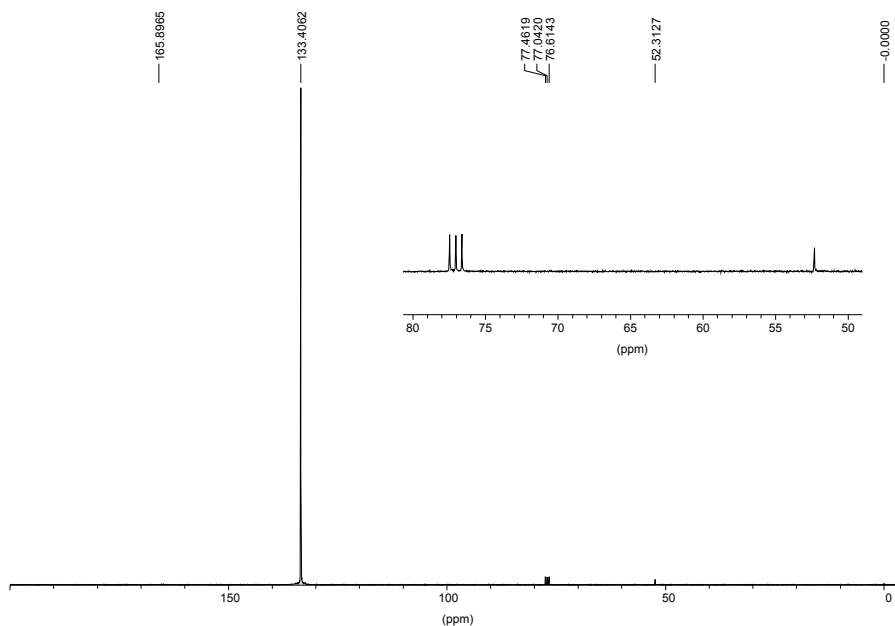


Abb. 12.4: ^{13}C -NMR Spektrum ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz) von $2,3\text{-}^{13}\text{C}$ -Fumarsäuredimethylester

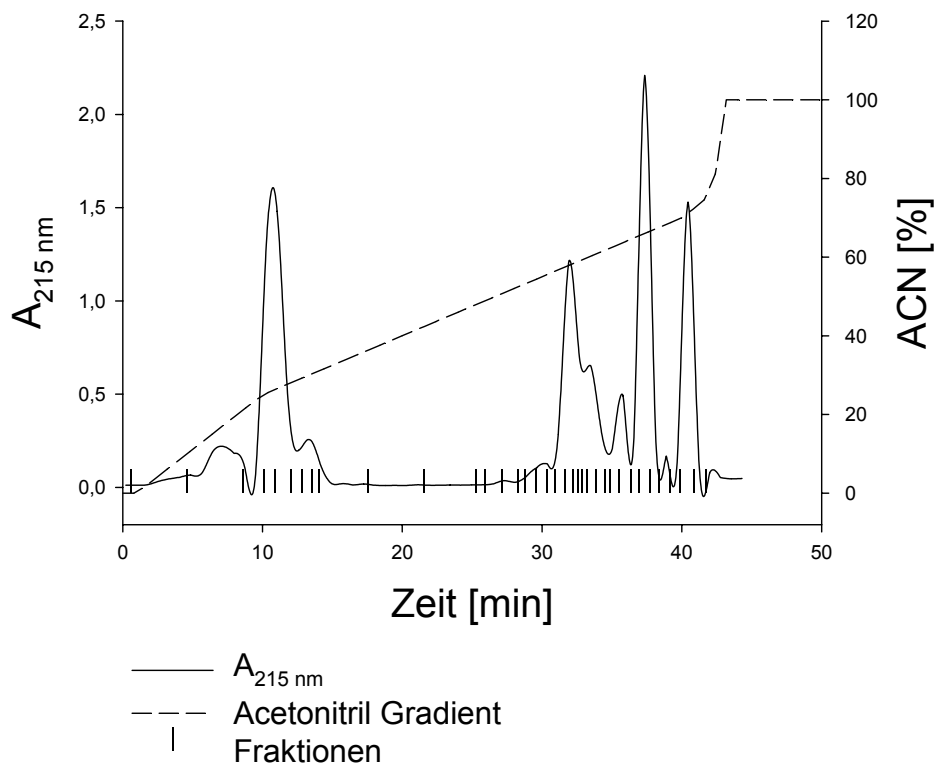


Abb. 12.5: Repräsentatives Chromatogramm nach chromatographischer Auftrennung von mit $2,3\text{-}^{13}\text{C}$ -DMF inkubierten Plasma

13 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

13.1 Material und Methoden

13.1.1 Material und Geräte

Trypsin/EDTA (Cell Concepts); EDTA (Fluka); PBS (PAA); TNS (Trypsin neutralization solution) (PromoCell); Einmalpipetten, Kryoröhrchen, Zellkulturflaschen, Zentrifugenröhrchen (Sarstedt).

Eppendorf Zentrifuge 5810 R; Inkubations-/Inaktivierungsbad (GFL); Biofuge fresco (Heraeus).

13.1.2 Zelllinien

In den entsprechenden Versuchen wurden normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK), humanen Fibroblasten, HaCaT-Keratinozyten und/oder CaCo-2 Zellen verwendet.

13.1.3 Kultivierung und Passagierung verschiedener Zellarten

Jede Zellart wurde in dem entsprechenden Medium (Tab. 13.1) in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Den Medien Quantum 263 und Quantum 333 sind essentielle Serumbestandteile schon zugesetzt, so dass eine Zugabe von FCS wie zu dem CaCo-2 Medium nicht mehr notwendig war. Bei dem „Keratinocyte Growth Medium 2“ handelt es sich um ein serumfreies Kulturmedium. Alle Arbeitsschritte in der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Medien, bis auf das für die Kultivierung von NHEK, zusätzlich mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin versetzt. Da von den Zellen Bestandteile des Mediums verbraucht und Stoffwechselprodukte in das Medium abgegeben werden, ist es notwendig, das

Medium in regelmäßigen Abständen zu wechseln. Ein Mediumwechsel erfolgte für jede Zellart alle 2-3 Tage. Das verbrauchte Medium wurde hierzu verworfen und durch einen Spülschritt mit PBS restliche Stoffwechselprodukte entfernt. Anschließend wurde frisches Medium zugegeben.

Sobald die Konfluenz des Zellrasens in der Kulturflasche > 90 % war, mussten die Zellen subkultiviert (passagiert) werden. Dazu wurden die adhärenen Zellen vom Kulturflaschenboden gelöst. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Nur bei der Kultur von CaCo-2 Zellen erfolgte jetzt der Zusatz einer 50 mM EDTA/PBS Lösung bei RT für 5 min. Dies erwies sich als notwendig, damit durch den nachfolgenden Trypsinisierungsprozeß alle CaCo-2 Zellen abgelöst werden konnten. Nachdem die PBS-Waschlösung bzw. die PBS/EDTA Lösung entfernt wurde, erfolgte eine Inkubation mit 5-6 ml einer Trypsin (0,05 %)/EDTA (0,02 %) Lösung bei 37 °C für 7-10 min. NHEK wurden bei RT trypsinisiert. Der Trypsinisierungsprozeß war abgeschlossen, sobald im Mikroskop nur noch kugelige, nicht adhärenente Zellen zu beobachten waren. Es erfolgte die Zugabe des jeweiligen Mediums, durch dessen FCS-Bestandteile der Trypsinisierungsprozeß gestoppt wurde. Bei der Kultur der NHEK wurde TNS zugesetzt. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min mit 168 *g* zentrifugiert. Für HaCaT-Keratinocyten und humane Fibroblasten wurde die Zentrifuge auf 4 °C gekühlt. Die Zentrifugation von CaCo-2 Zellen und NHEK erfolgte bei RT. Das resultierende Zellpallet wurde in 1 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert und auf 2-3 Kulturflaschen mit ~ 15 ml Medium verteilt.

Zellart	Medium	Firma
CaCo-2	DMEM + 10 % FCS + 2 mM L-Glutamin + 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin	Cell Concepts
humane Fibroblasten	Quantum 333 + 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin	PAA
HaCaT-Keratinocyten	Quantum 263 + 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin	PAA
NHEK	Keratinocyte Growth medium 2	PromoCell

Tab. 13.1: Verwendete Zellkulturmedien zur Kultivierung von CaCo-2 Zellen, humanen Fibroblasten, HaCaT-Keratinocyten und NHEK

13.1.4 Einfrieren

Zur längerfristigen Lagerung können Zellen eingefroren werden. Hierzu wurde das Zellpellet wie beim Passagieren (s. 13.1.2) gewonnen und in 1 ml FCS mit 10 % DMSO (v/v) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryotubes zunächst für 2-3 Stunden bei -20 °C und anschließend bei -70 °C eingefroren. Hiernach erfolgte zur längerfristigen Lagerung die Überführung in flüssigen Stickstoff.

13.1.5 Auftauen

Das Auftauen erfolgte im 37 °C Wasserbad. Die Zellsuspension wurde in Kulturflaschen mit vorgelegtem Medium gegeben. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

13.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte lichtmikroskopisch mittels der Neubauer Zählkammer. Hierzu werden nach Aufgabe der Zellsuspension alle vier Quadrate der Neubauer Zählkammer, die jeweils in 16 Kleinstquadrate unterteilt sind, ausgezählt. War die Zelldichte zu hoch, wurden adäquate Verdünnungen mit PBS hergestellt. Die Zellzahl ließ sich nach folgender Formel berechnen:

$$\frac{GZ \times V_f}{4 \times V_{\text{Quadrat}}} \times 1000 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

GZ = Gesamtzellzahl

V_f = Verdünnungsfaktor

4 = Anzahl der ausgezählten Quadrate

V_{Quadrat} = Flüssigkeitsvolumen über einem Quadrat

1000 = Umrechnung von Zellzahl/ μ l auf Zellzahl/ml

Formel 13.1: Berechnung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

14 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die 1959 durch Zufall entdeckte antipsoriatische Wirkung eines Gemisches aus Fumarsäureestern hat heute in der systemischen Therapie der schweren Psoriasis vulgaris einen hohen Stellenwert. Bei dem Fertigarzneimittel Fumaderm[®] handelt es sich um eine magensaftresistente Tablette mit einem Gemisch aus Fumarsäuredimethylester (DMF) und Fumarsäuremonoethylester (MEF). Im Vergleich zu anderen Therapieformen der schweren Psoriasis vulgaris ist besonders die Möglichkeit einer sicheren und effektiven Langzeittherapie mit Fumaderm[®] hervorzuheben. Bis heute sind sowohl die Wirkform *in vivo* als auch der Wirkmechanismus der Fumarsäureester (FAE) unbekannt. Auch die Pharmakokinetik dieser Substanzen ist nur wenig erforscht. Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der FAE. Primäres Ziel war es die Wirkform der FAE zu identifizieren. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war Folgendes literaturbekannt:

1. MEF spielt für die Wirkung FAE keine Rolle.
2. Bezüglich der Pharmakokinetik von DMF nach oraler Gabe wurde angenommen, dass es bedingt durch das intestinale Milieu (alkalischer pH-Wert, Aktivität von Esterasen) vollständig zu MMF hydrolysiert wird und daher nicht bioverfügbar ist.
3. Allgemein stellt DMF ein gutes Substrat für Esterasen dar.
4. Nur MMF, das Hydrolyseprodukt von DMF, war nach oraler Gabe von DMF im Plasma von gesunden Probanden nachzuweisen.
5. Auch nach intravenöser Gabe von DMF an Schweine war nur MMF im Plasma bestimmbar.
6. Die ursprüngliche Theorie, dass dem Krankheitsbild der Psoriasis ein Mangel an Fumarsäure zugrunde liegt, der durch die Gabe von FAE als Prodrugs der FA ausgeglichen wird, konnte nicht bewiesen werden, da nach oraler Applikation von Fumaderm[®] die FA-Plasmaspiegel unverändert blieben.
7. Ausschließlich DMF zeigte *in vitro* anti-entzündliche Effekte, die die antipsoriatische Wirkung der FAE-Therapie erklären könnten. Mit MMF ließen

sich nur Effekte beobachten, wenn es in Konzentrationen eingesetzt wurde, die ein Vielfaches (~ 10 - 20 faches) der Plasma-Konzentration betragen, die nach oraler Einnahme von zwei Tabletten Fumaderm[®] *in vivo* resultierten.

8. Die Behandlung von Zellen mit DMF *in vitro* führte zu einer initialen Depletion gefolgt von einer zeitlich versetzten Aufregulierung von Glutathion (GSH).

Die grundlegende Problematik des bisherigen Verständnisses der Wirkweise von FAE war die fehlende Korrelation der *in vitro* und *in vivo* erhobenen Daten. Nur DMF zeigte *in vitro* relevante anti-entzündliche Wirkungen, war aber *in vivo* nicht nachweisbar.

Diese Diskrepanz zwischen den *in vitro* und *in vivo* Daten konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

Durch die Betrachtung der physikochemischen Parameter von FAE ließ sich aufgrund der relativ hohen Lipophilie von DMF im Gegensatz zu MMF eine gute Absorption von DMF aus dem Dünndarm vorhersagen. Dies legte den Schluss nahe, dass die relativ hohen MMF-Plasmaspiegel, die nach oraler Gabe von Fumaderm[®] resultierten, nicht allein durch die Absorption von MMF über die Darmmukosa in die Blutzirkulation entstehen konnten.

Die Bioverfügbarkeit von DMF wird aber durch mehrere Faktoren eingeschränkt. Nach Freisetzung von DMF aus der magensaftresistenten Tablette Fumaderm[®] erfolgt nur eine geringe chemische Hydrolyse von DMF zu MMF durch den pH-Wert des Dünndarms, der zwischen pH = 5,5 und 7,4 liegt. Da DMF ein gutes Substrat für Esterasen darstellt, wird ein weiterer Teil von DMF enzymatisch in der intestinalen Flüssigkeit gespalten. Es konnte gezeigt werden, dass DMF sehr schnell in Zellen bzw. durch einen CaCo-2-Monolayer, der ein *in vitro* Modell für die intestinale Mukosa darstellt, penetriert. Ein Teil von DMF wird daher als „Konkurrenzreaktion“ zur Hydrolyse in der intestinalen Flüssigkeit in die Zellen der Mukosa diffundieren.

Geringe Stoffmengen von DMF wurden nach Inkubation eines CaCo-2-Monolayers schnell und quantitativ zu MMF hydrolysiert. MMF flutete dabei schnell auf der luminalen und abluminalen Seite des Monolayers an. Erst durch den Einsatz höherer Stoffmengen an DMF konnte ein Teil unverstoffwechselt den CaCo-2-Layer passieren. Aus den hieraus errechneten Permeabilitätskoeffizienten für DMF lässt sich eine hohe Bioverfügbarkeit vorhersagen.

Die Ergebnisse, die mit dem CaCo-2-Modell erhalten wurden, lassen sich in Bezug auf die *in vivo* Situation nach Einnahme von Fumaderm[®] wie folgt interpretieren:

1. Bedingt durch die galenische Formulierung von Fumaderm[®] wird DMF schnell freigesetzt und liegt in einer hohen lokalen Konzentration vor.
2. In der intestinalen Flüssigkeit wird ein Teil des freigesetzten DMF hauptsächlich durch Esterasen gespalten.
3. DMF penetriert schnell in und durch die Zellen der Mukosa. Ein großer Teil von DMF wird aber durch Esterasen in der Mukosa zu MMF hydrolysiert. MMF penetriert dann in Richtung der Blutzirkulation oder wieder zurück ins Intestinum. Die hohe lokale Konzentration von DMF an der Mukosa überlastet die Kapazität der vorhandenen Esterasen, so dass ein Teil von DMF die Mukosa unverstoffwechselt passieren und im Pfortaderblut anfluten kann.
4. MMF selbst wird aufgrund seiner relativ niedrigen Lipophilie nur bedingt absorbiert. DMF stellt in diesem Zusammenhang ein Prodrug für MMF dar. Durch die Gabe von DMF kann MMF schneller und in einem größeren Maße in der systemischen Zirkulation anfluten.

Der wichtigste Hinweis auf den möglichen Wirkmechanismus der FAE wurde in der durchgeführten *in vivo* Studie durch den Nachweis der Mercaptursäure von DMF *N*-Acetyl-*S*-(1,2-dimethoxycarbonyl)ethyl)cystein (NAC-DMS) in höheren Konzentrationen im Urin nach oraler Gabe von DMF erlangt. Dies war der erstmalig *in vivo* erbrachte Beweis dafür, dass DMF nach oraler Gabe wahrscheinlich in das Pfortaderblut gelangt. Entscheidend für den postulierten Wirkmechanismus der FAE ist die begründete Annahme, dass die Addition von DMF an GSH schon im Pfortaderblut erfolgt.

DMF, das im Pfortaderblut anflutet, unterliegt größtenteils noch vor der ersten Leberpassage zwei konkurrierenden Reaktionen:

1. Zu ungefähr einem Drittel wird es durch Esterasen zu MMF hydrolysiert.
2. Es penetriert in Blutzellen und reagiert dort mit GSH zu GS-DMS.

Die hohe Metabolisierungsrate von DMF im Blut wird zusätzlich durch die Beobachtung von Werdenberg in 2003 unterstützt, dass auch nach intravenöser

Injektion am Schwein zu keinem Zeitpunkt DMF im Blutplasma nachgewiesen werden konnte (57).

Es konnten geringe Mengen von GS-MMS in der Blutzellfraktion nach oraler Einnahme von Fumaderm[®] nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass die Glutathionaddukte GS-DMS und GS-MMS die Wirkform der FAE darstellten, konnte in entsprechenden *in vitro* Versuchen nicht bestätigt werden.

Auch konnte *in vivo* bei Psoriasis-Patienten nach oraler Einnahme von Fumaderm[®] keine Veränderungen der FA-Konzentration im Plasma oder der Blutzellfraktion festgestellt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass DMF oder MMF Prodrugs für FA sind, ist daher gering.

Die Wirkung von FAE scheint auf der Addition vor allem von DMF an intrazelluläres GSH von Immunzellen zu beruhen. Dieses Postulat der Wirkungsweise ist in Kapitel 8.4 genau beschrieben. Eine Therapie mit Fumarsäureestern führt durch die Erhaltung der Immunhomöostase (Veränderung des Zytokinprofils oder Induktion von Apoptose in Immunzellen; insbesondere Th-Zellen) zur Begrenzung der Inflammation durch intrazelluläre Depletion von GSH in Immunzellen.

Der Teil an DMF, der eventuell bis zur ersten Leberpassage noch unverstoffwechselt bleibt, wird spätestens in der Leber durch Esterasen und/oder durch Konjugation an GSH verbraucht, da nach oraler Gabe von DMF zu keinem Zeitpunkt DMF-Plasmaspiegel zu bestimmen sind.

Die hier dargestellten Ergebnisse belegen, dass die Therapie mit DMF Glutathion verbraucht. Sie geben berechtigten Grund für das Postulat, dass der pharmakodynamische Effekt der FAE aus einem pharmakokinetischen Prozess, nämlich der Addition von insbesondere DMF an intrazellulären GSH im Rahmen des Phase-II-Metabolismus, resultiert.

Über die Beeinflussung intrazellulärer GSH-Spiegel durch DMF werden offensichtlich immunvermittelte, entzündungsfördernde Mechanismen, die bei Erkrankungen wie der Psoriasis hochreguliert sind, wirksam moduliert.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen ein therapeutisches Prinzip auf, das eventuell zukünftig auch bei der Entwicklung neuer entzündungshemmender Medikamente Berücksichtigung finden könnte.

Literaturverzeichnis

- (1) Christophers, E, Mrowietz, U, In: Freedberg IM, Eisen AZ *et al.* Dermatology in general medicine, 6.Auflage. New York: McGraw-Hill, 2003.
- (2) Farber EM, Nall ML. The natural history of psoriasis in 5600 patients. *Dermatologica* 1974; 148:1-18.
- (3) Brandrup F, Green A. The prevalence of psoriasis in Denmark. *Acta Derm Venereol* 1981; 61:344-346.
- (4) Nanda A, Kaur S, Kaur I, Kumar B. Childhood psoriasis: an epidemiologic survey of 112 patients. *Pediatr Dermatol* 1990; 7:19-21.
- (5) Swanbeck G, Inerot A, Martinsson T, Wahlstrom J. A population genetic study of psoriasis. *Br J Dermatol* 1994; 131:32-39.
- (6) Henseler T, Christophers E. Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13:450-456.
- (7) Abel EA, DiCicco LM, Orenberg EK, Fraki JE, Farber EM. Drugs in exacerbation of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15:1007-1022.
- (8) Tsankov N, Angelova I, Kazandjieva J. Drug-induced psoriasis. Recognition and management. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1:159-165.
- (9) Weinstein GD, Van Scott EJ. Autoradiographic analysis of turnover times of normal and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 1965; 45:257-262.
- (10) Weinstein GD, McCullough JL, Ross PA. Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1985; 85:579-583.
- (11) Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O *et al.* Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 2005; 202:135-143.

- (12) Boyman O, Conrad C, Tonel G, Gilliet M, Nestle FO. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol* 2007; 28:51-57.
- (13) Prinz JC, Gross B, Vollmer S, Trommler P, Strobel I, Meurer M *et al.* T cell clones from psoriasis skin lesions can promote keratinocyte proliferation *in vitro* via secreted products. *Eur J Immunol* 1994; 24:593-598.
- (14) Vallat VP, Gilleaudeau P, Battat L, Wolfe J, Nabeya R, Heftler N *et al.* PUVA bath therapy strongly suppresses immunological and epidermal activation in psoriasis: a possible cellular basis for remittive therapy. *J Exp Med* 1994; 180:283-296.
- (15) Mrowietz U. Advances in systemic therapy for psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26:362-367.
- (16) Nast A, Kopp IB, Augustin M, Banditt KB, Boehncke WH, Follmann M *et al.* [S3-Guidelines for the therapy of psoriasis vulgaris]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2006; 4 Suppl 2:S1-126.
- (17) Schweckendiek W. Behandlung der Psoriasis. *Med Monatsschr* 1959; 13(2):103-104.
- (18) Nast A, Kopp IB, Augustin M, Banditt KB, Boehncke WH, Follmann M *et al.* Evidence-based (S3) guideline for the treatment of psoriasis vulgaris. *J Dtsch Dermatol Ges* 2007; 5 Suppl 3:1-119.
- (19) Altmeyer PJ, Matthes U, Pawlak F, Hoffmann K, Frosch PJ, Ruppert P *et al.* Antipsoriatic effect of fumaric acid derivatives. Results of a multicenter double-blind study in 100 patients. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30:977-981.
- (20) Mrowietz U, Christophers E, Altmeyer P. Treatment of psoriasis with fumaric acid esters: results of a prospective multicentre study. *Br J Dermatol* 1998; 138:456-460.
- (21) Kolbach DN, Nieboer C. Fumaric acid therapy in psoriasis: results and side effects of 2 years of treatment. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27(5):769-771.

- (22) Thio B, van der Schroeff JG, Nugteren-Huying WM, Vermeer BJ. Long term systemic therapy with dimethylfumarate and monoethylfumarate (Fumaderm) in psoriasis. 4, 35-40. 1995. J Eur Acad Dermatol Venereol.
- (23) Hoefnagel JJ, Thio HB, Willemze R, Bouwes Bavinck JN. Long-term safety aspects of systemic therapy with fumaric acid esters in severe psoriasis. Br J Dermatol 2003; 149:363-369.
- (24) Nugteren-Huying WM, van der Schroeff JG, Hermans J, Suurmond D. Fumaric acid therapy for psoriasis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Am Acad Dermatol 1990; 22:311-312.
- (25) Altmeyer P, Hartwig R, Matthes U. Das Wirkungs- und Sicherheitsprofil von Fumarsäureestern in der oralen Langzeittherapie bei schwerer therapieresistenter Psoriasis vulgaris. Hautarzt 1996; 47:190-196.
- (26) Altmeyer P, Höxtermann S, Auer T. Verlaufsbeobachtungen der Lymphozytensubpopulationen bei Psoriasis-Patienten unter oraler Therapie mit Fumaraten. Akt Dermatol 1996; 47:272-277.
- (27) Fliegner L, Spiegel P. [Osteomalacia as an apparently rare side effect of oral fumaric acid therapy. Secondary DeToni-Debre Fanconi syndrome in the adult]. Hautarzt 1992; 43:554-560.
- (28) Blume H. 2005. Persönliche Mitteilung
- (29) Bergström CA, Norinder U, Luthman K, Artursson P. Experimental and computational screening models for prediction of aqueous drug solubility. Pharm Res 2002; 19:182-188.
- (30) Lüllmann H, Mohr K. Pharmakologie und Toxikologie. 14. Auflage 1999, Seite 18.
- (31) Mutschler E. Arzneimittelwirkungen. 7. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1997, Seite 20.

- (32) Meyer UA. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996; 24:449-459.
- (33) Gonzalez FJ, Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 1990; 6:182-186.
- (34) Guengerich FP. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* 2003; 3:194-204.
- (35) Hinson JA, Forkert PG. Phase II enzymes and bioactivation. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73:1407-1413.
- (36) Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Arch Pharm Res* 2000; 23:1-16.
- (37) Rushmore TH, Kong AN. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 2002; 3:481-490.
- (38) Schilter B, Turesky RJ, Juillerat M, Honegger P, Guigoz Y. Phase I and phase II xenobiotic reactions and metabolism of the food-borne carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in aggregating liver cell cultures. *Biochem Pharmacol* 1993; 45:1087-1096.
- (39) Brinkmann U, Eichelbaum M. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics J* 2001; 1:59-64.
- (40) Kim RB. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. *Eur J Clin Invest* 2003; 33 Suppl 2:1-5.
- (41) Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003; 55:425-461.

- (42) Staudinger JL, Madan A, Carol KM, Parkinson A. Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab Dispos* 2003; 31:523-527.
- (43) Lüllmann H, Mohr K. *Pharmakologie und Toxikologie*. 14. Auflage 1999, Seite 26-27.
- (44) Mutschler E. *Arzneimittelwirkungen*. 7. Auflage 1997, Seite 34-36.
- (45) Litjens NH, Burggraaf J, van Strijen E, van Gulpen C, Mattie H, Schoemaker RC *et al.* Pharmacokinetics of oral fumarates in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58:429-432.
- (46) Baumann M. *Pharmakokinetische Untersuchungen mit Fumarsäurederivaten in vitro und in vivo*. Pharmazeutisches Institut der ETH Zürich, 1989.
- (47) Reddingius WG. *Bioanalysis and Pharmacokinetics of Fumarates in Humans*. Department of Pharmacy, Swiss Federal Institute of Technology Zürich (ETH Zürich), Switzerland, 1997.
- (48) Werdenberg D, Joshi R, Wolfram S, Merkle HP, Langguth P. Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. *Biopharm Drug Dispos* 2003; 24:259-273.
- (49) Litjens NH, van Strijen E, van Gulpen C, Mattie H, van Dissel JT, Thio HB *et al.* *In vitro* pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters. *BMC Pharmacol* 2004; 4:22.
- (50) Werdenberg D. *Stability, Permeability and Pharmacokinetics of Perorally administered Fumarates*. Department of Applied Biosciences, Galenical Pharmacy, Swiss Federal Institute of Technology Zürich (ETH Zürich), 2003.
- (51) Marsh S, Xiao M, Yu J, Ahluwalia R, Minton M, Freimuth RR *et al.* Pharmacogenomic assessment of carboxylesterases 1 and 2. *Genomics* 2004; 84:661-668.

- (52) Quinney SK, Sanghani SP, Davis WI, Hurley TD, Sun Z, Murry DJ *et al.* Hydrolysis of capecitabine to 5'-deoxy-5-fluorocytidine by human carboxylesterases and inhibition by loperamide. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313:1011-1016.
- (53) Jewell C, Bennett P, Mutch E, Ackermann C, Williams FM. Inter-individual variability in esterases in human liver. *Biochem Pharmacol* 2007; 74:932-939.
- (54) Nieboer C, de Hoop D, van Loenen AC, Langendijk PN, van Dijk E. Systemic therapy with fumaric acid derivatives: new possibilities in the treatment of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20:601-608.
- (55) Nieboer C, de Hoop D, Langendijk PN, van Loenen AC, Gubbels J. Fumaric acid therapy in psoriasis: a double-blind comparison between fumaric acid compound therapy and monotherapy with dimethylfumaric acid ester. *Dermatologica* 1990; 181:33-37.
- (56) Fumapharm/Biogen Idec. BG 12/Oral Fumarate, FAG-201, second-generation fumarate derivative--Fumapharm/Biogen Idec. *Drugs R D* 2005; 6:229-230.
- (57) Bacharach-Buhles M, Pawlak FM, Matthes U, Joshi RK, Altmeyer P. Fumaric acid esters (FAEs) suppress CD 15- and ODP 4-positive cells in psoriasis. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1994; 186:79-82.
- (58) Höxtermann S, Nuchel C, Altmeyer P. Fumaric acid esters suppress peripheral CD4- and CD8-positive lymphocytes in psoriasis. *Dermatology* 1998; 196:223-230.
- (59) de Jong R, Bezemer AC, Zomerdijk TP, Pouw-Kraan T, Ottenhoff TH, Nibbering PH. Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. *Eur J Immunol* 1996; 26:2067-2074.

- (60) Litjens NH, Rademaker M, Ravensbergen B, Rea D, van der Plas MJ, Thio B *et al.* Monomethylfumarate affects polarization of monocyte-derived dendritic cells resulting in down-regulated Th1 lymphocyte responses. *Eur J Immunol* 2004; 34:565-575.
- (61) Litjens NH, Rademaker M, Ravensbergen B, Thio HB, van Dissel JT, Nibbering PH. Effects of monomethylfumarate on dendritic cell differentiation. *Br J Dermatol* 2006; 154:211-217.
- (62) Zhu K, Mrowietz U. Inhibition of dendritic cell differentiation by fumaric acid esters. *J Invest Dermatol* 2001; 116:203-208.
- (63) Stoof TJ, Flier J, Sampat S, Nieboer C, Tensen CP, Boorsma DM. The antipsoriatic drug dimethylfumarate strongly suppresses chemokine production in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Br J Dermatol* 2001; 144:1114-1120.
- (64) Treumer F, Zhu K, Gläser R, Mrowietz U. Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells. *J Invest Dermatol* 2003; 121:1383-1388.
- (65) Vandermeeren M, Janssens S, Borgers M, Geysen J. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234:19-23.
- (66) Loewe R, Holnthoner W, Groger M, Pillinger M, Gruber F, Mechtcheriakova D *et al.* Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol* 2002; 168:4781-4787.
- (67) Vandermeeren M, Janssens S, Wouters H, Borghmans I, Borgers M, Beyaert R *et al.* Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappa B1, but not RelA in normal human dermal fibroblast cells. *J Invest Dermatol* 2001; 116:124-130.

- (68) Gerdes S, Shakery K, Mrowietz U. Dimethylfumarate inhibits nuclear binding of nuclear factor kappaB but not of nuclear factor of activated T cells and CCAAT/enhancer binding protein beta in activated human T cells. *Br J Dermatol* 2007; 156:838-842.
- (69) Mrowietz U, Asadullah K. Dimethylfumarate for psoriasis: more than a dietary curiosity. *Trends Mol Med* 2005; 11:43-48.
- (70) Nelson KC, Carlson JL, Newman ML, Sternberg P, Jr., Jones DP, Kavanagh TJ *et al.* Effect of dietary inducer dimethylfumarate on glutathione in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:1927-1935.
- (71) Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52:711-760.
- (72) Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3071-3076.
- (73) Staal FJ, Roederer M, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:9943-9947.
- (74) Prochaska HJ, Yeh Y, Baron P, Polsky B. Oltipraz, an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3953-3957.
- (75) Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46:3-26.
- (76) Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 2002; 45:2615-2623.

- (77) Fallingborg J, Christensen LA, Ingeman-Nielsen M, Jacobsen BA, Abildgaard K, Rasmussen HH. pH-profile and regional transit times of the normal gut measured by a radiotelemetry device. *Aliment Pharmacol Ther* 1989; 3:605-613.
- (78) Bartolini M, Bertucci C, Gotti R, Tumiatti V, Cavalli A, Recanatini M *et al.* Determination of the dissociation constants (pKa) of basic acetylcholinesterase inhibitors by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2002; 958:59-67.
- (79) Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J Med Chem* 2000; 43:3714-3717.
- (80) Goldstein A. The interactions of drugs and plasma proteins. *Pharmacol Rev* 1949; 1:120.
- (81) Brodie BB. Displacement of one drug by another from carrier or receptor sites. *Proc Roy Soc Med* 1965; 58:946.
- (82) Franke R. Die hydrophobe Wechselwirkung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen mit Humanserumalbumin. *Biochim Biophys Acta* 1968; 160:378.
- (83) Bird AE, Marshall AC. Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients. *Biochem Pharmacol* 1967; 16:2275.
- (84) Hansch C, Kiehs K, Lawrence GL. The role of substituents in the hydrophobic bonding of phenols by serum and mitochondrial proteins. *J Amer chem Soc* 1965; 87:5770.
- (85) Müller WE. Die Plasmaproteinbindung von Pharmaka; Molekularpharmakologische Grundlagen und therapeutische Bedeutung. *Med Mo Pharm* 1982; 5:302-310.
- (86) Pfeifer S, Pfliegel P, Borchert H. Biopharmazie. Ullstein Mosby GmbH, Berlin, Wiesbaden, 1995.

- (87) Klotz JM. The application of the law of mass action to binding by proteins. Interactions with calcium. Arch Biochem 1946; 9:109.
- (88) Scholtan W. [Binding of sulfonamides to protein. 6. Determination of protein binding of sulfonamides by means of ultracentrifuge and gel filtration]. Arzneimittelforschung 1965; 15:1433-1441.
- (89) Benincosa LJ, Morris ME. Nonlinear pharmacokinetics and protein binding of tiaprofenic acid in female Lewis rats. J Pharm Sci 1993; 82:429-430.
- (90) Mrowietz U, Elder JT, Barker J. The importance of disease associations and concomitant therapy for the long-term management of psoriasis patients. Arch Dermatol Res 2006; 298:309-319.
- (91) Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35:495-516.
- (92) Sebök B, Bonnekoh B, Geisel J, Mahrle G. Antiproliferative and cytotoxic profiles of antipsoriatic fumaric acid derivatives in keratinocyte cultures. Eur J Pharmacol 1994; 270:79-87.
- (93) Gu B, DeAngelis LM. Enhanced cytotoxicity of bioreductive antitumor agents with dimethyl fumarate in human glioblastoma cells. Anticancer Drugs 2005; 16:167-174.
- (94) Zucker B, Hanusch J, Bauer G. Glutathione depletion in fibroblasts is the basis for apoptosis-induction by endogenous reactive oxygen species. Cell Death Differ 1997; 4:388-395.
- (95) Roh YJ, Moon C, Kim SY, Park MH, Bae YC, Chun MH *et al.* Glutathione depletion induces differential apoptosis in cells of mouse retina, *in vivo*. Neurosci Lett 2007; 417:266-270.
- (96) Laberge RM, Karwatsky J, Lincoln MC, Leimani ML, Georges E. Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. Biochem Pharmacol 2007; 73:1727-1737.

- (97) Cristofanon S, Nuccitelli S, D'Alessio M, Radogna F, De Nicola M, Bergamaschi A *et al.* Oxidative upregulation of Bcl-2 in healthy lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1091:1-9.
- (98) Hollins DL, Suliman HB, Piantadosi CA, Carraway MS. Glutathione regulates susceptibility to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 2006; 40:1220-1226.
- (99) Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 1985; 24:119-124.
- (100) Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; 27:502-522.
- (101) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
- (102) Bulychev A, Trouet A, Tulkens P. Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. *Exp Cell Res* 1978; 115:343-355.
- (103) Barile FA, Dierickx PJ, Kristen U. *In vitro* cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. *Cell Biol Toxicol* 1994; 10:155-162.
- (104) Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:1107-1112.
- (105) Schmidt TJ, Ak M, Mrowietz U. Reactivity of dimethyl fumarate and methylhydrogen fumarate towards glutathione and N-acetyl-l-cysteine-Preparation of S-substituted thiosuccinic acid esters. *Bioorg Med Chem* 2007; 15:333-342.

- (106) Mrowietz U, Christophers E, Altmeyer P. Treatment of severe psoriasis with fumaric acid esters: scientific background and guidelines for therapeutic use. The German Fumaric Acid Ester Consensus Conference. *Br J Dermatol* 1999; 141:424-429.
- (107) Schimrigk S, Brune N, Hellwig K, Lukas C, Bellenberg B, Rieks M *et al.* Oral fumaric acid esters for the treatment of active multiple sclerosis: an open-label, baseline-controlled pilot study. *Eur J Neurol* 2006; 13:604-610.
- (108) Held KD, Epp ER, Clark EP, Biaglow JE. Effect of dimethyl fumarate on the radiation sensitivity of mammalian cells *in vitro*. *Radiat Res* 1988; 115:495-502.
- (109) Murata Y, Shimamura T, Hamuro J. The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 2002; 14:201-212.
- (110) Utsugi M, Dobashi K, Koga Y, Shimizu Y, Ishizuka T, Iizuka K *et al.* Glutathione redox regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production through p38 mitogen-activated protein kinase activation in human monocytes: role of glutathione redox in IFN-gamma priming of IL-12 production. *J Leukoc Biol* 2002; 71:339-347.
- (111) Romberg R, Olofsen E, Sarton E, den Hartigh J, Taschner PE, Dahan A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of morphine-6-glucuronide-induced analgesia in healthy volunteers: absence of sex differences. *Anesthesiology* 2004; 100:120-133.
- (112) Moran TD, Smith PA. Morphine-3beta-D-glucuronide suppresses inhibitory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:568-576.
- (113) Zelcer N, van de WK, Hillebrand M, Sarton E, Kuil A, Wielinga PR *et al.* Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:7274-7279.

- (114) Lotsch J, Skarke C, Schmidt H, Grosch S, Geisslinger G. The transfer half-life of morphine-6-glucuronide from plasma to effect site assessed by pupil size measurement in healthy volunteers. *Anesthesiology* 2001; 95:1329-1338.
- (115) Mantione KJ, Goumon Y, Esch T, Stefano GB. Morphine 6beta glucuronide: fortuitous morphine metabolite or preferred peripheral regulatory opiate? *Med Sci Monit* 2005; 11:MS43-MS46.
- (116) Sticherling M, Sautier W, Schröder JM, Christophers E. Interleukin-8 plays its role at local level in psoriasis vulgaris. *Acta Derm Venereol* 1999; 79:4-8.
- (117) Beljaards RC, Van Beek P, Nieboer C, Stoof TJ, Boorsma DM. The expression of interleukin-8 receptor in untreated and treated psoriasis. *Arch Dermatol Res* 1997; 289:440-443.
- (118) Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harb Laboratory Press, New York, 1989.
- (119) de Haan P, von Blomberg-van der Flier BM, de Groot J, Nieboer C, Bruynzeel DP. The risk of sensitization and contact urticaria upon topical application of fumaric acid derivatives. *Dermatology* 1994; 188:126-130.
- (120) Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie.* Springer-Verlag, 1991.
- (121) Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S *et al.* Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 1993; 123:1777-1788.
- (122) Pappenheimer JR, Reiss KZ. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J Membr Biol* 1987; 100:123-136.
- (123) Dantzig AH, Hoskins JA, Tabas LB, Bright S, Shepard RL, Jenkins IL *et al.* Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily. *Science* 1994; 264:430-433.

- (124) Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, Simmons NL, Hirst BH. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *J Biol Chem* 1993; 268:14991-14997.
- (125) Augustijns PF, Bradshaw TP, Gan LS, Hendren RW, Thakker DR. Evidence for a polarized efflux system in CACO-2 cells capable of modulating cyclosporin A transport. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197:360-365.
- (126) Lin JH, Lu AY. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:535-567.
- (127) Imai T. Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 21:173-185.
- (128) Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988; 48:1936-1942.
- (129) Peters WH, Roelofs HM. Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferases. *Cancer Res* 1992; 52:1886-1890.
- (130) Harris KE, Jeffery EH. Sulforaphane and erucin increase MRP1 and MRP2 in human carcinoma cell lines. *J Nutr Biochem* 2007.
- (131) Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46:27-43.
- (132) Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci* 2000; 10:195-204.
- (133) Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175:880-885.

- (134) Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996; 22:67-84.
- (135) Buesen R, Mock M, Seidel A, Jacob J, Lampen A. Interaction between metabolism and transport of benzo[a]pyrene and its metabolites in enterocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 183:168-178.
- (136) Trotter PJ, Storch J. Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *J Lipid Res* 1991; 32:293-304.
- (137) Awasthi S, Cheng J, Singhal SS, Saini MK, Pandya U, Pikula S *et al.* Novel function of human RLIP76: ATP-dependent transport of glutathione conjugates and doxorubicin. *Biochemistry* 2000; 39:9327-9334.
- (138) Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; 96:736-749.
- (139) Müller M, Voss M, Heise C, Schulz T, Bunger J, Hallier E. High-performance liquid chromatography/fluorescence detection of S-methylglutathione formed by glutathione-S-transferase T1 *in vitro*. *Arch Toxicol* 2001; 74:760-767.
- (140) Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3071-3076.
- (141) Duffy S, So A, Murphy TH. Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage. *J Neurochem* 1998; 71:69-77.
- (142) Begleiter A, Sivananthan K, Curphey TJ, Bird RP. Induction of NAD(P)H quinone: oxidoreductase1 inhibits carcinogen-induced aberrant crypt foci in colons of Sprague-Dawley rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12:566-572.

- (143) Jones SB, Brooks JD. Modest induction of phase 2 enzyme activity in the F-344 rat prostate. *BMC Cancer* 2006; 6:62.
- (144) Fryčák P, Zdrahal Z, Ulrichova J, Wiegrebe W, Lemr K. Evidence of covalent interaction of fumaric acid esters with sulfhydryl groups in peptides. *J Mass Spectrom* 2005; 40:1309-1318.
- (145) Kadaba P. A Convenient Method of Esterification of Unsaturated Organic Acids Using a Boron Trifluoride Etherate-Alcohol Reagent. *Synthesis* 1971; 6:316-317.

A	Absorption
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ALAT	Alanin-Aminotransferase
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
AUC _{0-∞}	Gesamtfläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
BCA	2,2`-Bischinolin-4,4`-dicarbonsäure
BCS	Biopharmaceutics Classification System
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CaCo-2	Zelllinie eines Colon-Adenokarzinoms
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
Cl	Clearance
C _{max}	Maximalkonzentration
DMEM	Dulbeccos modified Eagle-Medium
DMF	Fumarsäuredimethylester
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
DTNB	5,5`-Dithiobis-2-nitrobezoessäure
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dendritische Zellen
EC ₅₀	Konzentration zur Erzielung des halbmaximalen Effekts
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Fumarsäure
FAE	Fumarsäureester
FCS	fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid

fwd.	vorwärts
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HaCaT	(human adult low calcium high temperature) Keratinozyten
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gl.	Gleichung
GR	Glutathionreduktase
GS-DMS	<i>S</i> -(1,2-Dimethoxycarbonylethyl)glutathion
GSH	reduziertes Glutathion
GS-MMS	Isomerengemisch aus <i>S</i> -(1-Carboxy-2-methoxycarbonylethyl)glutathion und <i>S</i> -(2-Carboxy-1-methoxycarbonylethyl)glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HLA	humane Leukozyten Antigene
HWZ ($t_{1/2}$)	Halbwertszeit
ICAM-1	intrazelluläres Zelladhäsionsmolekül
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IU	Internationale Einheit
Kap.	Kapitel
LADME	Liberation, Absorbtion, Distribution, Metabolismus, Exkretion
LC/MS	Kopplung von Hochleistungsflüssigchromatographie und Massenspektrometrie
LY	Luzifer Gelb
max.	maximal
MEF	Fumarsäuremonoethylester
MeOH	Methanol
M6G	Morphin-6-glucuronid
min	Minute
MMF	Fumarsäuremonomethylester
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure

MTP	Mikrotiterplatte
NAC-DMS	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(1,2-dimethoxycarbonylethyl)cystein
NAC-MES	Isomerengemisch aus <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(1-carboxy-2-ethoxycarbonylethyl)cystein und <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carboxy-1-ethoxycarbonylethyl)cystein
NAC-MMS	Isomerengemisch aus <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(1-carboxy-2-methoxycarbonylethyl)cystein und <i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-carboxy-1-methoxycarbonylethyl)cystein
n.d.	nicht detektierbar
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten
NIST	National Institute of Standards
NR	Neutralrot
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSA	polare Oberfläche
red.	reduziert
rev.	rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTQ-PCR	Echtzeit quantitative Polymerasekettenreaktion
SPE	Festphasenextraktion
SRB	Sulforhodamine B
5-SSA	5-Sulfosalicylsäure
Tab.	Tabelle
TE	Transwell [®] -Einsatz
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TFA	Trifluoressigsäure
Th	Thomsen
t_{lag}	Zeit bis zum Anfluten eines Stoffes
t_{max}	Zeit bis zur maximalen Konzentration
TMS	Tetramethylsilan

TNB	5-Thio-(2-nitrobenzoesäure)
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsions-Molekül
vs.	versus

Die vorliegende Arbeit entstand im Zuge einer Kooperation des Pharmazeutischen Instituts und der Hautklinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. B. Clement und Herrn Prof. Dr. U. Mrowietz

Für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppen, die Überlassung des höchst interessanten und fachübergreifenden Themas sowie die ständige Diskussionsbereitschaft und die mir stets erwiesene Förderung möchte ich mich bei meinem Doktorvater und besonders bei Prof. Dr. Ulrich Mrowietz sehr herzlich bedanken.

HD Dr. Thomas Kunze möchte ich für ein stets offenes Ohr und viele wertvolle Tipps danken, die aus humorvollen Gesprächen hervorgingen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Ulrich Girreser für seine Hilfe rund um die Massenspektrometrie.

Sven Wichmann danke ich für das Vermessen von Proben an der LC/MS.

Prof. Dr. Thomas J. Schmidt danke ich für viele freundliche Gespräche und die Bereitstellung von Standards für die Analytik.

Prof. Dr. Jens Schröder möchte ich für seine Diskussionsbereitschaft danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Arbeitsgruppe in der Hautklinik. Ich werde das freundschaftliche Verhältnis und die gute Stimmung in der Gruppe nie vergessen. Besonders Dr. Sascha Gerdes möchte ich für seine Unterstützung herzlich danken.

Ramona Schütz danke ich für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit im Labor. Jutta Quitzau und Anja Steinberg danke ich für die Unterstützung bei dem ¹³C-Projekt.

Kathrin möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit und nicht zuletzt für ihre „Stahlnerven“ danken.

Meinen Eltern, besonders meiner Mutter, danke ich von ganzem Herzen für ihr Vertrauen und die liebevolle Unterstützung in jeder Lebenslage.

Persönliche Daten

Vor- und Familienname: Martin Rostami Yazdi
Geburtsdatum: 25. Juli 1978
Geburtsort: Kiel
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Rammsee, Kreis Rendsburg-Eckernförde
1988-1997 Humboldt-Schule, Kiel
Mai 1997 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

1997-1998 Luftwaffe Eckernförde, Kreis Rendsburg-Eckernförde

Studium und Ausbildung

1998-2002 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
August 2000 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 2002 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar – Juni 2003 Pharmaziepraktikum, STADA Arzneimittel AG, Bad Vilbel, Frankfurt am Main
Juli – Dezember 2003 Pharmaziepraktikum, Nicolai-Apotheke, Eckernförde
Januar 2004 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit und Weiterbildung

seit April 2004 Wissenschaftlicher Angestellter in der Hautklinik des Universitätsklinikums der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. B. Clement und Prof. Dr. U. Mrowietz
seit Januar 2007 Teilnahme an internationalen klinischen Studien: Isotechnika Inc. (1065/ISA) und Galderma (RD.03.SPR.29064).
Juni 2007 Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik

Vorträge

„A new approach analysing the metabolism of fumaric acid esters“, Fumapharm Annual Research Meeting 2004

„Detection of fumarate adducts with glutathione *in vitro* and *in vivo* by using a HPLC-MS technique“ und „Metabolism of DMF *in vitro* and *in vivo*“, Fumapharm Annual Research Meeting 2005

„Pharmacokinetic aspects of fumaric acid esters“ Fumapharm / Biogen Idec Annual Research Meeting 2006

„Pharmacokinetic aspects of fumaric acid esters and the role of glutathione“ LEO Pharma, 2007

„Analytik von pharmakologisch wirksamen Fumarsäureestern und deren Metaboliten in humanen Proben“, Chrom Forum 2007

Poster

„Formation of dimethylfumarate or methylhydrogenfumarate adducts with intracellular glutathione *in vitro*“, XIXth International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC) 2006

Publikationen

Rostami Yazdi M; Mrowietz U, Fumaric acid esters, Clin Dermatol, im Druck

Martin Rostami Yazdi; Bernd Clement; Thomas J. Schmidt; Daniel Schinor and Ulrich Mrowietz, Detection of metabolites of fumaric acid esters in human urine and plasma: implications for their mode of action, in Vorbereitung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer – selbständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Betreuer dieser Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

„Formation of dimethylfumarate or methylhydrogenfumarate adducts with intracellular glutathione *in vitro*“, XIXth International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC) 2006, Poster

Kiel, im Dezember 2007

Martin Rostami Yazdi

Das Nutzen/Risiko-Verhältnis von Fumarsäureestern zur Therapie der Psoriasis wird als sehr gut eingestuft. Sowohl die Pharmakokinetik als auch die Pharmakodynamik der Substanzen sind aber bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es stellte sich heraus, dass Fumarsäuredimethylester (DMF) der essentielle Bestandteil zur Erzielung des antipsoriatischen Effektes ist. Aufgrund der Tatsache, dass nur das Hydrolyseprodukt Fumarsäuremonomethylester (MMF) im humanem Plasma nach oraler Gabe von DMF nachgewiesen werden konnte, wurde bezüglich der Pharmakokinetik von DMF angenommen, dass es schon im Milieu des Dünndarms vollständig zu MMF verstoffwechselt wird.

Mercaptursäure-Derivate sind Abbauprodukte von Glutathion-Konjugaten. Da sowohl DMF als auch MMF als elektrophile Substanzen an Glutathion addieren können, war ein Vorkommen ihrer Mercaptursäuren *in vivo* möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Mercaptursäuren von DMF und MMF in humanem Urin auftreten.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass DMF oral absorbiert wird, im Pfortaderblut anflutet und zum Teil in Form von *N*-Acetyl-*S*-(1,2-dimethoxycarbonyl)ethyl)cystein über die Nieren ausgeschieden wird. Die Bindung eines Teils von DMF an intrazelluläres Glutathion unter Bildung von *S*-(1,2-Dimethoxycarbonyl)ethyl)glutathion erfolgt wahrscheinlich schon in den Blutzellen des Pfortaderblutes. Der andere Teil des anflutenden DMF wird zu MMF hydrolysiert, das *in vivo* zu detektieren ist.

Durch diese zwei konkurrierenden Reaktionen wird DMF komplett verstoffwechselt, was wiederum zu nicht detektierbaren Konzentrationen im Plasma führt.

Da gezeigt werden konnte, dass DMF *in vitro* wesentlich stärkere Effekte als MMF induziert, kann auf eine Hauptwirkung von DMF durch dessen Einfluß auf den Glutathiongehalt von Immunzellen des Pfortaderblutes geschlossen werden.

The clinical efficacy of fumaric acid esters in the treatment of psoriasis is generally well accepted. However, their pharmacodynamic and pharmacokinetic properties are not fully understood. Dimethylfumarate (DMF) was found to be the clinically active FAE to treat psoriasis successfully. Regarding the pharmacokinetics of DMF it is assumed that it is hydrolysed already in the small intestine resulting in no measurable plasma levels after oral intake. So far, only its hydrolysis product monomethylfumarate (MMF) has been detected in plasma after oral intake of FAE.

Mercapturic acid derivatives are break-down products of originally formed glutathione-conjugates that could be secreted via the urine.

Since both electrophiles, DMF and MMF, are able to bind to glutathione (GSH) to form their respective GSH-conjugates it could be assumed that their mercapturic acids could be present *in vivo*. The results of the present work show for the first time the detection of the mercapturic acid of DMF and MMF in human urine. The data demonstrate that DMF enters the blood circulation after oral intake and is in part excreted via the kidneys in the form of *N*-Acetyl-*S*-(1,2-dimethoxycarbonylethyl)cysteine (NAC-DMS).

From the results it can be assumed that DMF after uptake partly binds to GSH of cells of the portal vein blood already forming *S*-(1,2-Dimethoxycarbonylethyl)-glutathione (GS-DMS) and is partly hydrolysed to MMF which is detectable *in vivo*. By these two competitive reactions DMF is quickly and completely utilized, leading to no measurable concentrations of DMF in plasma. As DMF was found to be significantly more active as compared to MMF *in vitro* it can be assumed that most of the pharmacological activities can indeed be attributed to DMF exerting its effect by modulation of the GSH content of immune cells in the portal vein blood.