

**Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar**

**Enantioselektive *in vivo*-Studien in Wistar- und Dark Agouti-
Ratten zur N-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2011***

vorgelegt von:
Thomas Pflugmann
geboren am 01.12.1976 in Stuttgart

Meinen Eltern
In ewiger Dankbarkeit

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. T. Krämer

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Thomas Krämer in der Abteilung Experimentelle und Klinische Toxikologie der Fachrichtung 2.4 Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar von 2000 bis 2002.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY	7
1.1 ZUSAMMENFASSUNG	7
1.2 SUMMARY	8
2. ALLGEMEINER TEIL	9
2.1 EINLEITUNG	9
2.1.1 <i>Amphetamin, Methamphetamin und Amphetamin-abgeleitete Medikamente</i>	9
2.1.1.1 Fenproporex	10
2.1.2 <i>Die Cytochrom P450 (CYP)-Enzymfamilie</i>	11
2.1.2.1 Struktur und Funktion	12
2.1.2.2 Nomenklatur und Vorkommen	13
2.2 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	16
3. EXPERIMENTELLER TEIL	18
3.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	18
3.2 IN VIVO-STOFFWECHSELVERSUCHE AN DER RATTE	18
3.2.1 <i>Stoffwechselversuch</i>	18
3.2.2 <i>Probenvorbereitung der Blutproben der Ratten</i>	19
3.2.3 <i>Bestimmung der Amphetamin-Enantiomeren in Blutplasma mittels enantioselektiver GC-MS</i>	20
3.2.4 <i>Aufarbeitung der Urinproben</i>	21
3.2.5 <i>GC-MS Methode für die Urinproben</i>	21
3.2.6 <i>Berechnungen und Statistik</i>	22
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	23
4.1 GC-MS METHODE	23
4.2 ERGEBNISSE DER RATTENVERSUCHE	24
5. DISKUSSION	32
5. LITERATUR	35
6. PUBLIKATIONEN	40

7. DANK41

8. LEBENSLAUF.....42

1. ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY

1.1 Zusammenfassung

Fenproporex ist ein Anorektikum. Es wird durch *N*-Desalkylierung zu R(-)-Amphetamin und S(+)-Amphetamin metabolisiert. Eine Beteiligung des polymorphen Cytochroms P450 (CYP) Isoenzym CYP2D6 am Metabolismus solcher Amphetamin-Vorläufersubstanzen wurde in der Literatur lange kontrovers diskutiert. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass nicht nur CYP2D6, sondern auch CYP1A2, CYP2B6 und CYP3A4 an der *N*-Desalkylierung beider Enantiomere mit leichter Präferenz für das S(+)-Enantiomer beteiligt sind. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden in in-vivo Experimenten die Blutkonzentrationen von R(-)-Amphetamin und S(+)-Amphetamin nach Gabe von Fenproporex in verschiedenen Rattenstämmen bestimmt. Dabei wurden weibliche Dark Agouti-Ratten (fDA) als Modell des humanen CYP2D6 Poor Metabolizer Phänotyps, männliche Dark Agouti-Ratten (mDA) als Intermediate Modell und männliche Wistar-Ratten (WI) als Modell für den humanen CYP2D6 Extensive Metabolizer Phänotyp eingesetzt. Die Analyse der entsprechenden Plasmaproben ergab, dass die weiblichen Dark Agouti-Ratten für beide Enantiomere des Amphetamins signifikant höhere Plasmakonzentrationen aufwiesen als die der männlichen Wistar-Ratten. Die Amphetamin-Plasmakonzentrationen der männlichen Dark Agouti-Ratten lagen zwischen denen der weiblichen Dark Agouti- und der männlichen Wistar-Ratten. Darüber hinaus führte eine Vorbehandlung der Wistar-Ratten mit Chinin (WIQ), einem spezifischen Inhibitor des Cytochrom P450 Isoenzym 2D, zu signifikant höheren Amphetamin-Plasmakonzentrationen, die wiederum nicht signifikant unterschiedlich waren zu denen in weiblichen Dark Agouti-Ratten. Diese Studien legen nahe, dass CYP2D6 nicht für die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin entscheidend ist. Möglicherweise spielt dieses polymorphe Isoenzym jedoch für einen anderen Metabolismus-Schritt, nämlich für die Ring-Hydroxylierung, eine entscheidende Rolle. Dies soll in einer zukünftigen Studie untersucht werden.

1.2 Summary

Fenproporex (FP) is a widely used anorectic and is known to be *N*-dealkylated to *R*(-)-amphetamine (AM) and *S*(+)-amphetamine. Involvement of the polymorphic cytochrome P450 (CYP) isoform CYP2D6 in metabolism of such amphetamine precursors is discussed controversially in literature. Studies had revealed that not only CYP2D6 but also CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 catalyzed this metabolic reaction for both enantiomers with slight preference for the *S*(+)-enantiomer. Within the framework of this dissertation *in vivo* experiments were performed to determine blood levels of *R*(-)-amphetamine and *S*(+)-amphetamine formed after administration of FP in female Dark Agouti-rats (fDA), a model of the human CYP2D6 poor metabolizer phenotype, male Dark Agouti-rats (mDA), an intermediate model, and in male Wistar-rats (WI), a model of the human CYP2D6 extensive metabolizer phenotype. Analysis of the plasma samples showed that fDA exhibited significantly higher plasma levels of both amphetamine enantiomers compared to those of WI. Corresponding plasma levels in mDA were between those in fDA and WI. Furthermore, pretreatment of WI with the CYP2D inhibitor quinine (WIQ) resulted in significantly higher amphetamine plasma levels, which did not significantly differ from those in fDA. The *in vivo* studies suggested that CYP2D6 is not crucial to the *N*-dealkylation but to another metabolic step, most probably to the ring hydroxylation. Further studies are necessary for elucidating the role of CYP2D6 in FP hydroxylation.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1 Einleitung

2.1.1 Amphetamin, Methamphetamin und Amphetamin-abgeleitete Medikamente

Amphetamin (*R,S*-1-Phenyl-2-propanamin) und Methamphetamin (*R,S-N*-Methyl-1-phenyl-2-propanamin) sind Psychostimulantien mit hohem Missbrauchspotential, die ihre Wirkung über die Freisetzung von Noradrenalin, Dopamin und Serotonin bzw. über die Hemmung der Wiederaufnahme dieser Neurotransmitter erzielen. Sie haben keine Affinität zu Adrenorezeptoren oder Dopaminrezeptoren. Ihre Effekte resultieren aus einer nicht-exozytotischen, carrier-vermittelten Freisetzung von Neurotransmittern. Die *S(+)*-Enantiomere von Amphetamin und Methamphetamin haben eine fünfmal stärker stimulierende Wirkung als die *R(-)*-Enantiomere. Die Hauptmetabolismuswege sind seit Jahren bekannt: aromatische Hydroxylierung, aliphatische Hydroxylierung, *N*-Desmethylierung, oxidative Desaminierung, *N*-Oxidation und Konjugation des Stickstoffs. Die phenolischen Metaboliten werden teilweise konjugiert ausgeschieden (Kraemer, 2002; Musshoff, 2000). Sowohl Amphetamin und Methamphetamin als auch einige ihrer Derivate unterliegen dem Betäubungsmittelgesetz und wurden in die Liste der verbotenen Substanzen des Internationalen Olympischen Komitees (IOC) und der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) aufgenommen. Fahren unter Einfluss von Drogen ("driving under the influence of drugs", "DUID") ist ein Thema, das in den Industrienationen immer größere Bedeutung gewinnt, da es häufig den Grund für Unfälle im Straßenverkehr darstellt. Amphetamin und einige seiner Derivate gehören zu den Substanzen, auf die im Rahmen solcher DUID-Fälle getestet wird (Kraemer, 2007).

N-alkylierte oder *N,N*-bisalkylierte Amphetamin-Derivate wie z.B. Clobenzorex, Famprofazon, Mefenorex, Methamphetamin, Prenylamin, Selegilin oder das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Fenproporex werden therapeutisch als Sympathomimetika, Anorektika, nicht-opioide Analgetika, Parkinsonmittel oder Vasodilatoren eingesetzt. Lange Zeit wurde dabei übersehen, dass die Einnahme dieser Substanzen der Grund für positive Amphetamin-Ergebnisse in Drogen-Tests sein könnte. Dies mag damit zusammenhängen, dass in

mehreren älteren Publikationen die metabolische Bildung von Amphetamin oder Methamphetamin aus diesen Medikamenten für irrelevant oder gar nicht existent erklärt wurde. Nichtsdestotrotz fielen bei Drogen-Tests (z.B. in der Psychiatrie, am Arbeitsplatz, bei DUID-Untersuchungen) zahlreiche Fälle ungeklärter, positiver Amphetamin-Ergebnisse nach Einnahme dieser Medikamente auf (Kraemer, 1998; Kraemer, 2002; Moeller, 2002).

2.1.1.1 Fenproporex

Fenproporex (*R,S*-3-[(1-phenyl-2-propyl)-amino-]propionitril) ist ein Anorektikum. Zahlreiche Autoren behaupteten, dass Fenproporex kein Abhängigkeitspotential oder zentral-stimulierende Effekte besitze (Cession-Fossion, 1970; Hertel, 1978). So wurde postuliert, dass die Cyano-Gruppe die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin verhindere. Andere Autoren berichteten jedoch über die metabolische *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin (AM) (Coutts, 1986; Nazarali, 1983; Tognoni, 1972). Letzteres war in Urin- oder Haarproben nach Einnahme von Fenproporex nachgewiesen worden (Cody, 1999; de la Torre, 1996; Nakahara, 1995; Nakahara, 1996). In diesen Publikationen waren allerdings nur die Muttersubstanz und das Amphetamin, nicht aber möglicherweise spezifischere Metaboliten, berücksichtigt worden. Die Metabolisierungswege von Fenproporex im Ganztier Ratte und auch im Menschen wurden inzwischen beschrieben (Coutts, 1986; Kraemer, 2000). Tatsächlich gibt es zwei Hauptmetabolisierungswege: *N*-Desalkylierung zu Amphetamin und die Ringhydroxylierung. Die Abbildung 1 zeigt das entsprechende Metabolismusschema.

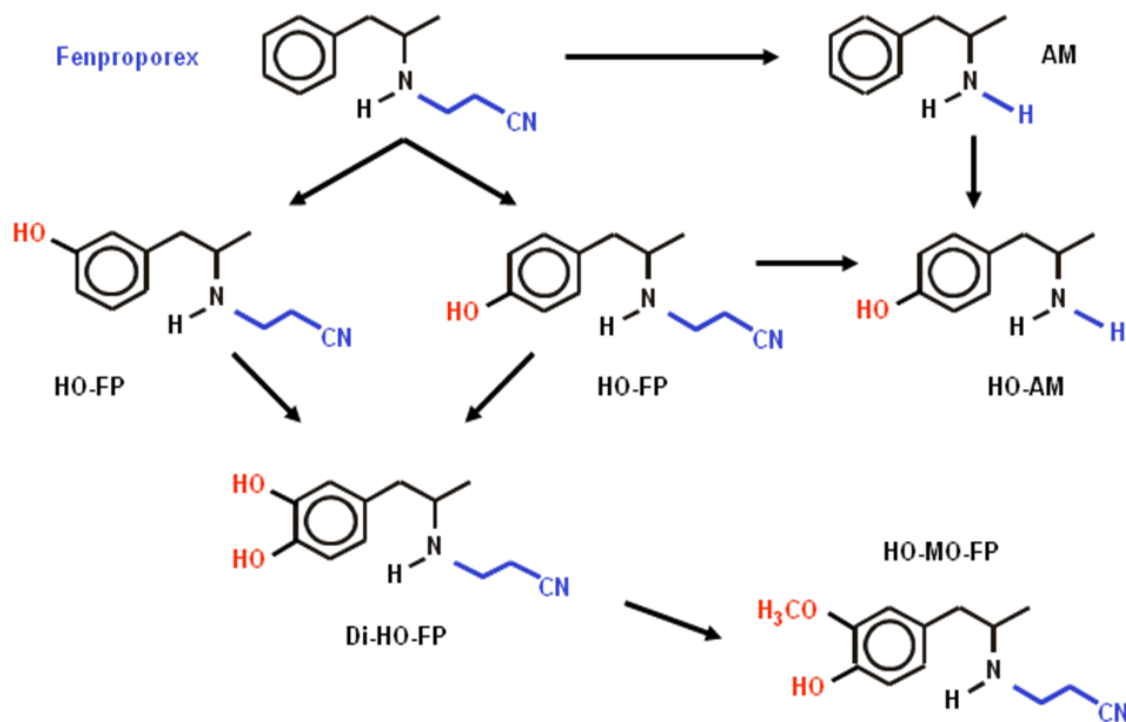


Abb. 1: Metabolismus von Fenproporex (nach: Kraemer, Theis, Weber, Maurer 2000(Coutts, 1986; Kraemer, 2000))

2.1.2 Die Cytochrom P450 (CYP)-Enzymfamilie

Die Cytochrom P450 Enzyme haben die größte Bedeutung hinsichtlich des Phase I-Metabolismus von Fremdstoffen, aber auch von körpereigenen Substanzen. Diese sogenannten Funktionalisierungsreaktionen dienen der Einführung oder Freilegung funktioneller Gruppen, die anschließend im Rahmen der Phase II Reaktionen, den Konjugationsreaktionen, an endogene polare Moleküle, wie z.B. Glukuronsäure, gekoppelt werden. Hierdurch wird in der Regel eine Hydrophilisierung und damit eine verbesserte Ausscheidbarkeit aus dem Organismus erzielt. Darüber hinaus stellt der Metabolismus ein Entgiftungs- und Inaktivierungssystem dar. Seltener kann der Phase I-Metabolit jedoch auch deutlich toxischer als die Muttersubstanz sein oder es werden toxische Intermediate oder freie Radikale gebildet. CYP Enzyme können also auch zur Giftung beitragen (Rendic, 1997). Bei sogenannten Prodrugs stellt der Metabolit das eigentliche Wirkprinzip dar (Forth, 2001). Die Aufklärung der Metabolismuswege von Arzneistoffen ist also notwendig für ihre Risiko- und Wirksamkeitsabschätzung (Ono, 1996).

2.1.2.1 Struktur und Funktion

Cytochrom P450 Enzyme sind Hämoproteine, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert sind. Das Zentralatom Eisen liegt im Low-spin-Zustand als Fe^{3+} vor. Es hat sechs Liganden, von denen vier mit dem Stickstoff aus dem Porphyrinring des Häms koordiniert sind. Über die fünfte Koordinationsstelle ist das Häm-Eisen mit einem Cystein-Schwefel des Apoproteins verbunden. Man nennt CYP-Enzyme deshalb auch Häm-Thiolat-Komplexe. Der sechste Ligand ist durch Wasser besetzt (Pfeifer, 1995).

CYP-Enzyme katalysieren hauptsächlich Oxidationen, seltener Reduktionen. Im Rahmen der Reaktion wird aus molekularem Sauerstoff (O_2) ein Sauerstoffatom in das Substrat eingeführt, das zweite zu Wasser reduziert. CYP-Enzyme werden wegen dieses Mechanismus auch mischfunktionelle Monooxygenasen genannt. In Abbildung 2 ist der Reaktionszyklus dargestellt. Außer molekularem Sauerstoff wird zur Reaktion noch das Coenzym NADPH-Cytochrom P450-Oxidoreduktase benötigt, über das das erste Elektron im Reaktionszyklus ausschließlich bereitgestellt wird. Das zweite Elektron kann ebenfalls von diesem Enzym oder aber auch über das zweite Redoxsystem, Cytochrom b5 und NADPH Cytochrom b5-Reduktase, geliefert werden.

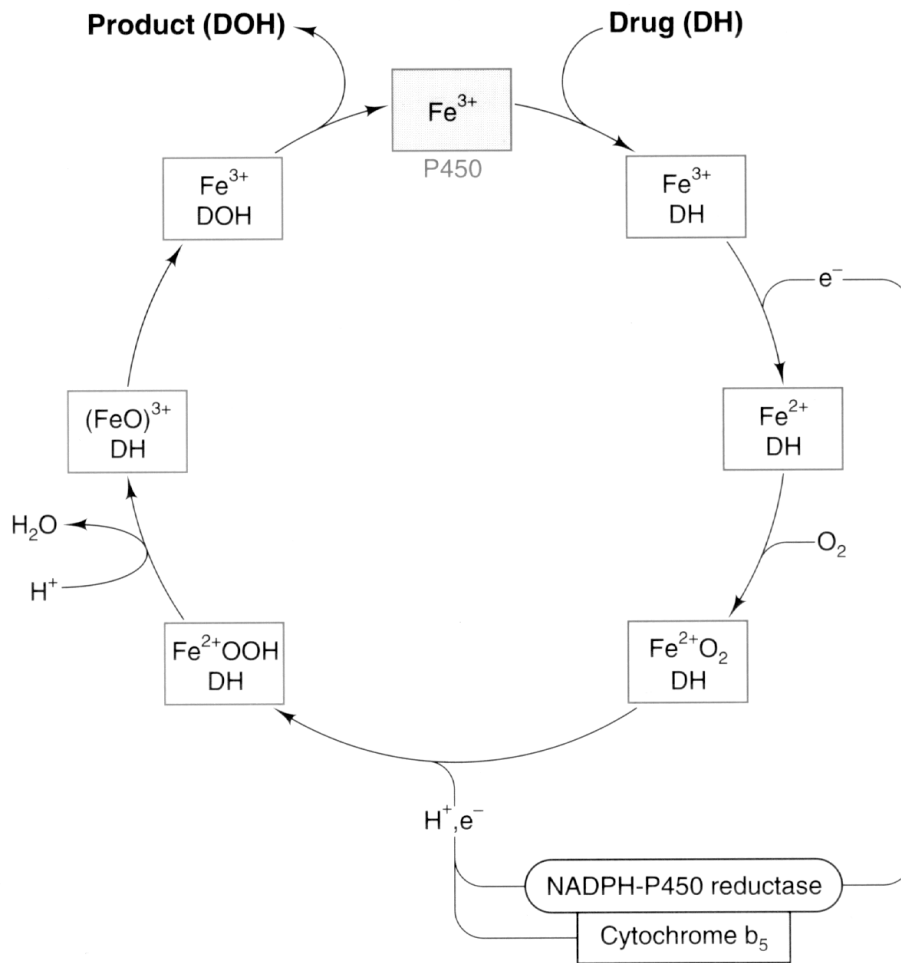


Abb. 2: Redoxzyklus von CYP-Reaktionen (aus (Rang, 1999), S. 81)

2.1.2.2 Nomenklatur und Vorkommen

Cytochrom P450 Enzyme zeigen im reduzierten Zustand im Komplex mit Kohlenmonoxid ein Absorptionsmaximum des Differenzspektrums bei 450 nm. Hiervon leitet sich der Name P450 ab. Die Einteilung und Nomenklatur der CYP-Gene erfolgt nach der Homologie der Aminosäuresequenzen (Rendic, 1997). CYP steht für Cytochrom P450, gefolgt von einer arabischen Ziffer für die Familie, einem Großbuchstaben für die Subfamilie und einer arabischen Ziffer für die Isoform (Nelson, 1996) (siehe Tabelle 1).

	Sequenzhomologie	Beispiel für Nomenklatur
Familie	> 40%	CYP2
Subfamilie	> 55%	CYP2C
Isoform		CYP2C19

Tab. 1: Nomenklatur innerhalb der CYP-Enzymfamilie

CYP-Enzyme kommen ubiquitär vor: in Bakterien, Pflanzen und Tieren. Die bekannten CYP-Gene gehen vermutlich auf ein gemeinsames Vorläufergen zurück, das vor 3-3,5 Milliarden Jahren entstanden sein dürfte. Beim Menschen unterscheidet man 14 CYP-Genfamilien und 20 Subfamilien. Insgesamt sind 33 menschliche CYP-Isoformen bekannt, von denen 12 aus 7 Subfamilien der Genfamilien 1, 2 und 3 für den Fremdstoffmetabolismus relevant sind (siehe Abbildung 3). Die übrigen CYP-Enzyme katalysieren die Biotransformation endogener Substrate. Die am Arzneistoffwechsel beteiligten Enzyme zeigen eine breite Substratspezifität.

Relevant for Drug Metabolism:

3 Genefamilies with
7 Subfamilies with
12 Isoenzymes

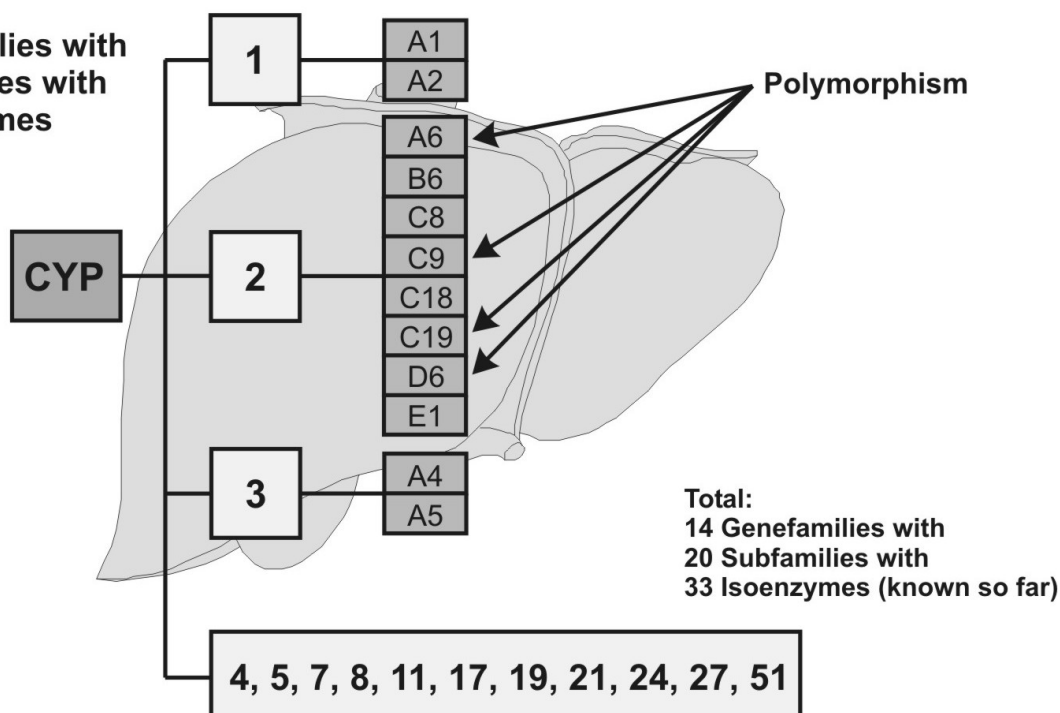


Abb. 3: Cytochrom P450 Enzyme beim Menschen und relevante Isoformen für den Fremdstoffmetabolismus

In Säugetieren sind CYP-Enzyme in nahezu allen Geweben zu finden. Den höchsten Anteil mit 90-95% des gesamten CYPs enthält die Leber. Davon entfallen 60-65% auf Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Abbildung 4 zeigt die prozentuale Verteilung der einzelnen Isoformen in der humanen Leber sowie den relativen Anteil der Isoformen am Fremdstoffmetabolismus.

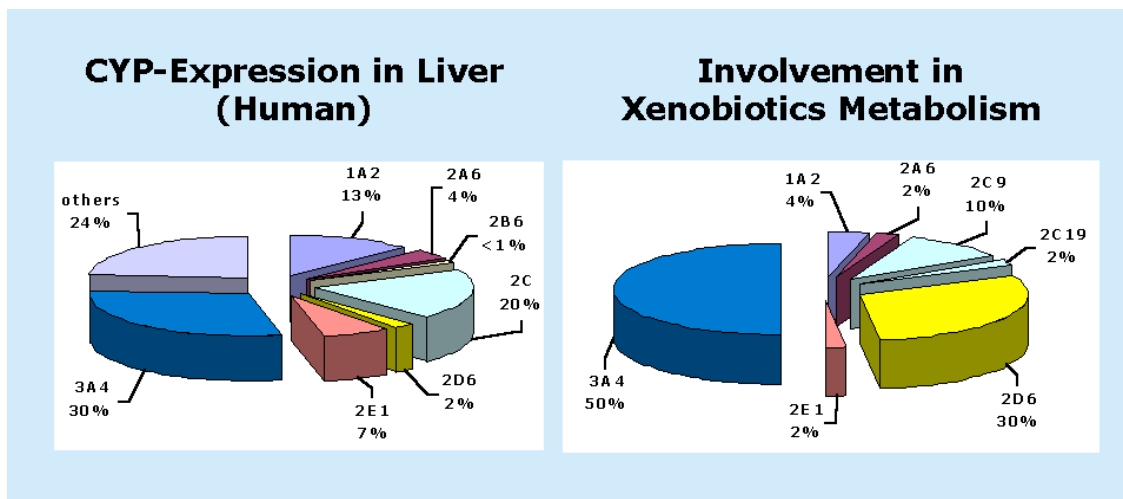


Abb. 4: Relative Mengenverteilung der CYP-Isoenzyme in der menschlichen Leber (links) und deren relative Beteiligung am Fremdstoffmetabolismus (rechts)

Bemerkenswert ist, daß das nur zu etwa 2% vorkommende CYP2D6 einen Anteil von 30% am Arzneistoffwechsel hat. Dies ist auch aus dem Grund von Bedeutung, dass CYP2D6 polymorph exprimiert wird. Unter genetischem Polymorphismus versteht man das Auftreten bestimmter Mutationen, aufgrund derer bestimmte Enzyme nicht exprimiert werden oder in ihren katalytischen Eigenschaften verändert sind. Man spricht von defizienten (poor), normalen (extensive) und im Falle von CYP2D6 auch extrem schnellen (ultrarapid) Metabolisierern für ein bestimmtes Isoenzym. Etwa 7% der Kaukasier sind defizient für CYP2D6 (poor metabolizers) (Bertilsson, 1995; Smith, 1998) und 1-3% unter Asiaten und Afrikanern. 80-85% der Kaukasier sind extensive und 1-10% ultrarapid Metabolisierer (Meyer, 2000). CYP2D6 Aktivitäten variieren daher interindividuell um das tausendfache (Yan, 2001). Genetischer Polymorphismus ist bis heute bekannt für CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 und eben CYP2D6. Das CYP2C19-Gen fehlt bei 2-6% der kaukasischen Bevölkerung und bei bis zu 20% der Asiaten (Flockhart, 1995; Rendic, 1997). Aber auch nicht polymorph exprimierte CYP-Isoenzyme wie

CYP3A4 können in ihrem Auftreten variieren. Dies wird hauptsächlich durch Induktion oder Inhibition der Aktivität durch Arzneistoffe oder Umweltchemikalien verursacht. So kann die enzymatische Funktion von CYP3A4 um das 20-fache variieren (Eichelbaum, 2001; Rendic, 1997). Wird die Aktivität eines CYP-Isoenzym durch Induktion oder Inhibition verändert, kann sich die biologische Aktivität von Fremdstoffsubstraten dramatisch ändern. Solche Effekte bezeichnet man als drug-drug, drug-chemical oder chemical-chemical Interaktionen (Rendic, 1997).

2.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Untersuchungen speziell zum CYP-Metabolismus werden heute auch als integraler Bestandteil der Arzneistoffentwicklung und Risikobewertung von Fremdstoffen betrachtet (Guengerich, 1998). Arbeiten zu diesem Thema schließen Studien an CYP-Enzymen in experimentellen Tiermodellen, aber auch in humanen Systemen ein. Besonders die Abschätzung von Fremdstoffinteraktionen wie z.B. kompetitive Inhibition auf der Ebene des CYP-Metabolismus erfordert die Aufklärung der Isoformenabhängigkeit in den wichtigsten CYP-katalysierten Reaktionen einer Substanz. In einer vorangegangenen Dissertation im Arbeitskreis waren die humanen hepatischen CYPs identifiziert worden, die die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu R(-)-Amphetamin und S(+)-Amphetamin katalysieren. Darüber waren die kinetischen Konstanten für diese Reaktionen ermittelt worden. In weiteren Untersuchungen war die Bildung von R(-)-Amphetamin and S(+)-Amphetamin aus der Muttersubstanz Fenproporex in humanen Lebermikrosomen mit CYP2D6 poor metabolizer Genotyp (PM HLM) mit derjenigen in gepoolten humanen Lebermikrosomen jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit des spezifischen CYP2D6 Inhibitors Chinidin verglichen worden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, den tatsächlichen in vivo Einfluss von CYP2D6 auf den Metabolismus von Fenproporex zu untersuchen. Da Versuche an Menschen nicht möglich waren, sollten verschiedene Rattenstämme verwendet werden. Weibliche Dark Agouti-Ratten sollten dabei als Modell des humanen CYP2D6 poor metabolizer Phänotyps herangezogen werden, während männliche Wistar-Ratten als Modell für den humanen extensive metabolizer Phänotyp dienen sollten. Ausserdem sollte überprüft werden, ob männliche Dark Agouti-Ratten als Modell des intermediate metabolizer Phänotyps fungieren können.

Nach Gabe von Fenproporex sollten die Plasma-Konzentrationen von R(-)-AM und S(+)-AM in den verschiedenen Rattenmodellen bestimmt werden. Der Vergleich der Ergebnisse in den verschiedenen Modellen sollte im Hinblick auf eine mögliche Relevanz auch für die Pharmakokinetik im Menschen (bei poor metabolizern und bei extensive metabolizern) ausgewertet werden.

Die möglicherweise gefundenen pharmakokinetischen Unterschiede in den verschiedenen Modellen sollten in Hinblick auf ihre Relevanz für die klinische und forensische Toxikologie und für die Dopingkontrolle diskutiert werden.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Fenproporex wurde von Herrn Professor Pflieger, Homburg, zur Verfügung gestellt. Methanolische Lösung von Amphetamin-D11 (1000 mg/L), Chinin wurde von Promochem und Amphetamin-Hydrochlorid von Lipomed bezogen. 0.1 M S(-) Heptafluorbutyrylpropylchlorid (HFBPCI) in Dichlormethan wurde gemäß Peters (Peters, 2002) synthetisiert.

NADP⁺ wurde von Biomol (Hamburg), Isocitrat und Isocitratdehydrogenase von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Ammoniumformiat und Superoxid-Dismutase stammten von Fluka (Neu-Ulm). Alle weiteren verwendeten Chemikalien stammten von E. Merck (Darmstadt) und entsprachen p.a. Qualität.

3.2 In vivo-Stoffwechselfersuche an der Ratte

3.2.1 Stoffwechselfersuch

Zu toxikologisch-diagnostischen Zwecken wurden Untersuchungen an männlichen Wistar-Ratten (WI) (Ch. River, Sulzfeld), männlichen Dark Agouti-Ratten (mDA) (siehe Abbildung 5) und an weiblichen Dark Agouti-Ratten (fDA) (beide von Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) durchgeführt. Die Ratten wurden unter kontrollierten Luftfeuchte- und Temperatur-Bedingungen ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) gehalten. Der Tag-Nacht-Zyklus betrug 12 Stunden (Licht-an von 7.00 Uhr bis 19 Uhr). Futter und Wasser gab es ad libitum.

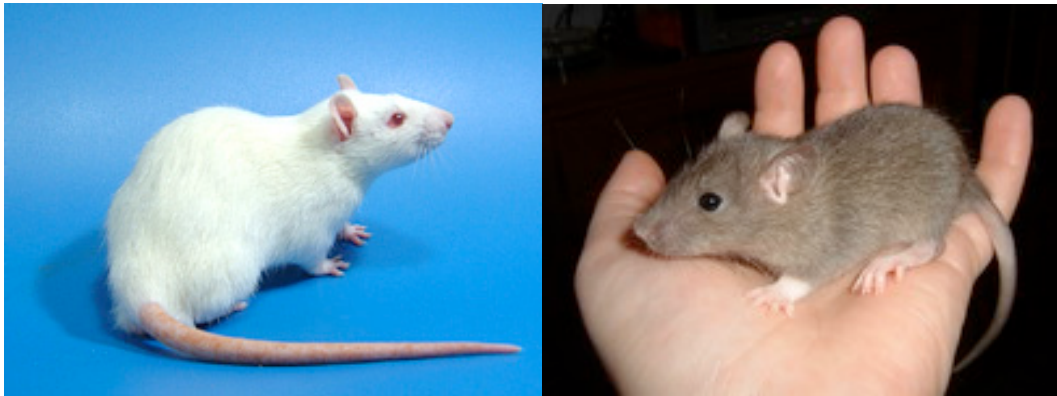


Abb. 5: Männliche Wistar-Ratte (links) und männliche Dark Agouti-Ratte (rechts)

Jeweils fünf Ratten eines Stammes wurde einmalig Fenproporex (3 mg/kg KG) in je 2 mL wässriger Lösung per Schlundsondierung verabreicht. In speziellen Stoffwechsellkäfigen wurde der Urin von den Faeces getrennt und über 24 Stunden gesammelt. Auf die gleiche Weise wurde vor Substanzverabreichung Nativurin gewonnen, um mögliche analytische Interferenzen der Matrix ausschließen zu können. Alle Proben wurden direkt analysiert und der verbleibende Rest für weitere Untersuchungen bei -20°C gelagert.

In einer weiteren Versuchsserie wurden männliche Wistar-Ratten mit Chinin (80 mg/kg KG) drei Stunden vor der Verabreichung von Fenproporex (3 mg/kg KG) vorbehandelt (Law, 2000; Staack, 2004). Danach wurde wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Blutproben wurden aus der Schwanzvene der Ratten 3, 6, 9 und 12 Stunden nach Verabreichung von Fenproporex entnommen. Alle Blutproben wurden unmittelbar nach Erhalt mittels GC-MS analysiert (s. Abschnitt 4.1).

3.2.2 Probenvorbereitung der Blutproben der Ratten

Die Blutproben der Ratten wurden gemäss einer validierten Methode, allerdings mit leichten Modifikationen, aufgearbeitet (Peters, 2002). Aliquote (0,2 mL) des Rattenblutplasmas wurden mit 2 mL Wasser verdünnt. Nach Zugabe von 0,1 mL einer methanolischen Lösung des razemischen internen Standards (IS) AM-d₁₁ (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wurden die Proben für etwa 15 Sekunden auf einem Rundschtüttler geschüttelt und auf die HCx Festphasen-Säulen gegeben. Diese waren vorher mit jeweils 1 mL Methanol und gereinigtem Wasser konditioniert

worden. Nach der Extraktion wurden die Säulen mit 1 mL Wasser, 1 mL 0,01 M Salzsäure und 2 mL Methanol gewaschen. Die Säulen wurden trockengesaugt und die Analyten dann mit 1 mL einer Methanol/wässrigem Ammoniak Lösung (98:2 v/v) in 1.5 mL Reaktionsgefäße gegeben. Das Eluat wurde unter Stickstoff bei 56 °C zur Trockne eingedampft. Nach Zugabe von 0,2 mL eines wässrigen Carbonat-Puffers (5%, w/v; pH 9) und 6 μ L des Derivatisierungs-Reagenzes HFBP wurden die Reaktionsgefäße verschlossen und für 30 Minuten auf dem Rundschüttler belassen. Dann wurden 0,1 mL Cyclohexan dazupipettiert, das Gefäß wieder verschlossen und 1 Minute auf dem Rundschüttler geschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation für etwa eine Minute bei 14.000 upm getrennt. Die Cyclohexan-Phase (oben) wurde in Autosampler-Vials pipettiert. Aliquote (3 μ L) wurden in das GC-MS System eingespritzt.

3.2.3 Bestimmung der Amphetamin-Enantiomeren im Blutplasma mittels enantioselektiver GC-MS

Apparatus: Die Proben wurden mittels eines Agilent Technologies (AT, Waldbronn, Germany) 6890 series GC System mit einem AT 5973 network Massenselektiven Detektor, einem AT 7683 Injektor und einer AT Chem Station G1701CA (Version C.00.00 21.12.1999) analysiert.

GC Bedingungen: Splitless Injektionsmodus; Säule, 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5MS, 30 m \times 0.25 mm I.D., 250 nm Filmdicke); Einspritzblocktemperatur, 280°C; Trägergas, Helium; Flussrate, 1 mL/min; Säulentemperatur, von 100°C nach 180°C mit 30°C/min, dann von 230°C mit 5°C/min und schließlich auf 310°C mit 30°C/min.

MS Bedingungen: Transfer line Heizer, 280°C; NICI, Methan (2 mL/min); Quelltemperatur, 150°C; Solvent delay, 9 min; Selected Ion Monitoring (SIM) Modus; 9-11 min *m/z* 399 (Target-Ion), 379, 439 for AM-d₁₁; 388 (Target-Ion), 368, 428 for AM. Die Enantiomere von AM wurden quantifiziert durch Vergleich der Peakflächenverhältnisse (Enantiomer des Analyten vs. entsprechendes Isomer des Internen Standards) mit denen von Kalibrationsgeraden (lineares Regressionsmodell), bei denen die Peakflächenverhältnisse von gespikten Kalibrierstandards gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen wurden.

3.2.4 Aufarbeitung der Urinproben

5 ml Urin wurden mit 1 mol/L Essigsäure auf pH 5,2 eingestellt. Danach wurden 0,05 ml einer Lösung von β -Glucuronidase und Arylsulfatase zugegeben und das Gemisch 24 Stunden in einem Wasserbad bei 38 °C inkubiert. Zur Extraktion wurde der Urin auf pH 8-9 eingestellt. Um die gleichen Bedingungen wie nach salzsaurer Hydrolyse (Routine-Methode) zu schaffen, wurden dafür 1,5 ml konzentrierte Salzsäure, 2,5 ml 2,3 mol/L Ammoniumsulfat sowie 2 ml 10 mol/L Natronlauge zur Alkalisierung hinzugegeben. Die Probe wurde anschließend auf Eis gekühlt.

Nach Zugabe von 5 ml eines Gemisches aus 3 Teilen Ethylacetat, 1 Teil Isopropanol und 1 Teil Dichlormethan wurde die Probe von Hand über eine Dauer von 40 Sekunden geschüttelt und zur Phasentrennung über 4 Minuten bei 3.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, organische Phase mit der Überführungsvorrichtung in ein Spitzkölbchen transferiert und mit der Abdampfvorrichtung bei 60 °C und ca. $2,0 \times 10^4$ bis $2,5 \times 10^4$ Pa vorsichtig eingedampft. Dieser Rückstand wurde mit 0,1 ml Acetylierungsgemisch, bestehend aus 3 Teilen Acetanhydrid und 2 Teilen Pyridin, aufgenommen. Die Probe wurde verschlossen und 5 Minuten im Mikrowellenherd bei 440 Watt Leistung acetyliert (Kraemer et al., 1997a). Danach wurde das Acetylierungsgemisch abgedampft und das Kölbchen auf Eis gekühlt. Nach Kühlung wurde der Rückstand mit 0,1 ml Methanol aufgenommen und ein Mikroliter davon in die GC-MS eingespritzt.

3.2.5 GC-MS Methode für die Urinproben

Apparatus: Die Proben wurden mittels eines Agilent Technologies (AT, Waldbronn, Germany) 6890 series GC System mit einem AT 5973 network Massenselektiven Detektor, einem AT 7683 Injektor und einer AT Chem Station G1701CA Version C.00.00 21-Dec-1999. *GC Bedingungen:* Splitless Injektionsmodus; Säule, 5% Phenyl Methyl Siloxane (HP-5MS, 30 m \times 0,25 mm I.D., 250 nm Filmdicke); Einspritzblocktemperatur, 280°C; Trägergas,

Helium; Flussrate, 1 mL/min; Säulentemperatur, von 100°C nach 310°C mit 30°C/min. *MS Bedingungen*. Transfer line Heizer, 280°C; Electron Ionization, Quellentemperatur, 150°C; Solvent delay, 3 min; Full Scan (FS) Modus.

3.2.6 Berechnungen und Statistik

Alle kinetischen und statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung der GraphPad Prism 3.02 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) durchgeführt. Die Michaelis-Menten-Parameter K_m und V_{max} wurden über das ein- oder zweiphasische Enzymmodell mit nichtlinearer Regressionsanalyse ermittelt. Die K_i -Werte wurden entsprechend der Methode von Cheng und Prusoff (Cheng, 1973) bestimmt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mittels eines einseitigen t-Tests überprüft.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 GC-MS Methode

Zur enantioselektiven Bestimmung von Amphetamin wurde ein validiertes GC-MS Verfahren mit leichten Modifikationen eingesetzt. Die Verwendung eines deuterierten internen Standards (AM-d₁₁) erlaubt dabei eine sichere Quantifizierung. Die Derivatisierung mit HFBP hat einerseits den Vorteil, dass die Amphetamin-Enantiomere in die entsprechenden Diastereomere überführt werden und andererseits eignen sich die Derivate wegen der hohen Elektronegativität für die sehr empfindliche negativ chemische Ionisationstechnik der Massenspektrometrie.

In Abbildung 6 sind die Massenspektren und die Strukturformeln der HFBP-Derivate der S(+)-Enantiomere von Amphetamin und des Internen Standards Amphetamin-d₁₁ abgebildet. Die zur Selected Ion Monitoring (SIM)-Bestimmung gewählten Ionen sind markiert.

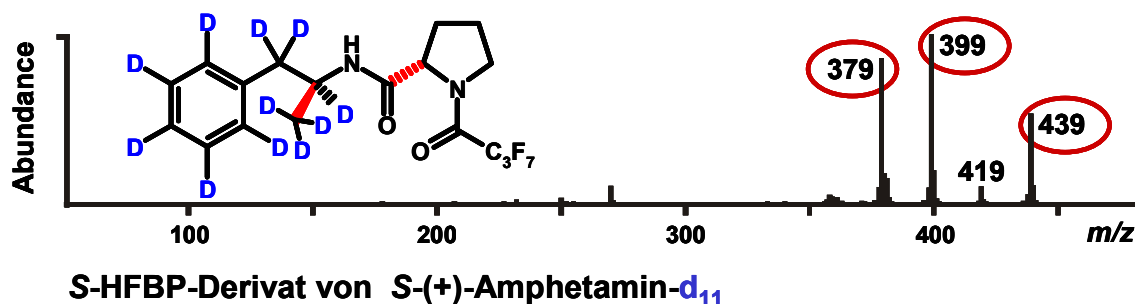
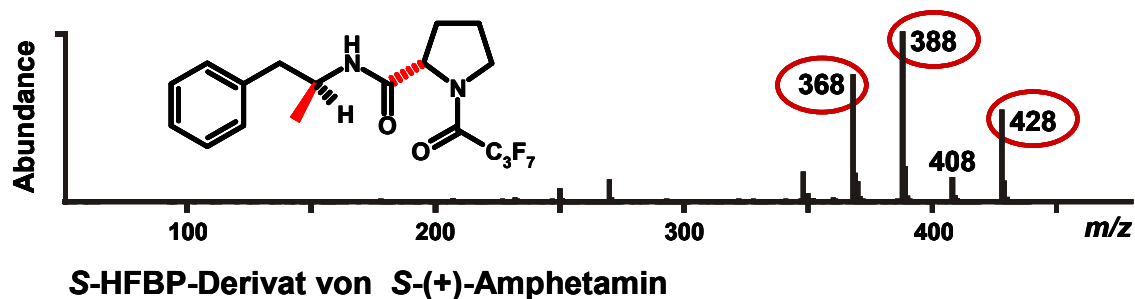


Abb. 6: Massenspektren und Strukturformeln der HFBP-Derivate der S(+)-Enantiomere von Amphetamin und Amphetamin-d₁₁

In Abbildung 7 sind typische Massenfragmentogramme eines mit racemischen Amphetamin gespickten Rattenblutes nach Extraktion und Derivatisierung zu sehen. Die Diastereomere sind basisliniengetrennt. Die Analyse dauert lediglich etwas über elf Minuten.

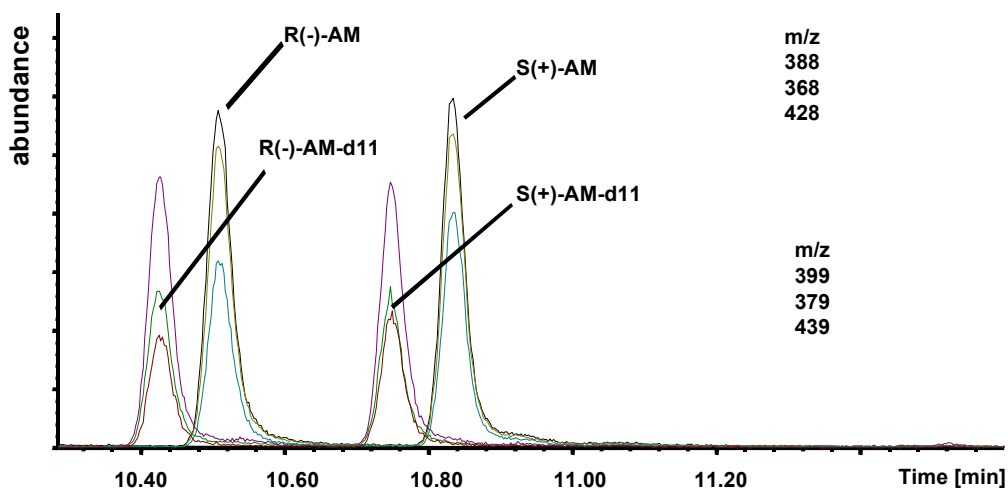


Abb. 7: Typische Massenfragmentogramme für ein Rattenblut nach Extraktion und Derivatisierung.

4.2 Ergebnisse der Rattenversuche

In den folgenden Abbildungen und Tabellen werden die Ergebnisse der Rattenversuche dargestellt. Es werden jeweils die Konzentrationen der entsprechenden Amphetamin-Enantiomeren in den verschiedenen Rattengruppen angegeben. In der Tabelle rechts wird gezeigt, ob die Unterschiede zwischen den Gruppen tatsächlich auch signifikant sind.

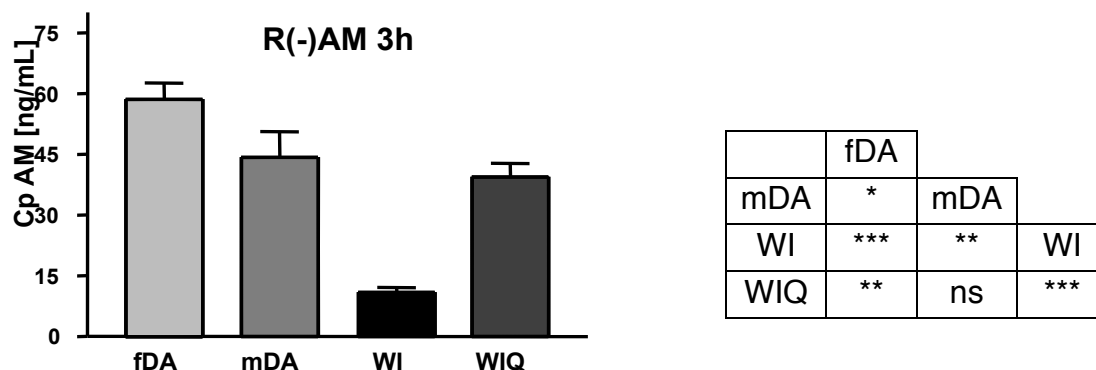


Abb. 8. R(-)-AM Konzentrationen bestimmt in Rattenblutplasma (Cp) von fDA, mDA, WI und WIQ Ratten nach Festphasenextraktion und HFBP-Derivatisierung. Die Proben wurden 3 Stunden nach Verabreichung von Fenproporex entnommen worden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von mindestens vier Bestimmungen. Der Streubalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die Tabelle 2 zeigt das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen. (* = P Wert 0.01 bis 0.05; ** = P Wert 0.001 bis 0.01; *** = P Wert < 0.001; ns = nicht signifikant, P Wert > 0.05).

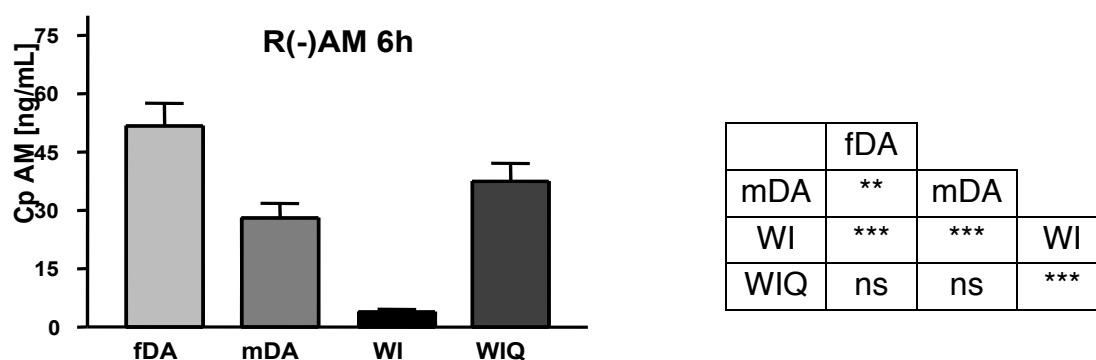


Abb. 9 R(-)-AM Konzentrationen bestimmt in Rattenblutplasma (Cp) von fDA, mDA, WI und WIQ Ratten nach Festphasenextraktion und HFBP-Derivatisierung. Die Proben wurden 6 Stunden nach Verabreichung von Fenproporex entnommen worden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von mindestens vier Bestimmungen. Der Streubalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die Tabelle 3 zeigt das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen. (* = P Wert 0.01 bis 0.05; ** = P Wert 0.001 bis 0.01; *** = P Wert < 0.001; ns = nicht signifikant, P Wert > 0.05).

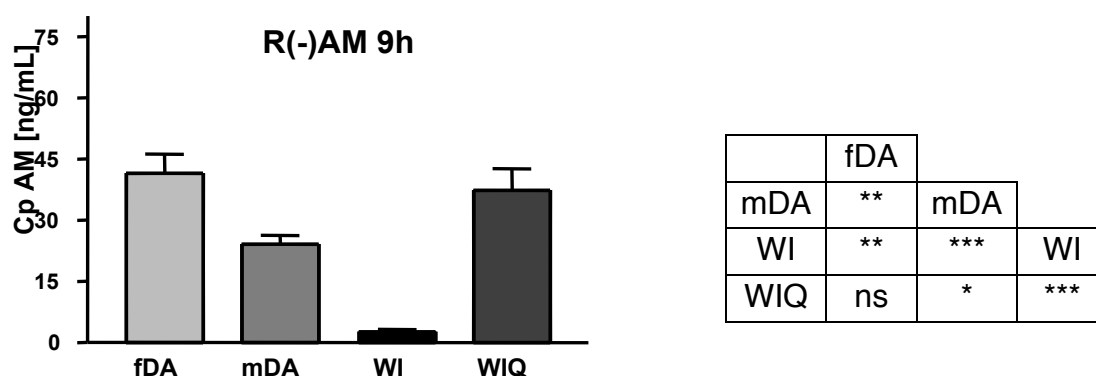


Abb. 10. R(-)-AM Konzentrationen bestimmt in Rattenblutplasma (Cp) von fDA, mDA, WI und WIQ Ratten nach Festphasenextraktion und HFBP-Derivatisierung. Die Proben wurden 9 Stunden nach Verabreichung von Fenproporex entnommen worden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von mindestens vier Bestimmungen. Der Streubalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die Tabelle 4 zeigt das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen. (* = P Wert 0.01 bis 0.05; ** = P Wert 0.001 bis 0.01; *** = P Wert < 0.001; ns = nicht signifikant, P Wert > 0.05).

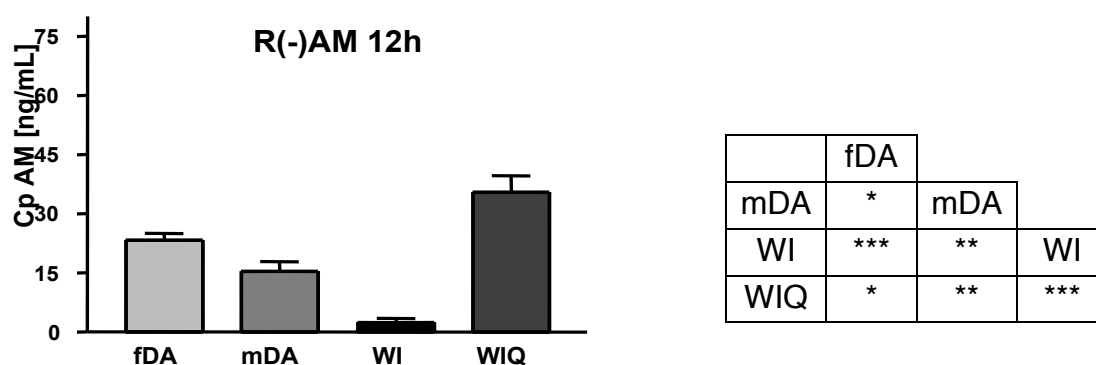


Abb. 11. R(-)-AM Konzentrationen bestimmt in Rattenblutplasma (Cp) von fDA, mDA, WI und WIQ Ratten nach Festphasenextraktion und HFBP-Derivatisierung. Die Proben wurden 12 Stunden nach Verabreichung von Fenproporex entnommen worden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von mindestens vier Bestimmungen. Der Streubalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die Tabelle 5 zeigt das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen. (* = P Wert 0.01 bis 0.05; ** = P Wert 0.001 bis 0.01; *** = P Wert < 0.001; ns = nicht signifikant, P Wert > 0.05).

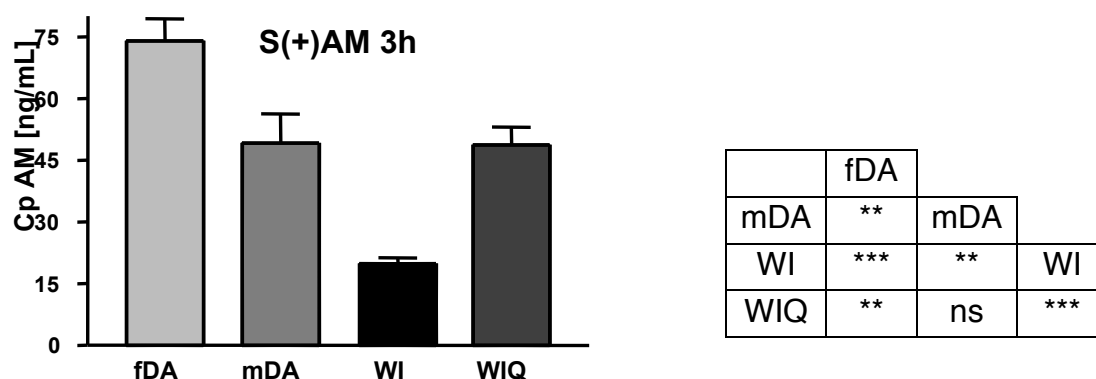


Abb. 12 S(+)-AM Konzentrationen bestimmt in Rattenblutplasma (Cp) von fDA, mDA, WI und WIQ Ratten nach Festphasenextraktion und HFBP-Derivatisierung. Die Proben wurden 3 Stunden nach Verabreichung von Fenproporex entnommen worden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von mindestens vier Bestimmungen. Der Streubalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die Tabelle 6 zeigt das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen. (* = P Wert 0.01 bis 0.05; ** = P Wert 0.001 bis 0.01; *** = P Wert < 0.001; ns = nicht signifikant, P Wert > 0.05).

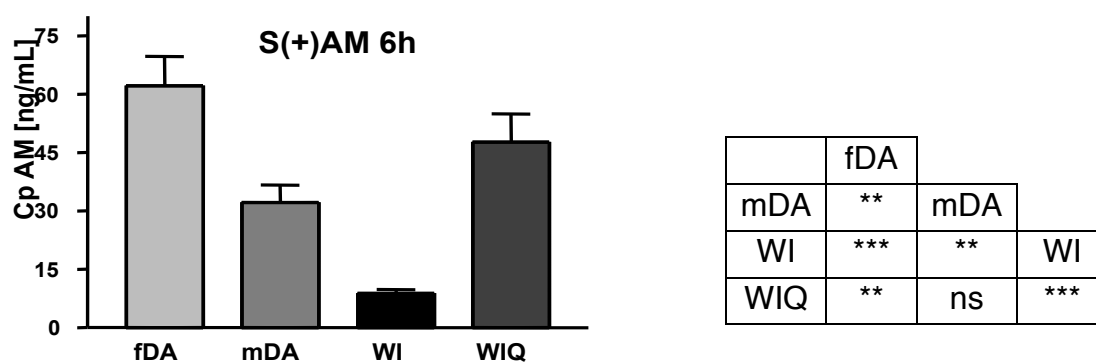


Abb. 13 S(+)-AM Konzentrationen bestimmt in Rattenblutplasma (Cp) von fDA, mDA, WI und WIQ Ratten nach Festphasenextraktion und HFBP-Derivatisierung. Die Proben wurden 6 Stunden nach Verabreichung von Fenproporex entnommen worden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von mindestens vier Bestimmungen. Der Streubalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die Tabelle 7 zeigt das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen. (* = P Wert 0.01 bis 0.05; ** = P Wert 0.001 bis 0.01; *** = P Wert < 0.001; ns = nicht signifikant, P Wert > 0.05).

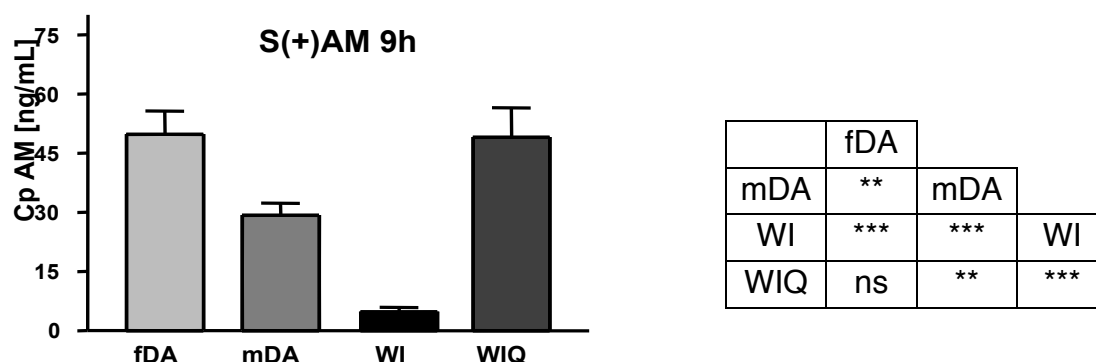


Abb. 14 S(+)-AM Konzentrationen bestimmt in Rattenblutplasma (Cp) von fDA, mDA, WI und WIQ Ratten nach Festphasenextraktion und HFBP-Derivatisierung. Die Proben wurden 9 Stunden nach Verabreichung von Fenproporex entnommen worden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von mindestens vier Bestimmungen. Der Streubalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die Tabelle 8 zeigt das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen. (* = P Wert 0.01 bis 0.05; ** = P Wert 0.001 bis 0.01; *** = P Wert < 0.001; ns = nicht signifikant, P Wert > 0.05).

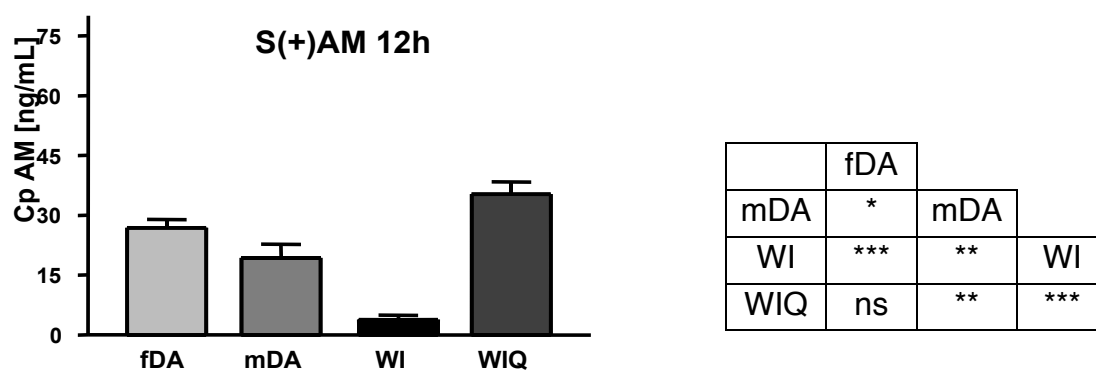


Abb. 15 S(+)-AM Konzentrationen bestimmt in Rattenblutplasma (Cp) von fDA, mDA, WI und WIQ Ratten nach Festphasenextraktion und HFBP-Derivatisierung. Die Proben wurden 12 Stunden nach Verabreichung von Fenproporex entnommen worden. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von mindestens vier Bestimmungen. Der Streubalken zeigt den Standardfehler des Mittelwerts. Die Tabelle 9 zeigt das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen. (* = P Wert 0.01 bis 0.05; ** = P Wert 0.001 bis 0.01; *** = P Wert < 0.001; ns = nicht signifikant, P Wert > 0.05).

Wie den vorangegangenen Abbildungen zu entnehmen ist, waren die Amphetamin-Konzentrationen beider Enantiomere im Poor Metabolizer Modell (weibliche Dark Agouti-Ratte) zu allen gemessenen Zeitpunkten signifikant höher als diejenigen im Extensive Metabolizer Modell (Wistar-Ratte). Die Blutplasma-Konzentrationen in männlichen Dark Agouti-Ratten lagen dabei zwischen diesen beiden Gruppen. Die Anwesenheit von CYP2D Isoenzymen führte also nicht zu höheren, sondern zu niedrigeren Amphetamin-Konzentrationen in den entsprechenden Rattenstämmen.

Zur weiteren Bestätigung dieser Befunde waren Wistar-Ratten vor der Gabe von Fenproporex mit dem starken CYP2D Hemmer Chinin vorbehandelt worden (s. Abschnitt 3.2.1 (Kobayashi, 1989; Moody, 1990)). Tatsächlich führte diese Vorbehandlung zu signifikant höheren Amphetamin-Konzentrationen beider Enantiomere zu allen gemessenen Zeitpunkten. Auch diese Ergebnisse sind in den obigen Abbildungen 8 bis 15 zu sehen.

Die Konzentrationen der Hydroxy-Metaboliten in den Blutproben konnten aufgrund der niedrigen Konzentrationen nicht bestimmt werden. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, konnte in Urinproben tatsächlich gezeigt werden, dass Hydroxy-Metaboliten in den entsprechenden Proben der weiblichen Dark Agouti Ratten und der Chinin vorbehandelten Wistar Ratten fast völlig fehlten, während sie in den Urinproben der Wistar Ratten die Hauptmetaboliten darstellen.

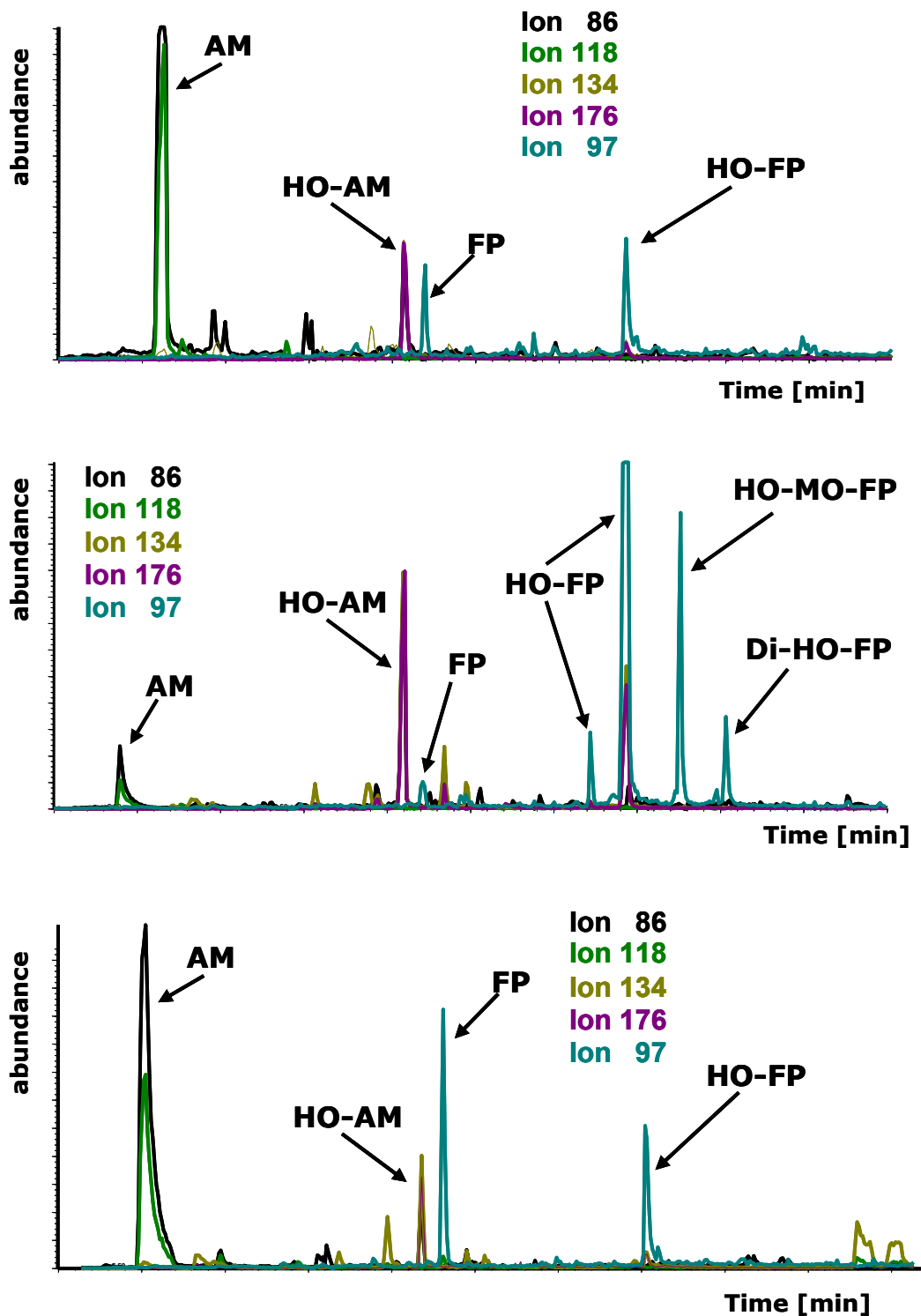


Abb. 16. Massenfragmentogramme (m/z 86, 118, 134, 176, 97) aus acetylierten Urinextrakten, die die Anwesenheit von Fenproporex (FP), seinen Hydroxy-Metaboliten, Amphetamin (AM) und Hydroxy-AM (HO-AM) anzeigen. Oben: weibliche Dark Agouti-Ratte; Mitte: Wistar-Ratte; Unten: Wistar-Ratte nach Chinin Vorbehandlung. (HO-FP: Hydroxy-Fenproporex; Di-HO-FP: Dihydroxy-Fenproporex; HO-MO-FP: Hydroxy-Methoxy-Fenproporex)

Da in der vorliegenden Arbeit für die quantitative Bestimmung von Amphetamin chirale Analytik zum Einsatz kam, konnten auch Änderungen in den Enantiomeren-Verhältnissen (R/S) bestimmt werden. In Abbildung 17 sind die entsprechenden Änderungen über die Zeit der R- zu S-Verhältnisse der Konzentrationen der Amphetamin-Enantiomeren aufgetragen. Die entsprechenden Werte wurden in den Blutplasma Proben der unbehandelten Wistar-Ratten, der weiblichen Dark Agouti-Ratten und der mit Chinin vorbehandelten Ratten bestimmt. Die entsprechenden R/S-Verhältnisse für die weiblichen Dark Agouti-Ratten (fDA) und die Wistar-Ratten (WI), die mit Chinin vorbehandelt waren (WIQ), sind signifikant höher als jene der nicht vorbehandelten Wistar-Ratten. Die R/S-Verhältnisse für die weiblichen Dark Agouti- und der Chinin vorbehandelten Wistar-Ratten sind nicht signifikant unterschiedlich (mit Ausnahme der 9 Stunden Werte).

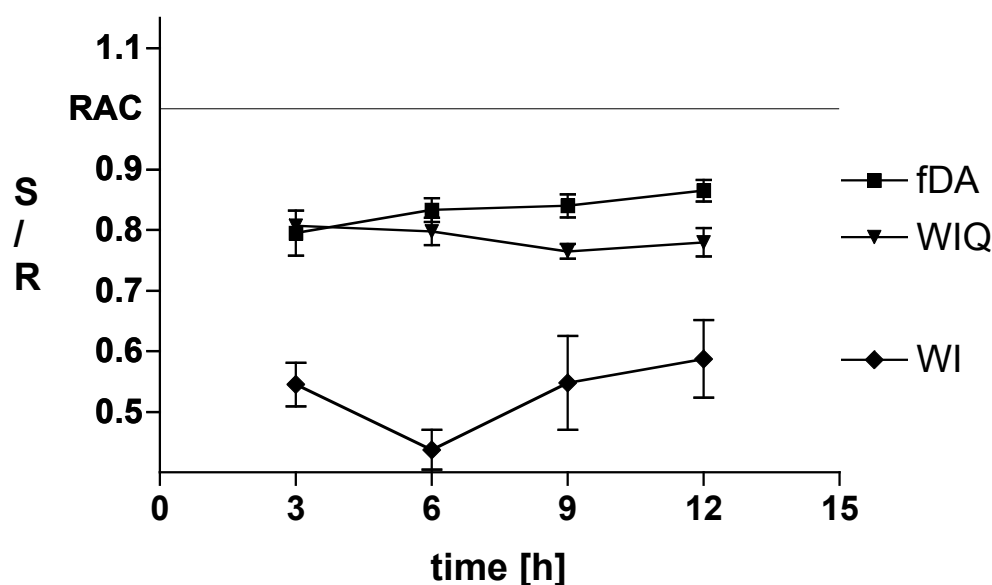


Abb. 17. Änderung der R/S Verhältnisse der Konzentrationen der AM Enantiomere über die Zeit, bestimmt in Blutproben der verschiedenen Rattenmodelle (WIQ, fDA und WI). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus mindestens vier Proben plus/minus dem Standardfehler des Mittelwerts. (RAC = R/S Verhältnis für das Razemat, 1,0)

5. DISKUSSION

Im Rahmen einer im Arbeitskreis vorangegangenen Studie waren die humanen, hepatischen CYP Isoenzyme, die an der *N*-Desalkylierung von Fenproporex beteiligt sind, mittels rekombinanter CYPs und mittels humaner Lebermikrosomen (HLM) identifiziert worden. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur CYP2D6, sondern auch CYP1A2, CYP2B6 und CYP3A4 an dieser metabolischen Reaktion beteiligt sind. Die Bildung von Amphetamin aus der Muttersubstanz Fenproporex konnte dabei vom CYP2D6-Hemmstoff Chinidin nicht signifikant verändert werden. Es konnten auch keine Unterschiede in der Amphetamin-Bildungsrate zwischen Poor-Metabolizer HLM und gepoolten HLM (Extensive Metabolizer) festgestellt werden. Diese Studien legten nahe, dass CYP2D6 nicht für die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin entscheidend ist. Möglicherweise spielt dieses polymorphe Isoenzym jedoch für einen anderen Metabolismus-Schritt, nämlich für die Ring-Hydroxylierung, eine entscheidende Rolle.

Allerdings spiegeln solche *in vitro*-Experimente nicht immer die tatsächlichen *in vivo*-Verhältnisse wider. *In vivo*-Experimente am Menschen konnten aus ethischen Gründen nicht durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb *in vivo*-Experimente an speziellen Rattenstämmen durchgeführt, die als Modell für den humanen Extensive bzw. Poor Metabolizer dienen (Kraemer, 2004). Dort zeigten sich dann tatsächlich auch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Metabolisierern. Zu allen überprüften Zeitpunkten waren die Amphetamin-Konzentrationen im Blut der Dark Agouti-Ratten (PM-Modell) signifikant höher als im EM-Modell (Wistar-Ratten). Offensichtlich war CYP2D6 sogar für niedrigere Amphetamin-Konzentrationen im Blut verantwortlich. Dies wurde dann noch dadurch bestätigt, dass Wistar-Ratten (EM) nach Gabe von Chinin (CYP2D1-Hemmstoff) ähnlich hohe Amphetamin-Konzentrationen erreichten wie die Dark Agouti-Ratten. Wie in Abbildung 1 beschrieben, gibt es als zweiten Metabolisierungsweg neben der *N*-Desalkylierung von Fenproporex auch noch die Hydroxylierung am Ring. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studien könnte man nun annehmen, dass diese Ringhydroxylierung über CYP2D6 katalysiert wird. Das würde bei den PM zu einer geringeren Hydroxylierungsrate

von Muttersubstanz und Amphetamin führen. Das würde einerseits die Menge an Muttersubstanz erhöhen, die zur *N*-Desalkylierung zur Verfügung steht, und andererseits mehr unverändertes Amphetamin zurücklassen. Zumindest für die Hydroxylierung von Amphetamin und Methamphetamin ist die Beteiligung von CYP2D6 an der Ringhydroxylierung schon gezeigt worden (Bach, 1999; Kraemer, 2002; Law, 2000; Lin, 1995; Lin, 1997; Moody, 1990). Für Selegilin (*R*-(-)-*N*-methyl-(1-phenyl-2-propyl)-2-propinylamin), ebenfalls ein Amphetamin-Precursor, der zu Amphetamin und Methamphetamin *N*-desalkyliert wird, wird eine CYP2D-Beteiligung an der Ringhydroxylierung zumindest diskutiert (Scheinin, 1998). Offensichtlich spiegeln die *in vitro*-Ergebnisse bezüglich der Amphetamin-Bildung in pHLM, PM HLM und Chinidin-behandelten pHLM nicht die *in vivo*-Ergebnisse aus den verschiedenen Rattenmodellen wider. Das mag durch die deutlich geringere Hydroxylierungsrate unter *in vitro*-Bedingungen erklärbar sein. Hier sollte man bedenken, dass die entstandenen Hydroxy-Metaboliten unter *in vivo*-Bedingungen sofort nach ihrer Funktionalisierung konjugiert werden und so aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt werden. Unter *in vitro*-Bedingungen findet eine solche Konjugation nicht statt. Tatsächlich zeigte sich, dass die gemessene Konzentration an Hydroxy-Fenproporex in den getesteten *in vitro*-Systemen, im Vergleich zu der von Amphetamin, extrem gering war.

Auch die Unterschiede in den R/S-Verhältnissen zwischen den Wistar-Ratten auf der einen Seite und den weiblichen Dark Agouti-Ratten bzw. Chinin-vorbehandelten Wistar-Ratten auf der anderen Seite könnte mit der Hydroxylierungsreaktion erklärt werden. Wie bereits bei einer früheren Doktorarbeit gezeigt (Kneller, 2009), sollten die Unterschiede in der enantiomeren Zusammensetzung von Amphetamin gering sein. Die Tatsache, dass das Verhältnis bei fehlender Hydroxylierung hier nicht genau 1,0 war, kann mit den leicht höheren Affinitäten der Isoenzyme erklärt werden, die an der *N*-Desalkylierung von Fenproporex beteiligt sind (oder natürlich durch weitere konkurrierende Phase I Reaktionen oder andere enantioselektive Prozesse (Konjugation, Verteilung)).

Die signifikant niedrigeren R/S-Verhältnisse in der Wistar-Gruppe (Mittelwert 0.53 vs. 0.83 bei den weiblichen Dark Agouti-Ratten) können jedoch nicht mit der Tatsache erklärt werden, dass die Unterschiede in den K_m Werten für die *R*- oder *S*-Enantiomere bezüglich CYP2D6 höher (3,5 fach) sind als für die

anderen Isoenzyme (nur 1 bis 2,2 fach). Wäre das richtig, müsste CYP2D6 einen deutlichen Anteil an der Amphetaminbildung aus Fenproporex haben. Wie bereits gezeigt hat es aber keinen entscheidenden Einfluss darauf. Folglich müssen die niedrigeren R/S-Verhältnisse in der Wistar-Gruppe durch eine andere CYP2D6 katalysierte und gleichzeitig enantioselektive Reaktion erklärt werden. Diese Reaktion könnte die Ring-Hydroxylierung, also der zweite wichtige Metabolisierungsweg von Fenproporex, sein. Allerdings wären hier noch weitere Untersuchungen notwendig, um diese Hypothese vollständig zu beweisen.

Insgesamt kann nach Auswertung der vorliegenden Doktorarbeit und der vorangegangenen Studien festgestellt werden, dass die Fenproporex *N*-Desalkylierung zu Amphetamin durch vier verschiedene CYP Isoenzyme katalysiert wird: CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 und CYP3A4.

Unabhängig davon, welches dieser 4 Isoenzyme nun die Hauptrolle bei dieser Reaktion spielt, kann jedes einzelne davon für interindividuelle Schwankungen verantwortlich sein. CYP1A2 ist induzierbar (z.B. durch Zigarettenrauch) (Sesardic, 1990), CYP2D6 wird polymorph exprimiert (Ingelman-Sundberg, 2002), die CYP3A4-Expression in der Leber schwankt interindividuell um das 40-fache (Wojnowski, 2004) und auch CYP2B6 wurde in neuerer Zeit als polymorph beschrieben (Eichelbaum, 2006; Klein, 2005).

Wie die *in vivo*-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zumindest an Rattenmodellen gezeigt haben, könnten bei PM-Individuen (immerhin 7% der Kaukasier (Bertilsson, 1995; Smith, 1998)) nach Einnahme von Fenproporex höhere Amphetamin-Konzentrationen im Blut auftreten als bei Extensive-Metabolizern. Dies könnte in der Forensischen Toxikologie oder bei der Doping-Kontrolle eine Rolle spielen. Außerdem könnte die Einnahme von Medikamenten, die CYP2D6 Hemmstoffe sind (z.B. Paroxetin und Fluoxetin (Crewe, 1992)), ebenfalls zu erhöhten Amphetamin-Konzentrationen im Blut führen. Gewissheit darüber können allerdings nur *in vivo*-Studien am Menschen bringen, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings aus ethischen Gründen nicht durchgeführt werden konnten.

5. LITERATUR

1. Bach, MV, Coutts, RT, Baker, GB (1999) Involvement of CYP2D6 in the *in vitro* metabolism of amphetamine, two N- alkylamphetamines and their 4-methoxylated derivatives. *Xenobiotica* 29: 719-732
2. Bertilsson, L (1995) Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clinical Pharmacokinetics* 29: 192-209
3. Cession-Fossion, A (1970) [Some pharmacological properties of fenproporex in rats] Sur quelques proprietes pharmacologiques du fenproporex chez le rat. *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.* 187: 192-198
4. Cheng, Y Prusoff, WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem.Pharmacol.* 22: 3099-3108
5. Cody, JT, Valtier, S, Stillman, S (1999) Amphetamine and fenproporex levels following multidose administration of fenproporex. *J.Anal.Toxicol.* 23: 187-194
6. Coutts, RT, Nazarali, AJ, Baker, GB, Pasutto, FM (1986) Metabolism and disposition of N-(2-cyanoethyl)amphetamine (fenproporex) and amphetamine: study in the rat brain. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* 64: 724-728
7. Crewe, HK, Lennard, MS, Tucker, GT, Woods, FR, Haddock, RE (1992) The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 34: 262-265
8. de la Torre, R, Badia, R, Gonzalez, G, Garcia, M, Pretel, MJ, Farre, M, Segura, J (1996) Cross-reactivity of stimulants found in sports drug testing by two fluorescence polarization immunoassays. *J.Anal.Toxicol.* 20: 165-170
9. Eichelbaum, M Burk, O (2001) CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat.Med.* 7: 285-287

10. Eichelbaum, M, Ingelman-Sundberg, M, Evans, WE (2006) Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. *Annu.Rev.Med.* 57: 119-137
11. Flockhart, DA (1995) Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 2C19. *Clinical Pharmacokinetics* 29 Suppl 1: 45-52
12. Forth, W, Henschler, D, Rummel, W, Förstermann, U, Starke, K, (2001) *Pharmakologie und Toxikologie*. in: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., and Starke, K., 8. ed. Urban & Fischer, München
13. Guengerich, FP, Hosea, NA, Parikh, A, Bell, PL, Johnson, WW, Gillam, EM, Shimada, T (1998) Twenty years of biochemistry of human P450s: purification, expression, mechanism, and relevance to drugs. *Drug Metabolism and Disposition* 26: 1175-1178
14. Hertel, G Fallot-Burghardt, W (1978) [Treatment of obese female patients with fenproporex within the framework of gynecologic practice] *Behandlung adipöser Patientinnen mit Fenproporex im Rahmen einer gynäkologischen Fachpraxis*. *Fortschr.Med.* 96: 2380-2382
15. Ingelman-Sundberg, M (2002) Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* 181-182: 447-452
16. Klein, K, Lang, T, Saussele, T, Barbosa-Sicard, E, Schunck, WH, Eichelbaum, M, Schwab, M, Zanger, UM (2005) Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. *Pharmacogenet.Genomics* 15: 861-873
17. Kneller, NM, (2009) *In vitro*-Studien zur Beteiligung humaner Cytochrom P450 Isoenzyme an der *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin mittels humaner Lebermikrosomen und rekombinanter CYPs. *Dissertation Universität des Saarlandes*,
18. Kobayashi, S, Murray, S, Watson, D, Sesardic, D, Davies, DS, Boobis, AR (1989) The specificity of inhibition of debrisoquine 4-hydroxylase activity by quinidine and quinine in the rat is the inverse of that in man. *Biochem.Pharmacol.* 38: 2795-2799

19. Kraemer, T Maurer, HH (1998) Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine [review]. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* 713: 163-187
20. Kraemer, T Maurer, HH (2002) Toxicokinetics of amphetamines: Metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, of amphetamine, methamphetamine and their N-alkyl derivatives [review]. *Ther.Drug Monit.* 24: 277-289
21. Kraemer, T Paul, LD (2007) Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in blood. *Anal.Bioanal.Chem.* 388: 1415-1435
22. Kraemer, T, Pflugmann, T, Bossmann, M, Kneller, NM, Peters, FT, Paul, LD, Springer, D, Staack, RF, Maurer, HH (2004) Fenproporex N-dealkylation to amphetamine-enantioselective in vitro studies in human liver microsomes as well as enantioselective in vivo studies in Wistar and Dark Agouti rats. *Biochem.Pharmacol.* 68: 947-957
23. Kraemer, T, Theis, GA, Weber, AA, Maurer, HH (2000) Studies on the metabolism and toxicological detection of the amphetamine-like anorectic fenproporex in human urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay (FPIA). *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* 738: 107-118
24. Law, MY, Slawson, MH, Moody, DE (2000) Selective involvement of cytochrome P450 2D subfamily in in vivo 4-hydroxylation of amphetamine in rat. *Drug Metabolism and Disposition* 28: 348-353
25. Lin, LY, Di Stefano, EW, Schmitz, DA, Hsu, L, Ellis, SW, Lennard, MS, Tucker, GT, Cho, AK (1997) Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. *Drug Metabolism and Disposition* 25: 1059-1064
26. Lin, LY, Kumagai, Y, Hiratsuka, A, Narimatsu, S, Suzuki, T, Funae, Y, Distefano, EW, Cho, AK (1995) Cytochrome P4502D isozymes catalyze the 4-hydroxylation of methamphetamine enantiomers. *Drug Metabolism and Disposition* 23: 610-614
27. Meyer, UA (2000) Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 356: 1667-1671

28. Moeller, MR Kraemer, T (2002) Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs [review]. *Ther.Drug Monit.* 24: 210-221
29. Moody, DE, Ruangyuttikarn, W, Law, MY (1990) Quinidine inhibits in vivo metabolism of amphetamine in rats: impact upon correlation between GC/MS and immunoassay findings in rat urine. *J.Anal.Toxicol.* 14: 311-317
30. Musshoff, F (2000) Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine [review]. *Drug Metab.Rev.* 32: 15-44
31. Nakahara, Y (1995) Detection and diagnostic interpretation of amphetamines in hair. *Forensic Sci.Int.* 70: 135-153
32. Nakahara, Y Kikura, R (1996) Hair analysis for drugs of abuse. XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. *Arch.Toxicol.* 70: 841-849
33. Nazarali, AJ, Baker, GB, Coutts, RT, Pasutto, FM (1983) Amphetamine in rat brain after intraperitoneal injection of N-alkylated analogues. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 7: 813-816
34. Nelson, DR, Koymans, L, Kamataki, T, Stegeman, JJ, Feyereisen, R, Waxman, DJ, Waterman, MR, Gotoh, O, Coon, MJ, Estabrook, RW, Gunsalus, IC, Nebert, DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42
35. Ono, S, Hatanaka, T, Hotta, H, Satoh, T, Gonzalez, FJ, Tsutsui, M (1996) Specificity of substrate and inhibitor probes for cytochrome P450s: evaluation of in vitro metabolism using cDNA-expressed human P450s and human liver microsomes. *Xenobiotica* 26: 681-693
36. Peters, FT, Kraemer, T, Maurer, HH (2002) Drug testing in blood: validated negative-ion chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric assay for determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers and its application to toxicology cases. *Clin.Chem.* 48: 1472-1485
37. Pfeifer, S, Pflugel, P, Borchert, HH, (1995) *Biopharmazie: Pharmakokinetik-Bioverfügbarkeit-Biotransformation.* Ullstein Mosby, Berlin

38. Rang, HP, Dale, MM, Ritter, JM, (1999) Pharmacology. 4 ed. Churchill Livingstone, London
39. Rendic, S Di Carlo, FJ (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab.Rev.* 29: 413-580
40. Scheinin, H, Anttila, M, Dahl, ML, Karnani, H, Nyman, L, Taavitsainen, P, Pelkonen, O, Bertilsson, L (1998) CYP2D6 polymorphism is not crucial for the disposition of selegiline. *Clin.Pharmacol.Ther.* 64: 402-411
41. Sesardic, D, Pasanen, M, Pelkonen, O, Boobis, AR (1990) Differential expression and regulation of members of the cytochrome P450IA gene subfamily in human tissues. *Carcinogenesis* 11: 1183-1188
42. Smith, DA, Abel, SM, Hyland, R, Jones, BC (1998) Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica* 28: 1095-1128
43. Staack, RF, Paul, LD, Springer, D, Kraemer, T, Maurer, HH (2004) Cytochrome P450 dependent metabolism of the new designer drug 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP). *In vivo* studies in Wistar and Dark Agouti rats as well as *in vitro* studies in human liver microsomes. *Biochem.Pharmacol.* 67: 235-244
44. Tognoni, G, Morselli, PL, Garattini, S (1972) Amphetamine concentrations in rat brain and human urine after fenproporex administration. *Eur.J.Pharmacol.* 20: 125-126
45. Wojnowski, L (2004) Genetics of the variable expression of CYP3A in humans [review]. *Ther.Drug Monit.* 26: 192-199
46. Yan, Z Caldwell, GW (2001) Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. *Curr.Top.Med.Chem.* 1: 403-425

6. PUBLIKATIONEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Vortrag und als *peer reviewed* Originalarbeit publiziert:

T. Kraemer, **T. Pflugmann**, F.T. Peters and H.H. Maurer. Dark Agouti rats as a human poor metabolizer model for forensic questions - Studies on the (meth)amphetamine formation from precursor drugs. *Abstract Book of the 40th International TIAFT Meeting in Prague, 2002.*

T. Kraemer, M. Bossmann, **T. Pflugmann**, N.M. Kneller, F.T. Peters and H.H. Maurer. Fenproporex N-dealkylation to amphetamine-enantioselective in vitro studies in human liver microsomes as well as enantioselective in vivo studies in Wistar and Dark Agouti rats. *Biochem. Pharmacol.* 68: 947-957 (2004).

7. DANK

Die wissenschaftlichen Anregungen und die Unterstützung vieler Personen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich deshalb herzlich bedanken bei:

Herrn Univ.-Prof. Dr. Hans H. Maurer für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Hier konnte ich jederzeit Fragen stellen und erhielt hilfreiche Antworten und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Krämer für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und für die stete Hilfe und Beratung bei der Durchführung der Versuche und Abfassung der vorliegenden Arbeit, insbesondere für die Bereitschaft, jederzeit bei Problemen zu helfen.

Meinen Kollegen im Arbeitskreis Liane Paul, Carsten Kratzsch, Frank Peters, Dietmar Springer und Roland Staack für die freundliche Unterstützung, Hilfestellungen und wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn A.A. Weber für die ständige Einsatzbereitschaft, Wartung und Pflege der Messgeräte und für seine Hilfe bei technischen Fragen.

8. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Pflugmann
 Vorname: Thomas
 Geburtsdatum: 01.12.1976
 Geburtsort: Stuttgart
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet
 Eltern: Milica Pflugmann, geb. Stanojevic
 Klaus Eugen Pflugmann

Schule und Studium

1983 – 1987	Grundschule	Jakobschule Stuttgart
1987 – 1996	Gymnasium	Karls-Gymnasium Stuttgart
1996	Abitur Note: 2,4	
1997 – 2004	Studium der Humanmedizin	Universität des Saarlandes

Beruflicher Werdegang

02/2005 – 06/2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter	Universitätsklinikum Essen, Klinik für Urologie, Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. H. Rübber
07/2006 – 09/2010	Assistenzarzt	Kliniken Maria Hilf GmbH, Mönchengladbach, Klinik für Urologie, Prof. Dr. med. H. Sperling

Seit 10/2010

Oberarzt

Kliniken Maria Hilf
GmbH,
Mönchengladbach, Klinik
für Urologie, Prof. Dr.
med. H. Sperling