

**INTERAKTIONEN AUSGEWÄHLTER HISTAMIN
H₂-REZEPTORANTAGONISTEN MIT DEM CYTOCHROM P-450-SYSTEM
UND MÖGLICHE AUSWIRKUNGEN AUF DIE PHARMAKOKINETIK
NICHTSTEROIDALER ANTIRHEUMATIKA**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Martin Schulz
aus Hamburg

Hamburg 1988

1. Gutachter: Professor Dr. J.B. Mielck

2. Gutachter: Professor Dr. A. Schmoldt

Angenommen vom Promotionsausschuß des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg am 08.08.1988

In memoriam

Alfred Schulz

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg in der Zeit von Oktober 1984 bis Mai 1988 angefertigt.

Danksagungen

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Achim Schmoldt möchte ich für die Bereitstellung und Diskussion des Themas und die immerwährende Unterstützung der Arbeit herzlich danken.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Jobst B. Mielck, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Hamburg, Abteilung Pharmazeutische Technologie, danke ich ganz besonders für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Chemie.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Hans-Friedrich Benthe, Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg, Abteilung Pharmakologie für Pharmazeuten, danke ich für die Bereitschaft, durch Verfügungstellung von Geräten und Räumen, die Arbeit ermöglicht zu haben.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Jürgen Jacob, Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Ahrensburg/Holst., danke ich für die gaschromatographisch-massenspektrometrische Analyse der Benz(a)anthracen-Metaboliten.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Rechtsmedizin und am Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg danke ich für die freundliche Zusammenarbeit.

Stellvertretend möchte ich Frau Ursula von Gavel, Frau Erika Hemmingson, Herrn Dipl.-Physiker Dr. rer. nat. Friedel Wischhusen und Herrn Dipl.-Chemiker Dr. rer. nat. Lutz von Meyerinck besonders für die kollegiale, freundschaftliche Kooperation danken.

Herrn Apotheker Dr. rer. nat. H. Kroemer, Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart, danke ich für die frühzeitige Überlassung eines preprints.

Abschließend möchte ich der Friedrich-Ebert-Stiftung danken, die diese Arbeit durch ihre finanzielle Unterstützung ermöglicht hat.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
2. Problemstellungen	8
3. Material und Methoden	11
3.1. Materialien	11
3.1.1. Chemikalien	11
3.1.1.1. Synthese von Etintidinsulfoxid	15
3.1.1.2. Synthese von Ethoxyresorufin	15
3.1.2. Tiere	16
3.1.2.1. Vorbehandlung der Tiere	16
3.1.3. Menschliches Lebergewebe	16
3.1.4. Geräte	17
3.2. Methoden	19
3.2.1. Mikrosomenpräparation	19
3.2.2. Bestimmung des Proteingehalts	20
3.2.3. Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehalts	20
3.2.4. Messung der Differenzspektren	20
3.2.5. Inkubationen mit Lebermikrosomen	22
3.2.5.1. Benzphetamin-N-Demethylierung	22
3.2.5.2. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	24

	Seite
3.2.5.3. Benzo(a)pyren-Oxidation	26
3.2.5.4. Wasserstoffperoxidbildung in Lebermikrosomen	27
3.2.5.5. Benz(a)anthracen-Oxidation	28
3.2.5.6. Sulfoxidation	28
3.2.5.7. Diclofenac-Hydroxylierung	30
3.2.6. Analytik	31
3.2.6.1. Dünnschichtchromatographische Bestimmung von Cimetidin, Etintidin und der Sulfoxide in Mikrosomensuspension	31
3.2.6.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographische (HPLC) Bestimmung von Cimetidin, Etintidin und der Sulfoxide in Mikrosomensuspension	32
3.2.6.3. HPLC-Bestimmung von Diclofenac und seiner Hydroxy-Derivate in Mikrosomensuspension	34
3.2.6.4. HPLC-Bestimmung der H ₂ -Rezeptorantagonisten Cimetidin (Cimetidinsulfoxid), Etintidin (Etintidinsulfoxid) und Ranitidin im menschlichen Plasma	35
3.2.6.5. HPLC-Bestimmung der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) Diclofenac, Indometacin, Naproxen, Piroxicam und Salicylsäure im menschlichen Plasma	38

	Seite
3.2.7. Einfluß von Ranitidin auf die Einzeldosis- Kinetik und minimale steady state- Plasmakonzentrationen von Indometacin bei freiwilligen Probanden.	44
4. Ergebnisse	49
4.1. Interaktionen von Cimetidin und Etintidin mit dem Cytochrom P-450-System der Rattenleber	49
4.1.1. Optische Differenzspektren	49
4.1.2. Inhibierung Cytochrom P-450-abhängiger Oxidationsreaktionen	55
4.1.2.1. Benzphetamin-N-Demethylierung	55
4.1.2.2. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	57
4.1.2.3. Benzo(a)pyren-Oxidation	60
4.1.2.4. Einfluß von Etintidin auf den Benz(a)- anthracen Metabolismus in Lebermikrosomen 5,6-Benzoflavin vorbehandelter Ratten	63
4.2. Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch Ratten- und Menschenlebermikrosomen	66
4.2.1. Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch Rattenlebermikrosomen	66

	Seite
4.2.2. Cimetidin- und Etintidinsulfoxid als Substrate mikrosomaler Enzymsysteme der Rattenleber	75
4.2.3. Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch menschliche Lebermikrosomen	77
4.3. Interaktionen von nichtsteroidalen Antirheumatika mit Histamin H ₂ -Rezeptorantagonisten	81
4.3.1. Einfluß von Ranitidin auf die Hydroxylierung von Diclofenac durch Ratten- und Menschenlebermikrosomen	81
4.3.2. HPLC-Bestimmung der H ₂ -Rezeptorantagonisten Cimetidin, Etintidin und Ranitidin im menschlichen Plasma	86
4.3.2.1. Cimetidin und Cimetidinsulfoxid	86
4.3.2.2. Etintidin und Etintidinsulfoxid	88
4.3.2.3. Ranitidin	90
4.3.3. HPLC-Bestimmung der nichtsteroidalen Antirheumatika Diclofenac, Indometacin, Naproxen, Piroxicam und Salicylsäure im menschlichen Plasma	92
4.3.3.1. Diclofenac	95
4.3.3.2. Indometacin	97
4.3.3.3. Naproxen und Desmethylnaproxen	99

	Seite
4.3.3.4. Piroxicam	101
4.3.3.5. Salicylsäure	103
4.3.4. Einfluß von Ranitidin auf die Einzeldosis- Kinetik und minimale steady state- Plasmakonzentrationen von Indometacin	104
5. Diskussion	115
6. Zusammenfassung	143
7. Literatur	148

1. Einleitung

Durch die enorm verbesserten analytischen Möglichkeiten ist der Erkenntnisgewinn über die Pharmakokinetik und den Metabolismus sowohl von neu in die Therapie eingeführten als auch von älteren Arzneistoffen in den letzten Jahren stark angewachsen.

Zweifellos setzt die optimale Pharmakotherapie Kenntnisse der Pharmakokinetik voraus, um durch die gewählte Dosis und die Dosierungsintervalle therapeutische Plasma- und damit (in der Regel) Wirkort- (Rezeptor) Konzentrationen zu erreichen und subtherapeutische bzw. toxische Werte zu vermeiden.

Zusätzlich ist es eher die Regel als die Ausnahme, daß (vor allem ältere) Patienten mehrere Arzneimittel gleichzeitig einnehmen, so daß - eventuell auch nur theoretische - pharmakokinetische und pharmakodynamische Interaktionen gut untersucht sein sollten.

Die Histamin H_2 -Rezeptorantagonisten wie Cimetidin, Famotidin oder Ranitidin, die zur Therapie und (Rezidiv-) Prophylaxe von peptischen Ulcera, streß-induzierter Läsionen, Refluxösophagitis und des Zollinger-Ellison-Syndroms eingesetzt werden, gehören zu den meist verschriebenen Arzneimitteln. So soll Ranitidin die

weltweit am häufigsten verordnete Substanz sein (Heinzl 1987).

Auf Platz 3 der verordnungstärksten Indikationsgruppen standen 1986 in der Bundesrepublik Deutschland die Magen-Darm-Mittel, von denen die H₂-Rezeptorantagonisten mit zusammen 65,6 Millionen definierten Tagesdosen (DDD) einen großen Teil ausmachen (Schwabe und Paffrath 1987).

Die Gruppe der Analgetika/Antirheumatika stand 1985 und 1986 mit weitem Abstand auf Platz 1 der verordnungstärksten Indikationsgruppen in der Bundesrepublik Deutschland. Bei den nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) dominierte die Substanz Diclofenac mit nahezu der Hälfte der Verordnungen 1986. Weitere häufig eingesetzte Antirheumatika sind Indometacin, Piroxicam, Ketoprofen, Ibuprofen und Naproxen (Schwabe und Paffrath 1987).

Die häufigsten unerwünschten Wirkungen der NSAR betreffen den Gastrointestinaltrakt. Sie werden durch lokale Schädigung der Mukosa (hämorrhagische Gastritis) einerseits (vor allem durch Salicylate, Gilbert et al. 1984) und durch Hemmung der Cyclooxygenase und damit der Synthese von Prostaglandinen, vor allem der E-Gruppe (Vane 1971), andererseits hervorgerufen (Arvidsson et al. 1975, Beard et al. 1987, Bjarnason et al. 1987, Caradoc-Davies 1984, Clinch et al. 1987, Duggan et al. 1986, Henry et al. 1987,

Jick und Porter 1978, Lanza et al. 1979, Larkai et al. 1987).

Außer der Provokation von *Ulcera duodeni et ventriculi* und in manchen Fällen zentralnervösen Störungen (Müdigkeit, Verwirrtheit, Kopfschmerzen, Schwindel) sind als unerwünschte Wirkungen dieser Substanzgruppe insbesondere die zwar seltenen aber schweren Knochenmarksschädigungen bis hin zur Agranulozytose zu beachten.

Da bis auf weiteres in der Therapie verschiedenster Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises auf die NSAR wegen ihrer antiphlogistischen und analgetischen Wirkungen nicht verzichtet werden kann, ist die Frage nach den optimalen Dosierungsintervallen und der optimalen Dosierung von großer Bedeutung.

Dies ist von besonderer Relevanz, wenn zur Vermeidung (Prophylaxe und Therapie) gastro-intestinaler Nebenwirkungen gleichzeitig andere Arzneimittel gegeben werden.

Neben den Antacida (Levy et al. 1975), Pirenzepin, Sucralfat (Manniche et al. 1987), dem Hemmstoff der H⁺/K⁺-ATPase der Parietalzelle Omeprazol (Konturek et al. 1983a) und den Prostaglandinderivaten (Aadland et al. 1987, Gilbert et al. 1984, Müller et al. 1981, Silverstein et al. 1987) kommen vor allem die sehr gut untersuchten

(Brimblecombe et al. 1985, Editorial 1988)

H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin und Ranitidin für diese Indikationen in Frage (Croker et al. 1980, Kauffman und Grossman 1978, MacKercher et al. 1977, Konturek et al. 1983b, LoIudice et al. 1981, Welch et al. 1978).

Die Entdeckung der Histamin H₂-Rezeptoren durch Black et al. (1972) und die Entwicklung des potenten Histamin H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin (Brimblecombe et al. 1975) haben neue Möglichkeiten in der Therapie peptischer Ulcera eröffnet.

Aufgrund der breiten und häufig auch langfristigen Anwendung von H₂-Rezeptorantagonisten wurde schon bald nach ihrer Einführung in die Therapie die Aufmerksamkeit auf die Möglichkeit klinisch relevanter Interaktionen mit anderen Arzneistoffen gelenkt. Nach ersten Fallberichten über Wechselwirkungen von Cimetidin mit Warfarin (Flind 1978, Silver und Bell 1979) konnten Puurunen und Pelkonen (1979) zeigen, daß Cimetidin die N-Demethylierung von Aminopyrin durch Rattenlebermikrosomen hemmt und die Hexobarbital-Schlafzeit bei Ratten verlängert.

In vitro-Versuche mit Lebermikrosomen von Nager und Mensch zeigten, daß Cimetidin und in geringerem Maße Ranitidin an Cytochrom P-450 gebunden werden (Rendić et al. 1979, 1982, 1983, 1984, Knodell et al. 1982, Speeg et al. 1982) und

somit über eine Hemmung des für den oxidativen Arzneistoffmetabolismus wichtigen mischfunktionellen Monooxygenasesystems mit anderen Pharmaka interferieren können (Reimann und Klotz 1986).

Rendić et al. (1979) zeigten, daß Cimetidin, wie viele andere stickstoffhaltige lipophile Basen (Wilkinson et al. 1972, 1974), mit dem mikrosomalen Cytochrom P-450-System der Rattenleber ein Typ-II Bindungsspektrum (Schenkman et al. 1967) ergibt.

Die Affinität zum Cytochrom P-450 ist so groß, daß Cimetidin die Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen der Leber auch in klinisch relevanten Konzentrationen hemmen kann (Klotz und Reimann 1984).

Die Ergebnisse zahlreicher Studien zur Interaktion von H_2 -Rezeptorantagonisten mit anderen Arzneistoffen wurden in mehreren Übersichtsarbeiten zusammengefaßt (u.a. Kirch et al. 1984, Klotz und Reimann 1984, Reimann und Klotz 1986, Sedman 1984, Somogyi und Gugler 1982, Somogyi und Muirhead 1987).

Klinisch bedeutsame Interaktionen mit Cimetidin betreffen die Arzneistoffe Ketoconazol (Reduktion der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) um 65%), Warfarin (erhöhter Wirkspiegel, verlängerte Eliminationshalbwerts- und Prothrombinzeit, erniedrigte Clearance), Phenytoin (erhöhter Wirkspiegel, verlängerte Eliminations-

halbwertszeit, erniedrigte Clearance), Theophyllin (wie Phenytoin) und Lidocain (erhöhter Wirkspiegel, erniedrigte Clearance und Verteilungsvolumen, verlängerte Eliminationshalbwertszeit und größere Bioverfügbarkeit) (Reimann und Klotz 1986).

Pharmakokinetische Interaktionsstudien zwischen H_2 -Rezeptorantagonisten und NSAR finden sich in der Literatur vergleichsweise wenig. Trnavská et al. (1985) zeigten, daß nach Cimetidintherapie die Clearance von Salicylsäure reduziert, die Eliminationshalbwertszeit verlängert und die AUC vergrößert war. Sullivan et al. (1986) fanden eine größere AUC von Flurbiprofen unter der Gabe von Cimetidin, nicht aber bei Gabe von Ranitidin. Conrad et al. (1984) untersuchten den Einfluß von Cimetidin auf die Ibuprofenkinetik bei Einmaldosis-Applikation und fanden keinen Unterschied in der Eliminationshalbwertszeit und der AUC, während in einer weiteren Studie (Ochs et al. 1985) Cimetidin, im Gegensatz zu Ranitidin, die AUC und die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) von Ibuprofen erhöhte und die Clearance erniedrigte. Howes et al. (1983) konnten zeigen, daß Cimetidin die mittlere steady state-Plasmakonzentration von Indometacin erniedrigt.

Unklar ist bis heute, wie der genaue Mechanismus der Interaktion der H₂-Rezeptorantagonisten bei der hepatischen Elimination ist.

Untersuchungen zum Metabolismus der H₂-Rezeptorantagonisten könnten im Hinblick auf diese Fragestellung nützlich sein. Der Metabolismus von Cimetidin war bisher in wenigen Untersuchungen Gegenstand der Forschung (Taylor und Cresswell 1975, Taylor et al. 1978, Mitchell et al. 1982a, 1982b). Beim Menschen ist der Hauptmetabolit das N-Glucuronid (Mitchell et al. 1982b), der Phase I-Hauptmetabolit bei der Ratte, Hund und beim Menschen ist das Cimetidinsulfoxid, welches bei männlichen Wistar-Ratten ca. 30% der im Urin unverändert ausgeschiedenen Cimetidinmenge ausmacht (Taylor et al. 1978).

Der biochemische Mechanismus dieser Oxidation an der Thioether-Struktur des Cimetidins ist bisher unklar. Einerseits könnte diese Sulfoxidation durch Cytochrom(e) P-450, andererseits aber auch durch Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO; N,N-Dimethylanilin-N-Oxidase, EC 1.14.13.8) oder andere mikrosomale Enzyme (Fukushima et al. 1978) katalysiert werden.

Selbst eine nicht-enzymatische Oxidation der Substanz ist bisher noch nicht sicher ausgeschlossen worden.

Eine gleich gute Wirksamkeit von Etintidin und Ranitidin fanden Dammann et al. (1984) in der Therapie von Ulcera duodeni und Wienbeck et al. (1986) in der Therapie der Refluxösophagitis.

Zur Abschätzung der möglichen pharmakokinetischen Interaktionen von Etintidin sollten in vitro-Untersuchungen durchgeführt werden. Als Vergleich diene das Cimetidin.

2.1. Interaktionen von Cimetidin und Etintidin mit dem Cytochrom P-450-System der Rattenleber.

Es sollte untersucht werden, ob Etintidin, wie Cimetidin, mit dem Cytochrom P-450-System der Rattenleber interagiert. Hierzu kommen einerseits Bindungsstudien mit Lebermikrosomen und andererseits Hemmversuche der durch Cytochrome P-450 katalysierten Enzymreaktionen (Benzphetamin-N-Demethylierung, Ethoxyresorufin-O-Deethylierung, Benzo(a)pyren-Oxidation und Benz(a)anthracen-Oxidation) in Frage.

2.2. Metabolismus von Cimetidin und Etintidin.

Angaben zum Metabolismus von Etintidin liegen bisher nicht vor. Während über pharmakokinetische Interaktionen von Cimetidin mit anderen Substanzen bereits eine Reihe von Daten vorliegen, gibt es über den biochemischen Mechanismus

der Metabolisierung von Cimetidin keine differenzierten Untersuchungen. Hier interessiert vor allem die Frage der möglichen Sulfoxidation.

Nach Etablierung von Analysemethoden zur Bestimmung von Cimetidin, Etintidin und den entsprechenden Sulfoxiden in Mikrosomensuspensionen sollte versucht werden, den biochemischen Mechanismus der Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin aufzuklären und der Frage nachgegangen werden, ob diese Sulfoxide Substrate für mikrosomale Enzymsysteme der Rattenleber darstellen.

2.3. Interaktionen von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) mit H₂-Rezeptorantagonisten.

2.3.1. Etablierung von Analysemethoden für die Bestimmung der NSAR Diclofenac, Indometacin, Naproxen (und des möglichen Metaboliten 6-O-Desmethylnaproxen), Piroxicam und Salicylsäure im menschlichen Plasma.

2.3.2. Untersuchungen zum Einfluß von Ranitidin auf die Hydroxylierung von Diclofenac durch Ratten- und Menschenlebermikrosomen.

2.3.3. Untersuchungen zum Einfluß von Ranitidin auf die Pharmakokinetik und minimale steady state-Plasmakonzentrationen von Indometacin bei freiwilligen Probanden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Die Substanzen sind nach den jeweiligen Lieferanten geordnet aufgelistet. Alle anderen verwendeten Chemikalien stammten von Merck bzw. Merck-Schuchardt (Darmstadt). Alle Chemikalien waren von größter erhältlichlicher Reinheit.

Adenylchemie GmbH (Berlin)

Isoxicam

Asche AG (Hamburg)

Etintidin-HCl

Asta Pharma AG (Frankfurt)

Methimazol (Thiamazol, Favistan^R Ampullen)

Baker (Gross-Gerau)

Acetonitril (HPLC Grade)

Bayropharm GmbH (Leverkusen)

Ketoprofen

Bio-Rad (München)

Gamma-Globulin vom Rind

Protein Assay Reagenz

Bischoff GmbH (Leonberg)

HPLC-Säulen (250 x 4,6 mm I.D.), gefüllt mit LiChrosorb^R

RP-8, 5 µm (Merck)

2 cm Vorsäulen, gefüllt mit LiChrosorb^R RP-8, 7 µm (Merck)

Boehringer (Mannheim)

NAD, NADP, NADH, NADPH

Isocitratdehydrogenase (ICDH)

Ciba-Geigy (Basel, CH)

Diclofenac, -Na

4',5-Dihydroxydiclofenac

5-Hydroxydiclofenac

3'-Hydroxydiclofenac

4'-Hydroxydiclofenac

4'-Methoxydiclofenac (CGP 4287)

Fluka (Neu-Ulm)

Benz(a)anthracen nach Umkristallisation (Reinheitsgrad

besser als 99%)

Benzo(a)pyren

Glaxo (Ware, Herts., UK)

N-Methyl-N'-[3-[(3-dimethylaminomethyl)phenoxy]propyl]-

2-nitro-1,1-ethendiamin, -HCl (AH 20480)

Ranitidin, -HCl (Zantic^R Ampullen)

Gödecke AG (Freiburg)

Mefenaminsäure

Hoffmann-La Roche AG (Basel, CH)

Carprofen

ICT (Frankfurt)

Bond Elut^R C₁₈ (1 ml)-Säulen

Lindopharm GmbH (Hilden)

Flufenaminsäure

Macherey & Nagel (Düren)

HPLC-Säulen Nucleosil^R 120-5 C₈ (250 x 4 mm I.D.)

Merckle GmbH (Blaubeuren)

Ibuprofen

Lonazolac-Ca

Monsanto (Düsseldorf)

Aroclor 1254 (polychlorierte Biphenyle)

MSD Sharp und Dohme (München)

Indometacin

Pfizer (Karlsruhe)

Piroxicam

Riedel-de Haen (Seelze)

DC-Mikrokarten SIF (5 x 10 cm)

Roth (Karlsruhe)

5,6-Benzoflavon

Serva (Heidelberg)

Catalase (65000 U/mg)

D,L-Na₃-Isocitrat (IC)

Triton X-100

Smith, Kline und French (Welwyn Garden City, Herts., UK)

Cimetidin, -HCl (Tagamet^R Ampullen)

Cimetidinsulfoxid

Syntex (Palo Alto, Calif., USA)

S(+)-Naproxen

6-O-Desmethylnaproxen

Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Apotheke

Acetylsalicylsäure (Ph.Eur.)

Erdnußoel (DAB 8)

Humanplasma (Blutbank bzw. Eigenplasma)

Paracetamol (DAB 9)

Salicylamid (DAC)

Salicylsäure (Ph.Eur.)

Destilliertes Wasser (sterilisiert)

3.1.1.1. Synthese von Etintidinsulfoxid

500 mg (1,6 mmol) Etintidin-HCl wurden bei 4 °C in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. 340 mg (1,6 mmol) Natrium-meta-periodat, gelöst in 3 ml destilliertem Wasser (6 °C), wurden tropfenweise (10 ml h⁻¹) unter ständigem Rühren zugegeben. Nach 90 min Rühren bei 4 °C wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt, das Reaktionsgemisch über 24 h gerührt und anschließend mit einer 10 %igen Na₂CO₃-Lösung auf pH 9 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde mit dem 3-fachen Volumen Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum abgezogen und die erhaltene Substanz durch Umkristallisation aus Aceton/Wasser gereinigt. Der Verlauf der Reaktion wurde von Beginn an dünnschichtchromatographisch (Bedingungen s. 3.2.6.1.) verfolgt.

Die Identifizierung der Substanz als Etintidinsulfoxid erfolgte mittels Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (1 mg/150 mg KBr, >S=O Bande bei 1040 cm⁻¹), die Reinheit (93 %; 4 % unverändertes Etintidin) wurde mit der HPLC (Bedingungen s. 3.2.6.2.) bestimmt.

3.1.1.2. Synthese von Ethoxyresorufin

Die Synthese von Ethoxyresorufin wurde nach der Methode von Prough et al. (1978) durchgeführt.

3.1.2. Tiere

Männliche Wistar-Ratten wurden direkt vom Züchter (Hagemann, Hannover) erworben. Sie erhielten Standardnahrung (Altromin[®]) und Trinkwasser ad lib.

3.1.2.1. Vorbehandlung der Tiere

Männliche Wistar-Ratten (190 ± 20 g KG) erhielten 80 mg Phenobarbital-Na (in 0,9 % NaCl) kg^{-1} i.p. täglich für 3 Tage oder 0,1 % Phenobarbital-Na in Trinkwasser für 7 Tage, 40 mg 5,6-Benzoflavon (in Erdnußoel) kg^{-1} i.p. täglich für 3 Tage oder einmal polychlorierte Biphenyle (300 mg Aroclor 1254 in 1 ml Erdnußoel kg^{-1}) p.o., Kontrolltiere erhielten nur die Lösungsmittel.

3.1.3. Menschliches Lebergewebe

Proben menschlichen Lebergewebes wurden von Organspendern im Zustand des zentralen Todes erhalten. Die Leberproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in Teilen von ca. 10 g mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

3.1.4. Geräte

Homogenisator: Braun-Melsungen
(Typ: Potter-Elvehjem)

Zentrifugen: MSE High Speed 18
MSE Multex
Eppendorf Tischzentrifuge 5413

Ultrazentrifugen: Kontron TGA 65
Beckmann L 50

Rotoren: Kontron TFT 65.38
Beckmann 50 TI

Photometer: Shimadzu UV-200
Aminco DW-2

Fluoreszenzphotometer: Aminco-Bowman

pH-Meter: Knick

Heizblock: Thermolyne Dri-Bath

Schüttelapparaturen: Eppendorf Mixer 5432
GFL Schüttelwasserbad
Heidolph Rüttler

Ultraschallbad: Julabo USR 3

FT-IR: Nicolet 5-MX

Extraktionssystem: Baker-10 Extraction System

Computer: Siemens PC 1611
Panatek PC/XT

HPLC:

Milton Roy (Hasselroth):

- Constametric-III Pumpen
- Spectro Monitor D
- Accessory Control Module
- Chromatography Control Module
- CI-10 Integrator
- Houston Printer/Plotter
- Sekonic Printer/Plotter

Kontron (Eching):

- automatischer Probengeber MSI 660

Bio-Rad (München):

- HPLC Pumpe Model 1330

Rheodyne (ICT, Frankfurt):

- Probeninjektionsventil 7010
- Probeninjektor 7125
- 6-Position-Selektionsventile 7060
- 20, 50 und 100 μ l Probenschleifen

Hamilton:

- 25 und 100 μ l HPLC-Spritzen

3.2. Methoden

3.2.1. Mikrosomenpräparation

Lebermikrosomen wurden nach der Methode von Kutt und Fouts (1971) präpariert: Wistar-Ratten wurden nach Genickschlag dekapitiert und die Lebern der Tiere sofort nach Entnahme gewogen, klein geschnitten, mit eiskaltem 0,15 mol KCl-Puffer l^{-1} (pH 7,45) blutfrei gespült und in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Puffer im Verhältnis 1:4 homogenisiert. Menschliche Leberproben wurden über Nacht bei 4 °C im Puffer aufgetaut und vor dem Homogenisieren mit einem Skalpell zerkleinert. Das Homogenat wurde bei 10.000 x g 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der dabei erhaltene Überstand wurde bei 105.000 x g bei 4 °C 60 min ultrazentrifugiert, der Überstand verworfen und das Röhrchen vom Fett gereinigt. Der aus Mikrosomen bestehende Niederschlag wurde in KCl-Puffer resuspendiert und mit einem Handhomogenisator rehomogenisiert.

Alle Versuche wurden mit jeweils frisch hergestellten Mikrosomensuspensionen durchgeführt.

3.2.2. Bestimmung des Proteingehalts

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Bio-Rad Protein-Kit und Gamma-Globulin (vom Rind) als Proteinstandard durchgeführt.

3.2.3. Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehalts

Die Bestimmung des Cytochrom P-450-Gehaltes erfolgte nach der Methode von Omura und Sato (1964) am Aminco DW-2, mit der Modifikation, daß statt Phosphatpuffer Tris-HCl (pH 7,45) benutzt wurde.

3.2.4. Messung der Differenzspektren

Differenzspektren wurden auf einem Aminco DW-2 Spektrophotometer im "split beam mode" registriert: In 10 mm Halbmikroküvetten wurden in die Meß- und Referenzküvette 1 mg mikrosomales Protein ml Tris-Puffer⁻¹ (pH 7,45) pipettiert und ein Nullabgleich über den Wellenlängenbereich 360 - 500 nm durchgeführt. Etintidin-HCl (10 mg ml Wasser⁻¹) bzw. Cimetidin-HCl (10 mg ml Wasser⁻¹) wurden in Mikroliter-Aliquots in die Meßküvette pipettiert. Das gleiche Volumen Wasser wurde in die Referenzküvette gegeben. Nach dem Mischen wurde das Spektrum registriert (0,02 - 0,05 Absorption, Schreibergeschwindigkeit: 5 nm sec⁻¹) und die Extinktionsdifferenz zwischen Absorptionsmaximum und

Absorptionsminimum ($\Delta A = A_{\max} - A_{\min}$) für jede Konzentration notiert.

Da in der doppelt-reziproken Darstellung $[\Delta A]^{-1}$ vs. $[\text{Substratkonzentration}]^{-1}$ keine Gerade sondern eine zum Ursprung gebogene Kurve erhalten wurde, wurde unter der Annahme der Beteiligung von zwei verschiedenen Cytochromen P-450 den Meßpunkten eine Hyperbel der Formel

$$\Delta A = \frac{\Delta A_{\max 1} \cdot [S]}{K_{s 1} + [S]} + \frac{\Delta A_{\max 2} \cdot [S]}{K_{s 2} + [S]}$$

angepaßt und daraus die spektralen Dissoziationskonstanten $K_{s 1}$ und $K_{s 2}$ berechnet.

Hierzu diente das Programm "EVOL" (Schwefel 1977), das auf einem Siemens PC 1611 in BASIC programmiert wurde.

3.2.5. Inkubationen mit Lebermikrosomen

Soweit nichts anderes angegeben, wurden alle Bestimmungen mindestens zweifach durchgeführt.

3.2.5.1. Benzphetamin-N-Demethylierung

Die N-Demethylierung von Benzphetamin (Abb. 2) wurde über das gebildete Formaldehyd nach Nash (1953) mit Modifikationen von Werringloer (1978) gemessen.

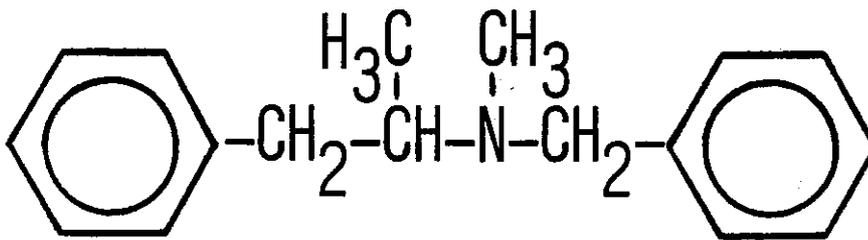


Abb. 2. Strukturformel von Benzphetamin

Der komplette Inkubationsansatz (2 ml) bestand aus:
50 mmol Tris-HCl (pH 7,45) l⁻¹, 150 mmol KCl l⁻¹, 5 mmol MgCl₂ l⁻¹, 8 mmol Isocitrat (IC) l⁻¹, 400 mU Isocitratdehydrogenase, 4 mg mikrosomales Protein und 0,5 bzw. 1,0 mmol Benzphetamin l⁻¹ (0,1 - 0,75 mmol l⁻¹ für die K_M bzw. K_i-Bestimmung). Nach 5 min Vorinkubation bei 37 °C wurde mit 0,5 mmol NADPH l⁻¹ gestartet und 10 min unter intensivem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml 1 mol Trichloressigsäure l⁻¹ gestoppt, zentrifugiert (5 min bei 3000 U min⁻¹) und 1,3 ml des Überstandes mit 0,7 ml 3,6 %iger NaHCO₃-Lösung und 2 ml Nash B-Reagenz (2 mol Ammoniumacetat, 50 mmol Essigsäure und 20 mmol Acetylaceton l⁻¹) versetzt.
Nach 40 min Inkubation bei 37 °C und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde photometrisch bei 412 nm gegen Leerwert (ohne NADPH) gemessen und das gebildete Formaldehyd mittels einer Eichgerade (2,5 - 100 µmol Formaldehyd l⁻¹) bestimmt.

3.2.5.2. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

Die Bestimmung der O-Deethylierung von Ethoxyresorufin (Abb. 3) erfolgte nach der Methode von Burke und Mayer (1974).

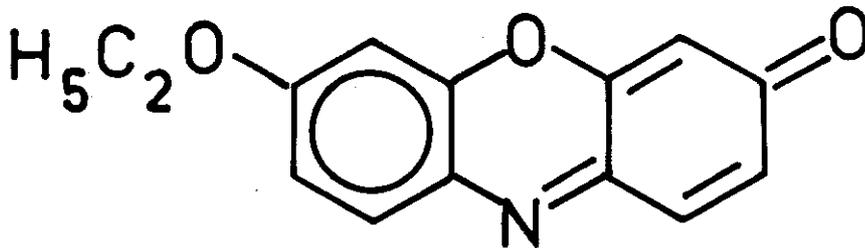


Abb. 3. Strukturformel von Ethoxyresorufin

Das komplette Inkubationssystem (2 ml) bestand aus: 50 mmol Tris-HCl (pH 7,45) l^{-1} , 150 mmol KCl l^{-1} , 5 mmol $MgCl_2$ l^{-1} und 3,1 μ mol Ethoxyresorufin l^{-1} (0,16 - 1,6 μ mol Ethoxyresorufin l^{-1} für die K_M bzw. K_I -Bestimmung). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 mg mikrosomalem Protein und 0,5 mmol NADPH l^{-1} gestartet, der Verlauf der Reaktion sofort fluoreszenzphotometrisch (über 1,5 min alle

15 sec ablesen von ΔF ex. 520 nm; em. 590 nm, Spalt 5 mm) verfolgt und das gebildete Resorufin mittels einer Eichgerade (100 - 1000 nmol Resorufin l⁻¹) bestimmt.

Die Inhibitorkonstanten (K_i) wurden nach der Formel

$$K_i = \frac{K_M \cdot [I]}{K' - K_M}$$

berechnet (K_M = scheinbare Michaelis-Menten-Konstante, [I] = Inhibitorkonzentration und K' ist der reziproke Wert des Schnittpunktes der gehemmten Reaktion mit der Abszisse bei der Auftragung nach Lineweaver-Burk).

3.2.5.3. Benzo(a)pyren-Oxidation

Die Messung der Benzo(a)pyren-Oxidation (Abb. 4) erfolgte nach der Methode von Dehnen et al. (1973).

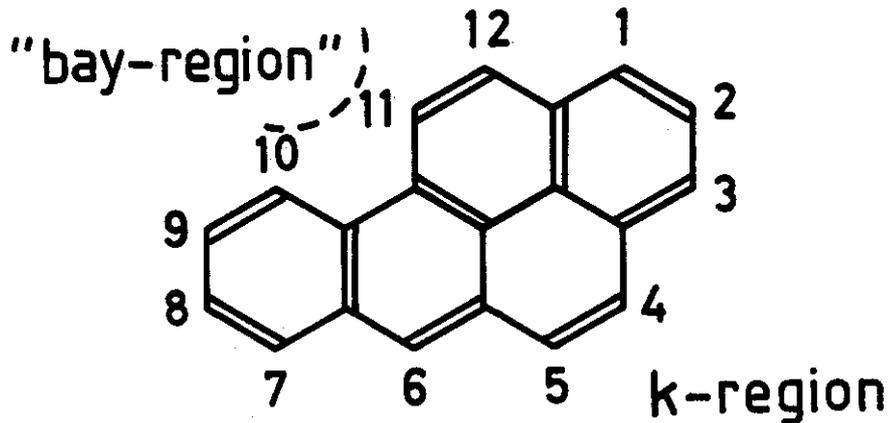


Abb. 4. Strukturformel von Benzo(a)pyren

Der komplette Inkubationsansatz (2 ml) bestand aus: 50 mmol Tris-HCl (pH 7,45) l^{-1} , 150 mmol KCl l^{-1} , 5 mmol $MgCl_2$ l^{-1} , 8 mmol IC l^{-1} , 400 mU ICDH, 0,5 mg mikrosomales Protein und 20 bzw. 40 μ mol Benzo(a)pyren (in 20 μ l Aceton) l^{-1} . Nach 2 min Vorinkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mmol NADPH l^{-1} gestartet und 5 min unter intensivem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 μ l 10 %iger Triton X-100-Lösung

in Triethanolamin gestoppt und die Fluoreszenz (ex. 460 nm; em. 522 nm, Spalt 0,5 mm) der gebildeten Benzo(a)pyren Oxidationsprodukte (hauptsächlich 3-OH-Benzo(a)pyren) gegen Leerwert (ohne IC, ICDH und NADPH) gemessen.

3.2.5.4. Wasserstoffperoxidbildung in Lebermikrosomen

Um die Effektivität der Antioxidantien Glutathion (GSH) und EDTA (jeweils in einer Konzentration von 1 mmol l⁻¹) zu prüfen, wurde die H₂O₂-Bildung in Rattenlebermikrosomen gemessen, indem die enzymatische Entstehung von Formaldehyd aus Methanol über Catalase bestimmt wurde (Hildebrandt et al. 1978). Zum kompletten Inkubationssystem (s.

Sulfoxidation) wurden 2000 U Catalase ml⁻¹ und 50 mmol Methanol l⁻¹ gegeben und die Inkubation wie beschrieben (s. 3.2.5.6.) durchgeführt. 1 ml Inkubationssuspension wurde mit 1 ml eiskalter 10 %iger (w/v) wäßriger Trichlor-essigsäurelösung versetzt und 15 min bei 3000 x g zentrifugiert. 1,5 ml Überstand wurden mit 1,5 ml Nash B-Reagenz (vgl. 3.2.5.1.) versetzt, geschüttelt und 8 min bei 58 °C im Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde photometrisch bei 412 nm gegen den entsprechenden Leerwert (ohne NADPH und ohne NADPH-regenerierendes System) gemessen und das entstandene Formaldehyd (vgl. 3.2.5.1.) bestimmt.

3.2.5.5. Benz(a)anthracen-Oxidation

Inkubationen von Benz(a)anthracen mit Rattenlebermikrosomen 5,6-Benzoflavon-vorbehandelter Tiere wurden nach der Methode von Jacob et al. (1981a) durchgeführt. Das komplette Inkubationssystem (2 ml) bestand aus: 50 mmol Tris-HCl (pH 7,45) l⁻¹, 150 mmol KCl l⁻¹, 5 mmol MgCl₂ l⁻¹, 8 mmol IC l⁻¹, 400 mU ICDH und 45 µmol Benz(a)anthracen (in 20 µl Aceton) l⁻¹. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 mmol NADPH l⁻¹ gestartet und über 20 min bei 37 °C unter intensivem Schütteln durchgeführt. Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 ml Aceton wurden die Proben bis zur Aufarbeitung (Jacob et al. 1981b) bei -20 °C eingefroren.

3.2.5.6. Sulfoxidation

Der komplette Inkubationsansatz (2 ml) für Cimetidin, Etintidin sowie für die entsprechenden Sulfoxide enthielt: 50 mmol Tris-HCl (pH 7,45) l⁻¹, 150 mmol KCl l⁻¹, 5 mmol MgCl₂ l⁻¹, 8 mmol IC l⁻¹, 400 mU ICDH, 2 mg mikrosomales Protein und verschiedene Konzentrationen der Substrate. Um eine Inaktivierung der FMO zu minimieren (Cashman und Ziegler 1980) wurden alle Schritte so schnell wie möglich bei 4 °C ausgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 0,5 mmol NADPH l⁻¹ gestartet und die Inkubationen über 10 min bei 37 °C unter intensivem Schütteln durchgeführt.

Gestoppt wurde durch Zusatz von 100 µl kaltem Eisessig, anschließend wurden die Proben sofort bei -20 °C bis zur Aufarbeitung (s. 3.2.6.) eingefroren.

Inhibitionen des Cytochrom P-450-Systems:

Um die Beteiligung Cytochrom P-450-abhängiger Monooxygenasen bei dieser Sulfoxidation zu testen, wurde einerseits 3 mmol n-Octylamin l⁻¹ (Oldham und Chenery 1985, Tynes und Hodgson 1983, Ziegler 1980) und andererseits Kohlenmonoxid (CO/O₂; 3+2; v/v), als Inhibitor aller Cytochrome (Hartmann et al. 1983, Kreft und Breyer-Pfaff 1979, Vignier et al. 1985) zugegeben.

Inhibitionen Flavin-abhängiger Monooxygenasen (FMO):

Eine Vorinkubation (45 min bei 37 °C) der Mikrosomen ohne NADPH (Dyroff und Neal 1983, Rouer et al. 1987), Zusetzen von 0,4 mmol N,N-Dimethylanilin (Ziegler 1980) bzw. von 1 mmol Methimazol (Thiamazol) l⁻¹ (Cashman und Ziegler 1986, Young und Mehendale 1987) gelten als suffiziente Methoden zur Inhibierung der FMO-Aktivität und wurden dementsprechend für die Inhibition der FMO eingesetzt (s. Tabellen zur Sulfoxidation).

3.2.5.7. Diclofenac-Hydroxylierung

Das komplette Inkubationssystem für die Bestimmung der Hydroxylierung von Diclofenac durch Ratten- und Menschenlebermikrosomen (2 ml) bestand aus: 50 mmol Tris-HCl l⁻¹, 150 mmol KCl l⁻¹, 5 mmol MgCl₂ l⁻¹, 8 mmol IC l⁻¹, 400 mU ICDH, 100 µmol Diclofenac l⁻¹, 2 mg mikrosomales Protein einer Kontroll-Rattenleber (0,43 nmol Cytochrom P-450 mg mikr. Prot.⁻¹) bzw. einer Menschenleber (0,22 nmol Cytochrom P-450 mg mikr. Prot.⁻¹) und 0,5 mmol NADPH l⁻¹. Inkubationszeit: 10 min; Stop durch 100 µl Eisessig und Einfrieren der Proben bei -20 °C bis zur Aufarbeitung (s. 3.2.6.3.).

3.2.6. Analytik

3.2.6.1. Dünnschichtchromatographische Bestimmung von Cimetidin, Etintidin und der Sulfoxide in Mikrosomen-suspension.

100 µl der bei 4 °C aufgetauten Mikrosomensuspension wurden zweimal mit je 100 µl Aceton extrahiert (5 min schütteln), anschließend zentrifugiert (1 min bei 8.800 x g) und 100 µl der vereinigten Überstände auf Kieselgel 60 F₂₅₄ DC-Platten mit Konzentrierungszone (20 x 20 cm) strichförmig zusammen mit den Vergleichssubstanzen (Cimetidin, Cimetidinsulfoxid, Etintidin und Etintidinsulfoxid) aufgetragen. Das Laufmittel bestand aus Essigsäurethylester:Methanol:Ammoniak (25 %) im Verhältnis 75:20:5 (v/v), Laufstrecke: 12-14 cm, Trocknung: 5 min bei 70 °C, Detektion durch Fluoreszenzlöschung des Indikators Fluoreszein bei 254 nm und Anfärbung durch Besprühen mit Dragendorffs Reagenz nach Munier und Macheboeuf (Lösung a: 3,4 g basisches Wismut(III-)nitrat wurden in einer Mischung aus 40 ml Eisessig und 160 ml Wasser gelöst; Lösung b: 32 g Kaliumiodid wurden in 80 ml Wasser gelöst. Gleiche Volumina an Lösung a und b wurden gemischt und als Vorratslösung in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Die Sprühlösung wurde durch Mischen von 2 ml Vorratslösung mit 4 ml Eisessig und 20 ml Wasser jeweils frisch hergestellt), alle 4 Substanzen

färbten sich rosa, Zwischentrocknung (5 min 70 °C) und anschließender Detektion mit frisch hergestellter Kaliumiodid-platinatlösung (6 ml Hexachloro(IV)-säurelösung (10 %) wurden mit 12 g Kaliumiodid in 200 ml Wasser vermischt): Cimetidin (R_f -Wert 0,44) färbte sich braun, Cimetidinsulfoxid (0,21) gelb-braun, Etintidin (0,50) gelb und Etintidinsulfoxid (0,30) dunkelgelb.

3.2.6.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographische (HPLC) Bestimmung von Cimetidin, Etintidin und der Sulfoxide in Mikrosomensuspension.

Nach dem Auftauen und Schütteln wurden je 700 μ l der Inkubationsansätze 1 min bei 8.800 x g zentrifugiert. 500 μ l der Überstände wurden mit 10 μ g internem Standard (Etintidin für die Bestimmung von Cimetidinsulfoxid und Cimetidin für die Bestimmung von Etintidinsulfoxid) 10 μ l Wasser⁻¹ und 500 μ l 1 mol Phosphat-Puffer l⁻¹ (pH 10,0) versetzt und nach 2 min Schütteln 1 min bei 8.800 x g zentrifugiert. Die erhaltene Mischung wurde quantitativ mittels Festphasenextraktion (1 ml C₁₈ Bond Elut^R-Säulen, Vorkonditionierung mit 2 x 1 ml Methanol und 2 x 1 ml Wasser, Aufgabe des Probengemisches, Reinigung mit 2 x 1 ml Wasser, 2 min trocken saugen und Elution mit 4 x 200 μ l Methanol) gereinigt und konzentriert. Die vereinigten Methanoleluate wurden bei 50 °C unter

leichtem Stickstoffstrom eingedampft, die Rückstände in 1,0 - 1,5 ml HPLC-Laufmittel aufgenommen und 100 µl mittels automatischem Probengeber injiziert.

HPLC-Bedingungen:

Säule: a) Nucleosil[®] 120-5 C₈ (250 x 4 mm I.D.)

b) Bischoff HPLC-Säule (250 x 4,6 mm I.D.) gefüllt mit LiChrosorb[®] RP-8, 5 µm

Vorsäule: a) + b) Bischoff 2 cm gefüllt mit LiChrosorb[®] RP-8, 7 µm

Laufmittel: ortho-Phosphorsäure (0,085%) : Acetonitril (80:20, v/v, pH 2,3)

Fluß: 1,3 (a) bzw. 1,5 ml min⁻¹ (b)

Detektion: 220 nm

Empfindlichkeit: 0,02 - 0,05 AUFS

Druck: a) 2000 PSI (13,8 MPa)

b) 2800 - 3000 PSI (19,3 - 20,7 MPa)

Die Methode wurde nach Zusatz von Cimetidin, Etintidin und den Sulfoxiden zu Ratten- und Menschenlebermikrosomen geprüft (Wiederfindung 85-92 %).

Bei allen HPLC-Bestimmungen wurde bei Raumtemperatur (24-28 °C) gearbeitet, der Papiervorschub betrug 10 mm min^{-1} und die Berechnungen erfolgten jeweils über die Flächenprozentage. Alle Laufmittel für die HPLC wurden vor dem Gebrauch mit Helium entgast.

3.2.6.3. HPLC-Bestimmung von Diclofenac und seiner Hydroxy-Derivate in Mikrosomensuspension.

Die Analyse von Diclofenac und seiner Metaboliten erfolgte in Anlehnung an die Bestimmungsmethode von Diclofenac im Plasma (s. 3.2.6.5. a)) mit den Ausnahmen, daß als interner Standard $10 \mu\text{g}$ Flufenaminsäure $10 \mu\text{l}$ Methanol⁻¹ verwendet wurde, keine Zugabe von $500 \mu\text{l}$ $1 \text{ mol KH}_2\text{PO}_4 \text{ l}^{-1}$ (pH 6,8) erfolgte und sowohl bei 220 als auch bei 276 nm detektiert wurde.

Die Etablierung der Methode erfolgte durch Zusatz von Diclofenac und seiner Metaboliten zu Ratten- und Menschenlebermikrosomen (Wiederfindung 84-95 %).

3.2.6.4. HPLC-Bestimmungen der H₂-Rezeptorantagonisten

Cimetidin (Cimetidinsulfoxid), Etintidin

(Etintidinsulfoxid) und Ranitidin im menschlichen Plasma.

In Anlehnung an publizierte Methoden zur hochdruck-flüssigkeitschromatographischen Bestimmung von Cimetidin (Bartle et al. 1983, Larsen 1979, Lorenzo und Drayer 1981, Pancorbo et al. 1982, Randolph et al. 1977), Cimetidinsulfoxid (Larsson et al. 1982, Lin et al. 1985, Lee und Osborne 1978, Ziemniak et al. 1981) und Ranitidin (Carey und Martin 1979, 1984, Mihaly et al. 1980, Mullersman und Derendorf 1986, Vandenberghe et al. 1980) wurden Bestimmungsmethoden für die Analyse von Cimetidin, Cimetidinsulfoxid, Etintidin, Etintidinsulfoxid sowie von Ranitidin entwickelt:

a) Cimetidin, Etintidin und deren Sulfoxide.

Die Analyse von Cimetidin, Etintidin und den entsprechenden Sulfoxiden im menschlichen Plasma erfolgte in Anlehnung an die oben beschriebene (3.2.6.2.) Methode mit den Änderungen, daß 5 µg interner Standard 5 µl Wasser⁻¹ zu 500 µl Plasma gegeben wurde, daß jeweils 20 µl injiziert wurden und die Detektorempfindlichkeit bei 0,01 - 0,05 AUFS lag.

b) Ranitidin

Nach dem Auftauen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) der Plasmaproben (Leerplasma bzw. 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ng Ranitidin ml^{-1}) unter fließendem Wasser und Rütteln für 10 sec wurden 1 ml Plasma zu 1 μg AH 20480-HCl (Abb. 5) 10 μl Wasser $^{-1}$ pipettiert und 2 min intensivst geschüttelt. Anschließend wurden 50 μl 0,1 mol NaOH l^{-1} und 500 μl 1 mol Phosphatpuffer l^{-1} (pH 10,0) zugegeben und nach 5 min Schütteln 1 min bei 8.800 x g zentrifugiert. Die erhaltene Mischung wurde quantitativ mittels Festphasenextraktion (s. 3.2.6.2.) gereinigt und konzentriert. Die vereinigten Methanoleluate wurden bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter leichtem Stickstoffstrom in silanisierten Glasröhrchen (s. unten) zur Trockne eingedampft. Nach Zugabe von 60 μl Laufmittel (s. unten) wurde die Probe 3 min mit Ultraschall behandelt und je 20 μl injiziert.

Silanisierung der Glasröhrchen:

Nach dem Ausspülen der Röhrchen mit Methanol wurden je 2 ml 5 %ige Dimethyldichlorsilan in Toluol-Lösung zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lösungen ausgegossen und die Röhrchen 30 min bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Heizblock erwärmt. Anschließend wurde 5 x mit ca. 3 ml Methanol nachgespült und für 2 h bei $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Trockenschrank erhitzt.

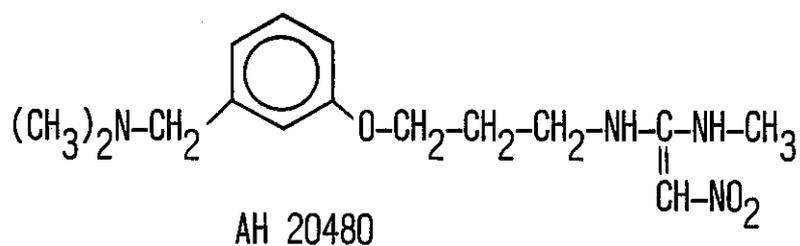
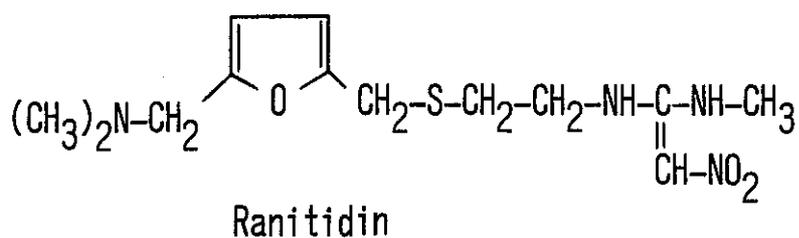


Abb. 5. Strukturformeln des Histamin H_2 -Rezeptor-antagonisten Ranitidin und des internen Standards AH 20480

HPLC-Bedingungen:

Säule: Nucleosil[®] 120-5 C₈ (250 x 4 mm I.D.)

Vorsäule: Bischoff 2 cm gefüllt mit LiChrosorb[®] RP-8, 7 μ m

Laufmittel: Kaliumdihydrogenphosphat (50 mmol l⁻¹) :

Acetonitril (75 : 25, v/v, pH 4,8)

Fluß: 1,3 ml min⁻¹

Detektion: 318 nm

Empfindlichkeit: 0,005 - 0,05 AUFS

Druck: 2200 PSI (15,2 MPa)

3.2.6.5. HPLC-Bestimmungen der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) Diclofenac, Indometacin, Naproxen, Piroxicam und Salicylsäure im menschlichen Plasma.

In Kenntnis und in Anlehnung an publizierte Methoden zur hochdruckflüssigkeitschromatographischen Bestimmung von mehreren NSAR (Moore und Tebbett 1987, Nielsen-Kudsk 1980) bzw. der einzelnen Substanzen Diclofenac (Chan et al. 1982, Derendorf et al. 1986), Indometacin (Bechgaard et al. 1982, Cooper et al. 1982, Schöllnhammer et al. 1986), Naproxen (Goto et al. 1982, Shimek et al. 1982, McVerry et al. 1986), Piroxicam (Edwards et al. 1985, Richardson et al. 1985, Tsai et al. 1985) und Salicylsäure (Bakar und Niazi 1983, Cham et al. 1979, Chubb et al. 1986) wurde eine Methode entwickelt, um mehrere NSAR mit einer Säulen-Laufmittelkonfiguration (bei verschiedenen Detektionswellenlängen) im menschlichen Plasma bzw. Serum zu analysieren. Gleichzeitig sollte die Probenaufbereitung möglichst einheitlich sein.

Methode (Einzelheiten bei den jeweiligen Substanzen):

Die Plasma- bzw. Serumproben (-20 °C) wurden unter fließendem Wasser aufgetaut und 10 sec gerüttelt, danach wurden 500 µl Aliquots mit interner Standardlösung 3 min geschüttelt. Nach Zugabe von 500 µl 1 mol KH_2PO_4 l^{-1} (pH 6,8) wurde 3 min geschüttelt und 1 min bei 8.800 x g

zentrifugiert. Die Überstände wurden quantitativ einer Festphasenextraktion (1 ml C_{18} Bond-Elut[®]-Säulen auf Baker-10 Extraktionssystem) unterworfen: Die Säule wurde mit 2 x 1 ml Methanol, gefolgt von 1 x 1 ml Wasser und 1 x 1 ml 0,01 mol HCl l^{-1} konditioniert. Nach Aufgabe des Proben-Puffer-Gemisches wurde 2 x mit 1 ml Wasser gespült und die Säulen anschließend trocken gesaugt. Mit 4 x 200 μ l alkalischer Acetonitrillösung (500 μ l 25 %ige Ammoniaklösung in 50 ml Acetonitril, pH 11) wurden die NSAR von der Säule eluiert und die vereinigten Eluate in Glasröhrchen bei 60 °C unter leichtem Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Nach Zugabe von 100 μ l Laufmittel wurden 20 μ l mittels automatischem Probengeber oder Spritzentechnik injiziert.

Allgemeine HPLC-Bedingungen:

Säule: Nucleosil[®] 120-5 C_8 (250 x 4 mm I.D.)

Vorsäule: Bischoff 2 cm gefüllt mit LiChrosorb[®] RP-8 7 μ m

Laufmittel: Kaliumdihydrogenphosphat (50 mmol l^{-1}) :

Acetonitril (50 : 50, v/v, pH 5,4)

Fluß: 1,3 ml min^{-1}

Detektion: im jeweiligen UV-Maximum (bestimmt durch Messung der UV-Absorption von je 10 μ g NSAR ml Laufmittel $^{-1}$ gegen Laufmittel zwischen 200 und 380 nm)

Druck: 1200 PSI (8,3 MPa)

Einzelne NSAR:

a) Diclofenac

1 ml Plasma (Leerplasma bzw. Leerplasma versetzt mit 20, 50, 100, 500, 1000 und 3000 ng Diclofenac ml Plasma⁻¹) wurden mit 5 µg CGP 4287 (interner Standard, Abb. 6) 10 µl Methanol⁻¹ 2 min geschüttelt und anschließend wie oben beschrieben extrahiert.

HPLC-Bedingungen:

Fluß: 1,5 ml min⁻¹

Detektion: 276 nm (bei Konzentrationen <50 ng

Diclofenac ml⁻¹ zusätzlich bei 220 nm)

Empfindlichkeit: 0,01 - 0,02 AUFS

Druck: 1800 PSI (12,4 MPa)

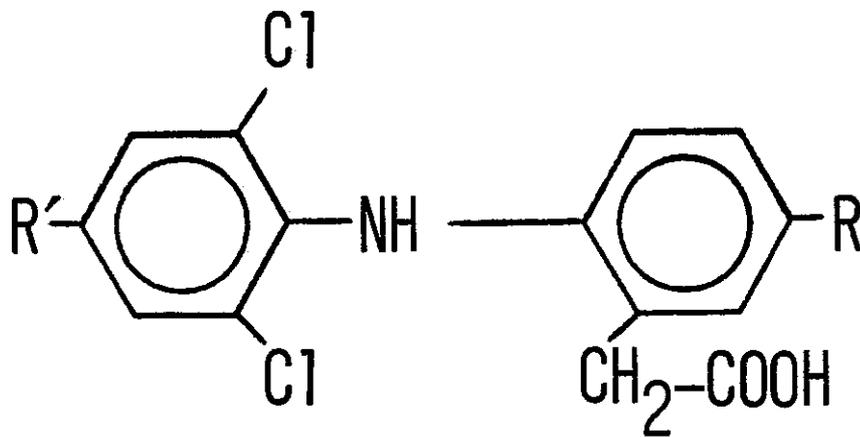


Abb. 6. Strukturformeln von Diclofenac, seinen Hauptmetaboliten und des internen Standards CGP 4287
 R, R' = H: Diclofenac; R = OH: 5-Hydroxydiclofenac;
 R' = OH: 4'-Hydroxydiclofenac; R' = OCH₃: CGP 4287

b) Indometacin

500 μl Plasma (Leerplasma bzw. 20, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 und 5000 ng Indometacin ml Plasma⁻¹) wurden mit 10 μg Ketoprofen 10 μl Methanol⁻¹ 2 min geschüttelt und anschließend wie oben beschrieben extrahiert.

HPLC-Bedingungen:

Fluß: 1,5 ml min⁻¹

Detektion: 260 nm

Empfindlichkeit: 0,01 - 0,05 AUFS

Druck: 1800 PSI (12,4 MPa)

c) Naproxen

200 μl Plasma (Leerplasma bzw. 20, 40, 60 μg Naproxen und 0,5, 1,0 und 1,5 μg 6-O-Desmethylnaproxen ml Plasma⁻¹) wurden mit 10 μg Flufenaminsäure 500 μl kaltem Acetonitril⁻¹ gemischt und nach 5 min Schütteln 2 min bei 8.800 x g zentrifugiert. 250 μl klarer Überstand wurden abgenommen und je 20 μl injiziert.

HPLC-Bedingungen:

Fluß: 1,5 ml min⁻¹

Detektion 230 nm

Empfindlichkeit: 0,02 - 0,05 AUFS

Druck: 1800 PSI (12,4 MPa)

d) Piroxicam

500 µl Plasma (Leerplasma bzw. 50, 100, 500, 1000, 3000 und 5000 ng Piroxicam ml Plasma⁻¹) wurden mit 5 µg Isoxicam 10 µl Methanol⁻¹ 2 min geschüttelt und wie oben beschrieben extrahiert.

HPLC-Bedingungen:

Detektion: 365 nm

Empfindlichkeit: 0,02 - 0,05 AUFS

e) Salicylsäure

100 µl Plasma (Leerplasma bzw. 10, 20, 50 und 100 µg Salicylsäure ml Plasma⁻¹) wurden mit 10 µg 2-Methoxybenzoesäure 10 µl Methanol⁻¹ 3 min geschüttelt und mit 200 µl kaltem Acetonitril versetzt. Nach 3 min schütteln wurde 2 min bei 8.800 x g zentrifugiert und 20 µl des klaren Überstandes direkt injiziert.

HPLC-Bedingungen:

Detektion: 300 nm

Empfindlichkeit: 0,02 - 0,05 AUFS

3.2.7. Einfluß von Ranitidin auf die Einzeldosis-Kinetik und minimale steady state-Plasmakonzentrationen von Indometacin bei freiwilligen Probanden.

Im Krankenhaus Bethanien, Hamburg (Leitung: Prof. Dr. med. H.G. Dammann), wurde eine endoskopisch kontrollierte, randomisierte cross over-Studie durchgeführt, in der die präventiven Eigenschaften von Ranitidin und des Prostaglandinderivates Misoprostol auf die Schädigung der Schleimhaut des oberen Gastrointestinaltraktes durch Indometacin vergleichend geprüft wurde.

Diese Studie bot Gelegenheit, im begrenzten Umfang Plasmaproben für die Bestimmung der Indometacin-konzentration zu erhalten. Eine weitere Ausdehnung des Versuchsprotokolls im Hinblick auf eine detaillierte Untersuchung der Pharmakokinetik war nicht möglich.

9 freiwillige Probanden (Tab. 1) erhielten nach schriftlicher Einverständniserklärung und einer eingehenden klinischen Untersuchung von Tag 0 (nur abends) bis Tag 6 zweimal täglich (8.00 und 19.00 Uhr) entweder 150 mg Ranitidin (Zantic^R Filmlipetten), 400 µg Misoprostol (Cytotec^R Tabletten) oder Placebo (G.D. Searle GmbH, Dreieich) p.o. (Tab. 1a). Am Tag 1 (9.00 Uhr) erhielten die Probanden 100 mg Indometacin p.o. (2 Kapseln

Indomet-ratiopharm[®] 50 auf nüchternen Magen zusammen mit 100 ml Wasser von 20 °C). Vor und 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 7 und 10 h nach der Einnahme wurden jeweils 10 ml peripheres Venenblut entnommen, unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert und das so gewonnene Plasma sofort bei -20 °C bis zur Aufarbeitung (s. 3.2.6.5. b) eingefroren. Am Tag 1 (20.00 Uhr) erhielten die Probanden 50 mg Indometacin p.o. und vom Tag 2 bis Tag 6 jeweils morgens (9.00 Uhr) und abends (20.00 Uhr) je 75 mg Indometacin p.o. (1 Kapsel Indomet-ratiopharm[®] 25 + 1 Kapsel Indomet-ratiopharm[®] 50). Vom Tag 2 bis Tag 7 (Schema 1) wurden jeweils morgens 1 h vor der ersten Indometacindosis Blut abgenommen und das gewonnene Plasma, wie oben beschrieben, bis zur Aufarbeitung eingefroren.

In dieser Arbeit (s. 4.3.4.) wird nur auf den Einfluß von Ranitidin auf die Pharmakokinetik von Indometacin eingegangen und nicht auf die Effekte von Misoprostol, da dieses im Hinblick auf metabolische Interaktionen unverdächtig ist und als Prostaglandinderivat aufgrund seiner Wirkung auf die Magen-Darm-Motilität zu unüberschaubaren Verhältnissen bei der Absorption führen kann.

Tabelle 1. Probandendaten

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Geschlecht	m.	m.	w.	m.	m.	w.	m.	m.	w.
Alter (Jahre)	33	34	30	29	25	24	29	28	33
Körper- größe (cm)	1,70	1,67	1,70	1,65	1,73	1,84	1,80	1,78	1,62
Gewicht (kg)	62	69	53	72	63	78	78	74	61

w. = weiblich; m. = männlich

Die Berechnung der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) von 0-7 bzw. 0-10 h erfolgte nach der Trapezregel. Maximale Plasmakonzentrationen (C_{max}) wurden aus den Individualkurven (log C gegen die Zeit) entnommen und danach die Zeit bis zum Erreichen von C_{max} (t_{max}) bestimmt.

Steady state-Bedingungen wurden nach 2 Tagen als erreicht angenommen.

Für jeden Probanden wurden AUC, C_{max} , t_{max} und C_{min} im steady state ($C_{ss, min}$) individuell bestimmt.

Der statistische Vergleich der Stichproben wurde mit dem Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon (Irrtumswahrscheinlichkeit 5%) durchgeführt (Sachs 1978, Wissenschaftliche Tabellen Geigy 1980).

Tabelle 1a. Randomisierungsschema für 9 Probanden

(Pla = Placebo, Ran = Ranitidin, Miso = Misoprostol)

Proband	1. (Phase)	2.	3.
1	Pla	Miso	Ran
2	Miso	Pla	Ran
3	Ran	Pla	Miso
4	Pla	Ran	Miso
5	Ran	Miso	Pla
6	Miso	Ran	Pla
7	Miso	Ran	Pla
8	Pla	Miso	Ran
9	Ran	Pla	Miso

Zwischen den einzelnen Abschnitten der Studie (1.-3.)

wurden jeweils 2 Wochen Pause eingelegt ("Auswaschphase").

Schema 1. Versuchsprotokoll für die Studie "Einfluß von Ranitidin auf die Pharmakokinetik und minimale steady state-Plasmakonzentrationen von Indometacin bei Probanden."

Tag 0: zur Nacht 150 mg Ranitidin oder Placebo,
anschließend nüchtern.

Tag 1: 8.00 Uhr 150 mg Ranitidin oder Placebo
8.50 Uhr Blutentnahme (Leerwert)
9.00 Uhr 100 mg Indometacin
9.30, 10.00, 10.30, 11.00, 12.00, 16.00, und
19.00 Uhr Blutentnahmen
19.05 Uhr 150 mg Ranitidin oder Placebo
20.05 Uhr 50 mg Indometacin

Tag 2 -

Tag 6: 7.55 Uhr Blutentnahmen
8.00 Uhr 150 mg Ranitidin oder Placebo
9.00 Uhr 75 mg Indometacin
19.05 Uhr 150 mg Ranitidin oder Placebo
20.05 Uhr 75 mg Indometacin

Tag 7: 8.00 Uhr Blutentnahmen

4. Ergebnisse

4.1. Interaktionen von Cimetidin und Etintidin mit dem Cytochrom P-450-System der Rattenleber.

Für die Beurteilung von möglichen Interaktionen infolge Konkurrenz um arzneimittelmetabolisierende Enzyme der Leber (vor allem Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen) mit konsekutiven Veränderungen der hepatischen Clearance boten sich in vitro-Untersuchungen mit Lebermikrosomen an. In diesen Untersuchungen wurde als Maß für die Affinität zum Cytochrom P-450 die Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstante(n) herangezogen. Außerdem wurden Enzymkinetiken mit und ohne fragliche Inhibitoren aufgenommen.

4.1.1. Optische Differenzspektren

Abbildung 7 zeigt beispielhaft die optischen Differenzspektren von Rattenlebermikrosomen nach Zugabe steigender Konzentrationen an Etintidin. Die vorliegenden Spektren bestätigen die Ergebnisse anderer Autoren mit Cimetidin (Bell et al. 1981, Reilly et al. 1983, Rendić et al. 1979), daß die Interaktion der Imidazol-haltigen H_2 -Rezeptor-antagonisten durch ein Typ II-Bindungsspektrum (Schenkman et al. 1967) charakterisiert ist: Maximum bei 428 nm, Minimum bei 392 nm und isosbestischer Punkt bei 416 nm.

Um eventuell unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Cytochromen P-450 erkennen zu können (Jones et al. 1974), wurden die Tiere mit den Enzyminduktoren Phenobarbital, 5,6-Benzoflavon (β -Naphthoflavon) und polychlorierte Biphenyle (Aroclor 1254) vorbehandelt. Während Phenobarbital und 5,6-Benzoflavon unterschiedliche Isoenzyme induzieren (Phenobarbital-Typ induzierbares Cytochrom P-450 (P-450_b) bzw. 3-Methylcholanthren-Typ induzierbares Cytochrom P-450 (P-450_c, P-448, P₁-450)), gilt Aroclor 1254 als Induktor mehrerer Cytochrome P-450 (Conney 1986).

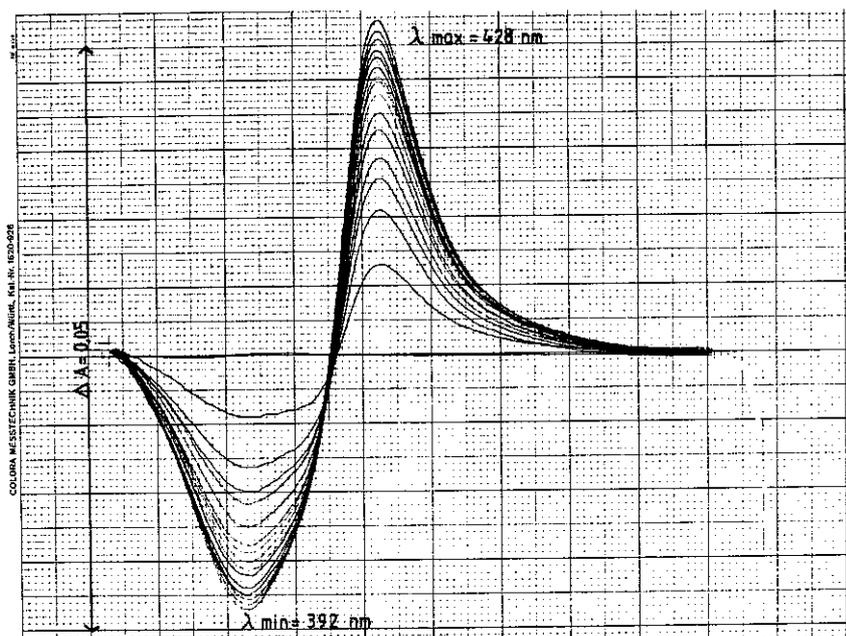


Abb. 7. Lebermikrosomen-Differenzspektren von Aroclor 1254-vorbehandelten Ratten nach Zugabe steigender Konzentrationen von Etintidin ($0,032 - 2,4 \text{ mmol l}^{-1}$). Proteinkonzentration: $0,55 \text{ mg ml}^{-1}$, $1,4 \text{ nmol Cytochrom P-450 mg mikrosomales Protein}^{-1}$.

Bei der doppelt-reziproken Auftragung (ΔA^{-1} vs. Substratkonzentration $^{-1}$) wurden keine Geraden sondern zum Ursprung abwärts gebogene ("curvilineare") Kurven erhalten.

Demzufolge genügten die spektralen Veränderungen, in Abhängigkeit der Substratkonzentration, keiner einfachen Hyperbel sondern einer aus mindestens 2 Hyperbeln zusammengesetzten Funktion. Dies ließ darauf schließen, daß Cimetidin und Etintidin an mindestens 2 verschiedene Cytochrome P-450 gebunden werden, für die stark unterschiedliche spektrale Dissoziationskonstanten bestehen.

Tabelle 2 zeigt die für Etintidin und Cimetidin berechneten spektralen Dissoziationskonstanten K_{s1} und K_{s2} . Diese repräsentieren je eine hohe und eine niedrig affine Bindungsstelle, d.h. verschiedene Formen von Cytochromen P-450 (Abb. 8).

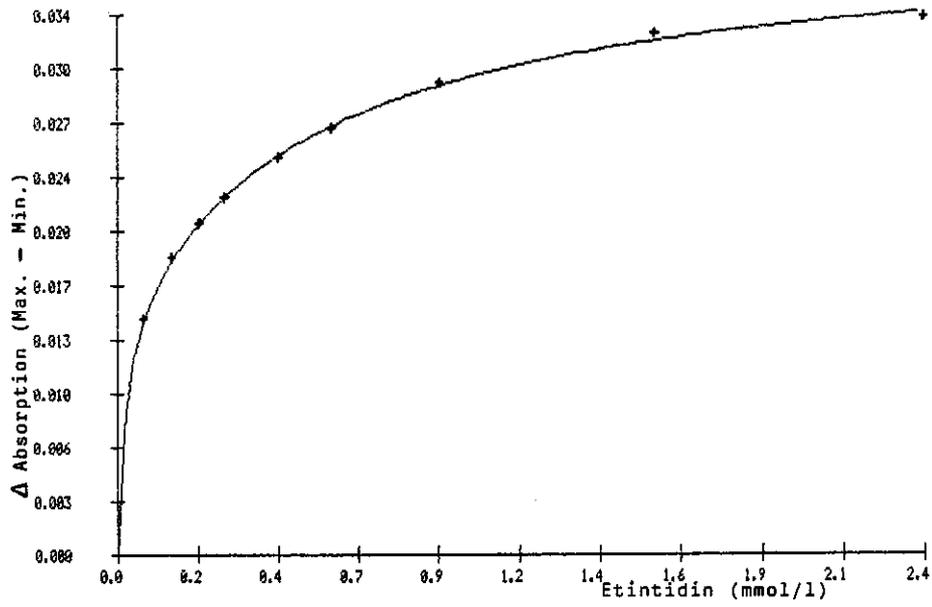


Abb. 8. Computergestützte Berechnung der spektralen Dissoziationskonstanten (K_s) für Etintidin in Rattenlebermikrosomen von Kontrolltieren

Eine Ausnahme dabei wiesen die Etintidinbindungsspektren mit Lebermikrosomen Phenobarbital-vorbehandelter Ratten auf. Es wurde nur ein K_s -Wert von $0,122 \pm 0,063 \text{ mmol l}^{-1}$ erhalten.

Die berechneten K_s -Werte von Etintidin für die K_{s1} von im Mittel $0,014 - 0,037$ bzw. K_{s2} von im Mittel $0,275 - 0,340 \text{ mmol l}^{-1}$ lagen für Kontrolltiere und für Tiere nach Aroclor 1254- oder 5,6-Benzoflavon-Vorbehandlung im gleichen Bereich. Auch für die erhaltenen Werte für Cimetidin ergaben sich keine Unterschiede durch Vorbehandlung der Tiere mit diesen verschiedenen Enzyminduktoren. Die K_s -Werte des Cimetidins lagen aber, im Vergleich zum Etintidin, sehr viel höher.

Tabelle 2. Spektrale Dissoziationskonstanten (K_s) für Etintidin und Cimetidin in Lebermikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten

a) Etintidin

Vorbehandlung	Cytochrom P-450 (nmol mg Prot. ⁻¹)	K_{s1} (mmol l ⁻¹)	K_{s2}
-----	0,43 ± 0,18	0,015 ± 0,006	0,340 ± 0,056
Phenobarbital	1,40 ± 0,45	-----	0,122 ± 0,063
Aroclor 1254	1,14 ± 0,30	0,037 ± 0,013	0,284 ± 0,131
BNF	1,21 ± 0,48	0,014 ± 0,007	0,275 ± 0,065

b) Cimetidin

-----	s. a)	0,098 ± 0,032	1,199 ± 0,080
Phenobarbital		0,139 ± 0,019	1,369 ± 0,112
Aroclor 1254		0,119 ± 0,033	1,079 ± 0,232
BNF		0,067 ± 0,006	1,164 ± 0,299

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung von mindestens 3 Messungen mit Lebermikrosomen verschiedener Ratten.

Etintidinkonzentration: 0,03 - 2,4 mmol l⁻¹,

Cimetidinkonzentration: 0,10 - 4,0 mmol l⁻¹,

BNF = 5,6 Benzoflavon.

4.1.2. Inhibierung Cytochrom P-450-abhängiger Oxidationsreaktionen.

Als Substrate für verschiedene Cytochrome P-450 wurden Benzphetamin, Ethoxyresorufin, Benzo(a)pyren und Benz(a)anthracen gewählt. Während Benzphetamin als Modells substrat für Phenobarbital-induzierbare (Werringloer 1978) und Ethoxyresorufin als Modells substrat für 3-Methylcholanthren- (5,6-Benzoflavon-) induzierbare Cytochrome P-450 (Burke und Mayer 1974, Prough et al. 1978) gelten, werden die polyaromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons) Benzo(a)pyren und Benz(a)anthracen von beiden Cytochromen P-450 oxidiert (Wiebel 1980).

4.1.2.1. Benzphetamin-N-Demethylierung

Etintidin (1 mmol l^{-1}) und Cimetidin ($1,2 \text{ mmol l}^{-1}$) hemmten die N-Demethylierung von Benzphetamin ($1000 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) um ca. 60 %. Nach Phenobarbitalvorbehandlung hemmten Etintidin und Cimetidin diese N-Demethylierung (Substratkonzentration: $500 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) nur um ca. 25-30 % (Tab. 3). Abbildung 9 zeigt die Lineweaver-Burk-Darstellungen für die N-Demethylierung von Benzphetamin mit und ohne Etintidin (1 mmol l^{-1}). Der Inhibitionstyp ist kompetitiv und die Inhibitorkonstante K_i wurde mit ca. $4,0 \text{ mmol l}^{-1}$ bestimmt.

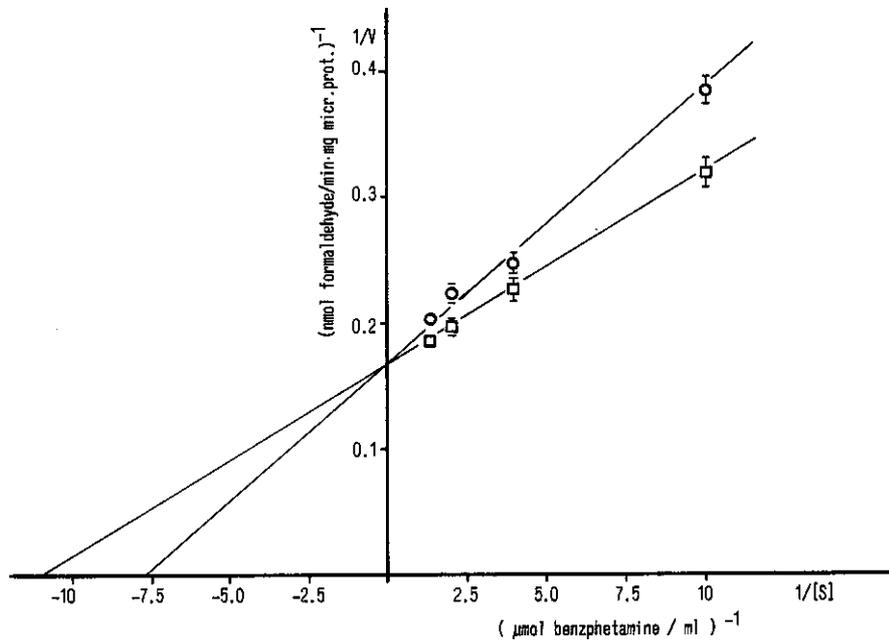


Abb. 9. Lineweaver-Burk-Darstellungen für die Hemmung der N-Demethylierung von Benzphetamin.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$) mit (O) und ohne (□) $1,0 \text{ mmol Etintidin l}^{-1}$.

Lebermikrosomen von Phenobarbital vorbehandelten Ratten.

Substratkonzentration: $0,1 - 0,75 \text{ mmol l}^{-1}$

4.1.2.2. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

Die O-Deethylierung von Ethoxyresorufin gilt als Modellreaktion für eine Cytochrom P-448-abhängige Enzymreaktion in Rattenlebermikrosomen und ist bei unvorbehandelten Ratten praktisch nicht meßbar ($<0,02 \text{ nmol Resorufin min}^{-1} \text{ mg mikrosomales Protein}^{-1}$).

Im Gegensatz zu Cimetidin ($0,4 \text{ mmol l}^{-1}$) hemmte Etintidin ($0,32 \text{ mmol l}^{-1}$) die O-Deethylierung von Ethoxyresorufin durch Lebermikrosomen 5,6-Benzoflavon-vorbehandelter Ratten um ca. 50 % (Tab. 3).

Abbildung 10 zeigt die Lineweaver-Burk-Darstellungen für die O-Deethylierung von Ethoxyresorufin mit und ohne Etintidin ($0,24 \text{ mmol l}^{-1}$). Der Inhibitionstyp ist als kompetitiv zu interpretieren. Die Inhibitorkonstante K_i betrug ca. $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß das sogenannte klassische Cytochrom P-448 in Rattenlebermikrosomen eine Affinität für Etintidin aber nicht für Cimetidin besitzt.

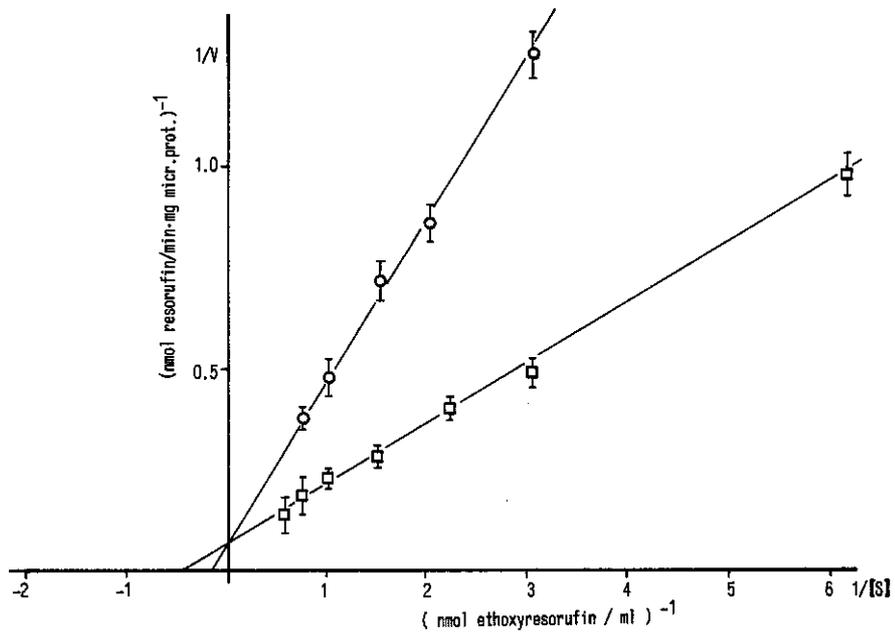


Abb. 10. Lineweaver-Burk-Darstellungen für die Inhibierung der O-Deethylierung von Ethoxyresorufin.

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$) mit (○) und ohne (□) $0,24 \text{ mmol Etintidin l}^{-1}$. Lebermikrosomen von 5,6-Benzoflavin-vorbehandelter Ratten. Substratkonzentration: $0,16 - 1,6 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$

Tabelle 3. Einfluß von Etintidin und Cimetidin auf
Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasereaktionen durch
Lebermikrosomen verschieden vorbehandelter Ratten

Mikrosomen	Substrat ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Inhibitor (mmol l^{-1})	gebildete Metaboliten (nmol min^{-1} mg Prot.^{-1})	Inhibition (% \pm s)
Kontrolle	BP (1000)	---	$0,38 \pm 0,03$	---
Kontrolle	BP (1000)	Etin. (1,0)	$0,14 \pm 0,01$	62 ± 2
Kontrolle	BP (1000)	Cim. (1,2)	$0,14 \pm 0,01$	62 ± 2
PB	BP (1000)	---	$1,10 \pm 0,08$	---
PB	BP (500)	---	$0,73 \pm 0,06$	---
PB	BP (500)	Etin. (1,0)	$0,54 \pm 0,02$	26 ± 4
PB	BP (500)	Cim. (1,2)	$0,52 \pm 0,08$	29 ± 3
Kontrolle	ETOR (3,1)	---	$< 0,02$	---
BNF	ETOR (3,1)	---	$11,6 \pm 4,3$	---
BNF	ETOR (3,1)	Etin. (0,32)	$5,3 \pm 1,4$	54 ± 5
BNF	ETOR (3,1)	Cim. (0,40)	$11,6 \pm 4,4$	---

Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 3 Messungen
mit Mikrosomen von verschiedenen Ratten.

Die Werte für % Inhibition beziehen sich auf die
individuellen Kontrollen.

BNF = 5,6-Benzoflavon; BP = Benzphetamin;

Cim. = Cimetidin; Etin. = Etintidin;

ETOR = Ethoxyresorufin

4.1.2.3. Benzo(a)pyren-Oxidation

Nach Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital hemmten Etintidin ($1,0 \text{ mmol l}^{-1}$) und Cimetidin ($1,2 \text{ mmol l}^{-1}$) die Benzo(a)pyren-Oxidation (Substratkonzentration: $20 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) um ca. 70 %. Bei einer Verdopplung der Substratkonzentration auf $40 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ wurde diese Oxidation durch Cimetidin ($1,2 \text{ mmol l}^{-1}$) nur um ca. 17 % gehemmt (Tab. 4). Dies deutete auf eine kompetitive Inhibition der Benzo(a)pyren-Oxidation durch Cimetidin hin.

Im Gegensatz hierzu konnte nach Vorbehandlung der Tiere mit 5,6-Benzoflavon keine Hemmung der Benzo(a)pyren - Oxidation durch 1 mmol Etintidin oder $1,2 \text{ mmol Cimetidin l}^{-1}$ gemessen werden (Tab. 4).

Erstaunlich ist, daß Cimetidin und Etintidin zwar die Benzo(a)pyren-Oxidation nach Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital aber nicht nach Vorbehandlung mit 5,6-Benzoflavon hemmten. Hieraus läßt sich die Hypothese ableiten, daß die durch Cytochrom P-450_b (Phenobarbital-Typ) katalysierte Benzo(a)pyren-Oxidation sich von der durch Cytochrom P-450_c (Cytochrom P-448, 3-Methylcholanthren-Typ) katalysierten unterscheidet.

Da die Benzo(a)pyren-Oxidation lediglich ein numerischer Meßparameter für die Oxidation von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen darstellt, an der mehrere

Cytochrome P-450 beteiligt sind, sollte anhand der differenzierten Analyse der Benz(a)anthracen-Oxidationsprodukte Hinweise auf eine Inhibition spezifischer Cytochrome P-450 gewonnen werden.

Anhand des gut untersuchten Benz(a)anthracen-Metabolismus (Jacob et al. 1981a) sollte deshalb der Frage nachgegangen werden, ob der hier gefundene "Cytochrom P-448-Inhibitor" Etintidin (vgl. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung, 4.1.2.2.) in der Lage ist, die Benz(a)anthracen-Oxidation regioselektiv zu hemmen (s. 4.1.2.4).

Tabelle 4. Einfluß von Etintidin und Cimetidin auf die Benzo(a)pyren-Oxidation durch Lebermikrosomen verschieden vorbehandelter Ratten

Mikrosomen	Substrat- konz. ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Inhibitor (mmol l^{-1})	gebildete Metabolite*	Inhibition (% \pm s)
Kontrolle	(20)	---	5,6 \pm 1,5	---
BNF	(20)	---	13,2 \pm 4,2	---
BNF	(20)	Etin. (1,0)	12,6 \pm 4,0	---
BNF	(20)	Cim. (1,2)	13,4 \pm 4,1	---
PB	(20)	---	10,0 \pm 0,6	---
PB	(20)	Etin. (1,0)	2,7 \pm 0,5	72 \pm 7
PB	(20)	Cim. (1,2)	3,1 \pm 0,3	69 \pm 3
PB	(40)	---	9,0 \pm 0,3	---
PB	(40)	Etin. (1,0)	3,3 \pm 0,2	65 \pm 1
PB	(40)	Cim. (1,2)	7,5 \pm 0,1	17 \pm 3

Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 3 Messungen mit Mikrosomen verschiedener Ratten.

Die Werte für % Inhibition beziehen sich auf die individuellen Kontrollen.

* = ΔF ex. 466 nm; em. 522 nm $5 \text{ min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$

BNF = 5,6-Benzoflavon; Cim. = Cimetidin; Etin. = Etintidin;

PB = Phenobarbital

4.1.2.4. Einfluß von Etintidin auf den Benz(a)anthracen-Metabolismus in Lebermikrosomen 5,6-Benzoflavon-vorbehandelter Ratten.

Zur differenzierten Untersuchung des Hemmeffektes der Oxidation polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAH) durch Etintidin wurde der Metabolismus von Benz(a)anthracen (Abb. 11) untersucht.

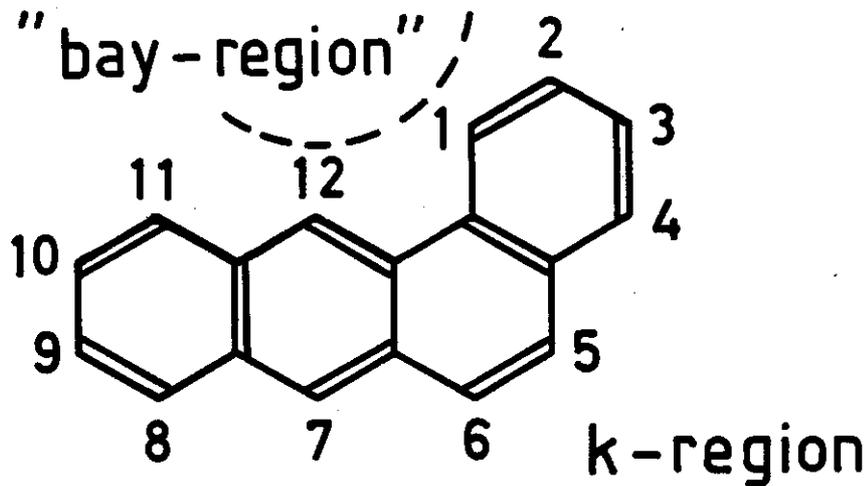


Abb. 11. Strukturformel von Benz(a)anthracen

Tabelle 5 zeigt die Metabolitenprofile von Benz(a)anthracen nach Inkubation mit Rattenlebermikrosomen 5,6-Benzoflavon-vorbehandelter Tiere in Ab- und Anwesenheit von 0,24 bzw. 0,48 mmol Etintidin l⁻¹.

Tabelle 5. Einfluß von Etintidin auf das Metabolitenprofil von Benz(a)anthracen nach Inkubation mit Lebermikrosomen 5,6-Benzoflavon-vorbehandelter Ratten

RRT	Metabolit	ohne	mit 0,24 Etintidin l ⁻¹ (nmol Metabolit 20 min ⁻¹)	mit 0,48 mmol mg Protein ⁻¹
1,096	5,6-Diol	2,9	3,9	3,9
1,246	K-Tetrol	0,1	0,2	a)
1,291	non-K-Triol (non-viz.)	1,4	0,3	0,9
1,312	non-K-Triol (non-viz.)	0,5	0,3	0,3
1,320	K-Triol	0,8	1,6	2,0
1,327	10,11-Diol	0,6	0,3	0,3
1,333	2,3,4-Triol	0,1	a)	0,4
1,367	8,9-Diol	6,1	5,8	4,4
1,389	non-K-Triol (all-viz.)	0,2	0,1	a)
1,477	non-K-Triol (all-viz.)	0,3	2,3	2,0
1,510	non-K-Triol (non-viz.)	1,3	0,6	0,4
Summe der identifizierten Metaboliten		14,3	15,4	14,6
unbekannte Metaboliten		0,4	0,5	0,8

Mittelwerte von 3 separaten Experimenten mit Mikrosomen von 3 Ratten (0,92 nmol Cytochrom P-450 mg mikrosomales Protein⁻¹), Substratkonzentration: 45 µmol l⁻¹, Inkubationszeit: 20 min

a) = kleiner als 2 pmol (Nachweisgrenze)

RRT = relative Retentionszeit (Benz(a)anthracen = 1,0)

viz. = vizinal

Gemessen an dem Gesamtumsatz hatte das Etintidin nur einen minimalen Effekt. Die Hemmungen betrafen die 8,9- und 10,11-Oxidation sowie die durch sekundäre Oxidation entstehenden non-K-Triole (Dihydrodiol-enoile) mit den relativen Retentionszeiten 1,291, 1,312 und 1,510.

Ob die durch Etintidin inhibierten Oxidationen alle durch Hemmung eines oder mehrerer Cytochrom P-450-Formen verursacht wurden, muß offen bleiben.

Scheinbar paradox bewirkte Etintidin auch eine Aktivierung des Benz(a)anthracen-Metabolismus. So stieg die primäre 5,6-(K-Region) Oxidation um 50 % (von 3,8 auf 5,9 nmol Metabolite $20 \text{ min}^{-1} \text{ mg mikrosomales Protein}^{-1}$ in Anwesenheit von $0,48 \text{ mmol Etintidin l}^{-1}$). (Die primäre Oxidation berechnet sich als Summe aus 5,6-Diol und den K-Region-Triolen und -Tetrolen). Weiterhin wurde eine 7-fache Zunahme eines non-K-Triols (mit 3 vizinalen OH-Gruppen, RRT = 1,477) gefunden.

4.2. Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch Ratten- und Menschenlebermikrosomen.

Ausgehend von der relativ hohen Affinität der beiden H_2 -Rezeptorantagonisten Cimetidin und Etintidin zum Cytochrom P-450-System der Rattenleber (s. 4.1.) stellte sich die Frage, ob die Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen der Leber diese beiden Substanzen metabolisieren. Hier ist am ehesten an eine Sulfoxidationsreaktion zu denken (Taylor et al. 1978). Die Ergebnisse der in vitro-Inkubationen werden im folgenden dargestellt.

4.2.1. Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch Rattenlebermikrosomen.

Zur Detektion der möglicherweise oxidativ gebildeten Sulfoxide und Sulfone wurden empfindliche analytische Methoden benötigt. Die Abbildung 12 zeigt die hochdruckflüssigkeitschromatographische Auftrennung von Cimetidinsulfoxid, Etintidinsulfoxid, Cimetidin und Etintidin auf einer Nucleosil[®] 120-5 C₈-Säule (A; kugelförmiges reversed phase Kieselgel, durchschnittlicher Porendurchmesser 12 nm, Korngröße $5 \pm 1,5 \mu\text{m}$ (Herstellerangaben)) bzw. auf einer LiChrosorb[®] RP-8-Säule (B; unregelmäßige, gebrochene Teilchen, reversed phase Kieselgel, mittlere Korngröße $5 \mu\text{m}$ (Herstellerangaben)).

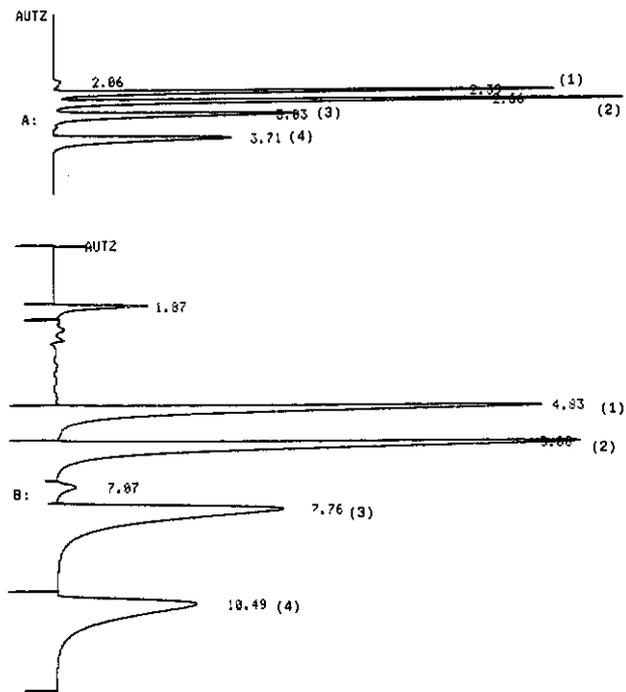


Abb. 12. HPLC-Auftrennung von je 100 ng 20 μl^{-1} (A) bzw. 1000 ng 100 μl Laufmittel $^{-1}$ (B) Cimetidinsulfoxid (1), Etintidinsulfoxid (2), Cimetidin (3) und Etintidin (4).

A = Nucleosil^R 120-5 C₈-Säule (0,05 AUFS)

B = Bischoff HPLC-Säule gefüllt mit LiChrosorb^R RP-8 5 μm (0,05 AUFS), je 1,5 ml Laufmittel H₃PO₄ (0,085 %):CH₃CN (80:20, v/v, pH 2,3) min $^{-1}$, 220 nm

Abbildung 13 zeigt die HPLC-Analyse nach Inkubation von Cimetidin mit Menschenlebermikrosomen.

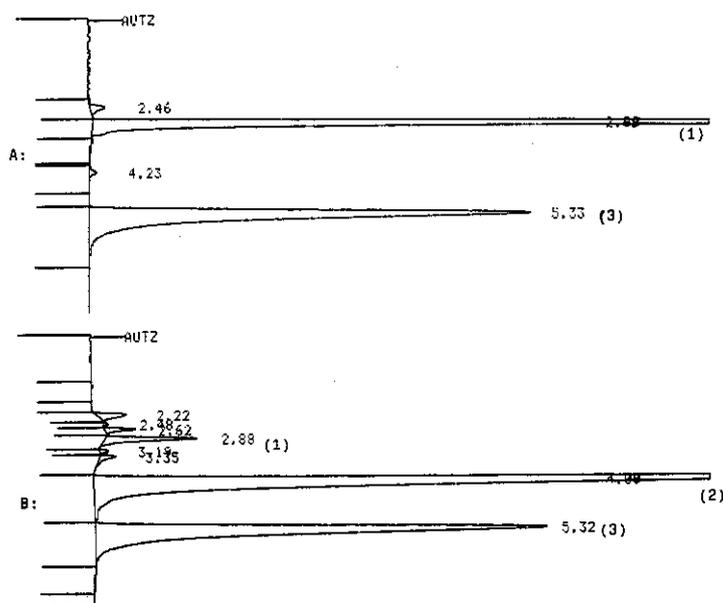


Abb. 13. HPLC-Auftrennung von Cimetidinsulfoxid, Cimetidin und Etintidin.

A = je 1 μg Cimetidinsulfoxid (1) und Etintidin (3)

20 μl Laufmittel $^{-1}$;

B = 2,1 μg Cimetidinsulfoxid (1) ml Menschenlebermikrosomen $^{-1}$ (0,39 nmol gebildetes Cimetidinsulfoxid min^{-1} mg mikrosomales Protein $^{-1}$ aus einer Inkubation von Cimetidin (400 nmol l^{-1} , (2)), 3 = Etintidin.

Bedingungen: 1,3 ml Laufmittel H_3PO_4 (0,085 %): CH_3CN

(80:20, v/v, pH 2,3) min^{-1} , 0,05 AUFS, 2000 PSI

(13,8 MPa), Nucleosil^R 120-5 C_8 -Säule, 220 nm

Tabelle 6. Effekte einer Phenobarbital- oder 5,6-Benzoflavon-Vorbehandlung auf die Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch Rattenlebermikrosomen

Mikrosomen	Cimetidinsulfoxid	Etintidinsulfoxid
	(nmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)	
Kontrolle	1,06 ± 0,10	0,91 ± 0,10
Phenobarbital	1,20 ± 0,08	1,09 ± 0,10
5,6-Benzoflavon	1,30 ± 0,12	-----

Mittelwerte ± Standardabweichung von Einzelversuchen mit Mikrosomen von mindestens 3 Ratten.

Cytochrom P-450-Gehalt : Kontrolle 0,36 ± 0,05,

Phenobarbital 0,86 ± 0,10 und 5,6-Benzoflavon 0,76 ± 0,12 nmol Cytochrom P-450 mg mikrosomales Protein⁻¹.

Substratkonzentration: 200 µmol Cimetidin und 320 µmol Etintidin l⁻¹.

Es stellte sich nun die Frage, ob diese Sulfoxidation überhaupt eine Cytochrom P-450-abhängige Reaktion ist, wenn die bekannten Cytochrom P-450-Induktoren keinen Einfluß auf die Umsatzraten besaßen.

Cytochrom P-450-abhängige Reaktionen benötigen NADPH als Cosubstrat und in der Regel ein NADPH-regenerierendes System, das hier aus dem Enzym Isocitratdehydrogenase und dem Substrat Isocitrat bestand, um im Verlauf der Reaktion verbrauchtes NADPH wieder zur Verfügung zu stellen.

Weiterhin gilt Kohlenmonoxid, das hier zur Verhinderung einer kompletten Hemmung der Reaktion im Verhältnis 3+2 mit Luft gemischt wurde, als potenter Inhibitor aller Cytochrome P-450 (Kreft und Breyer-Pfaff 1979).

Tabelle 7 zeigt, daß eine nichtenzymatische Oxidation der Thioether während der Inkubation nicht stattfand, daß diese Reaktion NADPH benötigte und daß Kohlenmonoxid in der Lage war, diese Reaktion zu hemmen. In Anwesenheit des Cytochrom P-450-Hemmstoffs n-Octylamin (3 mmol l^{-1}) wurde die Sulfoxidation von Cimetidin um ca. 39 % und die Sulfoxidation von Etintidin um etwa 51 % gehemmt.

Diese Variationen der Versuchsbedingungen belegen, daß Cytochrom(e) P-450 an der Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin beteiligt sind.

Dabei ist aber daran zu denken, daß diese Sulfoxidation auch durch Bildung endogener Peroxide (Lipidperoxidation)

und/oder durch Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO) der Leber (Dixon et al. 1985, Dixon und Udeagha 1986, Oldham und Chenery 1985) katalysiert sein können.

Nachdem die Effektivität der Hemmung der Lipidperoxidation durch EDTA und Glutathion (GSH) über die Bestimmung der H_2O_2 -Bildung in Rattenlebermikrosomen überprüft wurde ($0,06 \pm 0,04$ nmol Formaldehyd min^{-1} mg mikrosomales Protein $^{-1}$ unter Zusatz von GSH und EDTA, je 1 mmol l^{-1} , vs. $1,47 \pm 0,16$ nmol Formaldehyd min^{-1} mg mikrosomales Protein $^{-1}$ ohne GSH und EDTA, Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 3$), wurden Inkubationen in Anwesenheit von GSH und EDTA (je 1 mmol l^{-1}) durchgeführt (Tab. 7).

Eine Hemmung der Lipidperoxidation durch EDTA (1 mmol l^{-1}) oder durch eine Kombination von EDTA und GSH (je 1 mmol l^{-1}) beeinflusste die Bildung der Sulfoxide nicht (Tab. 7).

Um jegliche FMO-Aktivität zu zerstören, wurden die Mikrosomen ohne NADPH und ohne NADPH-regenerierendes System (Isocitrat und Isocitratdehydrogenase) 45 min bei 37 °C vorinkubiert (Dyroff und Neal 1983). Hieraus resultierte nur ein geringer Verlust an Sulfoxidationsaktivität. Zusätzlich verursachte die Zugabe der FMO-Substrate Methimazol (Thiamazol, 1 mmol l^{-1}) oder N,N-Dimethylanilin ($0,4$ mmol l^{-1}) keine Hemmung der Umsatzraten (Tab. 7).

Die Kombination von FMO-Substrat (0,4 mmol N,N-Dimethylanilin l^{-1}) und Cytochrom P-450-Hemmstoff (3 mmol n-Octylamin l^{-1}) führte zu den gleichen Umsatzraten wie unter alleiniger Zugabe von n-Octylamin. Eine Kombination des FMO-Substrats Methimazol (1 mmol l^{-1}) mit einer Hemmung der Lipidperoxidation durch EDTA und GSH (je 1 mmol l^{-1}) führte zu gleichen Umsatzraten für Cimetidinsulfoxid wie unter kompletten Inkubationsbedingungen (Tab. 7).

Diese Variationen der Versuchsbedingungen zeigen, daß Flavin-abhängige Monooxygenasen und/oder nicht-enzymatische Reaktionen über endogene Peroxide nicht an der Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch Rattenlebermikrosomen beteiligt sind.

Der Einfluß von Methimazol auf die Sulfoxidation von Etintidin durch Rattenlebermikrosomen konnte nicht untersucht werden, da die Zugabe von Methimazol mit der hochdruckflüssigkeitschromatographischen Bestimmung von Etintidinsulfoxid interferierte.

Tabelle 7. Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch Rattenlebermikrosomen unter verschiedenen Bedingungen

Variation des kompletten Inkubationssystems ^a	Cimetidin sulfoxid (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	Etintidin sulfoxid (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)
-----	0,62 ± 0,07	0,82 ± 0,06
-----b	0,44 ± 0,09 ^b	0,51 ± 0,08 ^b
- Mikrosomen	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
- NADPH ^c	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01
+ 0.5 mmol NAD l ⁻¹ ; - NADPH ^c	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01
+ 0.5 mmol NADP l ⁻¹ ; - NADPH ^c	<0,01	<0,01
+ CO/O ₂ (3+2, v/v)	0,18 ± 0,03 ^b	0,24 ± 0,03 ^b
+ 3 mmol n-Octylamin l ⁻¹	0,38 ± 0,06	0,40 ± 0,08
+ 3 mmol n-Octylamin l ⁻¹ ; - NADPH ^c	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
+ 1 mmol EDTA l ⁻¹	0,65 ± 0,06	0,85 ± 0,05
+ 1 mmol EDTA l ⁻¹ ; + 1 mmol GSH l ⁻¹	0,59 ± 0,04	0,75 ± 0,07
+ 45 min Vorinkubation (37 °C; - NADPH ^c ; - Substrat), dann komplett	0,47 ± 0,04	0,59 ± 0,05
+ 1 mmol Methimazol l ⁻¹	0,63 ± 0,03	-----d
+ 1 mmol Methimazol l ⁻¹ ; + 1 mmol EDTA l ⁻¹ ; + 1 mmol GSH l ⁻¹	0,59 ± 0,06	-----d
+ 0.4 mmol N,N-DMA l ⁻¹	0,62 ± 0,06	0,77 ± 0,04
+ 0.4 mmol N,N-DMA l ⁻¹ ; + 3 mmol n-Octylamin l ⁻¹	0,42 ± 0,04	0,39 ± 0,03

Mittelwerte ± Standardabweichung von Individualexperimenten mit Mikrosomen von mindestens 3 verschiedenen Ratten.

^a: s. 3.2.5.6. Substratkonzentration 120 µmol Cimetidin bzw. 100 µmol Etintidin l⁻¹

^b: Substratkonzentration 40 µmol Cimetidin bzw. 32 µmol Etintidin l⁻¹

^c: und ohne NADPH-regenerierendes System

^d: Die Zugabe von Methimazol interferierte mit der HPLC-Bestimmung von Etintidinsulfoxid

N,N-DMA = N,N-Dimethylanilin; GSH = Glutathion

4.2.2. Cimetidin- und Etintidinsulfoxid als Substrate mikrosomaler Enzymsysteme der Rattenleber.

Mitchell et al. (1982c) konnten nach oraler Gabe von [2-¹⁴C] Cimetidinsulfoxid Cimetidin im menschlichen Urin identifizieren. Ausgehend von der Fragestellung, ob Cimetidinsulfoxid oder Etintidinsulfoxid selber als Substrate für mikrosomale Enzymsysteme der Rattenleber in Frage kommen, wurden Inkubationen dieser beiden Substrate (je 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$) mit Rattenlebermikrosomen durchgeführt. Tabelle 8 zeigt, daß weder Cimetidinsulfoxid noch Etintidinsulfoxid von Rattenlebermikrosomen zu den Thioethern reduziert oder zu den Sulfonen oxidiert wurden. Solch eine Reduktions- oder Oxidationsreaktion konnte weder unter aeroben oder anaeroben Bedingungen (100 % CO), noch durch Zugabe von NAD, NADH oder NADPH (je 0,5 mmol l^{-1}) als Cosubstrate nachgewiesen werden. Die letztere Variation des kompletten Ansatzes besagt ferner, daß auch in Anwesenheit von NADH als Cosubstrat für eine eventuelle Reduktionsreaktion keine Reduktion zum Thioether gefunden wurde. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden von Rendić et al. (1983) und Speeg et al. (1982), die für das Cimetidinsulfoxid im Vergleich zum Cimetidin eine 10- bis 30-fach höhere spektrale Dissoziationskonstante als Ausdruck für eine sehr viel niedrigere Affinität dieses Sulfoxids zum Cytochrom P-450-System der Rattenleber fanden.

Tabelle 8. Inkubationen von Cimetidinsulfoxid und Etintidinsulfoxid mit Rattenlebermikrosomen unter verschiedenen Bedingungen

Variation des kompletten Inkubationssystems ^a	Cimetidin- bzw. Etintidinsulfoxid Oxidations- oder Reduktionsprodukte
--	---

-----	nicht nachweisbar
- NADPH ^b	- " -
+ 100 % CO	- " -
+ 0.5 mmol NAD l ⁻¹ ; - NADPH ^b	- " -
+ 0.5 mmol NADH l ⁻¹ ; - NADPH ^b	- " -
+ 0.5 mmol NADH l ⁻¹ ; + 100 % CO; - NADPH ^b	- " -
+ 100 % CO; - NADPH ^b	- " -

Doppelbestimmungen von Versuchen mit Mikrosomen von Kontrolltieren (0,45 nmol Cytochrom P-450 mg mikrosomales Protein⁻¹).

^a: s. 3.2.5.6., Substratkonzentrationen je 100 µmol l⁻¹

^b: und ohne NADPH-regenerierendes System

4.2.3. Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch menschliche Lebermikrosomen.

Beide vorhandenen Proben menschlichen Lebergewebes wurden hinsichtlich ihrer mikrosomalen Enzymaktivität überprüft (Tab. 9). Sie wiesen beide erhebliche Aktivität bezüglich der Benzphetamin-N-Demethylierung und Benzo(a)pyren-Oxidation, hingegen, wie zu erwarten, keine Aktivität bezüglich der Ethoxyresorufin-O-Deethylierung auf.

Auch humane Lebermikrosomen waren in der Lage, Cimetidin und Etintidin an der Thioetherstruktur zu den entsprechenden Sulfoxiden zu metabolisieren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit Rattenlebermikrosomen konnten diese Reaktionen durch Kohlenmonoxid gehemmt werden. Es resultierte daraus aber nur eine Hemmung um 21 bis 33 % (Tab. 10).

Im Gegensatz zu Rattenlebermikrosomen wurde bei alleiniger Zugabe der Cosubstrate NAD oder NADP und Weglassen von NADPH und NADPH-regenerierendem System eine Restaktivität zwischen 25 und 50 % gemessen.

Bei Zugabe von 3 mmol n-Octylamin l^{-1} wurde die Reaktion um nicht mehr als 17 % gehemmt, während eine 45 minütige Vorinkubation bei 37 °C ohne NADPH und die Zugabe von 0,4 mmol N,N-Dimethylanilin l^{-1} keinen Effekt auf die Umsatzraten ausübten (Tab. 10).

Da nicht genügend menschliches Lebergewebe zur Verfügung stand, konnten nicht alle Variationen des kompletten Inkubationssystems durchgeführt werden.

Tabelle 9. Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasereaktionen in menschlichen Lebermikrosomen

Substrat	Inhibitor	gebildete	% Inhibition
($\mu\text{mol l}^{-1}$)	(mmol l^{-1})	Metabolite*	
BP	(1000)	-----	---
		---	---
BP	(1000) Cimetidin	(1,2)	0,56 0,48

BP	(1000) Etintidin	(1,0)	0,57 0,47
			14 17
BaP	(20)	-----	---
		---	---
BaP	(20) Cimetidin	(1,2)	0,83** 0,71**
			65 70
BaP	(20) Etintidin	(1,0)	0,29** 0,21**
			71 75
ETOR	(3,1)	-----	---
		---	---
			<0,02 <0,02

Mittelwerte aus je 2 Doppelbestimmungen mit zwei verschiedenen menschlichen Leberproben (0,26 und 0,31 nmol Cytochrom P-450 mg mikrosomales Protein⁻¹).

*: nmol gebildetes Produkt min⁻¹ mg mikrosomales Protein⁻¹

** : ΔF ex. 466 nm; em. 522 nm 5 min⁻¹ mg mikrosomales Protein⁻¹

BaP = Benzo(a)pyren; BP = Benzphetamin; ETOR = Ethoxyresorufin

Tabelle 10. Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin durch humane Lebermikrosomen unter verschiedenen Bedingungen

Variation des kompletten Inkubationssystems ^a	Cimetidin sulfoxid		Etintidin sulfoxid	
	(nmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)			
-----	0,47	0,61	0,30	0,37
- Mikrosomen	0,03	0,02	0,01	0,02
- NADPH ^b	0,11	0,31	0,07	0,16
+ CO/O ₂ (3+2, v/v)	0,35	0,48	0,20	0,25
+ 0.5 mmol NAD l ⁻¹ ; - NADPH ^b	0,30	0,39	0,22	0,30
+ 0.5 mmol NADP l ⁻¹ ; - NADPH ^b	0,33	0,46	0,19	0,21
+ 3 mmol n-OA l ⁻¹	0,41	0,53	0,25	0,32
+ 45 min Vorinkubation (37 °C; -Substrate; - NADPH ^b), dann komplett	0,43	0,56	0,28	0,34
+ 0.4 mmol N,N-DMA l ⁻¹	0,46	0,60	0,29	0,38
+ 0.4 mmol N,N-DMA l ⁻¹ ; + 3 mmol n-OA l ⁻¹	0,40	0,53	0,25	0,33

Mittelwerte aus je 2 Doppelbestimmungen mit zwei verschiedenen menschlichen Leberproben (0,26 und 0,31 nmol Cytochrom P-450 mg mikrosomales Protein⁻¹).

^a: s. 3.2.5.6. Substratkonzentration 400 µmol Cimetidin bzw.

320 µmol Etintidin l⁻¹

^b: und ohne NADPH-regenerierendes System

N,N-DMA = N,N-Dimethylanilin; n-OA = n-Octylamin,; GSH = Glutathion

4.3. Interaktionen von nichtsteroidalen Antirheumatika mit Histamin H₂-Rezeptorantagonisten.

In vitro-Inkubationen mit Lebermikrosomen können zwar in der Regel keine klinischen Interaktionsstudien ersetzen, sind aber häufig ein geeignetes Werkzeug, um mit geringerem Aufwand mögliche Interaktionen abschätzen zu können.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurden Inkubationen von Diclofenac in An- und Abwesenheit äquimolarer Konzentration an Ranitidin mit Ratten- und Menschenlebermikrosomen durchgeführt.

4.3.1. Einfluß von Ranitidin auf die Hydroxylierung von Diclofenac durch Ratten- und Menschenlebermikrosomen.

Abbildung 15 zeigt die HPLC-Auftrennung von Diclofenac, einiger Phase I-Metaboliten von Diclofenac sowie des internen Standards für die Analytik in Lebermikrosomen Flufenaminsäure.

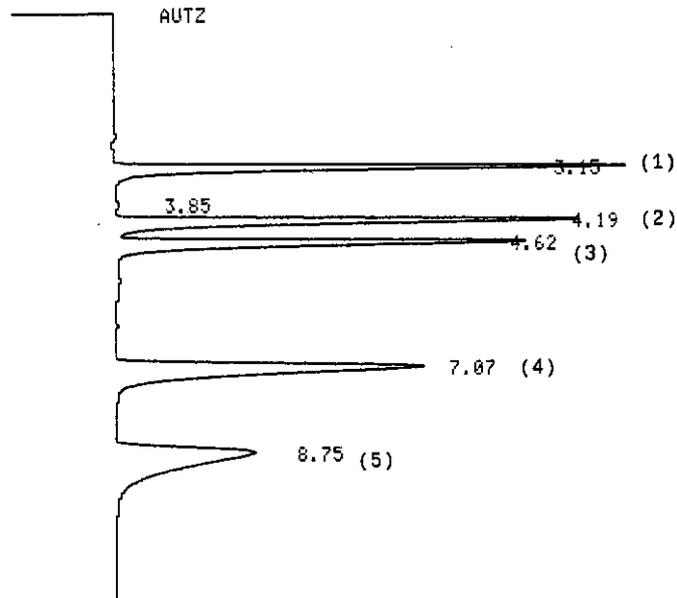


Abb. 15. HPLC-Auftrennung von Diclofenac, einiger Phase I-Metaboliten von Diclofenac und Flufenaminsäure.

1 = 4',5-Dihydroxydiclofenac, 2 = 5-Hydroxydiclofenac,
 3 = 4'-Hydroxydiclofenac, 4 = Diclofenac, 5 = Flufen-
 aminsäure (je 0,5 μg 20 μl Laufmittel⁻¹).

Bedingungen: 1,3 ml Laufmittel KH_2PO_4 (50 mmol l^{-1}): CH_3CN
 (50:50, v/v, pH 5,4) min^{-1} , 1200 PSI (8,3 MPa), 0,05 AUFS,
 276 nm, Nucleosil 120-5 C_8 -Säule

Ratten- und Menschenlebermikrosomen oxidierten Diclofenac zu den entsprechenden Hydroxy-Derivaten. Eine nicht-enzymatische Oxidation wurde nicht beobachtet (Tab. 11).

Von den möglichen und als Vergleichssubstanzen zur Verfügung stehenden Hydroxymetaboliten konnten nur 4'-Hydroxydiclofenac und 5-Hydroxydiclofenac nachgewiesen werden. Eine 3'- oder 4',5-Oxidation wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht gefunden.

In den Lebermikrosomen von Kontrollratten fand sich, sowohl pro mg mikrosomales Protein als auch pro nmol Cytochrom P-450 ausgedrückt, eine ca. 10-fach höhere Aktivität bezüglich der 4' und 5-Hydroxylierung von Diclofenac als in der humanen Lebermikrosomenprobe (Tab. 11).

Tabelle 11 zeigt weiterhin, daß Ranitidin in einer äquimolaren Konzentration ($100 \mu\text{mol l}^{-1}$) keinen Einfluß auf die 4'- und 5-Hydroxylierung von Diclofenac ausübte.

Tabelle 11. Einfluß von Ranitidin auf die Hydroxylierung von Diclofenac in Ratten- und Menschenlebermikrosomen

Variation des kompletten Inkubationssystems ^a	Ratte		Mensch	
	OH-Diclofenac ^b			
	(nmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)			
- Mikrosomen	<0,01		<0,01	
-----	1,71	1,89	0,10	0,11
+ 100 µmol Ranitidin l ⁻¹	1,78	1,72	0,12	0,11

Mittelwerte von Doppelbestimmungen je einer Kontrollratte und einer humanen Leberprobe.

^a: Das komplette Inkubationssystem (2,0 ml) enthielt: 0,5 mmol NADPH l⁻¹, NADPH-regenerierendes System (400 mU ICDH, 8 mmol IC l⁻¹), 2,0 mg mikrosomales Protein einer Kontroll-Rattenleber (0,43 nmol Cytochrom P-450 mg mikrosomales Protein⁻¹) bzw. einer Menschenleber (0,26 nmol Cytochrom P-450 mg mikrosomales Protein⁻¹) sowie 100 µmol Diclofenac l⁻¹. Inkubationszeit: 10 min

^b: Summe von 4'- und 5-Hydroxydiclofenac

Voraussetzung für Untersuchungen von möglichen pharmakokinetischen Interaktionen ist immer eine hinreichend sensitive, genaue und reproduzierbare Analytik der zu bestimmenden Substanz(en).

Zur Beschreibung aller erarbeiteten HPLC-Methoden wird jeweils die Genauigkeit (VK = Variationskoeffizient), die Wiederfindung (in %) und die Nachweisgrenze angegeben.

Angaben zu den Retentionszeiten der jeweiligen Substanzen finden sich auf den Chromatogrammen. Die quantitativen Auswertungen erfolgten über die Berechnung der Peakfläche der zu bestimmenden Substanz im Vergleich zur Peakfläche des internen Standards.

Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.3.2. HPLC-Bestimmung der H_2 -Rezeptorantagonisten
Cimetidin, Etintidin und Ranitidin im menschlichen Plasma.

4.3.2.1. Cimetidin und Cimetidinsulfoxid

a) Cimetidin

Genauigkeit der Methode:

zugesetzte Konzentration (ng ml ⁻¹)	gefundene Konzentration (ng ml ⁻¹)	VK (%)	n
20	19,8 ± 0,6	3,0	5
50	48,5 ± 1,6	3,3	5
100	102,3 ± 5,6	5,5	5
200	200,8 ± 4,9	2,4	5
500	487,9 ± 7,8	1,6	5
1000	1018,3 ± 34,6	3,4	5

Die Wiederfindung für den untersuchten

Konzentrationsbereich betrug $84,5 \pm 3,8 \%$.

Die Nachweisgrenze lag bei 20 ng ml Plasma⁻¹ für eine
500 µl Probe.

b) Cimetidinsulfoxid

Genauigkeit der Methode:

zugesetzte Konzentration (ng ml ⁻¹)	gefundene Konzentration (ng ml ⁻¹)	VK (%)	n
20	18,7 ± 2,1	11,2	5
50	48,1 ± 3,2	6,7	5
100	102,8 ± 6,8	6,6	5

Die Wiederfindung für den untersuchten Konzentrationsbereich betrug $79,2 \pm 4,2$ %.

Die Nachweisgrenze lag bei 20 ng ml Plasma⁻¹.

4.3.2.2. Etintidin und Etintidinsulfoxid

a) Etintidin

Genauigkeit der Methode:

zugesetzte Konzentration (ng ml ⁻¹)	gefundene Konzentration (ng ml ⁻¹)	VK (%)	n
20	22,1 ± 1,2	5,4	5
50	49,5 ± 2,4	4,8	5
100	99,6 ± 6,1	6,1	5
200	203,1 ± 5,9	2,9	5
500	509,4 ± 9,2	1,8	5
1000	1022,6 ± 27,1	2,7	5

Die Wiederfindung im untersuchten Konzentrationsbereich lag bei 86,1 ± 3,4 %.

Die Nachweisgrenze betrug 20 ng ml⁻¹.

b) Etintidinsulfoxid

Genauigkeit der Methode:

zugesezte Konzentration (ng ml ⁻¹)	gefundene Konzentration (ng ml ⁻¹)	VK (%)	n
20	21,0 ± 1,6	7,6	5
50	49,7 ± 2,8	5,6	5
100	102,6 ± 5,3	5,2	5

Die Wiederfindung im untersuchten Konzentrationsbereich betrug $76,8 \pm 5,1$ %. Die Nachweisgrenze lag bei 20 ng ml⁻¹.

4.3.2.3. Ranitidin

Abbildung 16 zeigt die HPLC-Bestimmung von Ranitidin im menschlichen Plasma.

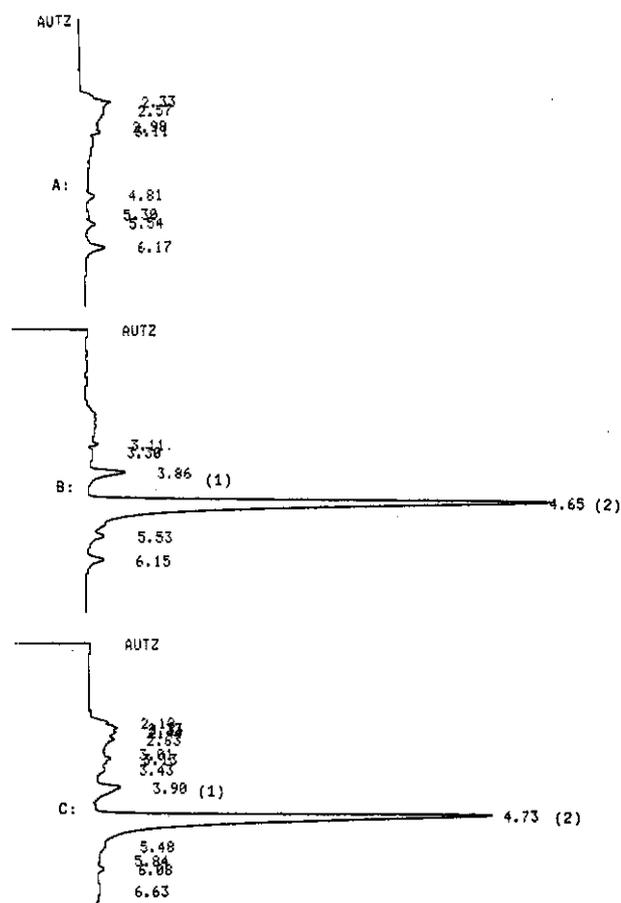


Abb. 16. HPLC-Bestimmung von Ranitidin im menschlichen Plasma.

A: Leerplasma; B: 1 = 50 ng Ranitidin ml Plasma⁻¹,
2 = AH 20480 (interner Standard); C: Probandenplasma 13 h
nach der letzten Dosis (2 x 150 mg Ranitidin p.o. pro Tag
für 6 Tage), entsprechend 39 ng Ranitidin ml Plasma⁻¹.

Genauigkeit der Methode:

zugesezte Konzentration (ng ml ⁻¹)	gefundene Konzentration (ng ml ⁻¹)	VK (%)	n
10	9,6 ± 0,96	10,0	5
20	19,4 ± 0,76	3,9	5
50	52,2 ± 1,8	3,4	5
100	102,0 ± 1,1	1,1	5
200	203,3 ± 3,5	1,7	5
500	514,9 ± 6,0	1,2	5
1000	1054,9 ± 18,6	1,8	5

Die Wiederfindung betrug im untersuchten Konzentrationsbereich $74,8 \pm 8,3$ % und lag für den internen Standard AH 20480 bei $76,5 \pm 7,1$ % (n = 35). Die Nachweisgrenze für eine 1 ml Plasmprobe betrug 10 ng Ranitidin ml⁻¹.

Applikation: Bei 9 freiwilligen Probanden (vgl. 4.3.4.), die 6 Tage um 8.00 und 19.00 Uhr je 150 mg Ranitidin p.o. erhielten, wurde am Tag 6 morgens vor der ersten Dosis die Ranitidin-Plasmakonzentration im steady state bestimmt. Es wurden Konzentrationen zwischen 39 und 271 ng Ranitidin ml Plasma⁻¹ (120 ± 94 ng ml⁻¹) gemessen.

4.3.3. HPLC-Bestimmung der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) Diclofenac, Indometacin, Naproxen, Piroxicam und Salicylsäure im menschlichen Plasma.

Abbildung 17 zeigt die HPLC-Auftrennung 12 verschiedener NSAR auf einer Nucleosil[®] 120-5 C₈-Säule.

Relative Retentionszeiten (Carprofen = 1,0) und Detektionswellenlängen verschiedener NSAR, einiger Phase I-Metaboliten und interner Standards zeigt Tabelle 12.

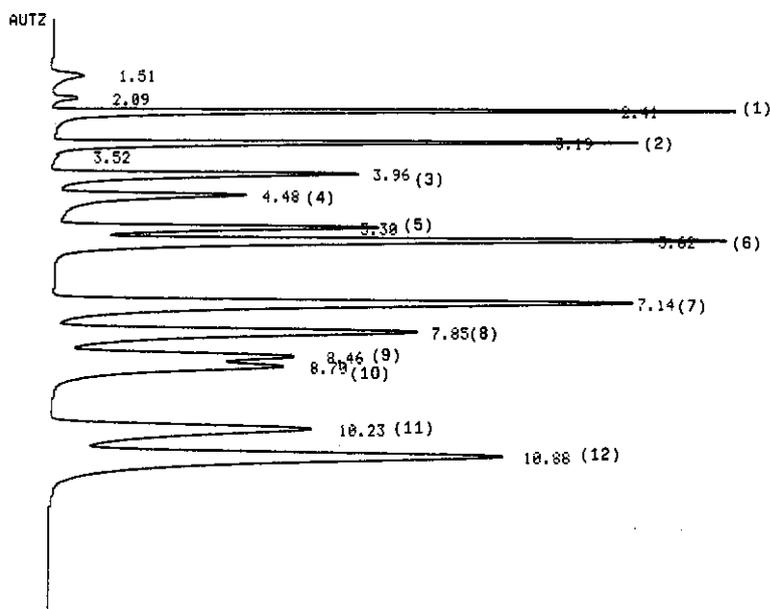


Abb. 17. HPLC-Auftrennung mehrerer NSAR.

Salicylsäure (1), 2-Methoxybenzoesäure (2), Isoxicam (3), Piroxicam (4), Ketoprofen (5), Naproxen (6), Carprofen (7), Indometacin (8), Lonazolac (9), Ibuprofen (10), Flufenaminsäure (11), und Mefenaminsäure (12), je 0,5 µg 20 µl Laufmittel⁻¹.

Bedingungen: 1,3 ml Laufmittel KH_2PO_4 (50 mmol l^{-1}): CH_3CN (50:50, v/v, pH 5,4) min^{-1} , 1800 PSI (12,4 MPa), 0,05 AUFS, 220 nm, Nucleosil^R 120-5 C_8 -Säule

Tabelle 12. Relative Retentionszeiten (RRT, Carprofen = 1,0) und Detektionswellenlängen (nm) verschiedener NSAR

Substanz	RRT	nm
Salicylsäure	0,34	300
Paracetamol	0,38	244
2-Methoxybenzoesäure	0,45	300
4',5-Dihydroxydiclofenac	0,47	220/276
Salicylamid	0,49	300
Isoxicam	0,55	365
6-O-Desmethylnaproxen	0,56	230
Piroxicam	0,63	365
5-Hydroxydiclofenac	0,63	220/276
3'-Hydroxydiclofenac	0,64	220/276
4'-Hydroxydiclofenac	0,68	220/276
Ketoprofen	0,74	260
Naproxen	0,79	230
Carprofen	1,00	260
Diclofenac	1,04	220/276
Indometacin	1,10	260
CGP 4287	1,13	220/276
Lonazolac	1,16	220/276
Ibuprofen	1,22	220
Flufenaminsäure	1,43	220/289
Mefenaminsäure	1,52	220

HPLC-Analytik der Einzelsubstanzen:

4.3.3.1. Diclofenac

Abbildung 18 zeigt die HPLC-Bestimmung von Diclofenac im menschlichen Plasma.

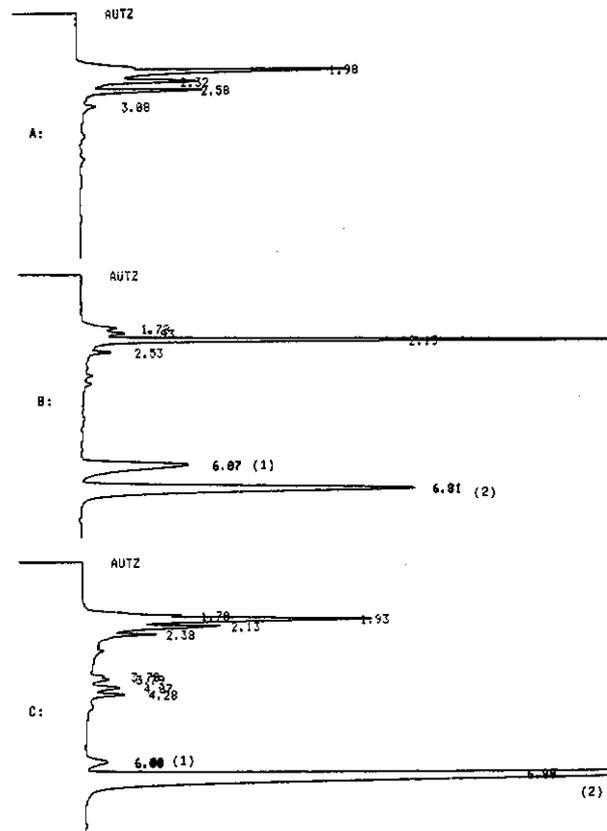


Abb. 18. HPLC-Bestimmung von Diclofenac im menschlichen Plasma. A: Leerplasma; B: 1 = 500 ng Diclofenac ml Plasma⁻¹, 2 = CGP 4287 (interner Standard); C: Patientenplasma 20 h nach peroraler Einnahme von ca. 1 g Diclofenac, entsprechend 210 ng Diclofenac ml Plasma⁻¹ (0,02 AUFS, 276 nm)

Genauigkeit der Methode:

zugesetzte Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	gefundene Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	VK (%)	n
0,1	0,103 \pm 0,01	9,7	5
0,5	0,505 \pm 0,01	2,0	5
1,0	1,01 \pm 0,09	8,9	5
3,0	3,02 \pm 0,11	3,6	5

Die Wiederfindung im untersuchten Konzentrationsbereich lag bei $75,9 \pm 4,7 \%$ und betrug für den internen Standard CGP 4287 $86,5 \pm 6,4 \%$ ($n = 20$). Die Nachweisgrenze für eine 1 ml Plasmaprobe betrug ca. 50 ng Diclofenac ml^{-1} bei einer Detektionswellenlänge von 276 nm und ca. 20 ng ml^{-1} bei 220 nm.

4.3.3.2. Indometacin

Abbildung 19 zeigt die HPLC-Bestimmung von Indometacin im menschlichen Plasma.

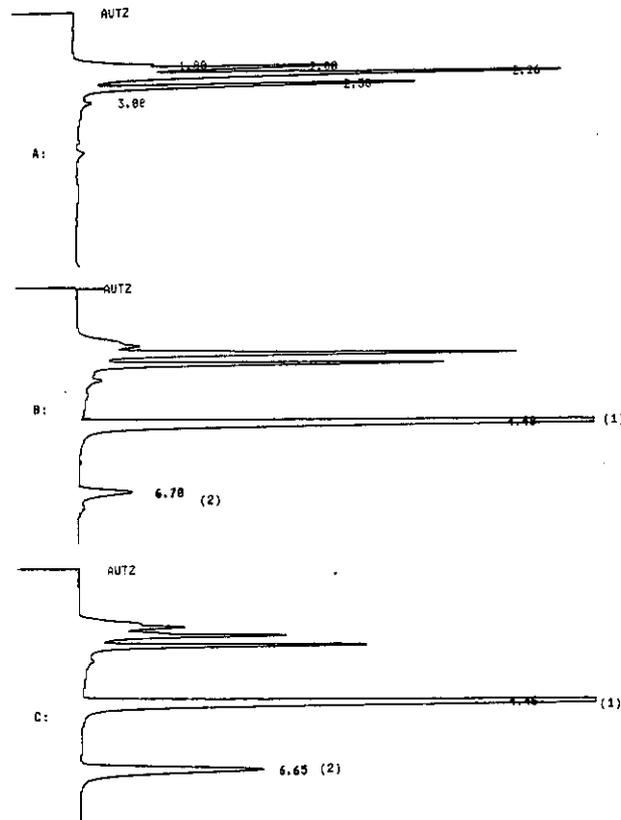


Abb. 19. HPLC-Bestimmung von Indometacin im menschlichen Plasma.

A: Leerplasma; B: 1 = Ketoprofen (interner Standard),
 2 = 250 ng Indometacin ml Plasma⁻¹; C: Probandenplasma 1 h
 nach 100 mg Indometacin p.o., entsprechend 4,22 µg
 Indometacin ml Plasma⁻¹ (0,02 AUFS, 260 nm)

Genauigkeit der Methode:

zugesezte Konzentration (ng ml ⁻¹)	gefundene Konzentration (ng ml ⁻¹)	VK (%)	n
100	98,0 ± 8,8	8,9	5
250	247,9 ± 10,1	4,1	5
500	498,5 ± 6,2	1,2	8
1000	1015,1 ± 27,1	2,7	5
2000	2013,6 ± 37,4	1,9	5
5000	5108,7 ± 112,0	2,2	5

Die Wiederfindung für den untersuchten Konzentrationsbereich betrug $73,0 \pm 5,7$ % und lag für den internen Standard Ketoprofen bei $72,1 \pm 6,4$ % (n = 50). Die Nachweisgrenze für eine 1 ml Plasmaprobe betrug 20 ng Indometacin ml⁻¹. Applikation s. 4.3.4.

Tag-zu-Tag Reproduzierbarkeit:

zugesezte Konzentration (ng ml ⁻¹)	gefundene Konzentration (ng ml ⁻¹)	VK (%)	n
100	102,5 ± 9,6	9,4	6
500	504,8 ± 11,1	2,2	6
2000	2022,4 ± 42,5	2,1	6

4.3.3.3. Naproxen und Desmethylnaproxen

Abbildung 20 zeigt die hochdruckflüssigkeits-
 chromatographische Bestimmung von Naproxen und seinem
 Phase I-Metaboliten 6-O-Desmethylnaproxen im menschlichen
 Plasma.

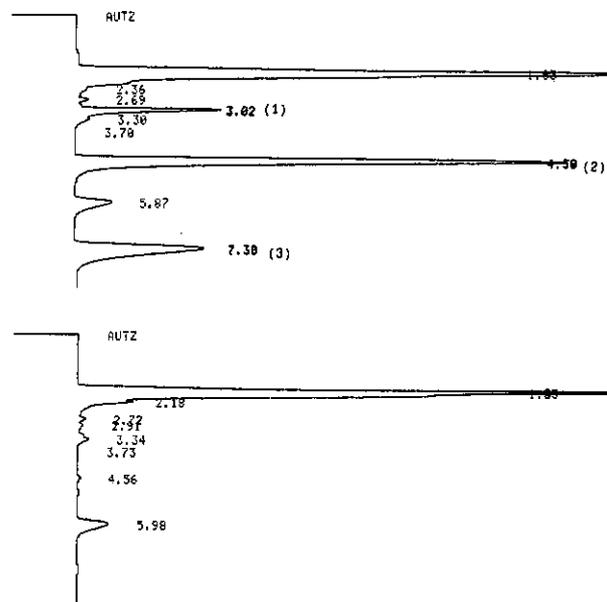


Abb. 20. HPLC-Bestimmung von Naproxen und Desmethylnaproxen
 im menschlichen Plasma.

Oben: 1 = 0,5 μg Desmethylnaproxen ml Plasma^{-1} , 2 = 20 μg
 Naproxen ml Plasma^{-1} , 3 = Flufenaminsäure (interner
 Standard); unten: Leerplasma (0,05 AUFS, 230 nm)

a) Naproxen

Genauigkeit der Methode:

zugesetzte Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	gefundene Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	VK (%)	n
20,0	$20,52 \pm 0,58$	2,8	5
40,0	$40,30 \pm 0,94$	2,3	5
60,0	$58,38 \pm 1,21$	2,1	5

Die Wiederfindung für diesen Konzentrationsbereich lag bei $71,6 \pm 3,2 \%$ und betrug für den internen Standard Flufenaminsäure $91,6 \pm 3,8 \%$ ($n = 15$). Die Nachweisgrenze betrug ca. $0,5 \mu\text{g Naproxen ml Plasma}^{-1}$ für eine $200 \mu\text{l}$ Plasmaprobe.

b) Desmethylnaproxen

Genauigkeit der Methode:

zugesetzte Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	gefundene Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	VK (%)	n
0,5	$0,49 \pm 0,02$	4,1	5
1,0	$0,99 \pm 0,08$	8,1	5
1,5	$1,54 \pm 0,05$	3,2	5

Die Wiederfindung betrug $91,4 \pm 8,4 \%$, die Nachweisgrenze lag bei $0,25 \mu\text{g ml Plasma}^{-1}$ für eine $200 \mu\text{l}$ Plasmaprobe.

4.3.3.4. Piroxicam

Abbildung 21 zeigt die HPLC-Bestimmung von Piroxicam im menschlichen Plasma.

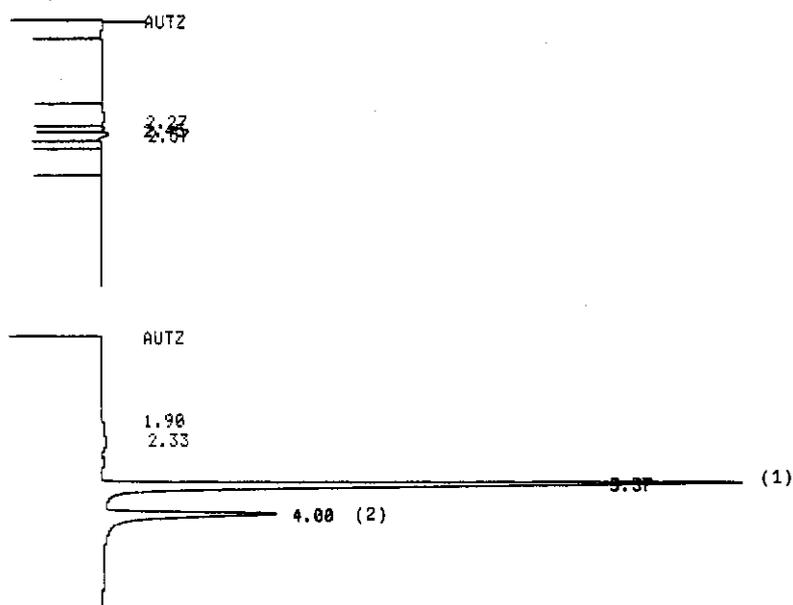


Abb. 21. HPLC-Bestimmung von Piroxicam im menschlichen Plasma.

Oben: Leerplasma; unten: 1 = Isoxicam (interner Standard),
2 = 500 ng Piroxicam ml Plasma⁻¹ (0,05 AUFS, 365 nm)

Genauigkeit der Methode:

zugesetzte Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	gefundene Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	VK (%)	n
1,0	$0,99 \pm 0,02$	2,0	5
3,0	$2,99 \pm 0,09$	3,0	5
5,0	$5,00 \pm 0,07$	1,4	5

Die Wiederfindung betrug $93,8 \pm 7,0 \%$ und für den internen Standard Isoxicam $96,7 \pm 6,9 \%$ ($n = 15$). Die Nachweisgrenze für eine 500 μl Plasmaprobe lag bei ca. $0,05 \mu\text{g Piroxicam ml Plasma}^{-1}$.

4.3.3.5. Salicylsäure

Genauigkeit der Methode:

zugesezte Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	gefundene Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	VK (%)	n
20,0	$19,8 \pm 0,3$	1,5	10
50,0	$50,2 \pm 0,4$	0,8	10
100,0	$99,8 \pm 0,4$	0,4	12

Die Wiederfindung lag bei $66,1 \pm 4,5 \%$ und betrug für den internen Standard 2-Methoxybenzoesäure $81,8 \pm 3,2 \%$ ($n = 32$). Eine Nachweisgrenze wurde nicht bestimmt.

Applikation: Die Methode wurde zur Bestimmung der Salicylsäurekonzentration im menschlichen Plasma von 19 freiwilligen Probanden 2 h nach peroraler Gabe (nüchtern) von $1,5 \text{ g Acetylsalicylsäure } 100 \text{ ml Wasser}^{-1}$ angewendet. Die Salicylsäure-Plasmakonzentrationen lagen zwischen $65,6$ und $138,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Abweichungen vom Mittelwert $< 1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) und betragen im Mittel $102,4 \pm 17,7 \mu\text{g ml Plasma}^{-1}$.

4.3.4. Einfluß von Ranitidin auf die Einzeldosis-Kinetik und minimale steady state-Plasmakonzentrationen von Indometacin.

Im Rahmen einer klinisch-pharmakologischen Studie über die Prävention der Ulzerogenität von Indometacin durch Ranitidin bot sich die Gelegenheit, Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von Indometacin unter gleichzeitiger Gabe von Placebo bzw. Ranitidin zu bestimmen. Die analytischen Ergebnisse dieser in vivo-Untersuchungen seien hier als Anhang zu den in vitro-Untersuchungen über die metabolischen Interaktionen dargestellt.

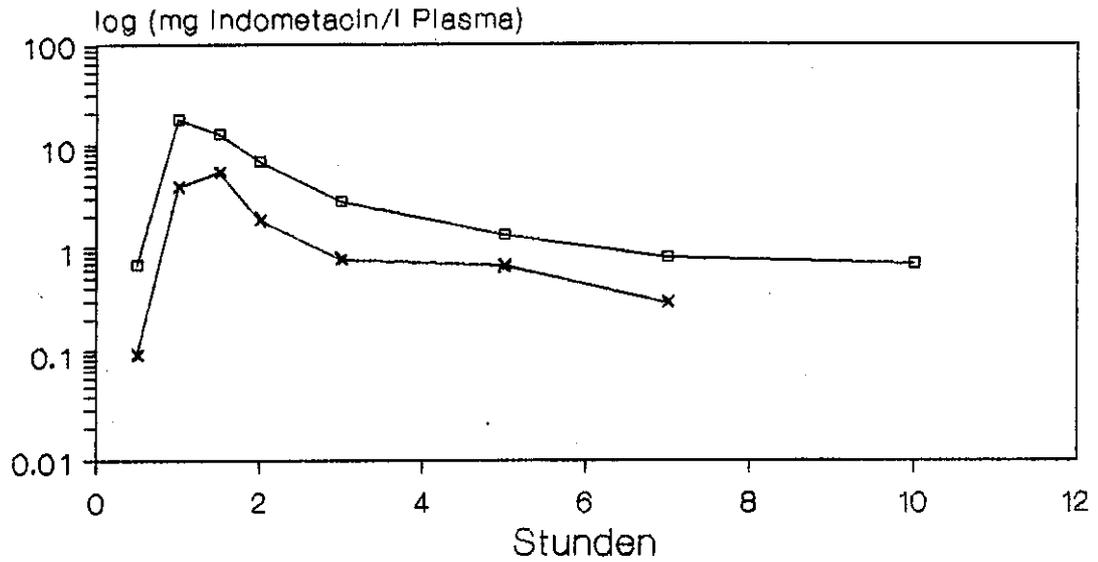
Leider ließ sich das Versuchsprotokoll dieser pharmakologisch ausgerichteten Studie (s. 3.2.7. und Abb. 22-30) in Bezug auf die Anzahl der Plasmaproben in der Absorptions- und Eliminationsphase nicht in der wünschenswerten Weise erweitern, so daß von vornherein nur mit einem begrenzten Informationsgewinn gerechnet werden konnte.

Indometacin wird nach peroraler Gabe schnell freisetzender Arzneiformen (wie z.B. Indomet-ratiopharm[®] 25/50 Kapseln, Settlage et al. 1983, Herstellerangaben) vollständig aus dem Gastrointestinaltrakt absorbiert. Ein großer Teil der Substanz wird in inaktive Metaboliten verstoffwechselt, die im Falle der Glucuronide nach Spaltung im Gastrointestinaltrakt über einen enterohepatischen Kreislauf wieder in die systemische Zirkulation gelangen können. Daraus erklären sich die erheblichen intra- und interindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik des Indometacins. Die Eliminationshalbwertszeit aus dem zentralen Kompartiment beträgt 3-11 Stunden (Cooper et al. 1982, Helleberg 1981, Kwan et al. 1976).

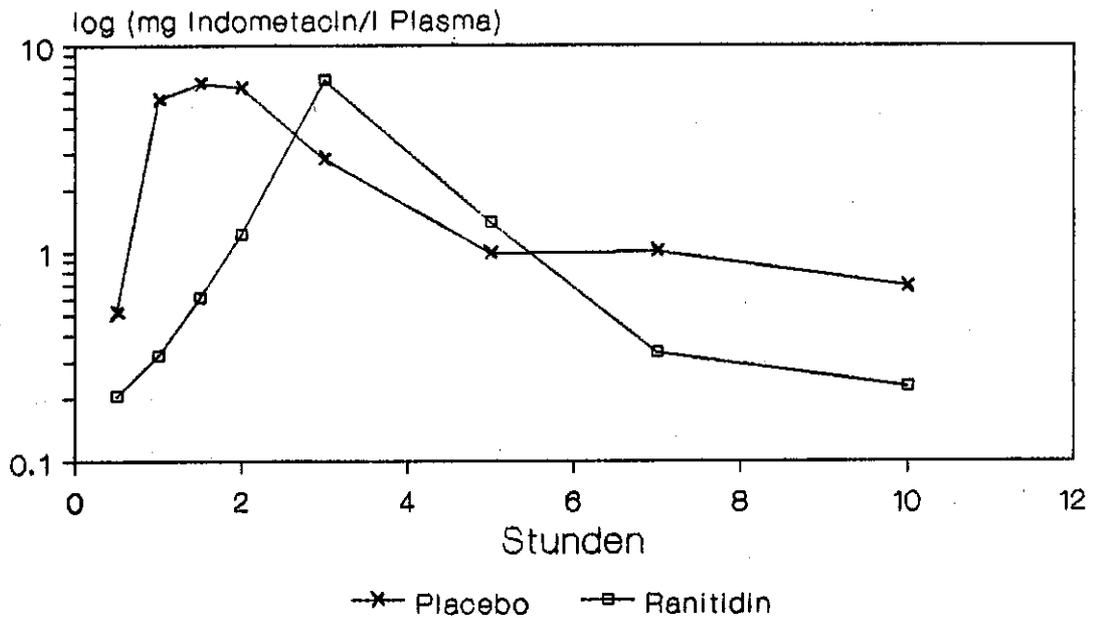
Die folgenden Abbildungen (22-30) zeigen, in halblogarithmischer Darstellung, die individuellen (Proband 1-9) Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe des Indometacins unter gleichzeitiger Gabe von Placebo bzw. Ranitidin.

Abb. 22-30. Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach einmaliger peroraler Applikation von 100 mg Indometacin bei 9 freiwilligen Probanden unter gleichzeitiger Gabe von Placebo oder Ranitidin.

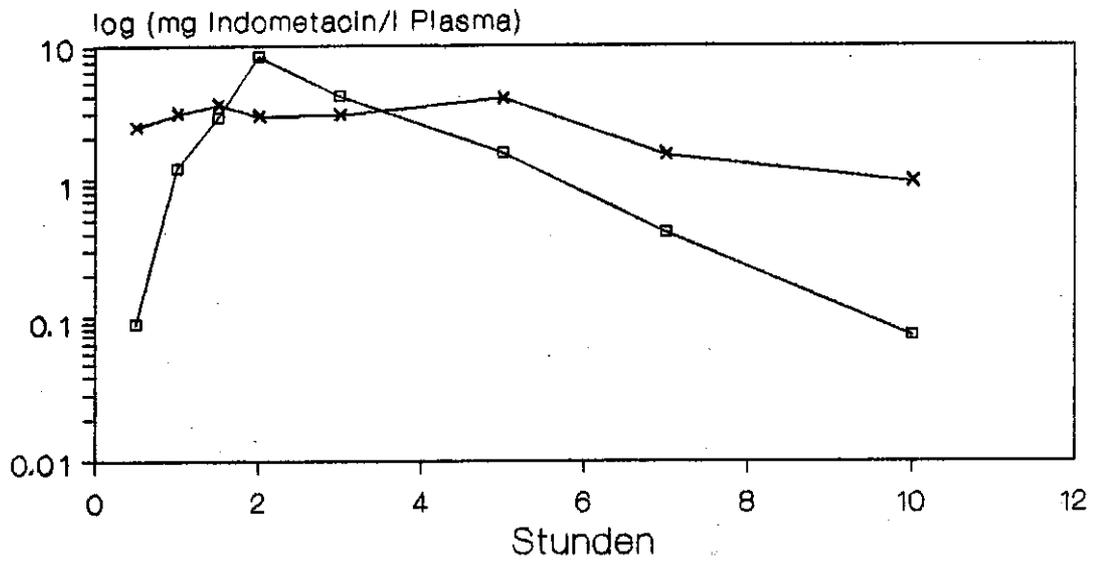
Proband 1



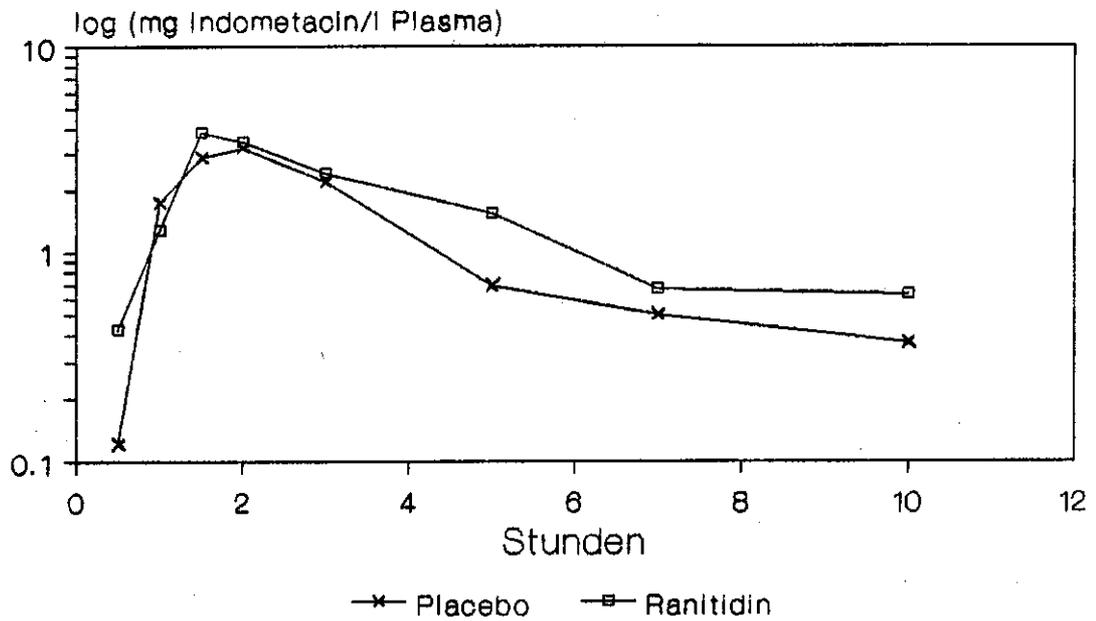
Proband 2



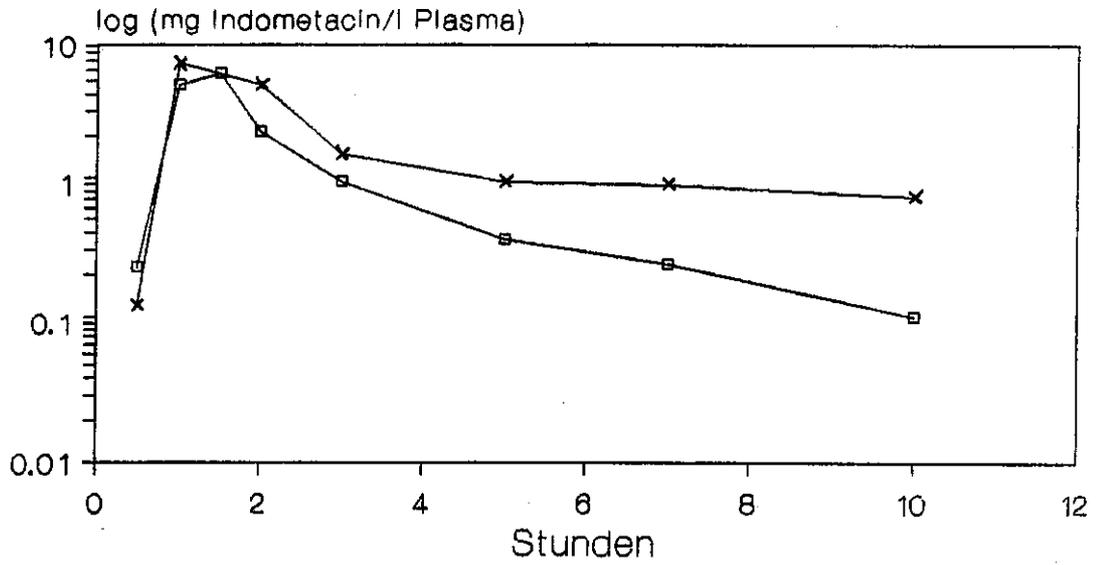
Proband 3



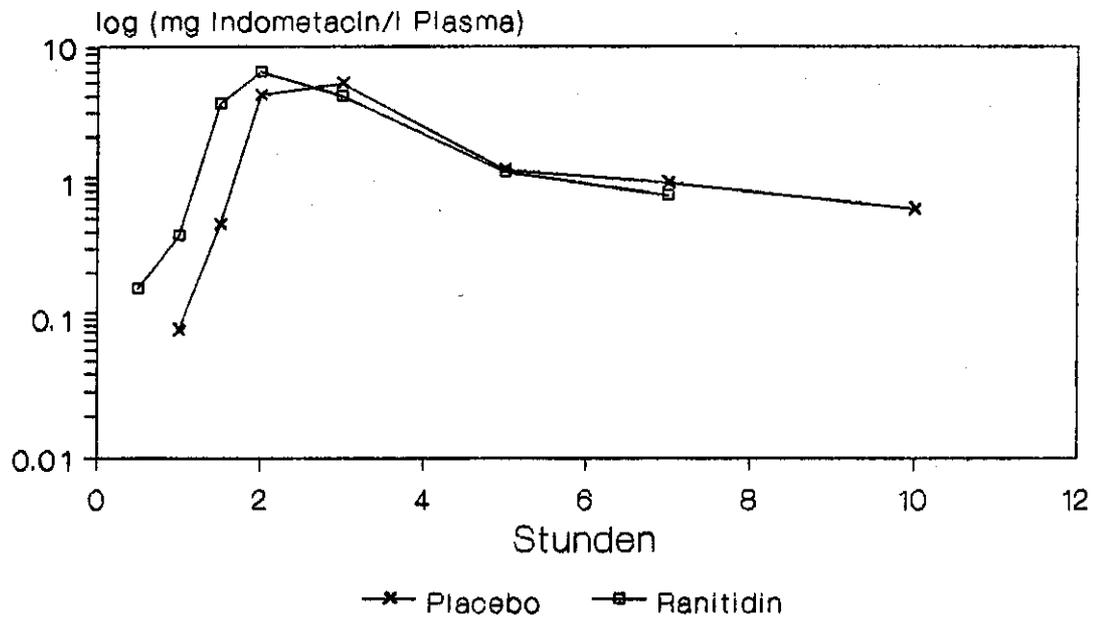
Proband 4



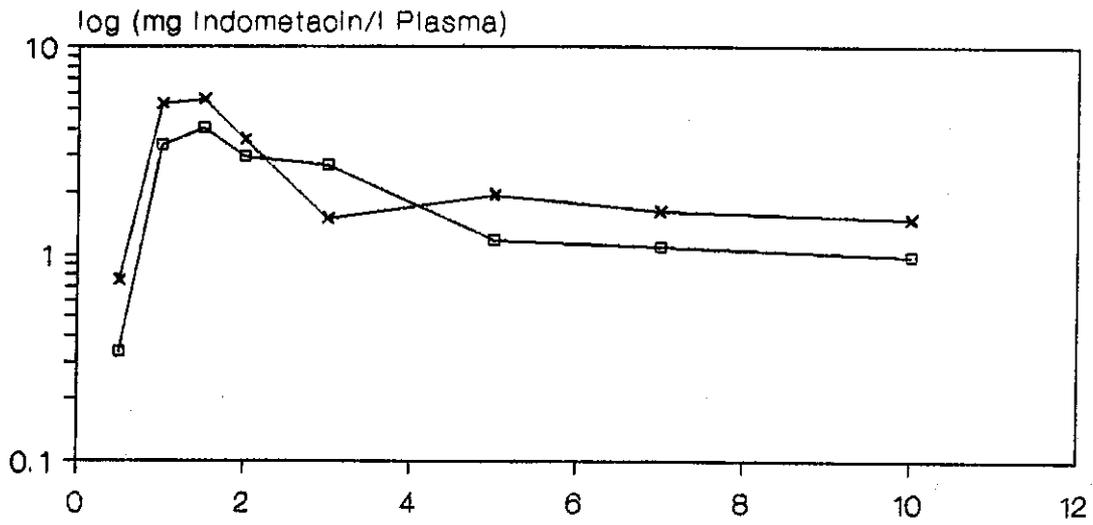
Proband 5



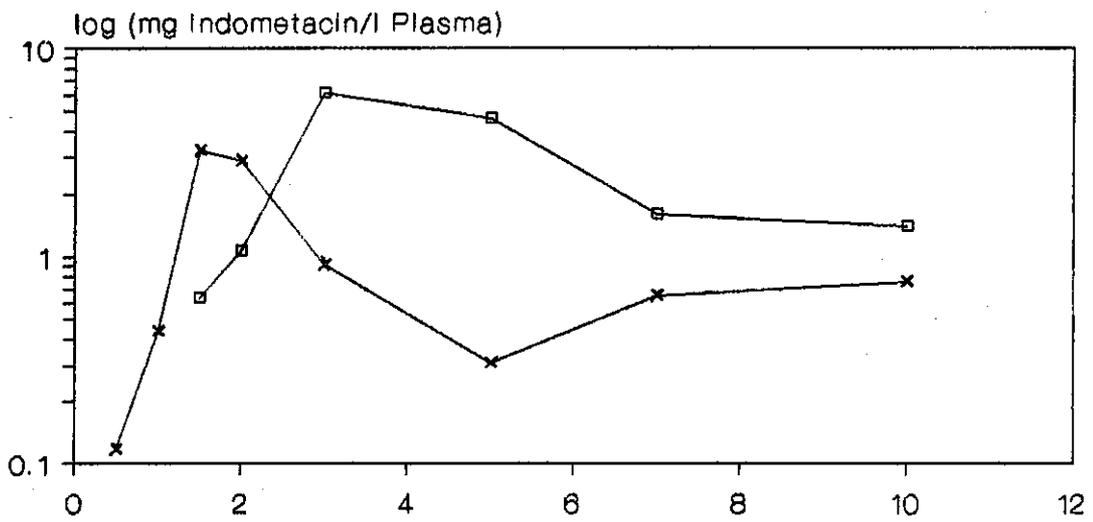
Proband 6



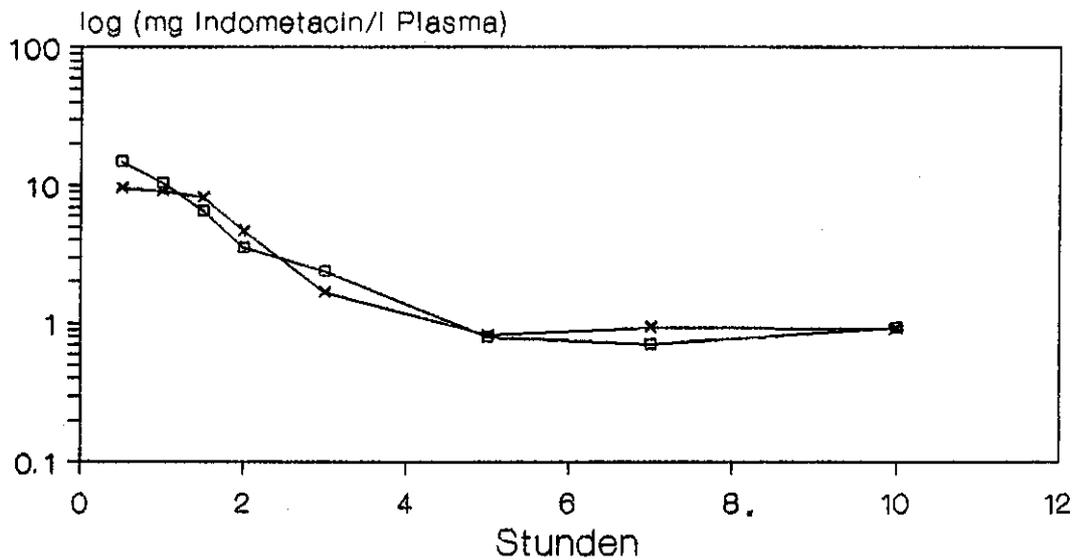
Proband 7



Proband 8



Proband 9



—x— Placebo —□— Ranitidin

Da nicht ausreichend lange nach der ersten Indometacin-Dosis Plasmaproben gewonnen wurden, zum Teil (Proband 1+6) nach 10 h kein Blut abgenommen wurde und zusätzlich, bedingt durch einen inter- und intraindividuell unterschiedlich ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf, die Indometacin-Plasmakonzentration nach ca. 5-7 h erneut anstieg, ließen sich sinnvollerweise nur die pharmakokinetischen Parameter C_{max} (daraus ungefähr abgeleitet t_{max}) und die AUC (0-7 bzw. 0-10 h) berechnen. Aufgrund der Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe ist auch die Bestimmung der maximalen Plasmakonzentration vorsichtig zu interpretieren (zum Beispiel Proband 3 und 9). Tabelle 13 zeigt diese pharmakokinetischen Parameter für Indometacin.

Tabelle 13. Einfluß einer Placebo- bzw. Ranitidintherapie auf pharmakokinetische Parameter nach einmaliger peroraler Gabe von 100 mg Indometacin an 9 freiwillige Probanden

Proband	C_{max} ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		t_{max} (h)		$AUC_{(0-10)}$ ($\mu\text{g h ml}^{-1}$)	
	Pla	Ran	Pla	Ran	Pla	Ran
1	5,91	19,18	1,5	1,0	9,70*	30,87*
2	6,59	6,80	1,5	3,0	20,72	15,66
3	3,77	8,47	1,5	2,0	26,02	19,82
4	3,19	3,81	2,0	1,5	11,25	14,62
5	7,42	6,25	1,0	1,5	18,88	10,73
6	5,44	6,60	3,0	2,0	15,34*	16,99*
7	5,59	4,05	1,5	1,5	20,79	16,64
8	3,22	6,08	1,5	3,0	8,81	25,81
9	9,48	14,87	0,5	0,5	24,53	26,79
\bar{x}	5,62	8,46	1,56	1,78	18,61 ^s	20,43 ^s
$\pm s$	2,07	5,17	0,68	0,83	5,98	7,57

*: AUC_{0-7}

^s: n = 8

Pla = Placebo; Ran = Ranitidin

Der statistische Vergleich zeigte, daß ein signifikanter Unterschied zwischen der Indometacinkinetik (C_{max} und AUC) unter gleichzeitiger Gabe von Placebo oder Ranitidin nicht festzustellen war.

Tabelle 14 zeigt für den einzelnen Probanden die jeweiligen Quotienten (Ranitidin/Placebo) für C_{max} und AUC.

Tabelle 14. Quotienten Ranitidin/Placebo für C_{max} und AUC von Indometacin bei 9 freiwilligen Probanden nach Einmalgabe (p.o.) von 100 mg

Proband	C_{max}	AUC ₀₋₁₀
1	3,25	3,18*
2	1,03	0,76
3	2,25	0,76
4	1,19	1,30
5	0,84	0,57
6	1,21	1,11*
7	0,72	0,80
8	1,89	2,93
9	1,57	1,09

*: AUC₀₋₇

Aufgrund der sehr hohen interindividuellen Streuung (Variationskoeffizient für die AUC 32 bzw. 37 %) konnten nur Angaben über individuelle Unterschiede gemacht werden. Nimmt man die aus Bioäquivalenzuntersuchungen stammenden 75/125 %-Grenzen als ein Maß für diese Abweichungen, so ergab sich folgendes:

Je 1 Proband wies einen Quotient $<0,75$ bei C_{max} bzw. AUC auf. 4 (44,4 %; C_{max}) bzw. 5 (55,5 %; AUC) der Quotienten lagen zwischen 0,75 und 1,25 und bei 4 bzw. 3 Probanden betrug der Quotient $>1,25$.

Bei Proband 1 und 8 war die AUC unter Ranitidin auf das 3-fache erhöht.

Einfluß von Ranitidin auf minimale Plasmakonzentrationen von Indometacin im Fließgleichgewicht (steady state).

Tabelle 15 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung der minimalen Plasmakonzentrationen von Indometacin im steady state (Tag 2-6, morgens vor der ersten Dosis) bei 8 bzw. 9 Probanden unter Placebo- oder Ranitidinbegleitmedikation.

Tabelle 15. Minimale Indometacin-Plasmakonzentrationen ($\mu\text{g ml}^{-1}$) im steady state unter Placebo oder Ranitidin

Proband	Therapie	
	Placebo	Ranitidin
1	0,698 \pm 0,250	1,025 \pm 0,302
2	0,626 \pm 0,216	0,837 \pm 0,484
3	1,627 \pm 0,583	0,380 \pm 0,147
4	0,579 \pm 0,227	1,410 \pm 0,443
5	0,803 \pm 0,512	0,394 \pm 0,074
6	0,937 \pm 0,174	1,234 \pm 0,259
7	1,051 \pm 0,407	1,342 \pm 0,711
8	1,001 \pm 0,425	-----*
9	1,106 \pm 0,236	0,955 \pm 0,493
$\bar{x} \pm s$ (n = 8)	0,928 \pm 0,342	0,947 \pm 0,396

Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 5)

*: Proband 8 hatte von Tag 3-6 unter der Ranitidintherapie kein Indometacin eingenommen.

Der statistische Vergleich zeigte, daß ein signifikanter Unterschied zwischen der minimalen Indometacin-Plasmakonzentration im steady state ($C_{ss, \min}$) unter gleichzeitiger Gabe von Placebo oder Ranitidin nicht festzustellen war.

5. Diskussion

Die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) sind die am häufigsten verwendeten Substanzen in der Therapie verschiedenster Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Sowohl die analgetischen und antiphlogistischen Wirkungen als auch die meisten unerwünschten Wirkungen dieser Substanzgruppe können mit der Hemmung der Synthese von Prostaglandinen (besonders PGE₂) erklärt werden (Robinson 1988, Vane 1971). Die häufigsten unerwünschten Wirkungen der NSAR betreffen den oberen Gastrointestinaltrakt, die sich als (teilweise auch asymptomatische) gastroduodenale Läsionen, peptische Ulcera oder Blutungen aus dem Gastroduodenaltrakt manifestieren können (Arvidsson et al. 1975, Beard et al. 1987, Bjarnason et al. 1987, Butt et al. 1988, Caradoc-Davies 1984, Clinch et al. 1987, Duggan et al. 1986, Henry et al. 1987, Jick und Porter 1978, Lanza et al. 1979, Larkai et al. 1987). Mit den H₂-Rezeptorantagonisten ("H₂-Blocker") Cimetidin, Etintidin, Famotidin, Nizatidin oder Ranitidin, die kompetitiv an den H₂-Rezeptoren die Histamin-vermittelte (basale und stimulierte) Säure- und Pepsinproduktion des Magens hemmen, stehen Substanzen zur Verfügung, mit denen es gelingt, die durch NSAR verursachten gastroduodenalen Schleimhautschädigungen zu verhindern oder zu therapieren

(Crocker et al. 1980, Kauffman und Grossman 1978, MacKercher et al. 1977, Konturek et al. 1983b, LoIudice et al. 1981, Welch et al. 1978). Zusätzlich bestehen Hinweise auf einen "cytoprotektiven" Effekt zum Beispiel beim Cimetidin (Guth et al. 1979, Ivey 1988, Romano et al. 1987).

Infolgedessen werden die NSAR immer häufiger zusammen mit H₂-Rezeptorantagonisten verordnet.

Die H₂-Rezeptorantagonisten (besonders Cimetidin) verursachen eine Reihe von Wechselwirkungen mit anderen Substanzen. Die Ergebnisse zahlreicher Studien zur pharmakokinetischen Interaktion von H₂-Rezeptorantagonisten mit anderen Arzneistoffen wurden in mehreren Übersichtsarbeiten zusammengefaßt (u.a. Kirch et al. 1984, Klotz und Reimann 1984, Reimann und Klotz 1986, Sedman 1984, Somogyi und Gugler 1982, Somogyi und Muirhead 1987). Pharmakokinetische Interaktionsstudien zwischen H₂-Rezeptorantagonisten und NSAR finden sich jedoch in der Literatur vergleichsweise nur selten (Conrad et al. 1984, Howes et al. 1983, Ochs et al. 1985, Sullivan et al. 1986, Trnavská et al. 1985).

Pharmakokinetische Interaktionen sind grundsätzlich möglich bei der Absorption, der Verteilung, dem Metabolismus und der Elimination. Tierexperimentelle Studien liefern in dieser Hinsicht nur erste Hinweise, die Ergebnisse lassen sich nur sehr begrenzt auf den Menschen übertragen. Dies

gilt insbesondere für die Elimination, die zum Beispiel bei Ratten überwiegend biliär, beim Menschen hingegen renal erfolgt (s. für die NSAR und H₂-Rezeptorantagonisten u.a. Brogden et al. 1980, 1981, 1982, Helleberg 1981, Taylor et al. 1978, Kroemer und Klotz 1987). Am besten geeignet erscheinen daher Studien zum Metabolismus. Hier konnte davon ausgegangen werden, daß die Metabolisierung sich für Ratten und Menschen entsprechen. Außerdem stand in begrenztem Umfang auch menschliches Lebergewebe zur Verfügung, so daß für diesen Teil der Pharmakokinetik auch direkte Vergleiche zwischen Ratte und Mensch möglich waren.

Die metabolischen Interaktionen zwischen H₂-Rezeptorantagonisten und NSAR können sogenannte Phase I-Reaktionen (Oxidation, Reduktion, Hydrolyse) und/oder Phase II-Reaktionen (Konjugation mit Glucuronsäure, Schwefelsäure, Aminosäuren, Glutathion) betreffen. Da mehrfach nachgewiesen wurde, daß die H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin und Ranitidin die Bildung von in der Regel biologisch inaktiven und wasserlöslichen Phase II-Metaboliten nicht hemmen (Breen et al. 1982, Kirch et al. 1984, Klotz und Reimann 1984, Somogyi und Muirhead 1987), konnte sich in dieser Arbeit auf die Untersuchung der Phase I-Reaktionen beschränkt werden. Das Cytochrom P-450-abhängige mischfunktionelle Oxygenasesystem der Leber hat

dabei die größte Bedeutung.

In vitro-Versuche mit Lebermikrosomen von Ratte und Mensch zeigten, daß Cimetidin und in geringerem Maße Ranitidin an Cytochrome P-450 gebunden werden und somit über eine Hemmung des für den oxidativen Arzneistoffmetabolismus wichtigen mischfunktionellen Monooxygenasesystems mit anderen Pharmaka interferieren können (Bell et al. 1981, Reimann und Klotz 1986, Rendić et al. 1984); dies scheint für Famotidin nicht zuzutreffen (Klotz et al. 1985).

5.1. Interaktionen von Cimetidin und Etintidin mit dem Cytochrom-P-450-System der Rattenleber.

Für die Beurteilung von möglichen Interaktionen infolge Konkurrenz um arznei- bzw. fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Leber können in vitro-Untersuchungen mit Lebermikrosomen studiert werden. In diesen Untersuchungen kann als Maß für die Affinität der H₂-Rezeptorantagonisten zum Cytochrom P-450 die Bestimmung der spektralen Dissoziationskonstante(n) herangezogen werden (s. 5.1.1.). Zusätzlich bieten sich Messungen von Enzymkinetiken von Cytochrom P-450-abhängigen Modellreaktionen und Untersuchungen zur möglichen Hemmung dieser Oxidationen durch H₂-Rezeptorantagonisten an (s. 5.1.2.).

5.1.1. Optische Differenzspektren

Die aufgenommenen Differenzspektren weisen darauf hin, daß Cimetidin und Etintidin mit dem Cytochrom P-450-System der Rattenleber durch Bindung interagieren. Für diese Bindung ist wahrscheinlich der substituierte Imidazolring des Cimetidins und Etintidins verantwortlich (Klotz und Reimann 1984, Rendic et al. 1979, 1983). Hierfür spricht zum Beispiel die Erkenntnis, daß viele substituierte Imidazole über eine Bindung an Cytochrome P-450 als Inhibitor mikrosomaler Oxidationsreaktionen agieren (Wilkinson et al. 1972, 1974) und daß die Furan bzw. Guanidinothiazol haltigen H₂-Rezeptorantagonisten Ranitidin bzw. Famotidin kaum bzw. nicht an Cytochrome P-450 gebunden werden (Klotz und Reimann 1984, Klotz et al. 1985). Gegen diese Theorie spricht, daß der Imidazol haltige H₂-Rezeptorantagonist Oxmetidin (Klotz und Reimann 1984) und auch das Cimetidinsulfoxid (Rendić et al. 1983, Speeg et al. 1982) kaum an Cytochrome P-450 gebunden werden.

Im Gegensatz zum Typ I-Bindungsspektrum, das zum Beispiel beim Hexobarbital durch ein Absorptionsmaximum bei 386 nm und ein Absorptionsminimum bei 421 nm charakterisiert ist (Kahl und Kahl 1981), ergeben Cimetidin und Etintidin ein sogenanntes Typ II-Bindungsspektrum (Schenkman et al. 1967), das in der Regel durch ein Minimum bei ca. 390 und

ein Maximum bei ca. 425 bis 430 nm charakterisiert ist. Typ II-Substrate, wie zum Beispiel Metyrapon, sind häufig stickstoffhaltige lipophile Basen, für die eine Interaktion des Stickstoffatoms über die 6. Bindungsstelle des Eisens im Hämanteil (prosthetische Gruppe) des Cytochroms angenommen wird und somit die spektralen Veränderungen (infolge spin state-Änderungen des dreiwertigen Fe) hervorrufen (Kahl und Kahl 1981).

In der doppelt-reziproken Auftragung (ΔA^{-1} vs. $[S]^{-1}$) wurden keine Geraden, sondern zum Ursprung abwärts gebogene ("curvilineare") Verläufe erhalten. Demzufolge genügten die spektralen Veränderungen (in Abhängigkeit der Substratkonzentration) keiner einfachen Hyperbel nach Michaelis und Menten sondern einer aus mindestens zwei Hyperbeln zusammengesetzten Funktion. Dies läßt darauf schließen, daß Cimetidin und Etintidin an mindestens zwei verschiedene Cytochrome P-450 gebunden werden, mit um den Faktor 5-10 unterschiedlichen (spektralen) Dissoziationskonstanten (K_s). In Übereinstimmung mit publizierten Daten für Cimetidin (Rendic et al. 1979, 1983, 1984, Speeg et al. 1982) wurden rechnerisch zwei spektrale Dissoziationskonstanten erhalten, die mehr als eine Bindungsstelle repräsentieren. Diese Bindungsstellen der Cytochrome P-450 besitzen unterschiedliche Affinitäten für diese beiden Verbindungen, wobei die niedrig affine (höherer K_s -Wert)

eine größere ΔA_{max} aufwies und somit in höherer Konzentration vorhanden war.

Obwohl die von Rendić et al. (1979, 1984) und Speeg et al. (1982) publizierte K_s -Werte für Cimetidin (für Sprague-Dawley-Ratten bzw. Schweine) niedriger liegen als die hier gemessenen (für Wistar-Ratten), zeigt der direkte Vergleich mit Etintidin, daß dieses eine mindestens 5-fach höhere Affinität zum Cytochrom P-450-System der männlichen Rattenleber als Cimetidin hat. Dies könnte durch die höhere Elektronendichte der Ethinylgruppe und durch die dadurch bedingte höhere Lipophilie des Etintidins verursacht sein. Der Grund für den Verlust der hochaffinen Bindungsstelle(n) für Etintidin, aber nicht für Cimetidin nach Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital ist unklar. Einerseits könnte die Bildung oder die Aktivität eines spezifischen Cytochrom P-450 Isoenzym für diesen H_2 -Rezeptorantagonisten unterdrückt sein, andererseits könnte aber auch eine starke Induktion von Cytochrom(en) P-450 mit niedriger Affinität das möglicherweise nicht induzierte hoch affine Cytochrom P-450 maskieren.

Um eventuell unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Cytochromen P-450 erkennen zu können, wurden die Tiere mit Induktoren Cytochrom P-450-abhängiger Monooxygenasen vorbehandelt. Die nach unterschiedlichen Vorbehandlungen mit Induktoren verschiedener Cytochrome P-450 (P-450_b durch

Phenobarbital, P-450_c (P-448) durch 5,6-Benzoflavon und mehrerer Cytochrome durch polychlorierte Biphenyle (Conney 1986)) durchgeführten Bindungsexperimente mit Cimetidin und Etintidin weisen nicht auf unterschiedliche Affinitäten zu diesen Cytochromen P-450 hin.

Die mit menschlichen Lebermikrosomen erhaltenen K_m -Werte für Cimetidin wurden von Rendić et al. (1984) und Klotz et al. (1985) mit ca. 0,75 bzw. 0,87 mmol l⁻¹ angegeben. Diese würden im Vergleich zu den hier vorliegenden Daten mit Rattenlebermikrosomen einer niedrigen Affinität des humanen Cytochrom P-450 für Cimetidin entsprechen. Wegen der relativ hohen Dosierung von Cimetidin ist aber gleichwohl mit Interaktionen zu rechnen, da entsprechend inhibitorische Gewebekonzentrationen in der Leber erreicht werden.

Mit einer wesentlich höheren Affinität zum Cytochrom P-450 bei ca. 50 % niedrigerer Dosierung (Brater et al. 1982a, Dammann et al. 1984) dürfte dies um so mehr für Etintidin zutreffen.

5.1.2. Cytochrom P-450-abhängige Modellreaktionen der Rattenleber.

Als Modellsubstrate für verschiedene Cytochrome P-450 der Rattenleber dienen Benzphetamin, Ethoxyresorufin und Benzo(a)pyren.

Mit Benzphetamin als Substrat für Phenobarbital-induzierbare Cytochrome P-450 (Werringloer 1978) konnten keine Unterschiede in der Hemmung der N-Demethylierung durch Cimetidin und Etintidin beobachtet werden. Etintidin ist ein kompetitiver Inhibitor dieser Enzymreaktion mit relativ geringer Potenz (Inhibitorkonstante (K_i): ca. 4 mmol l^{-1}).

Die Umsatzraten für Benzo(a)pyren sind sowohl durch Phenobarbital- als auch durch 5,6-Benzoflavon-Vorbehandlung zu steigern. Bei einer Substratkonzentration von $20 \text{ } \mu\text{mol Benzo(a)pyren l}^{-1}$ hemmen Cimetidin und Etintidin die Benzo(a)pyren-Oxidation in Lebermikrosomen Phenobarbital-vorbehandelter Ratten äquipotent. Verdoppelt man die Substratkonzentration, so erweist sich Cimetidin im Gegensatz zu Etintidin nur noch als schwacher Inhibitor. Wenn bei Erhöhung der Substratkonzentration die Hemmung geringer wird, spricht dies für eine kompetitive Hemmung. Hingegen berichteten Pelkonen und Puurunen (1980) bei Kontrolltieren und Phenobarbital-vorbehandelten Ratten (Sprague-Dawley) eine nicht-kompetitive Hemmung der Benzo(a)pyren-Oxidation durch Cimetidin (K_i : $1-10 \text{ mmol l}^{-1}$). Für ein besseres Verständnis dieser Effekte müßten die einzelnen Benzo(a)pyren-Metabolite bestimmt und nicht die Gesamtfluoreszenz gemessen werden. Im Gegensatz zur Inhibition bei Phenobarbital-

vorbehandelten Tieren hemmen weder Cimetidin noch Etintidin die Benzo(a)pyren-Oxidation in Mikrosomen 5,6-Benzoflavon-vorbehandelter Ratten. Obwohl durch Vorbehandlung der Ratten mit diesen beiden Induktoren wenigstens zum Teil die Bildung der gleichen fluoreszierenden Metaboliten (hauptsächlich 3-Hydroxybenzo(a)pyren) gesteigert wird, hemmen Cimetidin und Etintidin somit nur das/die Phenobarbital-induzierbare(n) Cytochrom(e) P-450.

Überraschend ist der Befund, daß Etintidin, im Gegensatz zu Cimetidin, ein potenter kompetitiver Inhibitor der Ethoxyresorufin-O-Deethylierung ist (K_i : ca. $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$). Die O-Deethylierung von Ethoxyresorufin gilt als Modellreaktion sogenannter Cytochrom P-"448"-abhängiger Monooxygenasen in Rattenlebermikrosomen (Burke und Mayer 1974, Prough et al. 1978). Diese Enzymreaktion ist erst nach Vorbehandlung der Tiere mit bestimmten Enzyminduktoren (3-Methylcholanthren, 5,6-Benzoflavon, polychlorierte Biphenyle (PCB), 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)) deutlich meßbar. Dieser Unterschied in der Hemmbarkeit der Ethoxyresorufin-O-Deethylierung durch Etintidin, aber nicht durch Cimetidin deutet darauf hin, daß das klassische Cytochrom P-"448" in Rattenlebermikrosomen zwar eine Affinität zum Etintidin aber nicht zum Cimetidin besitzt.

Obgleich der Metabolismus von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH, polycyclic aromatic hydrocarbons) nicht unmittelbar zum Thema der Arzneimittelinteraktion gehört, erschien es dennoch wichtig, für Etintidin der Frage nachzugehen, wie sich der Metabolismus der PAH in Gegenwart von Etintidin verändert, insbesondere wegen der durch Cytochrom P-450-katalysierten Aktivierung zu ultimatsten Cancerogenen (Jacob et al. 1981a, Wiebel 1980). Zur differenzierten Untersuchung wurde hier als Substrat das ebenfalls als cancerogen eingestufte Benz(a)anthracen eingesetzt, weil für diesen Kohlenwasserstoff umfangreiche Untersuchungen des vollständigen Metabolitenmusters und zur Regioselektivität der primären und sekundären Oxidation vorliegen (Jacob et al. 1981a).

In Gegenwart von Etintidin waren also diejenigen Cytochrome P-450 inhibiert, die bei Kontrolltieren für die Bildung fluoreszierender Benzo(a)pyren-Metabolite hauptverantwortlich sind, inklusive derjenigen, die auch durch Phenobarbital induzierbar sind. Und obgleich zusätzlich diejenigen Cytochrome P-450 gehemmt waren, welche die Ethoxyresorufin-O-deethylierung katalysieren (gemeinhin als Cytochrom(e) P-448 bezeichnet) hat das Etintidin, gemessen an dem Gesamtumsatz, nur einen relativ geringen Effekt auf den Metabolismus von Benz(a)anthracen in Lebermikrosomen 5,6-Benzoflavon-vorbehandelter Ratten.

Eine Dosisabhängigkeit der Effekte von 0,24 und 0,48 mmol Etintidin l^{-1} auf das Benz(a)anthracen-Metabolitenprofil konnte nicht gefunden werden.

Die scheinbar paradoxe Steigerung der Umsatzraten einiger hydroxylierter Metaboliten ist auch für andere Inhibitoren beobachtet worden (Wiebel et al. 1971). Bisher ist es nicht gelungen, den Mechanismus dieser Aktivierung aufzuklären.

Da bisher noch nicht bekannt ist, welche und wieviele Cytochrome P-450 am Benz(a)anthracen-Metabolismus beteiligt sind und welche Regioselektivität sie besitzen, können aus den vorliegenden Inhibitions- und Aktivierungsergebnissen noch keine weiteren Schlüsse gezogen werden. Vermutlich besitzt aber das Etintidin zu den verschiedenen beteiligten Cytochromen sehr unterschiedliche Affinitäten.

Aus den Dosis - Wirkungskurven von 7,8 Benzoflavin (α -Naphthoflavin), das in niedriger Konzentration eine Aktivierung und in hoher Konzentration eine Hemmung bewirkt (Wiebel et al. 1971), könnte man vermuten, daß auch beim Etintidin eine niedrige Affinität zu Cytochromen P-450 eine Aktivierung und eine hohe Affinität eine Inhibition verursacht.

Für die 10,11-Oxidation ist aus Untersuchungen von Jacob et al. (1981a) bekannt, daß diese Oxidation nach Vorbehandlung

mit 3-Methylcholanthren-Typ-Induktoren (wie 5,6-Benzo-flavon = β -Naphthoflavon) nicht gesteigert, sondern vermindert ist. Wahrscheinlich ist dies ein Ausdruck für eine Hemmung der Neusynthese dieses spezifischen Enzyms. Da die an Position 10,11 oxidierte Verbindung der Hauptmetabolit bei Inkubationen von Benz(a)anthracen mit Lebermikrosomen nicht induzierter Ratten ist (Jacob et al. 1981a), kann angenommen werden, daß bei Kontrolltieren die Metabolisierung von Benz(a)anthracen durch Etintidin hemmbar ist.

Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß weder die Benzo(a)pyren-oxidierenden konstitutiven und Phenobarbital-induzierbaren P-450 Cytochrome noch das Ethoxyresorufin umsetzende Cytochrom P-450 alleinigen oder wesentlichen Anteil am Benz(a)anthracen-Metabolismus besitzen. Offenbar sind somit noch andere konstitutive und induzierbare Cytochrome P-450 beteiligt und möglicherweise auch für die toxische Aktivierung des Benz(a)anthracens (und des Benzo(a)pyrens?) (mit)verantwortlich.

Weitere Schlüsse wird man erst erwarten können, wenn eine präparative Trennung der verschiedenen, sich am Benz(a)anthracen-Metabolismus beteiligenden Cytochrome P-450 gelungen ist.

Die Befunde zur Hemmung Cytochrom P-450-abhängiger

Modellreaktionen weisen darauf hin, daß sowohl Cimetidin als auch im besonderen Maße Etintidin in der Lage sind, Cytochrom P-450-katalysierte Monooxygenasereaktionen von NSAR zu hemmen.

5.2. Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin in Ratten- und Menschenlebermikrosomen.

Der Metabolismus von Cimetidin ist bisher kaum untersucht worden. Beim Menschen ist das N-Glucuronid der Hauptmetabolit (Mitchell et al. 1982b).

Der Phase I-Hauptmetabolit bei der Ratte und beim Menschen ist das Sulfoxid-Derivat (Taylor et al. 1978). Weiterhin sind als Metabolite ein 5-Hydroxymethyl- und ein Guanylharnstoff-Derivat sowie N-Desmethylcimetidin beschrieben worden (Mitchell et al. 1982a, 1982b, Taylor und Cresswell 1975, Taylor et al. 1978, Zbaida et al. 1984). Angaben zum Metabolismus von Etintidin finden sich in der Literatur nicht. Ebenfalls fehlten bisher Untersuchungen zum in vitro-Metabolismus dieser H₂-Rezeptorantagonisten und zum biochemischen Mechanismus der Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin.

Neben Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenasen könnten auch Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO) (Dixon et al. 1985, Dixon und Udeagha 1986, Oldham und Chenery 1985), andere mikrosomale Enzymsysteme (Fukushima et al. 1978)

oder auch eine nicht-enzymatische Reaktion, wahrscheinlich durch Peroxide oder Peroxidradikale (Lipidperoxidation) für die Oxidation am Schwefelatom verantwortlich sein.

Cimetidin und Etintidin werden durch Ratten- und Menschenlebermikrosomen zum Sulfoxid metabolisiert. Diese Sulfoxide lassen sich in Mikrosomensuspensionen dünnschichtchromatographisch detektieren und hochdruckflüssigkeitschromatographisch genau und empfindlich quantifizieren.

Zur Differenzierung zwischen der Cytochrom P-450 und FMO-katalysierten mikrosomalen Oxidation von Fremdstoffen ist es üblich, Inhibitoren einzusetzen oder auf andere Weise jeweils ein Enzym zu blockieren. Zum Studium der FMO-Aktivität verwenden die meisten Autoren n-Octylamin ($3-4 \text{ mmol l}^{-1}$) als Inhibitor des Cytochrom P-450-Systems (Hajjar und Hodgson 1982, Oldham und Chenery 1985, Poulsen et al. 1979, Tynes und Hodgson 1983, Ziegler 1980), weil dadurch gleichzeitig die O_2 -Bindung an die FMO erhöht wird (Ziegler 1980). Ob dies auch für die mikrosomale FMO der Rattenleber zutrifft, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Cashman und Ziegler 1986, Poulsen et al. 1974, Tynes und Hodgson 1985). Als weitere Inhibitoren sind SKF 525-A (Hoodi und Damani 1984, Kreft und Breyer-Pfaff 1979,

Porter und Neal 1978) und Kohlenmonoxid (Hartmann et al. 1983, Hoodi und Damani 1984, Kreft und Breyer-Pfaff 1979, Porter und Neal 1978, Vignier et al. 1985) gebräuchlich. Gerade letztere Methode ist jedoch, außer dem Einsatz von Antikörpern, am besten geeignet, da nur durch CO alle P-450-Cytochrome gleichmäßig inhibiert werden.

Umgekehrt wird die FMO durch Präinkubation der Mikrosomen bei 37-50 °C in Abwesenheit von NADPH zerstört (Dyroff und Neal 1983, Poulsen et al. 1979, Uehleke 1971, Ziegler 1980) oder durch Zugabe von N,N-Dimethylanilin (Poulsen et al. 1979, Ziegler 1980) und/oder Methimazol (Thiamazol) (Cashman und Ziegler 1986, Young und Mehendale 1987) kompetitiv gehemmt.

Da mit N,N-Dimethylanilin in einer Konzentration von 0,4 mmol l⁻¹ (scheinbare K_M = 0,003 mmol l⁻¹ für Schweineleber-FMO (Ziegler 1980)) und Methimazol in einer Konzentration von 1 mmol l⁻¹ (scheinbare K_M = 0,017 mmol l⁻¹ für Mausleber-FMO (Tynes und Hodgson 1985)) und auch durch Präinkubation der Mikrosomen (45 min 37 °C) keine Hemmung der Sulfoxidation auftrat, scheidet bei der Ratte und dem Menschen eine Beteiligung der FMO bei der Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin aus.

Die beobachtete geringgradige Aktivitätsminderung widerspricht dieser Schlußfolgerung nicht, da aus anderen Messungen Cytochrom P-450 katalysierter Oxidationen (z.B.

Ethoxyresorufin-O-Deethylierung, Digitoxin-15'-Oxidation, Benz(a)anthracen-Oxidation) eine Aktivitätsminderung bei Präinkubation der Mikrosomen bekannt ist (Schmolzt, unveröffentlicht).

Bei der Ratte hatte die Hemmung des Cytochrom P-450 durch CO oder n-Octylamin eine deutliche Hemmung der Sulfoxidation zur Folge, so daß aus den Versuchen geschlossen werden kann, daß die Sulfoxidation zumindest hauptsächlich von (einer) Cytochrom P-450-abhängigen Monooxygenase(n) katalysiert wird. Diese(s) Enzym(e) (ist)sind durch eine Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital oder 5,6-Benzoflavon nicht induzierbar. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den am Schwein erhobenen Befunden, für das Oldham und Chenery (1985) eine FMO-katalysierte S- und N-Oxidation von Cimetidin und Ranitidin indirekt aus O₂-Verbrauchsmessungen abgeleitet haben. Dies sind die einzigen überhaupt bisher publizierten Befunde über die in vitro-Sulfoxidation von Cimetidin. Die von Dixon et al. (1985) aufgrund von in vivo-Experimenten angegebene Induktion der Sulfoxidation von Cimetidin nach Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital steht nur scheinbar im Widerspruch zu den hier vorliegenden Ergebnissen der konstant gebliebenen Aktivität pro mg mikrosomales Protein; denn infolge der durch Phenobarbital verursachten Hypertrophie des endoplasmatischen Retikulums

resultiert bei konstanter spezifischer Aktivität eine erhöhte Oxidationsrate pro Gesamtleber.

Die ebenfalls von Dixon et al. (1985) angegebene in vivo-Hemmung der Sulfoxidation von Cimetidin durch Methimazol, nicht aber durch Metyrapon, einem wie CO an das reduzierte Cytochrom P-450 bindenden Liganden, ist aus den publizierten Meßdaten nicht nachvollziehbar.

Da auch eine Hemmung der Lipidperoxidation durch Zugabe von Glutathion und EDTA die Bildung der Sulfoxide nicht beeinflusste, kann aus diesen Ergebnisse gefolgert werden, daß die Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin bei der Ratte ausschließlich durch Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen katalysiert wird.

Auch beim Menschen wird die Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin nicht von der FMO katalysiert. Indes läßt sich aus den Versuchen nicht klar ableiten, daß die Reaktion ausschließlich über Cytochrom P-450 erfolgt. In Abwesenheit von NADPH und NADPH-regenerierendem System (Isocitrat und Isocitratdehydrogenase) wurden ebenfalls Sulfoxide gemessen und in Gegenwart von NAD oder NADP wurden 50-66 % der maximalen Umsatzraten erzielt. Abgesehen davon, daß noch Spuren an Pyridinnukleotiden in der Mikrosomenfraktion vorhanden gewesen sein könnten, ist auch an die Möglichkeit

anderer Reaktionen zu denken. In Betracht kämen zum Beispiel eine Regeneration von NADPH aus NADP durch "endogene" Substrate und Oxidoreduktasen und die Bildung von Hydroperoxiden und Peroxidradikalen unabhängig von Cytochrom P-450 oder der FMO unter Mitwirkung von NAD bzw. daraus gebildetem NADH.

Die mögliche Beeinflussung der Sulfoxidation durch eine Rückreduktion über NADH- oder NADPH-abhängige Oxidoreduktasen spielte unter den gewählten in vitro-Bedingungen sicher keine Rolle. Denn bei Einsatz der Sulfoxide als Substrate der Mikrosomen konnte mit und ohne Zusatz von NADH oder NADPH kein Cimetidin oder Etintidin nachgewiesen werden. Das im Urin aufgefundene Cimetidin nach oraler Gabe von [2-¹⁴C] Cimetidinsulfoxid (Mitchell et al. 1982c) ist wahrscheinlich auf die Reduktion des Sulfoxids durch Darmbakterien zurückzuführen (Taylor et al. 1978). Andererseits wurde aber bei Inkubation der Sulfoxide unter aeroben Bedingungen in Gegenwart von NADPH keine Sulfone gefunden. Auch in vivo ist ja bisher dieser mögliche Metabolit nicht nachgewiesen worden. Er kann auch nur in allenfalls geringer Menge durch das Cytochrom P-450-System gebildet werden, da das Sulfoxid eine wesentlich geringere Affinität zum Cytochrom P-450 als Cimetidin besitzt (Rendic et al. 1983, Speeg et al. 1982). In Anwesenheit von unverändertem H₂-Rezeptorantagonisten müßte

diese Weiteroxidation zum Sulfon gehemmt sein, falls die Sulfoxid-Oxidation von demselben Cytochrom P-450 katalysiert würde, das für die primäre Sulfoxidation verantwortlich ist.

Untersuchungen mit Dibenzothiophen (Hoodi und Damani 1984, Vignier et al. 1985) und Benzo(b)naphthothiophen (Jacob et al. 1986, Schmoldt et al. 1986) einerseits und den Phenothiazinen andererseits ergaben ganz unterschiedliche Relationen zwischen Sulfonen und Sulfoxiden (Breyer-Pfaff et al. 1978, Hartmann et al. 1983, Kreft und Breyer-Pfaff 1979, Traficante et al. 1979).

Der komplexere Mechanismus der Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin beim Menschen könnte die Grundlage für weitere, vom Cytochrom P-450-System unabhängige Interaktionen sein.

5.3. Interaktionen von Histamin H₂-Rezeptorantagonisten mit nichtsteroidalen Antirheumatika.

Für die Untersuchung pharmakokinetischer Interaktionen zwischen H₂-Rezeptorantagonisten und NSAR kommen Bestimmungen pharmakokinetischer Parameter der NSAR nach Einzeldosis- bzw. Mehrfachapplikation in Frage. Da diese Untersuchungen aufwendige (zeit-, personal- und kostenintensive) klinische Studien und analytische

Verfahren aus biologischem Material (in der Regel Blut bzw. Plasma oder Serum und Urin) voraussetzen, können in vitro-Experimente - zusätzlich, nicht alternativ - präklinische Hinweise für mögliche Interaktionen liefern. Hier bieten sich Untersuchungen mit der mikrosomalen Fraktion der Leber an, in der die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme vorhanden sind.

5.3.1. Einfluß von Ranitidin auf den oxidativen Metabolismus von Diclofenac.

Der Histamin H₂-Rezeptorantagonist Ranitidin kann aufgrund seiner höheren Potenz gegenüber Cimetidin und Etintidin (Brater et al. 1982a, 1982b, Brogden et al. 1982) in einer, im Vergleich zum Cimetidin ca. 4-fach geringeren Dosierung zur Therapie und Prophylaxe peptischer Ulcera eingesetzt werden. Da Ranitidin eine sehr viel niedrigere Affinität zum Cytochrom P-450-System (keine hochaffine Bindungsstelle) der Ratten- und Menschenleber besitzt (Bell et al. 1981, Knodell et al. 1982, Rendić et al. 1982, 1984, Speeg et al. 1982) ist das Interaktionspotential dieser Substanz kleiner als bei Cimetidin (Kirch et al. 1984, Klotz und Reimann 1984, Reimann und Klotz 1986).

Das nichtsteroidale Antirheumatikum Diclofenac wird hauptsächlich durch Oxidation an den Positionen 3', 4', und 5 zu den Hydroxy-Derivaten metabolisiert und nach

Konjugation mit Glucuronsäure oder Sulfat vorwiegend renal eliminiert (Stierlin et al. 1979, Stierlin und Faigle 1979, Schneider und Degen 1981). Nur ca. 5 % einer peroralen Dosis werden als unveränderte Substanz frei und konjugiert mit dem Urin ausgeschieden (Brogden et al. 1980).

Der in vitro-Metabolismus von Diclofenac in Ratten- und Menschenlebermikrosomen ist bisher nicht untersucht worden. Sehr wahrscheinlich werden die Ringhydroxylierungen am Diclofenacmolekül durch Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen katalysiert.

In Übereinstimmung mit den von Fowler et al. (1983, 1986) publizierten in vivo-Daten beim Menschen wird Diclofenac von Ratten- und Menschenlebermikrosomen hauptsächlich zum 4'-Hydroxy- (und 5-Hydroxy-)diclofenac metabolisiert (S. 84, Tab. 11).

In äquimolarer Konzentration, die in etwa physiologische Verhältnisse repräsentiert, hat der H₂-Rezeptorantagonist Ranitidin keinen Einfluß auf die 4'- und 5-Hydroxylierung von Diclofenac in Ratten- und Menschenlebermikrosomen. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß Ranitidin keinen Einfluß auf den oxidativen Metabolismus von Diclofenac ausüben sollte.

Da keine der bekannten Indometacinmetaboliten (vor allem 5-O-Desmethylinometacin) zur Verfügung standen, war eine Untersuchung des Metabolismus dieses NSAR nicht möglich.

5.3.2. Analytik der H₂-Rezeptorantagonisten und NSAR im menschlichen Plasma.

Bei allen Untersuchungen pharmakokinetischer Interaktionen sind sensitive, genaue und reproduzierbare analytische Verfahren für die zu bestimmenden Substanzen notwendig. Die Nachweisgrenze sollte so niedrig liegen, daß eine hinreichend genaue Bestimmung der Eliminationshalbwertszeit möglich ist. Vor allem bei Studien mit nicht-stationären Probanden/Patienten sollte auch die Einnahme derjenigen Substanzen überwacht werden, deren Pharmakokinetik nicht untersucht wird ("Compliance"). Diese Substanzen sind bei Interaktionsstudien zwischen NSAR und H₂-Rezeptorantagonisten in der Regel die letztgenannten.

Für die drei H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin, Etintidin und Ranitidin konnten hier hochdruckflüssigkeitschromatographische (HPLC) Verfahren entwickelt werden, die auch eine Bestimmung der minimalen steady state-Konzentrationen im menschlichen Plasma ermöglichen (Variationskoeffizient (VK) für die Genauigkeit <7 %, mit einer Ausnahme). Zusätzlich ist es möglich die Hauptmetaboliten der Phase I-Reaktion Cimetidinsulfoxid und Etintidinsulfoxid gleichzeitig zu bestimmen. HPLC-Verfahren sind für die Bestimmung der H₂-Rezeptorantagonisten die zur Zeit geeignetsten, da sie eine genaue,

sensitive, reproduzierbare und häufig auch schnelle Bestimmung erlauben. Interferenzen durch endogene Plasma- und/oder Urinbestandteile müssen durch geeignete Reinigungs- und Extraktionsverfahren abgetrennt werden; hierfür ist die Festphasenextraktion besonders geeignet. Da die genannten H_2 -Rezeptorantagonisten schwer bzw. nicht verdampfbar sind, kommen gaschromatographische Trennverfahren nicht in Betracht.

Hingegen sind gaschromatographische Trennverfahren mit anschließender Detektion (z.B. Flammen-Ionisations-Detektor (FID), Elektroneneinfang-Detektor (ECD, electron capture detector) oder Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS) Kopplung) für die Bestimmung der NSAR Diclofenac und Indometacin gebräuchlich (Ferry et al. 1974, Helleberg 1976, 1981, Schneider und Degen 1981, Stierlin et al. 1979, Stierlin und Faigle 1979). Da in der Regel für diese gaschromatographischen Bestimmungen eine vorhergehende Derivatisierung notwendig ist, haben sich mit der Weiterentwicklung hochdruckflüssigkeitschromatographischer Trennverfahren und Detektionsmöglichkeiten (z.B. Fluoreszenzdetektor, Photodioden-Array-Detektor) die HPLC-Verfahren auch für die NSAR zunehmend durchgesetzt (Bakar und Niazi 1983, Bechgaard et al. 1982, Derendorf et al. 1986, Richardson et al. 1985, McVerry et al. 1986).

Für die Analytik der wichtigsten NSAR im Plasma bzw. Serum konnte ein in weiten Teilen einheitliches Extraktionsverfahren mit anschließender UV-Detektion erarbeitet werden, das die Bestimmung pharmakokinetischer Parameter ermöglicht. Die Verfahren sind hinreichend sensitiv für die Bestimmung der Eliminationshalbwertszeit, reproduzierbar und genau (VK <10 %).

Für eine pharmakokinetische Interaktionsstudie, in der der Einfluß von Ranitidin bzw. Misoprostol auf die Einzeldosis-Kinetik und minimale steady state-Plasmakonzentrationen von Indometacin im Vergleich zur Placebogabe untersucht werden sollte, konnte diese HPLC-Methode in praxi an ca. 800 Einzelmessungen geprüft werden (5.3.3.).

Da diese Studie von vornherein auf die Untersuchung des Nutzens eines H₂-Rezeptorantagonisten (Ranitidin) oder eines synthetischen Prostaglandinderivates (Misoprostol) abgestellt war (Objektivierung der Schleimhautschädigung durch Gastroskopie), ließen sich nicht alle wünschenswerten Bedingungen für eine optimale Pharmakokinetikstudie durchsetzen.

5.3.3. Einfluß von Ranitidin auf die Pharmakokinetik und minimale Plasmakonzentration im steady state von Indometacin.

Auf den Einfluß des Prostaglandin E₁-Derivates Misoprostol.

auf die Pharmakokinetik und minimale steady state-Plasmakonzentrationen von Indometacin wurde nicht eingegangen, da Prostaglandine, vor allem der E-Serie (und deren Derivate) durch Stimulierung der Sekretion von Elektrolyten und Wasser - vorwiegend im Dünndarm - und zusätzlich durch Kontraktion der glatten Längsmuskulatur des Gastrointestinaltraktes starke Diarrhoen auslösen können. Diese Diarrhoen traten auch während dieser Studie auf. Hierdurch sind eventuell auftretende pharmakokinetische Interaktionen nicht sicher zu bestimmen und schwer zu interpretieren.

Die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von Indometacin unter gleichzeitiger Gabe von Ranitidin im Vergleich zur Placebothherapie sind vorsichtig zu interpretieren:

Eine Bestimmung der Plasmaeliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) war nicht möglich, da nicht ausreichend lange nach der ersten peroralen Dosis von Indometacin Blutentnahmen erfolgten. Statt nach 10 Stunden hätte die letzte Blutentnahme erst nach 24 Stunden ($3-4 \times t_{1/2}$) erfolgen dürfen. Aus diesem Grund ist auch eine Berechnung der Gesamt-AUC (area under the curve, Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve) und eine Angabe der Absorptionsgeschwindigkeitskonstanten (k_a) nicht möglich gewesen, so daß eventuell auftretende Interaktionen während der Absorption nicht sicher erkannt worden wären. Der

Vergleich der Zeiten bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration (t_{max}) allein reicht hierfür nicht aus. Durch die pH-Wert Erhöhung des Magensaftes durch Ranitidin (und Misoprostol) können theoretisch solche Arzneimittel in ihrer Absorption beeinflusst werden, welche vorrangig im stark sauren Magenmilieu in undissoziierter Form vorliegen und resorbiert werden. Hierzu gehören die meisten nichtsteroidalen Antirheumatika als Arylessig- bzw. Arylpropionsäure-Derivate. Die von Howes et al. (1983) bei längerfristiger Komedikation von Cimetidin und Indometacin gefundenen niedrigeren steady state-Plasmakonzentrationen von Indometacin (ohne klinisch bemerkbares Nachlassen des antiphlogistischen Effektes) können durch eine verminderte Resorption von Indometacin durch die gleichzeitige Cimetidin-Einnahme erklärt werden.

Durch die erheblichen intra- und interindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik des Indometacins (unterschiedlich ausgeprägter enterohepatischer Kreislauf (Helleberg 1981)) können, zusätzlich bedingt durch einzelne unterlassene Blutentnahmen statistische Auswertungen bei nur 9 Probanden nur mit Vorbehalten erfolgen.

Da auch bei den minimalen Plasmakonzentrationen im steady state (Tag 2-6 der Studie, morgens vor der ersten Dosis) relativ große biologische Schwankungen auftraten, diese aber auch nicht durch die gleichzeitige Ranitidingabe

verändert wurden, konnte der Effekt von Ranitidin auf die Pharmakokinetik nach Einmalgabe (maximale Plasmakonzentration, AUC_{0-10}) und die minimalen Plasmakonzentrationen im steady state von Indometacin allenfalls gering und wahrscheinlich klinisch ohne Bedeutung sein.

Zusammenfassung:

Für die Untersuchung pharmakokinetischer Interaktionen von Histamin H₂-Rezeptorantagonisten (Cimetidin, Etintidin, Ranitidin) mit nichtsteroidalen Antirheumatika (Diclofenac, Indometacin) wurden folgende, den Arzneistoffmetabolismus betreffende Fragestellungen bearbeitet:

1. Bindungsstudien von Cimetidin und Etintidin mit dem Fremdstoff metabolisierenden mikrosomalen Cytochrom P-450-System der Rattenleber.
2. Hemmversuche der durch Cytochrome P-450 katalysierten Enzymreaktionen.
3. Untersuchungen zur Sulfoxidation von Cimetidin und Etintidin und zum biochemischen Mechanismus dieser Reaktion bei Ratte und Mensch.
4. Untersuchungen zum Einfluß von Ranitidin auf den in vitro-Metabolismus von Diclofenac.
5. Bestimmung der nichtsteroidalen Antirheumatika und Histamin H₂-Rezeptorantagonisten im menschlichen Plasma.
6. Untersuchungen zum Einfluß von Ranitidin auf die Pharmakokinetik und minimale steady state-Plasmakonzentrationen von Indometacin bei freiwilligen Probanden.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Die beiden Histamin H_2 -Rezeptorantagonisten Cimetidin und Etintidin interagieren mit dem Cytochrom P-450-System der Rattenleber.

Nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Tiere ergibt sich aus den Typ II-Bindungsspektren eine ca. 5-fach höhere Affinität für Etintidin zu den Cytochromen P-450 als für Cimetidin.

Dies gilt sowohl für die hoch als auch für die niedrig affine(n) Bindungsstelle(n).

2. Cimetidin und Etintidin hemmen die Cytochrom P-450-abhängige N-Demethylierung von Benzphetamin in Rattenlebermikrosomen. Etintidin ist ein kompetitiver Inhibitor der durch Phenobarbital induzierbaren Benzphetamin-N-demethylierung (Inhibitorkonstante K_i : $4,0 \text{ mmol l}^{-1}$).

Die durch Phenobarbital induzierbaren, an der Benzo(a)pyren-Oxidation beteiligten Cytochrome P-450 werden durch Etintidin stärker als durch Cimetidin gehemmt. Beide Substanzen hemmen die Benzo(a)pyren-Oxidation nicht, wenn Mikrosomen von Ratten eingesetzt werden, die mit 5,6-Benzoflavon vorbehandelt sind.

Etintidin ist ein potenter kompetitiver Inhibitor der Cytochrom P-450-abhängigen Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (K_i : $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$). Cimetidin ist nicht wirksam.

Aus der Untersuchung des Effektes von Etintidin auf das Metabolitenmuster von Benz(a)anthracen ergaben sich keine neuen Erkenntnisse bezüglich der Regioselektivität verschiedener am Metabolismus von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen beteiligter Cytochrome P-450.

Diese Befunde weisen darauf hin, daß Cimetidin und im besonderen Maße Etintidin in der Lage sind, Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasereaktionen von nichtsteroidalen Antirheumatika zu hemmen.

3. Cimetidin und Etintidin werden durch Ratten- und Menschenlebermikrosomen zu den Sulfoxiden metabolisiert. Die Umsatzraten für die Bildung von Cimetidinsulfoxid und Etintidinsulfoxid in Lebermikrosomen unvorbehandelter Ratten erreichten $0,6$ bzw. $0,8 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg mikrosomales Protein})^{-1}$, Substratkonzentration: $120 \text{ } \mu\text{mol Cimetidin l}^{-1}$ bzw. $100 \text{ } \mu\text{mol Etintidin l}^{-1}$ und sind durch Phenobarbital- oder 5,6-Benzoflavon-Vorbehandlung nicht zu steigern. Die Sulfoxidation wird bei Ratten ausschließlich durch Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen katalysiert. Beim Menschen ist die Cytochrom P-450-abhängige

Sulfoxidation für nicht mehr als 40 % der Gesamtoxidation verantwortlich. Eine Beteiligung Flavin-abhängiger Monooxygenasen scheidet aus.

Der komplexere Mechanismus dieser Sulfoxidation beim Menschen könnte die Grundlage für weitere, vom Cytochrom P-450-System unabhängige Interaktionen sein.

Es konnte ausgeschlossen werden, daß die Sulfoxide von Cimetidin und Etintidin durch mikrosomale Enzyme der Rattenleber zum Sulfon oxidiert oder zur Muttersubstanz reduziert werden.

4. In Vorbereitung einer klinischen Interaktionsstudie wurde zusätzlich die Interaktion des Histamin H₂-Rezeptor-antagonisten Ranitidin mit dem nichtsteroidalen Antirheumatikum Diclofenac überprüft. Diclofenac wird weitgehend zu hydroxylierten Metaboliten verstoffwechselt. In Ratten- und in Menschenlebermikrosomen hemmt Ranitidin selbst in einer Konzentration von 0,1 mmol l⁻¹ weder die 4'- noch die 5-Hydroxylierung von Diclofenac.

5. Für klinisch-pharmakologische Studien wurden Analysenmethoden entwickelt:

Die Histamin H₂-Rezeptorantagonisten Cimetidin (Cimetidinsulfoxid), Etintidin (Etintidinsulfoxid) und

Ranitidin lassen sich hochdruckflüssigkeits-
chromatographisch spezifisch und sensitiv im menschlichen
Plasma bestimmen.

Weiterhin wurde eine einheitliche HPLC-Bestimmungsmethode
für die Analytik der nichtsteroidalen Antirheumatika
Diclofenac, Indometacin, Naproxen (6-O-Desmethylnaproxen),
Piroxicam und Salicylsäure in menschlichem Plasma
entwickelt. Mit Hilfe dieser Methoden ist es möglich, alle
für die Untersuchungen von Interaktionen wichtigen
pharmakokinetischen Parameter zu bestimmen.

6. In einer vorwiegend pharmakologisch angelegten
Interaktionsstudie mit freiwilligen Probanden konnte
nachgewiesen werden, daß Ranitidin keinen signifikanten
Einfluß auf die maximalen Plasmakonzentrationen, die Fläche
unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC_{0-10}) und die
minimalen steady state-Plasmakonzentrationen von
Indometacin ausübt. Somit ergeben sich keinerlei Hinweise
auf Interaktionen des Ranitidins mit dem hier geprüften
nichtsteroidalen Antirheumatikum Indometacin. Für Cimetidin
und Etintidin müßte hingegen aufgrund der in vitro-
Untersuchungen mit Interaktionen am Cytochrom P-450-System
gerechnet werden. Deshalb sollte auf Kombinationen von
nichtsteroidalen Antirheumatika mit Cimetidin oder
Etintidin von vornherein verzichtet werden.

7. Literatur

- Aadland, E., Fausa, O., Vatn, M., Cohen, H. und Quinlan, D. (1987)
Protection by misoprostol against naproxen-induced gastric mucosal damage.
Am. J. Med. 83 (Suppl. 1A), 37-40
- Arvidsson, B., Magnusson, B., Sölvell, L. und Magnusson, A. (1975)
Acetylsalicylic acid and gastrointestinal bleeding. Measurement of blood loss using a modified radioactive chromium method.
Scand. J. Gastroenterol. 10, 155-160
- Bakar, S.K. und Niazi, S. (1983)
High-performance liquid chromatographic determination of aspirin and its metabolites in plasma and urine.
J. Pharm. Sci. 72, 1020-1023
- Bartle, W.R., Walker, S.E. und Shapero, T. (1983)
Dose-dependent effect of cimetidine on phenytoin kinetics.
Clin. Pharmacol. Ther. 33, 649-655
- Beard, K., Walker, A.M., Perera, D.R. und Jick, H. (1987)
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hospitalization for gastroesophageal bleeding in the elderly.
Arch. Intern. Med. 147, 1621-1623
- Bechgaard, H., Brodie, R.R., Chasseaud, L.F., Houmoeller, P., Hunter, J.O., Siklos, P. und Taylor, T. (1982)
Bioavailability of indomethacin from two multiple-units controlled-release formulations.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 21, 511-515

- Bell, J.A., Gower, A.J., Martin, L.E., Mills, E.N.C. und Smith, W.P.
(1981)
Interaction of H₂-receptor antagonists with drug metabolizing enzymes.
Biochem. Soc. Trans. 9, 113-114
- Bjarnason, I., Prouse, P., Smith, T., Gumpel, M.J., Zanelli, G.,
Smethurst, P., Levi, S. und Levi, A.J. (1987)
Blood and protein loss via small-intestinal inflammation induced by
non-steroidal anti-inflammatory drugs.
Lancet II, 711-714
- Black, J.W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R. und
Parsons, E.M. (1972)
Definition and antagonism of histamine H₂-receptors.
Nature 236, 385-390
- Bradford, N. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-253
- Brater, D.C., Meyers, W.M., Dandekar, K.A., Pittman, K.A. und Peterson,
W.L. (1982a)
Clinical pharmacology of etintidine in patients with duodenal ulcer.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 23, 495-500
- Brater, D.C., Peters, M.N., Eshelman, F.N. und Richardson, C.T. (1982b)
Clinical comparison of cimetidine and ranitidine.
Clin. Pharmacol. Ther. 32, 484-489

- Breen, K.J., Bury, R., Desmond, P.V., Mashford, M.L., Morphett, B., Westwood, B. und Shaw, R.G. (1982)
Effects of cimetidine and ranitidine on hepatic drug metabolism.
Clin. Pharmacol. Ther. 31, 297-300
- Breyer-Pfaff, U., Kreft, H., Rassner, H. und Prox, A. (1978)
Formation of sulfone metabolites from chlorpromazine and perazine in man.
Drug Metab. Dispos. 6, 114-119
- Brimblecombe, R.W., Duncan, W.A.M., Durant, G.J., Emmett, J.C., Ganellin, C.R., Leslie, G.B. und Parsons, M.E. (1975)
Cimetidine - a non-thiourea H₂-receptor antagonist.
J. Int. Med. Res. 3, 86-92
- Brimblecombe, R.W., Leslie, G.B. und Walker, T.F. (1985)
Toxicology of cimetidine.
Human Toxicol. 4, 13-25
- Brogden, R.N., Heel, R.C., Pakes, G.E., Speight, T.M. und Avery, G.S. (1980)
Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin.
Drugs 20, 24-48
- Brogden, R.N., Heel, R.C., Speight, T.M. und Avery, G.S. (1981)
Piroxicam: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy.
Drugs 22, 165-187

- Brogden, R.N., Carmine, A.A., Heel, R.C., Speight, T.M. und Avery, G.S. (1982)
Ranitidine: a review of its pharmacology and therapeutic use in peptic ulcer disease and other allied diseases.
Drugs 24, 267-303
- Burke, M.D. und Mayer, R.T. (1974)
Ethoxyresorufin: direct fluorometric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene.
Drug Metab. Dispos. 2, 583-588
- Butt, H., Barthel, J.R. und Moore, R.A. (1988)
Clinical spectrum of the upper gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Natural history, symptomatology, and significance.
Am. J. Med. 84 (Suppl. 2A), 5-14
- Caradoc-Davies, T.H. (1984)
Nonsteroidal antiinflammatory drugs, arthritis, and gastrointestinal bleeding in elderly in-patients.
Age Ageing 13, 295-298
- Carey, P.F. und Martin, L.E. (1979)
A high performance liquid chromatography method for the determination of ranitidine in plasma.
J. Liq. Chromatogr. 2, 1291-1303
- Carey, P.F. und Martin, L.E. (1984)
High-performance liquid chromatographic methods for the determination of ranitidine and its metabolites in biological fluids.
Chromatographia 19, 200-205

Cashman, J.R. und Ziegler, D.M. (1986)

Contribution of N-oxygenation to the metabolism of MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) by various liver preparations.

Mol. Pharmacol. 29, 163-167

Cavanagh, R.L., Usakewicz, J.J. und Buyniski, J.P. (1983)

A comparison of some of the pharmacological properties of etintidine, a new histamine H₂-receptor antagonist, with those of cimetidine, ranitidine and tiotidine.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 224, 171-179

Cham, B.E., Johns, D., Bochner, F., Imhoff, D.M. und Rowland, M. (1979)

Simultaneous liquid-chromatographic quantitation of salicylic acid, salicyluric acid, and gentisic acid in plasma.

Clin. Chem. 25, 1420-1425

Chan, K.K.H., Vyas, K.H. und Wnuck, K. (1982)

A rapid and sensitive method for the determination of diclofenac sodium in plasma by high-performance liquid chromatography.

Anal. Lett. 15, 1649-1663

Chubb, S.A.P., Campbell, R.S. und Price, C.P. (1986)

Rapid method for measuring salicylate in serum by high-performance liquid chromatography.

J. Chromatogr. 380, 163-169

Clinch, D., Banerjee, A.K., Levy, A.K., Ostick, G. und Faragher, E.B. (1987)

Non-steroidal anti-inflammatory drugs and peptic ulceration.

J. R. Coll. Physicians (London) 21, 183-187

- Conney, A.H. (1986)
Induction of microsomal cytochrome P-450 enzymes: the first
Bernard B. Brodie lecture at Pennsylvania State University.
Life Sci. 39, 2493-2518
- Conrad, K.A., Mayersohn, M. und Bliss, M. (1984)
Cimetidine does not alter ibuprofen kinetics after a single dose.
Br. J. Clin Pharmacol. 18, 624-626
- Cooper, J.K., McKay, G., Hawes, E.M. und Midha, K.K. (1982)
High-performance liquid chromatographic assay of indomethacin and its
application in pharmacokinetics in healthy volunteers.
J. Chromatogr. 233, 289-296
- Croker, J.R., Cotton, P.B., Boyle, A.C. und Kinsella, P. (1980)
Cimetidine for peptic ulcer in patients with arthritis.
Ann. Rheum. Dis. 39, 275-278
- Dammann, H.G., Walter, A., Müller, P. und Simon, B. (1984)
Etintidin versus Ranitidin: einmal abendliche Gabe in der Ulcus-
duodeni-Therapie.
Dtsch. Med. Wochenschr. 109, 886-887
- Dehnen, W., Tomingas, R. und Roos, J. (1973)
A modified method for the assay of benzo(a)pyrene.
Anal. Biochem. 53, 373-383
- Derendorf, H., Mullersman, G., Barth, J., Grüner, A. und Möllmann, H.
(1986)
Pharmacokinetics of diclofenac sodium after intramuscular
administration in combination with triamcinolone acetate.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 31, 363-365

- Dixon, P.A.F., Okereke, N.O. und Ogundahunsi, O.A. (1985)
Influence of species and drug pretreatment on the metabolic
oxidation of cimetidine and metiamide.
Biochem. Pharmacol. 34, 2028-2030
- Dixon, P.A.F. und Udeagha, A.U. (1986)
The effect of some hepatotoxins on the sulphoxidation of cimetidine
in rat.
Comp. Biochem. Physiol. 83C, 385-386
- Duggan, J.M., Dobson, A.J., Johnson, H. und Fahey, P. (1986)
Peptic ulcer and non-steroidal anti-inflammatory agents.
Gut 27, 929-933
- Dyroff, M.C. und Neal, R.A. (1983)
Studies on the mechanism of metabolism of thioacetamide
S-oxide by rat liver microsomes.
Mol. Pharmacol. 23, 219-227
- Editorial (1988)
Too many H₂ Antagonists.
Lancet I, 28-29
- Edwards, I.R., Ferry, D.G. und Campbell, A.J. (1985)
Factors affecting the kinetics of two benzothiazine non-steroidal
anti-inflammatory medicines, piroxicam and isoxicam.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 28, 689-692
- Ferry, D.G., Ferry, D.M., Moller, P.W. und McQueen, E.G. (1974)
Indomethacin estimation in plasma and serum by electron capture
gas chromatography.
J. Chromatogr. 89, 110-112

- Flind, A.C. (1978)
Cimetidine and oral anticoagulants.
Br. Med. J. II, 1367
- Fowler, P.D., Shadforth, M.F., Crook, P.R. und John, V.A. (1983)
Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium
and its major hydroxylated metabolites during long-term treatment
of rheumatoid arthritis.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 25, 389-394
- Fowler, P.D., Dawes, P.T., John, V.A. und Shotton, P.A. (1986)
Plasma and synovial fluid concentration of diclofenac sodium
and its hydroxylated metabolites during once-daily administration
of a 100 mg slow-release formulation.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 31, 469-472
- Fukushima, D., Kim, Y.H., Iyanagi, T. und Oae, S. (1978)
Enzymatic oxidation of disulfides and thiol-sulfinates by both
rabbit liver microsomes and reconstituted system with purified
cytochrome P-450.
J. Biochem. 83, 1019-1027
- Gilbert, D.A., Sarawicz, C.M., Silverstein, F.E., Weinberg, C.R.,
Saunders, D.R., Feld, A.D., Sanford, R.L., Bergman, D. und
Washington, P. (1984)
Prevention of acute aspirin-induced gastric mucosal injury by
15-R-15 methyl prostaglandin E₂: an endoscopic study.
Gastroenterol. 86, 339-345
- Goto, J., Goto, N. und Nambara, T. (1982)
Separation and determination of naproxen enantiomers in serum by
high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. 239, 559-564

- Guth, P.H., Aures, D. und Paulsen, G. (1979)
Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine.
Gastroenterol. 76, 88-93
- Hajjar, N.P. und Hodgson, E. (1982)
Sulfoxidation of thioether-containing pesticides by the flavin-adenine-dinucleotide-dependent monooxygenase of pig liver microsomes.
Biochem. Pharmacol. 31, 745-752
- Hartmann, F., Gruenke, L.D., Craig, J.C. und Bisell, D.M. (1983)
Chlorpromazine metabolism in extracts of liver and small intestine from guinea-pig and from man.
Drug Metab. Dispos. 11, 244-248.
- Heinzl, S. (1987)
Ulkuetherapie - Fünf Jahre Erfahrung mit Ranitidin.
Dtsch. Apoth. Ztg. 127, 2722
- Helleberg, L. (1976)
Determination of indomethacin in serum and urine by electron-capture gas-liquid chromatography.
J. Chromatogr. 117, 167-173
- Helleberg, L. (1981)
Clinical pharmacokinetics of indomethacin.
Clin. Pharmacokinet. 6, 245-258
- Henry, D.A., Johnston, A., Dobson, A. und Duggan, J. (1987)
Fatal peptic ulcer complications and the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin, and corticosteroids.
Br. Med. J. 295, 1227-1229

- Hildebrandt, A.G., Roots, I., Tjoe, M. und Heinemeyer, G. (1978)
Hydrogen peroxide in hepatic microsomes.
Methods Enzymol. 52, 342-350
- Hoodi, A.A. und Damani, L.A. (1984)
Cytochrome P-450 and non P-450 sulphoxidations.
J. Pharm. Pharmacol. 36, 62P
- Howes, C.A., Pullar, T., Sourindhrin, I., Mistra, P.C, Capel, H., Lawson, D.H. und Tilstone, W.J. (1983)
Reduced steady-state plasma concentrations of chlorpromazine and indomethacin in patients receiving cimetidine.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 24, 99-102
- Ivey, K.J. (1988)
Mechanisms of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage. Actions of therapeutic agents.
Am. J. Med. 84 (Suppl. 2A), 41-48
- Jacob, J., Grimmer, G. und Schmoldt, A. (1981a)
The influence of polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of monooxygenases on the metabolite profile of benz(a)anthracene in rat liver microsomes.
Cancer Lett. 14, 175-185
- Jacob, J., Schmoldt, A. und Grimmer, G. (1981b)
Glass-capillary-gas-chromatography/mass spectrometry data of mono- and polyhydroxylated benz(a)anthracene. Comparison with benz(a)anthracene metabolites from rat liver microsomes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1021-1030

- Jacob, J., Schmoldt, A. und Grimmer, G. (1986)
The predominant role of S-oxidation in rat liver
metabolism of thiaarenes.
Cancer Lett. 32, 107-116
- Jick, H. und Porter, J. (1978)
Drug-induced gastrointestinal bleeding.
Lancet II, 87-89
- Jonen, H.G., Hütthwohl, B., Kahl, R. und Kahl, G.F. (1974)
Influence of pyridine and some pyridine derivatives on
spectral properties of reduced microsomes and on microsomal
drug metabolizing activity.
Biochem. Pharmacol. 23, 1319-1329
- Kahl, R. und Kahl, G.F. (1981)
Entgiftung und Aktivierung von Arzneimitteln und Fremdstoffen:
Rolle verschiedener Cytochrome P-450.
Pharm. heute 3, 93-99
- Kauffman, G.L. Jr. und Grossman, M.I. (1978)
Prostaglandin and cimetidine inhibit the formation of ulcers
produced by parenteral salicylates.
Gastroenterol. 75, 1099-1102
- MacKercher, P.A., Ivey, K.J., Baskin, W.N. und Krause, W.J. (1977)
Protective effect of cimetidine on aspirin-induced gastric mucosal
damage.
Ann. Intern. Med. 87, 676-679
- Kirch, W., Hoensch, H. und Janisch, H.D. (1984)
Interactions and non-interactions with ranitidine.
Clin. Pharmacokinet. 9, 493-510

Klotz, U. und Reimann, I.W. (1984)

Drug interactions through binding to cytochrome P-450: the experience with H₂-receptor blocking agents.

Pharm. Res. 2, 59-62

Klotz, U., Arvela, P. und Rosenkranz, B. (1985)

Famotidine, a new H₂-receptor antagonist, does not affect hepatic elimination of diazepam or tubular secretion of procainamide.

Eur. J. Clin. Pharmacol. 28, 671-675

Knodell, R.G., Holtzman, J.L., Crankshaw, D.L., Steele, N.M. und Stanley, L.N. (1982)

Drug metabolism by rat and human hepatic microsomes in response to interaction with H₂-receptor antagonists.

Gastroenterol. 82, 84-88

Konturek, S.J., Brzozowski, T. und Radecki, T. (1983a)

Protective action of omeprazole, a benzimidazole derivative, on gastric mucosal damage by aspirin and ethanol in rats.

Digestion 27, 159-164

Konturek, S.J., Kwiecien, N., Obtulowicz, W., Polanski, M., Kopp, B. und Oleksy, J. (1983b)

Comparison of prostaglandin E₂ and ranitidine in prevention of gastric bleeding by aspirin in man.

Gut 24, 89-93

Kreft, H. und Breyer-Pfaff, U. (1979)

Formation of the sulfone metabolite of didesmethylchlorpromazine in the rat in vivo and in vitro.

Drug Metab. Dispos. 7, 404-410

Kroemer, H. und Klotz, U. (1987)

Pharmacokinetics of famotidine in man.

Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 25, 458-463

Kutt, H. und Fouts, J.R. (1971)

Diphenylhydantoin metabolism by rat liver microsomes and some effects of drug or chemical pretreatment on the diphenylhydantoin metabolism by rat microsomal preparations.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 176, 11-18

Kwan, K.C., Breault, G.O., Umbenhauer, E.R., McMahon, F.G. und

Duggan, D.E. (1976)

Kinetics of indomethacin absorption, elimination, and enterohepatic circulation in man.

J. Pharmacokinet. Biopharm. 4, 255-280

Lanza, F.L., Royer, G.L. Jr., Nelson, R.S., Chen, T.T., Seckman, C.E.

und Rack, M.F. (1979)

The effects of ibuprofen, indomethacin, aspirin, naproxen, and placebo on the gastric mucosa of normal volunteers.

A gastroscopic and photographic study.

Dig. Dis. Sci. 24, 823-828

Larkai, E.N., Smith, J.L., Lidsky, M.D. und Graham, D.Y. (1987)

Gastroduodenal mucosa and dyspeptic symptoms in arthritic patients during chronic nonsteroidal anti-inflammatory drug use.

Am. J. Gastroenterol. 82, 1153-1158

Larsen, N.-E. (1979)

Cimetidine assay in human plasma by liquid chromatography.

J. Chromatogr. 163, 57-63

- Larsson, R., Erlanson, P. Bodemar, G., Walan, A., Bertler, A.,
Fransson, L. und Norlander, B. (1982)
The pharmacokinetics of cimetidine and its sulphoxide metabolite in
patients with normal and impaired renal function.
Br. J. Clin. Pharmacol. 13, 163-170
- Lee, R.M. und Osborne, P.M. (1978)
High-pressure liquid chromatographic determination of cimetidine
sulphoxide in human blood and urine.
J. Chromatogr. 146, 354-360
- Levy, G., Lampman, T. Kamath, B.L. und Garrettson, L.K. (1975)
Decreased serum salicylate concentrations in children with rheumatic
fever treated with antacid.
N. Engl. J. Med. 293, 323-325
- Lin, Q., Lensmeyer, G.L. und Larson, F.C. (1985)
Quantitation of cimetidine and cimetidine sulphoxide in serum by solid-
phase extraction and solvent-recycled liquid chromatography.
J. Anal. Toxicol. 9, 161-166
- LoIudice, T.A., Saleem, T. und Lang, J.A. (1981)
Cimetidine in the treatment of gastric ulcer induced by steroidal and
non-steroidal anti-inflammatory agents.
Am. J. Gastroenterol. 75, 104-110
- Lorenzo, B. und Drayer, D.E. (1981)
Improved method for the measurement of cimetidine in human serum by
reverse-phase high-pressure liquid chromatography.
J. Lab. Clin. Med. 97, 545-550

Manniche, C., Malchow-Moeller, A., Andersen, J.R., Pedersen, C., Hansen, T.M., Jess, P., Helleberg, L., Rasmussen, S.N., Tage-Jensen, U. und Nielsen, S.E. (1987)

Randomised study of the influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the treatment of peptic ulcer in patients with rheumatic disease.

Gut 28, 226-229

Meyers, W.M. und Peterson, W.L. (1980)

Effect of BL-5641, a new histamine H₂-receptor antagonist, on meal stimulated acid secretion.

Clin. Res. 28, 30 A

Mihaly, G.W., Drummer, O.H., Marshall, A., Smallwood, R.A. und Louis, W.J. (1980)

High-pressure liquid chromatographic determination of ranitidine, a new H₂-receptor antagonist, in plasma and urine.

J. Pharm. Sci. 69, 1155-1157

Mitchell, S.C., Ritchie, J.C., Idle, J.R. und Smith, R.L. (1982a)

Nature of the polar urinary metabolites of metiamide and cimetidine in man.

Biochem. Soc. Trans. 10, 123-124

Mitchell, S.C., Idle, J.R. und Smith, R.L. (1982b)

The metabolism of [¹⁴C] cimetidine in man.

Xenobiotica 12, 283-292

Mitchell, S.C., Idle, J.R. und Smith, R.L. (1982c)

Reductive metabolism of cimetidine sulfoxide in man.

Drug Metab. Dispos. 10, 289-290

Moore, C.M. und Tebbett, I.R. (1987)

Rapid extraction of anti-inflammatory drugs in whole blood for HPLC analysis.

Forens. Sci. Int. 34, 155-158

Müller, P., Fischer, N., Dammann, H.G., Kather, H. und Simon, B. (1981)

Simultaneous addition of 16,16-dimethyl-prostaglandin E₂ prevents aspirin and bile salt damage to human gastric mucosa.

Z. Gastroenterol. 19, 373-376

Mullersman, G. und Derendorf, H. (1986)

Rapid analysis of ranitidine in biological fluids and determination of its erythrocyte partitioning.

J. Chromatogr. 381, 385-391

Nash, T. (1953)

The colorimetric estimation of formaldehyde by means of Hantzsch reaction.

Biochem. J. 55, 416-421

Nielsen-Kudsk, F. (1980)

HPLC-determination of some antiinflammatory, weak analgesic and uricosuric drugs in human blood plasma and its application to pharmacokinetics.

Acta Pharmacol. Toxicol. 47, 267-273

Ochs, H.R., Greenblatt, D.J., Matlis, R. und Weinbrenner, J. (1985)

Interaction of ibuprofen with the H₂-receptor antagonists ranitidine and cimetidine.

Clin. Pharmacol. Ther. 38, 648-651

- Oldham, H.G. und Chenery, R.J. (1985)
Oxidation of cimetidine and ranitidine by the flavin-containing monooxygenase in pig liver microsomes.
In: Gorrod, J.W. und Damani, L.A. (Hrsg.): Biological oxidation of nitrogen in organic molecules. Verlag Chemie, Weinheim, S. 115-121
- Omura, T. und Sato, R. (1964)
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.
J. Biol. Chem. 239, 2370-2378
- Pancorbo, S., Bubrick, M.P., Chin, T.W.F., Miller, K.W. und Onstad, G. (1982)
Cimetidine dynamics after single intravenous doses.
Clin. Pharmacol. Ther. 31, 83-88
- Pelkonen, O. und Puurunen, J. (1980)
The effect of cimetidine on in vitro and in vivo microsomal drug metabolism in the rat.
Biochem. Pharmacol. 29, 3075-3080
- Porter, W.R. und Neal, R.A. (1978)
Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes.
Drug Metab. Dispos. 6, 379-388
- Poulsen, L.L., Hyslop, R.M. und Ziegler, D.M. (1974)
S-oxidation of thioureylenes catalyzed by a microsomal flavoprotein mixed-function oxidase.
Biochem. Pharmacol. 23, 3431-3440
- Poulsen, L.L., Hyslop, R.M. und Ziegler, D.M. (1979)
S-Oxygenation of substituted thioureas catalyzed by the pig liver microsomal FAD-containing monooxygenase.
Arch. Biochem. Biophys. 198, 78-88

- Prough, R.A., Burke, M.D. und Mayer, R.T. (1978)
Direct fluorometric methods for measuring mixed-function oxidase activity.
Methods Enzymol. 52, 372-377
- Puurunen, J. und Pelkonen, O. (1979)
Cimetidine inhibits microsomal drug metabolism in the rat.
Eur. J. Pharmacol. 55, 335-336
- Randolph, W.C., Osborne, V.L., Walkenstein, S.S. und Intoccia, A.P. (1977)
High-pressure liquid chromatographic analysis of cimetidine, a histamine H₂-receptor antagonist, in blood and urine.
J. Pharm. Sci. 66, 1148-1150
- Reilly, P.E.B., Carrington, L.E. und Winzor, D.J. (1983)
The interaction of cimetidine with rat liver microsomes.
Biochem. Pharmacol. 32, 831-835
- Reimann, I.W. und Klotz, U. (1986)
Wechselwirkungen zwischen H₂-Blockern und anderen Pharmaka.
In: Simon, B., Bianchi Porro, G. und Dammann, H.G. (Hrsg.): Famotidin. Ein Fortschritt in der Therapie säurebedingter Erkrankungen. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S.22-48
- Rendić, S., Šunjić, V. Toso, R., Kajfež, F. und Ruf, H.H. (1979)
Interaction of cimetidine with liver microsomes.
Xenobiotica 9, 555-564
- Rendić, S. Alebić-Kolbah, T., Kajfež, F. und Ruf, H.H. (1982)
Interaction of ranitidine with liver microsomes.
Xenobiotica 12, 9-17

- Rendić, S., Kajfež, F. und Ruf, H.H. (1983)
Characterization of cimetidine, ranitidine, and related structures' interaction with cytochrome P-450.
Drug Metab. Dispos. 11, 137-142
- Rendić, S. Ruf, H.H., Weber, P. und Kajfež, F. (1984)
Cimetidine and ranitidine: their interaction with human and pig liver microsomes and with purified cytochrome P-450.
Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 9, 195-200
- Richardson, C.J., Blocka, K.L.N., Ross, S.G. und Verbeeck, R.K. (1985)
Effects of age and sex on piroxicam disposition.
Clin. Pharmacol. Ther. 37, 13-18
- Robinson, D.R. (1988)
Management of gastrointestinal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs during the therapy of rheumatic diseases. The rheumatologist's perspective.
Am. J. Med. 84 (Suppl. 2A), 1-4
- Romano, M., Razandi, M. und Ivey, K.. (1987)
Cimetidine and omeprazole directly protect human gastric epithelial cells in vitro.
Gastroenterol. 92, 1599
- Rouer, E., Lemoine, A., Cresteil, T., Rouet, P. und Leroux, J.P. (1987)
Effects of genetic or chemically induced diabetes on imipramine metabolism. Respective involvement of flavin monooxygenase and cytochrome P-450-dependent monooxygenases.
Drug Metab. Dispos. 15, 524-528
- Sachs, L. (1978)
Angewandte Statistik. Statistische Methoden und ihre Anwendungen.
5. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 244-246

- Schenkman, J.B., Remmer, H. Estabrook, R.W. (1967)
Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol. Pharmacol. 3, 113-123
- Schmoltdt, A., Jacob, J. und Grimmer, G. (1986)
On the metabolism of sulfur-containing polycyclic aromatic compounds (thiaarenes).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 334 (Suppl.), R 23
- Schneider, W. und Degen, P.H. (1981)
Simultaneous determination of diclofenac sodium and its hydroxy metabolites by capillary gas chromatography with electron-capture detection.
J. Chromatogr. 217, 263-271
- Schöllnhammer, G., Dell, H.D., Doersing, K. und Kamp, R. (1986)
Quantitative determination of acemetacin and its metabolite indometacin in blood and plasma by column liquid chromatography.
J. Chromatogr. 375, 331-338
- Schwabe, U. und Paffrath, D. (Hrsg.) (1987)
Arzneiverordnungs-Report '87. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Schwefel, H.P. (1977)
Numerische Optimierung von Computer-Modellen mittels der Evolutionsstrategie. Birkhäuser Verlag
- Sedman, A.J. (1984)
Cimetidine - drug interactions.
Am. J. Med. 76, 109-114

Settlage, J.A., Gielsdorf, W., Nieder, M., Rasper, J. und
Jaeger, H. (1983)

Die gaschromatographisch/massenspektrometrische Bestimmung
der Indometacin-Serumspiegel im Verlauf pharmakokinetischer
Untersuchungen an gesunden Freiwilligen.

Arzneim.-Forsch./Drug Res. 33, 885-888

Shimek, J.L., Rao, N.G.S., Wahba Khalil, S.K. (1982)

An isocratic high-pressure liquid chromatographic determination of
naproxen and desmethylnaproxen in human plasma.

J. Pharm. Sci. 71, 436-439

Silver, B.A. und Bell, W.R. (1979)

Cimetidine potentiation of the hypoprothrombinemic effect of
warfarin.

Ann. Intern. Med. 90, 348-349

Silverstein, F.E., Kimmey, M.B., Saunders, D.R., Surawicz, C.M.,

Willson, R.A. und Silverman, B.A. (1987)

Gastric protection by misoprostol against 1,300 mg of aspirin. An
endoscopic study.

Am. J. Med. 83 (Suppl. 1A), 32-36

Somogyi, A. und Gugler, R. (1982)

Drug interactions with cimetidine.

Clin. Pharmacokinet. 7, 23-41

Somogyi, A. und Muirhead, M. (1987)

Pharmacokinetic interactions of cimetidine 1987.

Clin. Pharmacokinet. 12, 321-366

- Speeg, K.V., Jr., Patwardhan, R.V., Avant, G.R., Mitchell, M.C. und Schenker, S. (1982)
Inhibition of microsomal drug metabolism by histamine H₂-receptor antagonists studied in vivo and in vitro in rodents.
Gastroenterol. 82, 89-96
- Stierlin, H., Faigle, J.W., Sallmann, A., K ng, W., Richter, W.J., Kriemler, H.P., Alt, K.O., Winkler, T. (1979)
Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren[®]) in animals and in man. I. Isolation and identification of principal metabolites.
Xenobiotica 9, 601-610
- Stierlin, H. und Faigle, J.W. (1979)
Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren[®]) in animals and in man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile.
Xenobiotica 9, 611-621
- Sullivan, K.M., Small, R.E., Rock, W.L., Cox, S.R. und Willis, H.E. (1986)
Effects of cimetidine or ranitidine on the pharmacokinetics of flurbiprofen.
Clin. Pharm. 5, 586-589
- Taylor, D.C. und Cresswell, P.R. (1975)
The metabolism of cimetidine in the rat, dog, and man.
Biochem. Soc. Trans. 3, 884-885
- Taylor, D.C., Cresswell, P.R. und Bartlett, D.C. (1978)
The metabolism and elimination of cimetidine, a histamine H₂-receptor antagonist, in the rat, dog, and man.
Drug Metab. Dispos. 6, 21-30

- Traficante, J., Siekierski, J., Sakalis, G. und Gershon, S. (1979)
Sulfoxidation of chlorpromazine and thioridazine by bovine liver -
preferential metabolic pathways.
Biochem. Pharmacol. 28, 621-626
- Trnavská, Z., Trnavský, K. und Šmondrk, J. (1985)
The effect of cimetidine on the pharmacokinetics of salicylic acid.
Drugs Exptl. Clin. Res. 11, 703-707
- Tsai, Y.H., Hsu, L.R. und Naito, S.I. (1985)
Simultaneous determination of piroxicam and its main metabolite in
plasma and urine by high-performance liquid chromatography.
Int. J. Pharm. 24, 101-108
- Tynes, R.E. und Hodgson, E. (1983)
Oxidation of thiobenzamide by the FAD-containing and cytochrome P-450-
dependent monooxygenases of liver and lung microsomes.
Biochem. Pharmacol. 32, 3419-3428
- Tynes, R.E. und Hodgson, E. (1985)
Catalytic activity and substrate specificity of the flavin-containing
monooxygenase in microsomal systems: characterization of the hepatic,
pulmonary and renal enzymes of the mouse, rabbit, and rat.
Arch. Biochem. Biophys. 240, 77-93
- Uehleke, H. (1971)
N-Hydroxylation.
Xenobiotica 1, 327-340
- Vandenberghe, H.M., MacLeod, S.M., Mahon, W.A., Lebert, P.A. und Soldin,
S.J. (1980)
Analysis of ranitidine in serum by high-performance liquid
chromatography.
Ther. Drug Monitor. 2, 379-384

Vane, J.R. (1971)

Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs.

Nature New Biol. 231, 232-235

McVerry, R.M., Lethbridge, J., Martin, N., Mukerjee, S.K., Littler, T.,

Tallis, R., Sibeon, R. und Orme, M.L.E. (1986)

Pharmacokinetics of naproxen in elderly patients.

Eur. J. Clin. Pharmacol. 31, 463-468

Vignier, V., Berthou, F., Dreano, Y. und Floch, H.H. (1985)

Dibenzothiophene sulphoxidation: a new and fast high-performance liquid chromatographic assay of mixed-function oxidation.

Xenobiotica 15, 991-999

Welch, R.W., Bentch, H.L. und Harris, S.C. (1978)

Reduction of aspirin-induced gastrointestinal bleeding with cimetidine.

Gastroenterol. 74, 459-463

Werringloer, J. (1978)

Assay of formaldehyde generated during microsomal oxidation reactions.

Methods Enzymol. 52, 297-310

Wiebel, F.J., Leutz, J.C., Diamond, L. und Gelboin, H.V. (1971)

Aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in microsomes from rat tissues: differential inhibition and stimulation by benzoflavones and organic solvents.

Arch. Biochem. Biophys. 144, 78-86

Wiebel, F.J. (1980)

Activation and inactivation of carcinogens by microsomal monooxygenases: modifications by benzoflavones and polycyclic aromatic hydrocarbons.

In: Slaga, T.J. (Hrsg.): Carcinogenesis, Vol. 5, Raven Press, New York, S. 57-84

Wienbeck, M., Rohner, H.G., Hüttemann, W. und Pelz, W. (1986)

Etintidin versus Ranitidin in der Behandlung der Refluxösophagitis. Dtsch. Med. Wochenschr. 111, 1501-1502

Wilkinson, C.F., Hetnarski, K. und Yellin, T.O. (1972)

Imidazole derivatives - a new class of microsomal enzyme inhibitors. Biochem. Pharmacol. 21, 3187-3192

Wilkinson, C.F., Hetnarski, K. und Hicks, L.J. (1974)

Substituted imidazoles as inhibitors of microsomal oxidation and insecticide synergists.

Pestic. Biochem. Physiol. 4, 299-312

Wissenschaftliche Tabellen Geigy (1980)

Teilband Statistik. 8. Aufl., Basel, S. 163+230

Young, R.A. und Mehendale, H.M. (1987)

Effect of cytochrome P-450 and flavin-containing monooxygenase modifying factors on the in vitro metabolism of amiodarone by rat and rabbit.

Drug Metab. Dispos. 15, 511-517

Zbaida, S., Silman-Greenspan, J., Yosselson-Superstine, S. und Merin, E. (1984)

In vitro studies on the metabolism of cimetidine by rat liver microsomes - identification of a new N-desmethylocimetidine metabolite.

Biopharm. Drug Dispos. 5, 415-419

Ziegler, D.M. (1980)

Microsomal flavin-containing monooxygenase: oxygenation of nucleophilic nitrogen and sulfur compounds.

In: Jakoby, W.B. (Hrsg.): Enzymatic basis of detoxication, Vol. 1, Academic Press, New York, S. 201-227

Ziemniak, J.A., Chiaromonte, D.A. und Schentag, J.J. (1981)

Liquid-chromatographic determination of cimetidine, its known metabolites, and creatinine in serum and urine.

Clin. Chem 27, 272-275

Lebenslauf

14. Dezember 1959 Geboren in Hamburg als 2. Kind der
Buchhändlerin Luise Schulz, geb.
Hesse und des wissenschaftlichen
Angestellten Alfred Schulz

1966 - 1970 Besuch der Volksschule in Hamburg

1970 - 1976 Besuch des Kirchenpauer Gymnasiums in Hamburg

1976 - 1978 Oberstufe des Gymnasiums St.Georg in Hamburg

14. Juni 1978 Ablegung der Reifeprüfung

Wintersemester 1978/79 Beginn des Studiums der Pharmazie an der
Universität Hamburg

22. September 1980 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

2. April 1982 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

1. Mai - Praktische Ausbildung in der Apotheke
31. Oktober 1982 "Am Mümmelmannsberg" in Hamburg

1. November 1982 - Praktische Ausbildung am Pharmakologischen Institut
30. April 1983 der Universität Hamburg

24. Mai 1983 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

26. Mai 1983 Approbation als Apotheker

1. Juni 1983 - Zivildienst in der Krankenhausapotheke des
30. September 1984 Krankenhauses Reinbek St.Adolf-Stift

1. Oktober 1984 Beginn der Arbeiten an der Dissertation am Institut
für Rechtsmedizin der Universität Hamburg

Wintersemester 1984/85 Beginn des Studiums der Medizin an der Universität
Hamburg

Seit 1. November 1986 Stipendiat in der Graduiertenförderung der
Friedrich-Ebert-Stiftung