

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: Untersuchungen zur Wirkung von Propiverin auf spezifische
Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen in der Rattenleber

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Medizinischen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2000

vorgelegt von: Christoph Ullmann
geb. am: 10.08.1972
in: Oelsnitz

Dekan:	Prof. Dr. Heyo K. Kroemer
1. Gutachter:	Herr Prof. Dr. Siegmund (Greifswald)
2. Gutachter:	Herr PD Dr. Gramatté (Dresden)
Raum:	Hörsaal des Institutes für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Tag der Disputation:	15.12.2000

Für Meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungen</i>	<i>1</i>
1. Einleitung und Problemstellung	3
1.1. Cytochrom-P450-abhängiger Metabolismus	3
1.2. Propiverin	6
1.3. Zielstellung	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Prüfpräparate und Chemikalien	12
2.1.1. Prüfsubstanzen	12
2.1.2. Weitere Chemikalien	12
2.2. Durchführung des Tierversuches	13
2.3. Gewinnung der Mikrosomen	14
2.4. Ermittlung des Protein- und Gesamtgehaltes an Cytochrom P450	15
2.5. Enzymbestimmungen	15
2.5.1. Aktivitäten	15
2.5.2. Enzymkinetik	16
2.6. Western Blot	17
2.6.1. Probenvorbereitung	17
2.6.2. Elektrophorese	18
2.6.3. Blot	19
2.7. Biometrische Verfahren und Statistik	20
3. Ergebnisse	21
3.1. Morphologische Veränderungen	21
3.2. Cytochrom-P450-Gehalt der Mikrosomen	22
3.3. Monooxygenaseaktivitäten	23
3.3.1. Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD)	23
3.3.2. Ethylresorufin-O-Deethylase (EROD)	25
3.3.3. Erythromycin-N-Demethylase (ERDM)	26
3.3.4. Ethoxycumarin-O-Deethylase (ECOD)	27

3.3.5. Diazepam-N-Demethylase (DNDM)	28
3.3.6. Dextromethorphan-O-Demethylase (DXDM)	29
3.3.7. P-Nitrophenolhydroxylase (NPH)	30
3.4. Ergebnisse der Wettbewerbsversuche	31
3.5. Wirkung von Propiverin auf die CYP2B-Expression	36
4. Diskussion	37
4.1. Diskussion der Methode	37
4.2. Diskussion der Ergebnisse	39
4.2.1. Relatives Lebergewicht und mikrosomaler Proteingehalt	39
4.2.2. Gesamt-CYP-Gehalt der Lebermikrosomen	39
4.2.3. Enzymaktivitäten	40
4.2.4. Einfluss von Propiverin auf ausgewählte Enzymaktivitäten <i>in vitro</i>	44
4.2.5. Klinische Bedeutung	46
4.3. Schlussfolgerungen	47
5. Zusammenfassung	48
6. Literaturverzeichnis	49
7. Anhang	63
7.1. Bestimmungsmethoden	63
7.1.1. Bestimmung des Eiweißgehaltes der Mikrosomen	63
7.1.2. Bestimmung des Gesamtgehaltes an Cytochrom P450	63
7.1.3. Bestimmung der Enzymaktivitäten	64
7.1.4. Untersuchungen zur Enzymkinetik	72
7.1.5. Puffer und Lösungen zum Western-Blot	73
7.2. Ergebnistabellen	74
7.2.1. Protein- und Gesamt-Cytochrom-P450-Gehalt	74
7.2.2. Enzymaktivitäten	75
7.2.3. Enzymkinetik	76

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
aqua dest.	destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BNF	β-Naphthoflavon
CYP	Cytochrom P450
d	Schichtdicke der Küvette (Fluorimeter und Spektrophotometer)
DEX	Dexamethason
DNDM	Diazepam-N-Demethylase
DXDM	Dextromethorphan-O-Demethylase
ECOD	Ethoxycumarin-O-Deethylase
ERDM	Erythromycin-N-Demethylase
EROD	Ethylresorufin-O-Deethylase
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PD	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IgG	Immunglobulin der Klasse G
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LW	Leerwert
M	Mittelwert
M2	Despropylpropiverin
M5	Propiverin-N-Oxid
M6	Despropylpropiverin-N-Oxid
N	Anzahl der Tiere je Versuchsgruppe
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsals
NOEL	Schwellendosis (no observed effect level)
NPH	P-Nitrophenolhydroxylase
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

PB	Phenobarbital-Natrium
p.o.	peroral
PROD	Pentylresorufin-O-Depentylase
[S]	Substratkonzentration
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Reaktionsgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Cytochrom-P450-abhängiger Metabolismus

Der Metabolismus eines Arzneimittels und damit auch seine Wirkung unterliegen zahlreichen endogenen und exogenen Einflüssen. Dazu zählen Alter, Geschlecht, genetische Disposition, Krankheit, Alkohol- und Tabakkonsum, Ernährungsgewohnheiten, Umwelteinflüsse, gleichzeitige Gabe anderer Arzneimittel und eine Reihe unbekannter Faktoren (Schmider et al. 1999). Dabei sind für die sichere Anwendung eines Pharmakons bezüglich seiner Pharmakokinetik folgende Überlegungen von besonderem Interesse (nach Meyer 1996):

1. Auf welchen Stoffwechselwegen wird die Substanz umgewandelt?
2. Welche Enzymsysteme sind für die Umwandlung verantwortlich?
3. Spielt ein genetischer Polymorphismus eine Rolle?
4. Handelt es sich um einen Enzyminduktor oder -inhibitor?
5. Sind Arzneimittelinteraktionen zu erwarten oder möglich?

Eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel körperfremder Substanzen spielen die zum Cytochrom-P450-System zählenden Monooxygenasen (Li et al. 1997, Schmider et al. 1999). Als Cytochrom P450 (CYP) bezeichnet man eine sehr heterogene Superfamilie von Hämoproteinen (Gonzalez und Lee 1996), welche die oxidative, peroxidative und reduktive Umwandlung einer Vielzahl endogener und exogener Substrate katalysieren (Guengerich 1993, Lin und Lu 1998). Diese Enzyme kommen praktisch in allen lebenden Organismen vor und sind in allen bisher untersuchten Geweben nachgewiesen worden (Wong 1998). Ihre Aufgabe im Fremdstoffmetabolismus erfüllen sie in Lunge, Niere, Magen-Darm-Trakt und hauptsächlich in der Leber (Delaforge 1998).

Im letzten Jahrzehnt sind entscheidende Erkenntnisse über das Cytochrom-P450-System gewonnen worden (Waxman 1999). Durch detaillierteres Verständnis der Mechanismen von Induktion und Inhibition dieses Enzymsystems ist die Abschätzung pharmakologischer und toxikologischer Konsequenzen dieser Vorgänge möglich geworden (Pelkonen et al. 1998).

Entscheidend ist dabei die Einteilung der CYP-Enzyme in Familien und Subfamilien mit einer Homologie der Aminosäuresequenz von >40 % innerhalb der Familien bzw. >55 % innerhalb der Subfamilien. Die Nomenklatur ergibt sich aus der Abkürzung CYP für Cytochrom P450, einer arabischen Zahl für die Familie, einem großen Buchstaben für die Subfamilie und einer weiteren arabischen Zahl für das individuelle Enzym (Nelson et al. 1996). Die Familien und Subfamilien unterscheiden sich in Substratspezifität, Induzier- und Hemmbarkeit.

Die fremdstoffmetabolisierenden CYPs sind hauptsächlich den Familien CYP1-4 zugeordnet (Gonzalez und Lee 1996). Den prozentualen Anteil der einzelnen Enzyme am Gesamt-CYP-Gehalt der menschlichen Leber zeigt Abbildung 1. Am oxidativen Arzneimittelmetabolismus beim Menschen haben die Enzyme CYP3A4/5, CYP2D6, CYP2C8/9/18/19 und CYP1A2 den größten Anteil (Rendic und Di Carlo 1997).

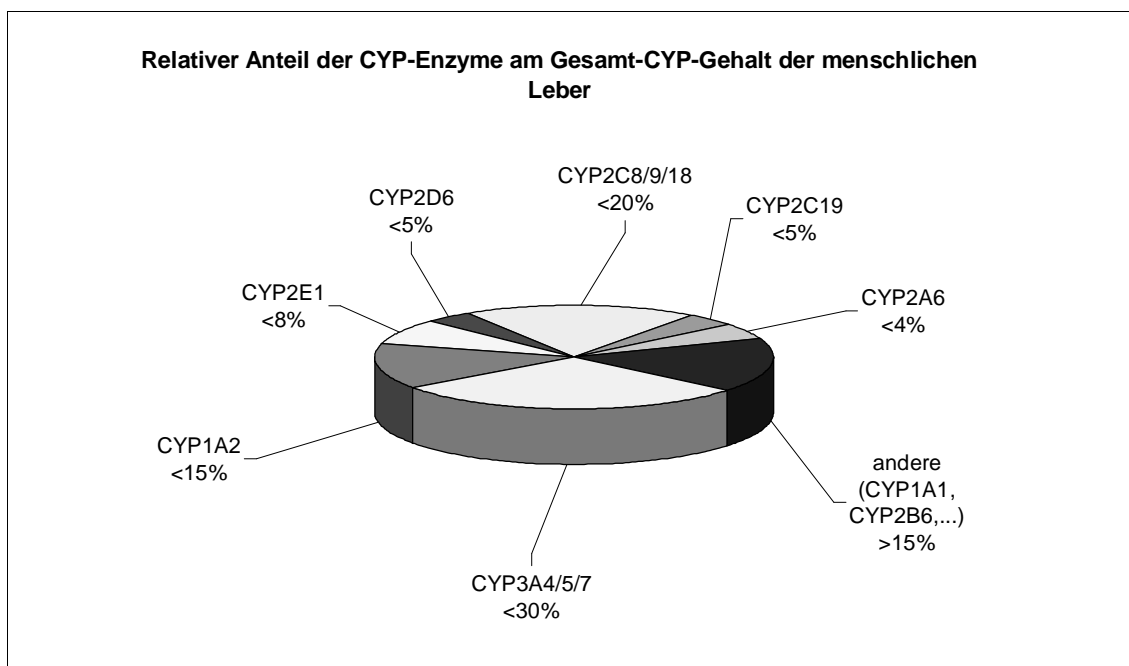


Abbildung 1: Relativer Anteil der einzelnen CYP-Enzyme am Gesamt-CYP-Gehalt der menschlichen Leber ohne Beachtung der z.T. erheblichen Variabilität (Daten aus Pelkonen et al. 1998 sowie Rendic und Di Carlo 1997)

Genetische Polymorphismen mit Einfluss auf Aktivität und Level der CYP-Enzyme sind für Mitglieder der Familien CYP1 und 2 beim Menschen beschrie-

ben (Rendic un Di Carlo 1997). Klinisch relevant sind vor allem Veränderungen der Gene *CYP2C19* und *CYP2D6* (Meyer et al. 1992, De Morais et al. 1994).

Zur Abschätzung von Arzneimittelinteraktionen ist die Kenntnis sowohl der für den Metabolismus verantwortlichen CYP-Enzyme als auch der Wirkung der verabreichten Medikamente auf das CYP-System notwendig. Eine Modifizierung der Aktivität der verantwortlichen Enzyme durch Induktion und Inhibition kann neben der Wirkungsabschwächung durch Beschleunigung von Abbau und Ausscheidung auch zur gesteigerten Bildung aktiver Metaboliten mit zum Teil toxischen oder kanzerogenen Eigenschaften führen.

Wegen der möglichen Vorhersage von Wechselwirkungen im Arzneimittelmetabolismus wurden in den letzten Jahren nicht nur neue, sondern auch bewährte und lange angewendete Medikamente hinsichtlich ihrer Wirkung auf CYP-Isoenzyme überprüft. Zahlreiche Interaktionen zwischen Medikamenten konnten so erklärt werden. Da nicht zuletzt wegen der gestiegenen Lebenserwartung die kombinierte Arzneimitteltherapie immer häufiger geworden ist, sind detaillierte Kenntnisse über zu erwartende Wechselwirkungen von besonderer Bedeutung für die sichere Anwendung dieser Pharmaka.

Zu den wichtigsten medizinischen Problemen im Alter mit großer sozialer Bedeutung zählen die Blasenfunktionsstörungen mit oder ohne Inkontinenz (WHO 1997, Wilz et al. 1999, Melchior 1996) . Dabei handelt es sich unter anderem um medikamentös zu behandelnde Formen der ungehemmten neuropathischen Blase und Mischformen der Harninkontinenz mit Kombinationen von Drang- und Stressinkontinenz (Schultz-Lampel et al. 1996). Bevorzugt werden bei deren Therapie Substanzen mit anticholinergen und myotrop-spasmolytischen Eigenschaften eingesetzt (Zwergel et al. 1996, Andersson 1999, Sullivan et al. 1999, Hegde et al. 1999, Chapple 2000). Das Blasenspasmolytikum Propiverin, das antimuskarinische und kalziumantagonistische Eigenschaften vereint, wird seit vielen Jahren in der Behandlung von Blasenfunktionsstörungen durch Harnblaseninstabilität und -überaktivität eingesetzt.

1.2. Propiverin

Das Benzilsäurederivat Propiverin findet als Hydrochlorid Anwendung unter den Handelsnamen Mictonorm[®] und Mictonetten[®]. Chemisch handelt es sich um 2,2-Diphenyl-2(1-propoxy)-essigsäure-(1-methylpiperid-4-yl)ester-hydrochlorid. Die weiße, kristalline und wasserlösliche Substanz hat die Summenformel $C_{23}H_{29}NO_3 \cdot HCl$ und eine relative Molekülmasse von 403,9 (Abbildung 2).

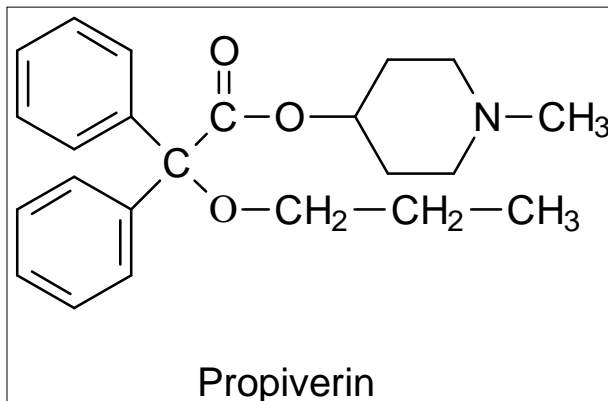


Abbildung 2: Strukturformel von Propiverin

Die muskelrelaxierende Wirkung von Propiverin und einiger seiner Metaboliten mit hoher Affinität zur glatten Muskulatur der Blase (Haruno 1992) beruht auf der Blockierung muskarinischer Rezeptoren (Siegmond et al. 1990, Wada et al. 1995), einer unspezifischen papaverinähnlichen Wirkung (Riotte und Mutschler 1987), einer kalziumantagonistischen Komponente (Tokuno et al. 1993) und auf der Inhibition von Calmodulin (Matsushima et al. 1997).

Diese Wirkung wird seit 1981 zur symptomatischen Behandlung einer Vielzahl von Blasenfunktionsstörungen in der Sammel- und Speicherphase der Harnblase genutzt. Hauptanwendungsgebiete sind Detrusorhyperaktivität und -instabilität; Urge-Symptomatik und -Inkontinenz; Enuresis; Reizblase mit Polakisurie, imperativem Harndrang und Nykturie sowie Harnblasenhyperreflexie nach Rückenmarkschädigung (Arzneimittel-Basisinformation der APOGEPHA). In zahlreichen Studien wurden Effektivität und Sicherheit einer Therapie dieser Erkrankungen mit 15–45 mg Propiverin täglich nachgewiesen (Dorschner et al. 2000, Blau und Retzke 1984, Otto-Unger 1985, Voigt et al. 1986, Wehnert und Sage 1989, Mazur et al. 1994, Yokoyama et al. 1990, Okada et al. 1998, No-

guchi et al. 1998, Halaska et al. 1997, Stohrer et al 1999, Madersbacher et al. 1999, Siepmann et al. 1998, Schwantes und Topfmeier 1999).

Die häufigsten Nebenwirkungen wie Mundtrockenheit, Akkomodationsstörungen, gastrointestinale Beschwerden, Schwindel und Müdigkeit sind zu meist auf anticholinerge Effekte zurückzuführen und in allen Studien bei entsprechender Dosierung als tolerabel bezeichnet worden (Noguchi et al. 1998, Halaska et al. 1997, Stohrer et al. 1999).

Die empfohlene Tagesdosis beträgt 30–45 mg täglich (Mazur et al. 1994), das entspricht etwa 0,4–0,8 mg/kg KG. Bei kontinuierlicher Gabe von 3 x 15 mg täglich stellt sich ein Plasmaspiegel von Propiverin zwischen 60 und 100 ng/ml ein (Potthast et al. 1996). Die Konzentration des Hauptmetaboliten (Propiverin-N-oxid) übersteigt diesen Wert noch um ein Vielfaches (Thümmler 1997). Im therapeutischen Dosisbereich liegt die *In-vitro*-Albuminbindung im menschlichen Serum bei ca. 90 % für Propiverin und 15, 20 und 60 % für die Hauptmetaboliten M2 (Despropylpropiverin), M6 (Despropylpropiverin-N-Oxid) bzw. M5 (Propiverin-N-Oxid). Die Bindung an menschliches Serum beträgt für Propiverin bei therapeutischer Dosierung insgesamt 95 % (Meisel et al. 1997, Langner 1998).

Die Ausscheidung von Propiverin erfolgt überwiegend in metabolisierter Form durch Urin und Faeces. Dabei handelt es sich vor allem um N-Oxide (Haustein und Hüller 1988).

Die Bedeutung des CYP-abhängigen Metabolismus für das Propiverin wurde bereits von zwei Seiten untersucht: Die Wirkung der Enzyme auf das Propiverinmolekül und die Wirkung des Propiverins auf die entsprechenden Enzyme.

Propiverin wird bei Mensch und Ratte *in vivo* intensiv zu teilweise aktiven und am Wirkprofil beteiligten Metaboliten verstoffwechselt (Nomura et al. 1989, Siegmund et al. 1990). Nach einmaliger Gabe wurden beim Menschen 22 Metaboliten im Urin gefunden; die Muttersubstanz wurde nur zu 3 % im Urin nachgewiesen. Bei den Metaboliten handelt es sich vorwiegend um N-Oxide, Produkte der Oxidation an einem der 3 C-Atome der Propylseitenkette, N-demethylierte Stoffe und Esterspaltprodukte (Hüller et al. 1988). Auch bei der

Ratte wurde ein nahezu vollständiger Abbau von Propiverin beobachtet (Göber et al. 1988).

Als für den Metabolismus von Propiverin verantwortliche Enzymsysteme wurden das Cytochrom P450, flavinhaltige Monooxygenasen und Carboxylesterasen vermutet (Wengler 1989). Die wichtigsten Hinweise auf eine entscheidende Rolle des Cytochrom P450 bei der Umwandlung von Propiverin waren:

- die Bindung von Propiverin und zahlreicher seiner Metaboliten an Cytochrom P450,
- eine Korrelation der spezies- und geschlechtsabhängigen Differenzen des *In-vitro*-Metabolismus von Propiverin mit dem Gesamtgehalt und der Zusammensetzung des Cytochrom P450 und
- die selektive Beeinflussung des Propiverinmetabolismus *in vitro* (Lebermikrosomen von Mensch und Ratte) a) nach Induktion (durch Phenobarbital, β -Naphthoflavon und Ethanol) und Inhibition (durch Cimetidin) *in vivo* und b) durch die Anwesenheit von *In-vitro*-Inhibitoren (Kohlenmonoxid, Metyrapon, Cimetidin und Chloramphenicol).

Eine Untersuchung der Pharmakokinetik von Propiverin in Abhängigkeit vom Polymorphismus des *CYP2D6* fand keine signifikanten Unterschiede zwischen *poor*- und *extensive-metabolizern* von Debrisoquin (Müller et al. 1993).

In der Literatur gibt es Hinweise für eine induzierende Wirkung von Propiverin auf das CYP-System. Untersuchungen von Borchert et al. (1985 und 1986) fanden nach 5-tägiger Vorbehandlung mit Propiverin (20 mg/kg) eine Zunahme der relativen Lebermasse und eine Erhöhung des Cytochrom-P450-Gehaltes im 9.000 g-Überstand des Leberhomogenates weiblicher Ratten. Die untersuchten Dealkylierungsreaktionen (Aminophenazon-N-Demethylierung, p-Nitroanisol-O-Demethylierung und p-Nitrophenetol-O-Dealkylierung) im 9.000 g-Überstand wurden nicht beeinflusst. Auch auf die Hexobarbitalschlafzeit hatte die Propiverinvorbehandlung keine Wirkung.

Wengler (1989) untersuchte die Wirkung von 60 und 120 mg/kg/d Propiverin über 5 Tage auf Gesamt-CYP-Gehalt und einige Monooxygenasen der Leber-

mikrosomen weiblicher und männlicher Ratten. Dabei kam es zu

- einer Steigerung des Propiverinabbaus *in vitro*,
- einer Erhöhung des Gesamtgehaltes an CYP,
- einer verstärkten Aktivität der Anilinhydroxylase und der Aminopyrindemethylase.

Im Gegensatz zu diesen *In-vitro*-Parametern wurde die Pharmakokinetik der Testsubstanz Antipyrin durch die Vorbehandlung mit 60 mg/kg Propiverin über 5 Tage nicht verändert.

Die vorliegenden Daten lassen wegen der verwendeten relativ unspezifischen Methoden, der im Vergleich zum therapeutischen Bereich hohen untersuchten Dosierungen und der teilweise widersprüchlichen Angaben keine ausreichende Genauigkeit der Interpretation zu:

- Die Mechanismen des *In-vitro*-Abbaus von Propiverin und die beteiligten Enzyme lassen sich nicht ausreichend eingrenzen. Die durch Phenobarbital, Ethanol und β -Naphthoflavon induzierten verschiedenen CYP-Formen sind bekannt (Kemper 1998, Guengerich 1995, Wrighton et al. 1993, Roberts et al. 1994). Beim Cimetidin handelt es sich *in vivo* um einen Induktor und Inhibitor von Cytochrom P450 (Wright et al. 1991, Rendic und Di Carlo 1997). Die *in vitro* verwendeten Inhibitoren von Cytochrom P450 Metyrapon, Cimetidin und Chloramphenicol beeinflussen jeweils mehrere Isoformen (Draper et al. 1997; Mäenpää et al. 1991, Niopas et al. 1999, Knodell et al. 1991, Ohashi et al. 1993, Wrighton und Ring 1994).
- Bei der Untersuchung der induktiven Wirkung von Propiverin wurden mit den gemessenen Aktivitäten der Aminopyrindemethylase [v.a. durch CYP 2C, CYP2D, CYP1A und CYP17 katalysiert (Niwa et al. 1999, Agundez et al. 1995)] und der Anilinhydroxylase [v.a. Reaktion des CYP2E1 (Amato et al. 1998)] relativ unspezifische Reaktionen überprüft und nur ein kleines Spektrum des möglichen Induktionsmusters erfasst. Auch in die durch Propiverin-vorbehandlung unbeeinflusste Antipyrinkinetik sind mehrere CYP-Formen [CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP3A (Sharer et al. 1996, Engel et al 1996)] involviert.

- Die bisher untersuchten Dosierungen (mindestens 20 bzw. 60 mg/kg) lagen weit oberhalb der beim Menschen üblichen therapeutischen Dosis. Angaben zum Dosisbereich ohne Wirkung von Propiverin auf das CYP-System (no observed effect level, NOEL) waren nicht verfügbar.

Das strukturverwandte Denaverin erwies sich an der Ratte als typischer Induktor vom Phenobarbital-Typ mit einer starken (20fachen) Erhöhung der CYP2B-Aktivität (gemessen als Aktivität der Pentylresorufindepentylase). Interessanterweise wurde außerdem eine Erniedrigung der Aktivität (gemessen als Dextromethorphanmethylase-Aktivität) und des Proteingehaltes des CYP2D beobachtet (Vogelgesang 1997, Engel et al. 1998). Diese Wirkung von Denaverin auf das CYP2D wurde auch in Hepatozyten aus Rattenlebern und humanen Leberresektaten beobachtet (Dressel 1998).

Zur genaueren Einschätzung möglicher klinischer Konsequenzen war eine nähere Klassifizierung der am Propiverinmetabolismus beteiligten und der von der Induktion betroffenen Isoformen des Cytochrom P450 nötig. In der vorliegenden Arbeit wurde die Propiverinwirkung auf die wichtigsten fremdstoffmetabolisierenden CYP-Familien bei der Ratte untersucht.

1.3. Zielstellung

Aufgrund der Ergebnisse von Wengler (1989) und der strukturellen Ähnlichkeit des Propiverins mit dem Denaverin sollte mit der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft werden, dass Propiverin ein Enzyminduktor vom Phenobarbital-Typ ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Präzisierung der Ergebnisse aus den 80er Jahren mit spezifischeren, modernen Methoden durch:

1. Charakterisierung des mikrosomalen CYP-Isoenzymmusters (mit Hauptaugenmerk auf CYP2B und CYP2D) der Leber männlicher Ratten nach 5-tägiger oraler Behandlung mit 0,6 – 60 mg/kg Propiverin durch Messung der Ethylresorufin-O-Deethylase (EROD), Ethoxycumarin-O-Deethylase (ECOD), Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD), Diazepam-N-Demethylase (DNDM), Dextromethorphan-O-Demethylase (DXDM), p-Nitrophenolhydroxylase (NPH) und Erythromycin-N-Demethylase (ERDM),
2. Vergleich mit der Wirkung bekannter Enzyminduktoren (β -Naphthoflavon für CYP1A, Phenobarbital für CYP2B und Dexamethason für CYP3A),
3. Untersuchung der Dosisabhängigkeit der Propiverinwirkung und Ermittlung einer Schwellendosis (NOEL) von Propiverin, die ohne Wirkung auf CYP-Isoenzyme toleriert wird und
4. Untersuchung des Einflusses von Propiverin *in vitro* auf die Aktivitäten der mikrosomalen EROD, PROD und ERDM.

2. Material und Methoden

2.1. Prüfpräparate und Chemikalien

2.1.1. Prüfsubstanzen

Alle Lösungen wurden entsprechend Tabelle 1 täglich frisch vor der Applikation hergestellt.

Tabelle 1: Prüfsubstanzen

Substanz	Herkunft	Charge	Lösung
Propiverin-hydrochlorid	APOGEPHA (Dresden, Deutschland)	608095	0,12–0,4–1,2–12 mg/ml aqua dest.
Phenobarbital-Natrium	Apotheke der Universität Greifswald	—	2 mg/ml aqua dest.
β-Naphthoflavon	SIGMA (Steinheim, Deutschland)	85H0356	20 mg/ml Kornöl, 5 min Ultraschallbad
Dexamethason	FLUKA (Buchs, Schweiz)	60923/123197	10 mg/ml Kornöl, 5 min Ultraschallbad

2.1.2. Weitere Chemikalien

Substrate, Reaktionsprodukte und Kofaktoren folgender Hersteller fanden bei den Enzymbestimmungen Anwendung:

Resorufin, 7-Ethylresorufin, 7-Pentylresorufin, 7-Ethoxycumarin, Dextromethorphan, 4-Nitrophenol, Nitrocatechol, Erythromycin, Kornöl und Diazepam von der Firma SIGMA (Steinheim, Deutschland); Glucose-6-Phosphat, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Grad 1), NADP (Natriumsalz, 98 %) von Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland); Humanserumalbumin, Natrium-desoxycholat, Natriumdithionit von FLUKA (Buchs, Schweiz); Dextrorphantriat von ICN Biomedicals (Eschwege, Deutschland); 7-Hydroxycumarin von Aldrich (St. Louis, USA); Formaldehyd von Riedel-de-Haen (Hannover, Deutschland); Propiverin-N-Oxid, Despropylpropiverin, Despropylpropiverin-N-Oxid von der Firma APOGEPHA (Dresden, Deutschland).

Phosphatpuffer: 0,1 mol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; pH 7,4

Für den Western-Blot wurden folgende Substanzen verwendet:

Acrylamid, Tetramethylethyldiamin (TEMED), Ammoniumpersulfat (APS), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Natriumdodecylsulfat (SDS) der Firma Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland); Glycerin, Bromphenolblau, β -Mercaptoethanol, Glycin von SIGMA (Steinheim, Deutschland); Methanol, Natriumchlorid, Kaliumchlorid von MERCK (Darmstadt, Deutschland); 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP), Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) und Dimethylformamid von Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland); TWEEN 20 von BIO RAD (München, Deutschland).

2.2. Durchführung des Tierversuches

Der Tierversuch wurde mit Genehmigung des Ministeriums für Landwirtschaft und Naturschutz Mecklenburg-Vorpommern (TV-017/93 FFA, vom 05.11.97) durchgeführt.

Nach Empfang von 72 männlichen LEW 1A Albino-Ratten aus dem Institut für Pathophysiologie der Universität Greifswald (Karlsburg) mit einem Körpergewicht von 236–290 g wurden die Tiere in 9 gleich große Gruppen (N = 8) randomisiert. Nach einer Eingewöhnungszeit von mehr als 4 Wochen unter Standardbedingungen [Life-island-Box A 110, Flufrance (Wissous, Frankreich), ständige Frischluftzufuhr, Temperatur 25° C, 12-Stunden-Hell/Dunkel-Rhythmus mit Licht ab 7⁰⁰ Uhr, Polycarbonatkäfige mit je 4 Tieren, Standard-Streu ssniff[®], freier Zugang zu Futter R/M-H ssniff[®] und angesäuertem Wasser] begann die Behandlung.

Aus technischen Gründen wurde der Versuch in 2 Serien durchgeführt, wobei der zweite Durchgang 3 Tage nach Beginn des ersten gestartet wurde. Jede Serie umfasste alle Behandlungsgruppen mit jeweils der Hälfte der Tiere.

Die Behandlung der Ratten erfolgte an 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit einer einmaligen morgendlichen Gabe zwischen 8.00 und 9.00 Uhr. Propiverin, Phenobarbital und aqua dest. (Kontrolle der oralen Behandlung) wurden mittels einer Schlundsonde (starre Knopfkanüle) in einem Volumen von 5 ml/kg verabreicht. Die Behandlung mit β -Naphthoflavon, Dexamethason und Kornöl (Kontrolle der intraperitonealen Behandlung) erfolgte intraperitoneal mit einem Appli-

kationsvolumen von 2 ml/kg (Tabelle 2).

Tabelle 2: Einteilung der Behandlungsgruppen und Dosierung der Prüfsubstanzen

Behandlungsgruppe	applizierte Substanz	Dosis (mg/kg)	Lösungsmittel
Kontrolle (p.o.)	—	—	aqua dest.
P 0,6 mg/kg	Propiverinhydrochlorid	0,6	aqua dest.
P 2 mg/kg	Propiverinhydrochlorid	2	aqua dest.
P 6 mg/kg	Propiverinhydrochlorid	6	aqua dest.
P 60 mg/kg	Propiverinhydrochlorid	60	aqua dest.
PB 10 mg/kg	Phenobarbital-Natrium	10	aqua dest.
Kontrolle (i.p.)	—	—	Kornöl
BNF 40 mg/kg	β -Naphthoflavon	40	Kornöl
DEX 20 mg/kg	Dexamethason	20	Kornöl

Die Versuchstiere wurden am Morgen des 6. Tages 24 Stunden nach der letzten Applikation nach 12-stündigem Fasten durch Dislokation der Halswirbelsäule und Dekapitation getötet und entblutet. Nach breiter Eröffnung des Abdomens wurde die Pfortader mit einer starren Sonde kanüliert und die Leber ektomiert und gewogen. Eine saubere Präparation der Leber war wegen der intraperitonealen Verwachsungen durch eine fibrinöse Entzündung bei den mit β -Naphthoflavon behandelten Tieren nicht ausführbar (siehe Kapitel 3.1.). Die exakte Bestimmung des Lebergewichtes war in diesen Fällen nicht möglich.

Anschließend wurde die Leber bis zur Gewinnung eines klaren (blutfreien) Perfusates mit eiskalter Kochsalzlösung gespült.

2.3. Gewinnung der Mikrosomen

Alle weiteren Schritte bis zum Einfrieren der Mikrosomen erfolgten unter Kühlung im Eisbad. Jeweils 6 g Lebergewebe und 8 ml Phosphatpuffer wurden mit Hilfe des Homogenisators Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik; Staufen, Deutschland) zweimal 30 Sekunden homogenisiert. Die Mikrosomenfraktion wurde mittels Differentialzentrifugation gewonnen:

- Zentrifugation des Homogenates für 30 min bei 9.000 x g (Centrikon H-401 B, Kontron), Gewinnung des Überstandes;
- Zentrifugation 60 min bei 100.000 x g, Waschen des Sedimentes in Puffer und nochmalige
- Zentrifugation 60 min bei 100.000 x g (Centrikon T-1170, Kontron);
- Resuspendierung der Pellets in Phosphatpuffer; portionsweises Einfrieren und Lagerung bei mindestens -80°C .

2.4. Ermittlung des Protein- und Gesamtgehaltes an Cytochrom P450

Der Proteingehalt der Mikrosomenfraktionen wurde mit Hilfe der Biuretreaktion modifiziert nach Gornall et al. (Gornall 1949) bestimmt (siehe Anhang, Kapitel 7.1.1.).

Die Ermittlung des Gesamtgehaltes an Cytochrom P450 erfolgte spektrophotometrisch mit einer Methode nach Greim (Greim 1970) (siehe Anhang, Kapitel 7.1.2.). Hierbei wurde die Differenz der Absorption der kohlenmonoxid-gesättigten Mikrosomensuspensionen bei 448 oder 450 nm mit und ohne Zugabe von Natriumdithionit bestimmt.

2.5. Enzymbestimmungen

2.5.1. Aktivitäten

Folgende Enzymaktivitäten wurden bestimmt:

Ethylresorufin-O-Deethylase	(EROD) (Burke et al 1983)
Ethoxycumarin-O-Deethylase	(ECOD) (Greenlee et al. 1978)
Pentylresorufin-O-Depentylase	(PROD) (Burke et al. 1983)
Diazepam-N-Demethylase	(DNDM) (Andersson et al. 1994, Nash 1953)
Dextromethorphan-O-Demethylase	(DXDM) (Schmid et al. 1985)
P-Nitrophenolhydroxylase	(NPH) (Reinke et al. 1985)
Erythromycin-N-Demethylase	(ERDM) (Wrighton et al. 1985, Nash 1953)

Die Mikrosomensuspensionen (definierter Proteingehalt) wurden in einem ge-

pufferten System (Phosphatpuffer) in der Anwesenheit eines NADPH-regenerierenden Systems (NADP, Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase) und der Kofaktoren KCl und MgCl₂ mit einem Modellsubstrat inkubiert. Die Substratkonzentration wurde im Sättigungsbereich gewählt. Eine Übersicht der Bestimmungen zeigt Tabelle 3; Details zu Methoden und Geräten sind Kapitel 7.1.3. im Anhang zu entnehmen.

Tabelle 3: Übersicht zum Ablauf der Aktivitätsbestimmungen (Abkürzungen siehe Text)

Reaktion	Substrat	Start mit	Inkubation	Abbruch mit	Messung	Analyt
EROD	7-Ethyl-resorufin	NADP	5 min	Methanol	fluorometrisch	Resorufin
ECOD	7-Ethoxy-cumarin	NADP	10 min	TCA	fluorometrisch	7-Hydroxy-cumarin
PROD	7-Pentyl-resorufin	NADP	10 min	Methanol	fluorometrisch	Resorufin
DNDM	Diazepam	NADP	20 min	TCA	photometrisch	Formaldehyd
DXDM	Dextrometho-phan	NADP	10 min	NaOH	gaschromato-graphisch	Dextrophan
NPH	4-Nitro-phenol	Substrat	20 min	TCA	photometrisch	4-Nitro-catechol
ERDM	Erythromycin	Substrat	20 min	TCA	photometrisch	Formaldehyd

Nach Vorinkubation des Analysenansatzes (2 min) bei 37° C erfolgte der Start der Reaktion mit NADP bzw. Substrat. Die Reaktionen wurden nach 5–20 min mit Methanol, Trichloressigsäure (TCA) bzw. NaOH abgebrochen.

Die Konzentrationen der entstandenen Metaboliten wurden photometrisch, fluorometrisch oder gaschromatographisch ermittelt. Bei der Bestimmung von DNDM und ERDM wurde das bei der Demethylierung entstehende Formaldehyd mit der Methode nach Nash (Nash 1953) gemessen. Als Maß für die Enzymaktivitäten wurde die Stoffmenge des entstandenen Produktes (nmol bzw. pmol) pro Zeiteinheit (min) und Masse mikrosomalen Proteins (mg) gewählt.

2.5.2. Enzymkinetik

Die *In-vitro*-Untersuchungen zur Enzymkinetik von EROD, PROD und ERDM wurden nach dem oben beschriebenen Prinzip der Aktivitätsmessung der ein-

zelenen Reaktionen durchgeführt. Hierbei kamen gepoolte Mikrosomen aus den Gruppen mit entsprechender Enzyminduktion zur Anwendung. Die jeweilige Enzymaktivität wurde bei aufsteigender Substratkonzentration in Gegenwart von Propiverin bzw. der Metaboliten M2 (dealkyliertes Propiverin), M5 (N-Oxid von Propiverin) oder M6 (N-Oxid von M2) bestimmt. Details zu Substratkonzentrationen, Propiverin- bzw. Metabolitenkonzentration und verwendeten Mikrosomen befinden sich im Anhang (Kapitel 7.1.4.).

2.6. Western Blot

Die Bestimmung des Gehaltes an CYP2B-Protein der Mikrosomen von Kontrolltieren und nach Behandlung mit 60 mg/kg Propiverin und 10 mg/kg Phenobarbital erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der mikrosomalen Proteine und immunologischen Nachweis von CYP2B nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran.

2.6.1. Probenvorbereitung

Die Mikrosomen wurden auf einen Proteingehalt von 1 µg/µl mit aqua bidest. verdünnt. Proben- und Positiv-Kontroll-Ansätze¹ hatten folgende Zusammensetzung (Tab. 4):

Tabelle 4: Proben- und Kontroll-Ansätze für die Elektrophorese

	Probenansatz	Positiv-Kontrolle
Mikrosomenlösung	1 µl	1 µl
Laemmli-Puffer 4fach	15 µl	20 µl
aqua bidest	44 µl	19 µl

Der verwendete Rainbow-Größenstandard (RPN 756; Amersham International, Buckinghamshire, Großbritannien) wurde unverdünnt mit einem Volumen von 10 µl in die erste Gelkammer gegeben.

Die Proben wurden für 3 min bei 95° C inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen.

2.6.2. Elektrophorese

Die Auftrennung der mikrosomalen Proteine erfolgte mit der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) in einer Elektrophorese-Apparatur (BIO RAD, München). Die zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel (Geldicke 1,5 mm) eingesetzten Substanzen und die entsprechenden Volumina sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Gelansätze für die Elektrophorese

	Trenngel 10%ig	Sammelgel
aqua dest.	18,0 ml	9,15 ml
Acrylamid	15,0 ml	2,0 ml
Tris pH 6,8 [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan]	—	3,75 ml
Tris pH 8,8	11,25 ml	—
SDS 10 % (Natriumdodecylsulfat)	450 µl	150 µl
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	45 µl	15 µl
Zur Polymerisation zugegeben:		
APS 10 % (Ammoniumpersulfat)	450 µl	150 µl

Die angelegte Spannung betrug 150 mV am Sammelgel und anschließend für ca. 4 Stunden 170 mV am Trenngel.

¹ Mikrosomen Phenobarbital-behandelter Ratte wurden als Positiv-Kontrolle mit dem Primär-Antikörper geliefert und nach Vorschrift angesetzt (Gentest; Frankfurt/Main).

2.6.3. Blot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran (Nitrocellulosemembran PROTRAN; Schleicher und Schuell, Dassel) erfolgte nach dem SemiDry-Blotting-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) mit dem Transfergerät Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell (BIO RAD, München) bei einer Spannung von 300 mA über ca. 2 Stunden. Die Membran trocknete anschließend über Nacht.

Die Kontrollanfärbung erfolgte nach Durchfeuchtung der Membran (aqua dest.) mit Ponceau S (SIGMA, St. Louis, USA). Nach Markierung der Banden und Kopie des Bildes erfolgte über ca. 1,5 Stunden die Entfärbung mit Blocking-Reagenz (Roti[®]-Block; Carl Roth, Karlsruhe).

Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (IgG der Ziege gegen CYP2B1/2 der Ratte; Gentest, Frankfurt/Main; 1:500 in TBST) erfolgte 1,5 Stunden bei Zimmertemperatur.

Anschließend wurde die Primärantikörper-Lösung abgegossen und die Membran mit TBST-Puffer viermal für jeweils fünf Minuten gewaschen. Daraufhin erfolgten die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (IgG des Kaninchen gegen IgG der Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase: AP106 A 1mL; Chemicon, Hofheim; 1:10.000 in TBST) für 1,5 Stunden und ein nachfolgender Waschvorgang wie zuvor beschrieben.

Danach wurde die Membran kurz mit BCIP/NBT-Puffer abgespült und anschließend mit dem Farbreagenz BCIP/NBT, das durch die mit dem Sekundärantikörper konjugierte alkalische Phosphatase umgesetzt wird, angefärbt. Nach Entfernen des Färbereagenzes und 2-3maligem Spülen mit aqua dest. wurde die Membran abgedeckt getrocknet und dann ausgewertet.

2.7. Biometrische Verfahren und Statistik

Die Konzentrationen und Aktivitäten wurden mit Hilfe der Parameter von linearen Regressionsgeraden jeweils mitgeführter Eichreihen ermittelt.

Berechnet wurden Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) der Resultate für jede Behandlungsgruppe. Die Gruppen wurden mit den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen entsprechend dem Vergleich zweier verteilungsunabhängiger Stichproben mittels Mann-Whitney-Test verglichen. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p < 0,05$ gewählt.

Die Bestimmung von K_m und V_{max} erfolgte durch nichtlineare Anpassung an die Funktion $V = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$ mit dem Computerprogramm ORIGIN™ (Version 3.5; Microcal Software Inc., USA).

3. Ergebnisse

3.1. Morphologische Veränderungen

Die Behandlung der Tiere mit Propiverin im Dosisbereich von 0,6–6 mg/kg wurde, gemessen an Körpergewicht, Habitus und körperlicher Aktivität der Tiere, gut vertragen. Hochdosierte Propiveringabe (60 mg/kg) führte zur deutlichen Beeinträchtigung dieser Parameter. Nach Behandlung mit 60 mg/kg Propiverin und 20 mg/kg Dexamethason verringerte sich das Körpergewicht signifikant; in beiden Gruppen verstarb je ein Tier.

Das relative Lebergewicht wurde durch die Behandlung mit Propiverin in der höchsten Dosierung (60 mg/kg), Phenobarbital, β -Naphthoflavon und Dexamethason signifikant erhöht (Tabelle 6).

Tabelle 6: Körpergewicht, absolutes und relatives Lebergewicht männlicher Ratten (M \pm SD; N = 8) nach Behandlung mit Propiverin (P), Phenobarbital (PB), β -Naphthoflavon (BNF) und Dexamethason (DEX) über 5 Tage

Behandlungsgruppe	Körpergewicht [g]	Lebergewicht [g]	relatives Lebergewicht [%]
Kontrolle (po)	274 \pm 14	7,93 \pm 0,59	2,89 \pm 0,11
P 0,6 mg/kg	271 \pm 15	7,79 \pm 0,44	2,88 \pm 0,09
P 2 mg/kg	268 \pm 7	7,69 \pm 0,39	2,87 \pm 0,08
P 6 mg/kg	270 \pm 8	7,72 \pm 0,16	2,86 \pm 0,09
P 60 mg/kg ²	236 \pm 26*	7,49 \pm 1,06	3,17 \pm 0,15*
PB 10 mg/kg	258 \pm 17	7,92 \pm 0,72	3,07 \pm 0,09*
Kontrolle (ip)	267 \pm 19	7,95 \pm 0,41	2,98 \pm 0,15
BNF 40 mg/kg	262 \pm 13	10,14 \pm 0,80 ^{*,1}	3,87 \pm 0,20 ^{*,1}
DEX 20 mg/kg ²	207 \pm 6*	12,69 \pm 0,87*	6,11 \pm 0,33*

*P < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe; ¹ Wert nur näherungsweise (siehe Text); ² N = 7

Die Baucheingeweide der intraperitoneal behandelten Tiere waren mit einem öligen Film überzogen. Zusätzlich führte die Gabe von β -Naphthoflavon zu intraperitonealen Verwachsungen und fibrinoiden Belägen an den Organen. Da sich diese schlecht vom Lebergewebe lösten, waren eine saubere Präparation und die genaue Bestimmung des Lebergewichtes bei den betroffenen Tieren nicht möglich.

3.2. Cytochrom-P450-Gehalt der Mikrosomen

Die Propiverinbehandlung führte nur bei der höchsten gewählten Dosis (60 mg/kg) zu einem signifikanten Anstieg des Cytochrom-P450-Gehaltes (+ 88 %). In den mit Phenobarbital bzw. β -Naphthoflavon behandelten Gruppen war dieser Anstieg ebenfalls signifikant (+ 78 % bzw. + 93 %) (Abb. 3; Tab. 18 im Anhang).

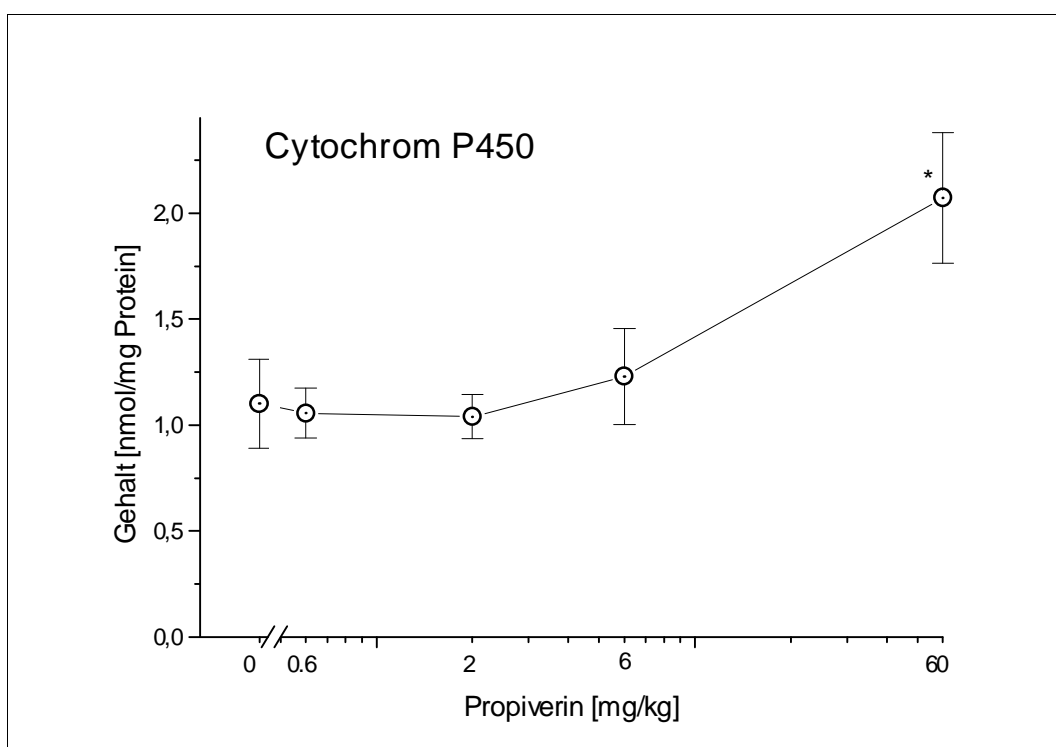


Abbildung 3: Einfluss einer Behandlung mit Propiverin über 5 Tage auf den mikrosomalen Gesamtgehalt an Cytochrom P450 in der Leber männlicher Ratten ($M \pm SD$; $N = 8$; $*p < 0,05$)

3.3. Monooxygenaseaktivitäten

Eine Zusammenfassung aller ermittelten Enzymaktivitäten ist im Anhang tabellarisch dargestellt (Tab. 19).

3.3.1. Pentyresorufin-O-Depentylase (PROD)

Die deutlichste Enzyminduktion wurde bei der PROD beobachtet: Phenobarbital bewirkte eine Zunahme der Aktivität auf das 36fache.

Propiverin erwies sich als starker PROD-Induktor in Abhängigkeit von der Dosis: Während im Dosisbereich von 0,6–6 mg/kg keine Änderung der Aktivität nachgewiesen werden konnte, kam es in der Gruppe der höchsten Dosierung (60 mg/kg) zu einer Erhöhung der Aktivität auf das 33fache (Abb. 4)

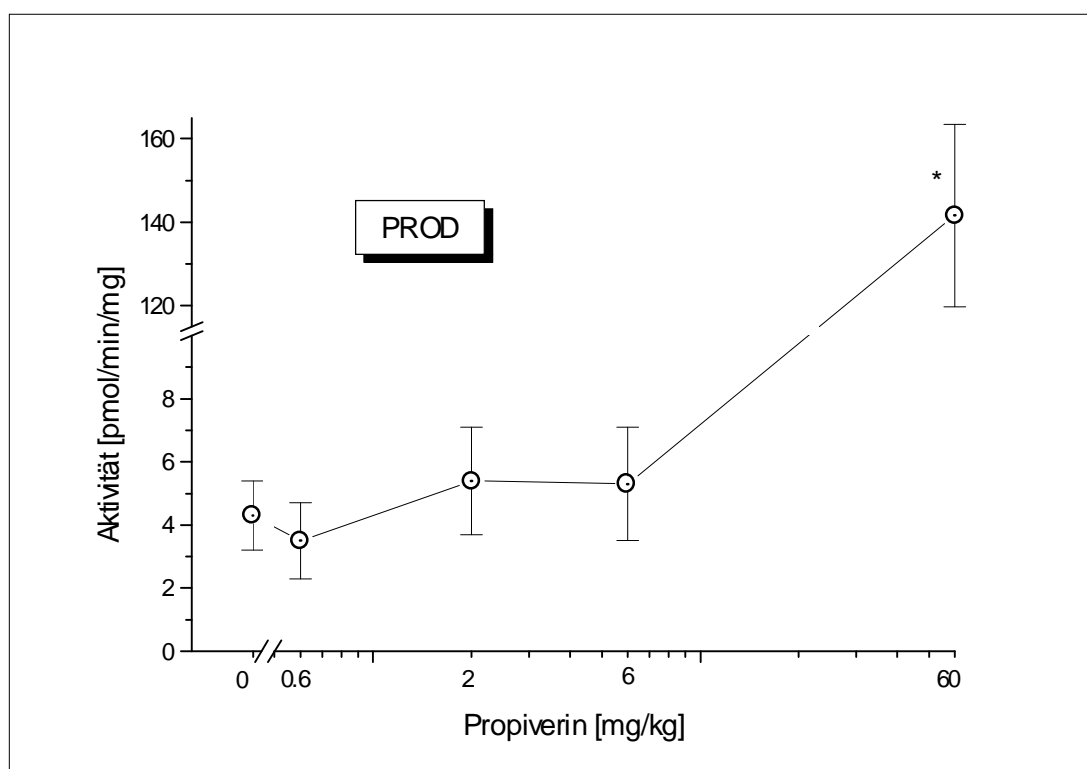


Abbildung 4: Einfluss einer Behandlung mit Propiverin über 5 Tage auf die mikrosomale Aktivität der PROD in der Leber männlicher Ratten ($M \pm SD$; $N = 8$; * $p < 0,05$)

Im Gegensatz zur starken Induktion durch Phenobarbital und Propiverin war die Zunahme der PROD-Aktivität nach Behandlung mit Dexamethason und β -Naphthoflavon (2- bzw. 3,5fach) geringgradig (Abb. 5).

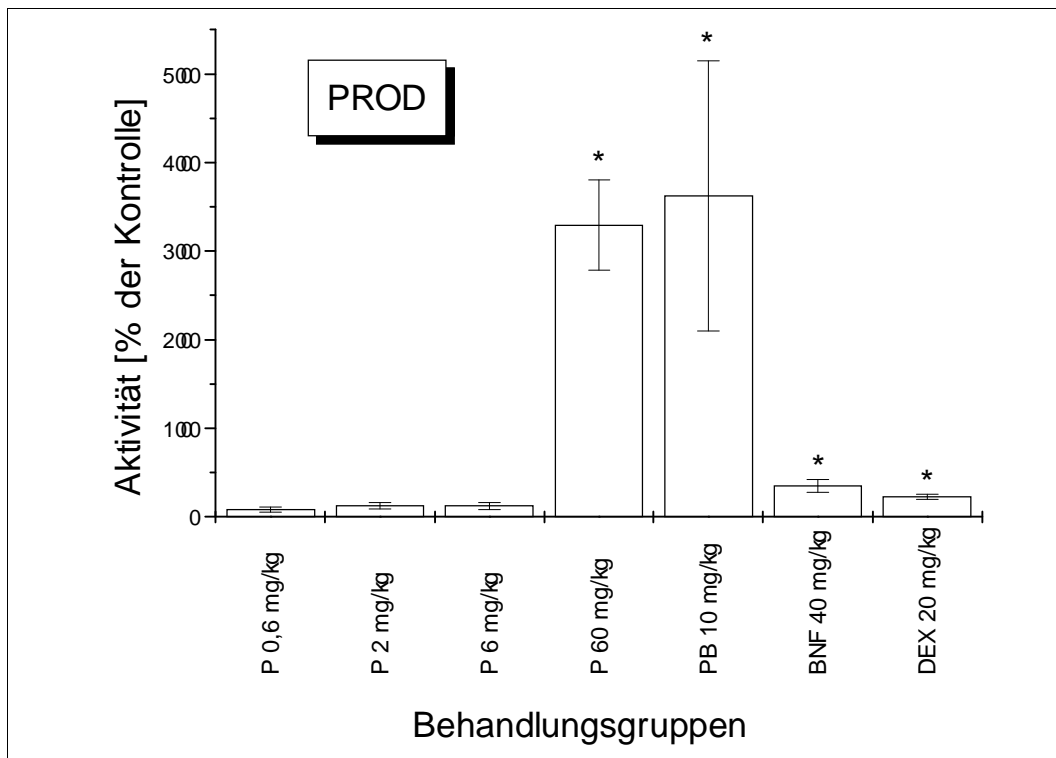


Abbildung 5: Aktivität der mikrosomalen PROD der Leber männlicher Ratten nach 5-tägiger Behandlung mit Propiverin (P), Phenobarbital (PB), β -Naphthoflavon (BNF) und Dexamethason (DEX); Kontrollgruppen entsprechen 100% ($M \pm SD$; $N = 8$; * $p < 0,05$)

3.3.2. Ethylresorufin-O-Deethylase (EROD)

Die Aktivität der EROD wurde durch die Behandlung mit β -Naphthoflavin auf das 16fache gesteigert. Propiverin führte zu einer dosisabhängigen Zunahme bis auf das 5fache in der höchsten Dosierung. In diesem Bereich lag auch die Erhöhung der EROD durch Phenobarbital. Dexamethason hatte keinen Einfluss auf die EROD (Abb. 6).

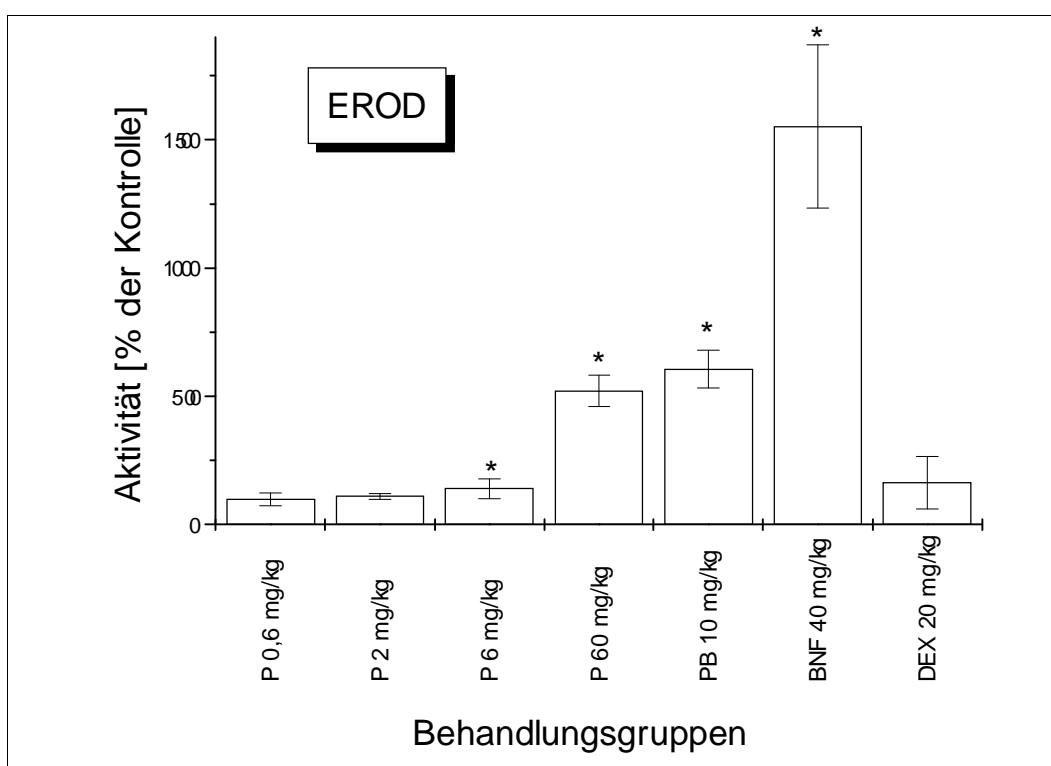


Abbildung 6: Aktivität der mikrosomalen EROD der Leber männlicher Ratten nach 5-tägiger Behandlung mit Propiverin (P), Phenobarbital (PB), β -Naphthoflavin (BNF) und Dexamethason (DEX); Kontrollgruppen entsprechen 100% ($M \pm SD$; $N = 8$; * $p < 0,05$)

3.3.3. Erythromycin-N-Demethylase (ERDM)

Die stärkste Steigerung der ERDM wurde durch die Positivkontrolle Dexamethason hervorgerufen. Nur in der höchsten Dosierung von Propiverin änderte sich die ERDM signifikant (+ 370 %). Phenobarbital führte zum 3fachen Anstieg (Abb. 7).

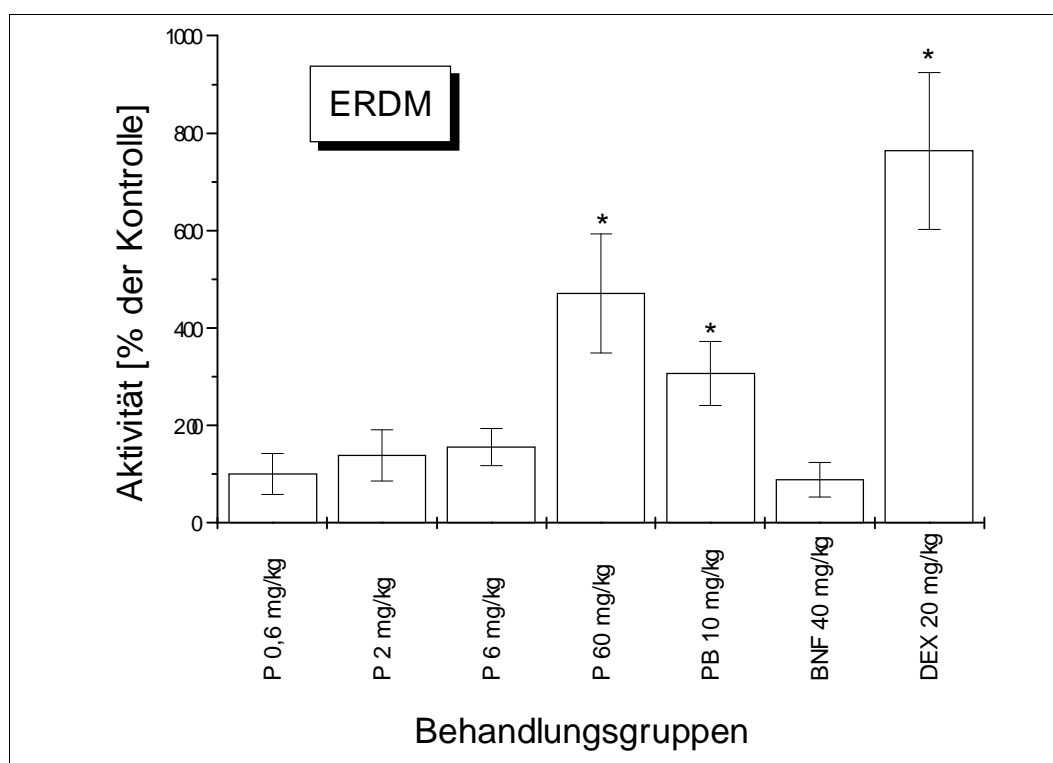


Abbildung 7: Aktivität der mikrosomalen ERDM der Leber männlicher Ratten nach 5-tägiger Behandlung mit Propiverin (P), Phenobarbital (PB), β -Naphthoflavon (BNF) und Dexamethason (DEX); Kontrollgruppen entsprechen 100% (M \pm SD; N = 8; * p < 0,05)

3.3.4. Ethoxycumarin-O-Deethylase (ECOD)

Die Propiverinbehandlung führte zum dosisabhängigen Anstieg der ECOD bis auf etwa das 4fache in der höchsten Dosierung. In diesem Bereich lag auch die Zunahme der Aktivität durch Phenobarbital. Der größte Anstieg war nach β -Naphthoflavongabe zu verzeichnen (Abb. 8).

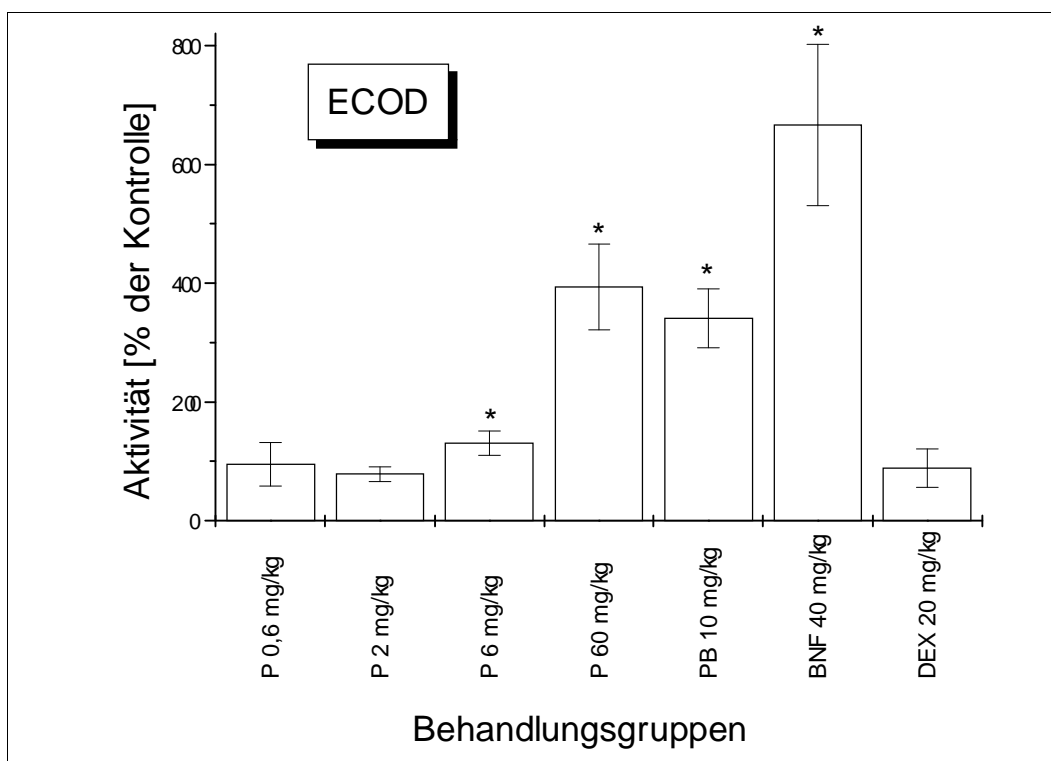


Abbildung 8: Aktivität der mikrosomalen ECOD der Leber männlicher Ratten nach 5-tägiger Behandlung mit Propiverin (P), Phenobarbital (PB), β -Naphthoflavon (BNF) und Dexamethason (DEX); Kontrollgruppen entsprechen 100% ($M \pm SD$; $N = 8$; * $p < 0,05$)

3.3.5. Diazepam-N-Demethylase (DNNDM)

Die Beeinflussung der DNNDM-Aktivität durch Propiverin war gering und nur in der höchsten Dosierung (60 mg/kg) signifikant. Auch die Referenzsubstanzen veränderten die DNNDM nur geringfügig (Abb. 9).

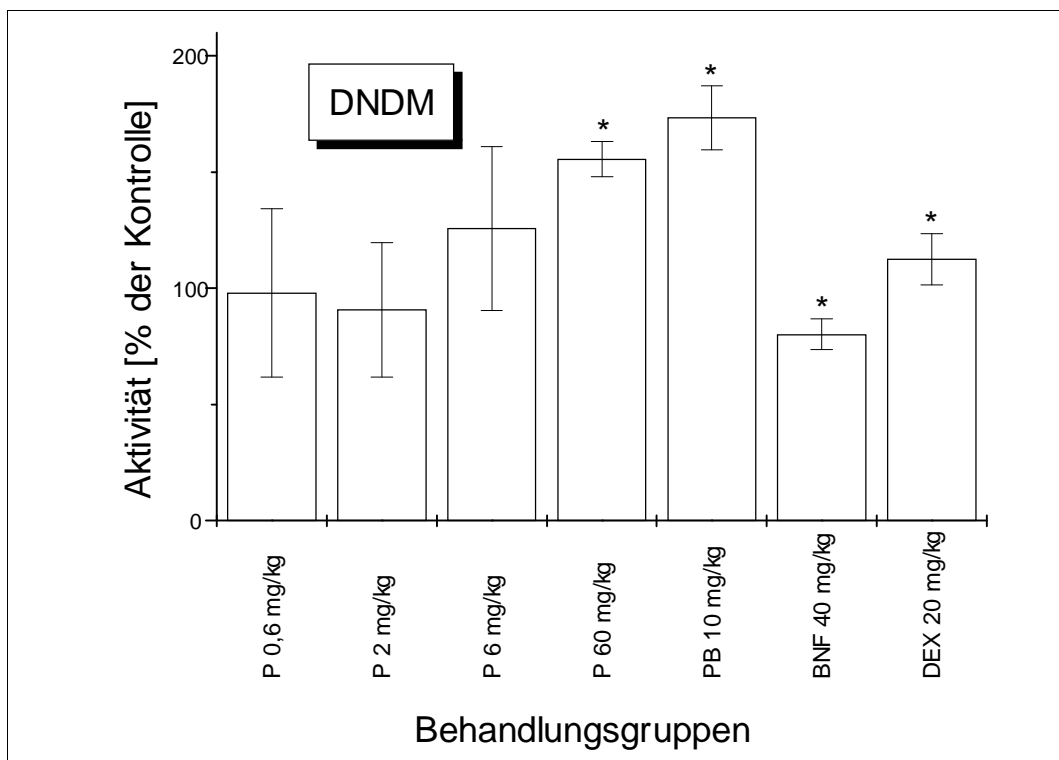


Abbildung 9: Aktivität der mikrosomalen DNNDM der Leber männlicher Ratten nach 5-tägiger Behandlung mit Propiverin (P), Phenobarbital (PB), β -Naphthoflavon (BNF) und Dexamethason (DEX); Kontrollgruppen entsprechen 100% (MW \pm SD; N = 8; * p < 0,05)

3.3.6. Dextromethorphan-O-Demethylase (DXDM)

Die DXDM-Aktivität wurde durch die Propiverinbehandlung im untersuchten Dosisintervall nicht signifikant beeinflusst (Abb. 10).

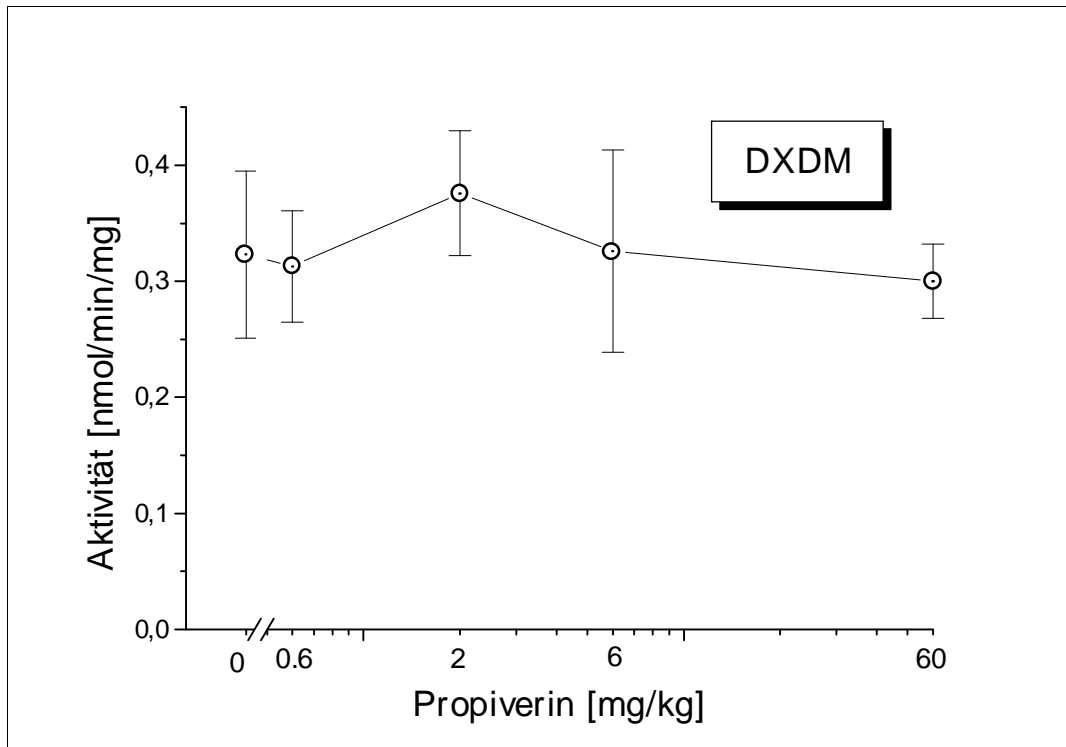


Abbildung 10: Änderung der mikrosomalen DXDM-Aktivität der Leber männlicher Ratten nach 5-tägiger Behandlung mit Propiverin ($M \pm SD$; $N = 8$; * $p < 0,05$)

Eine signifikante Abnahme der DXDM-Aktivität wurde nach Behandlung mit β -Naphthoflavin und Dexamethason beobachtet (Abb. 11).

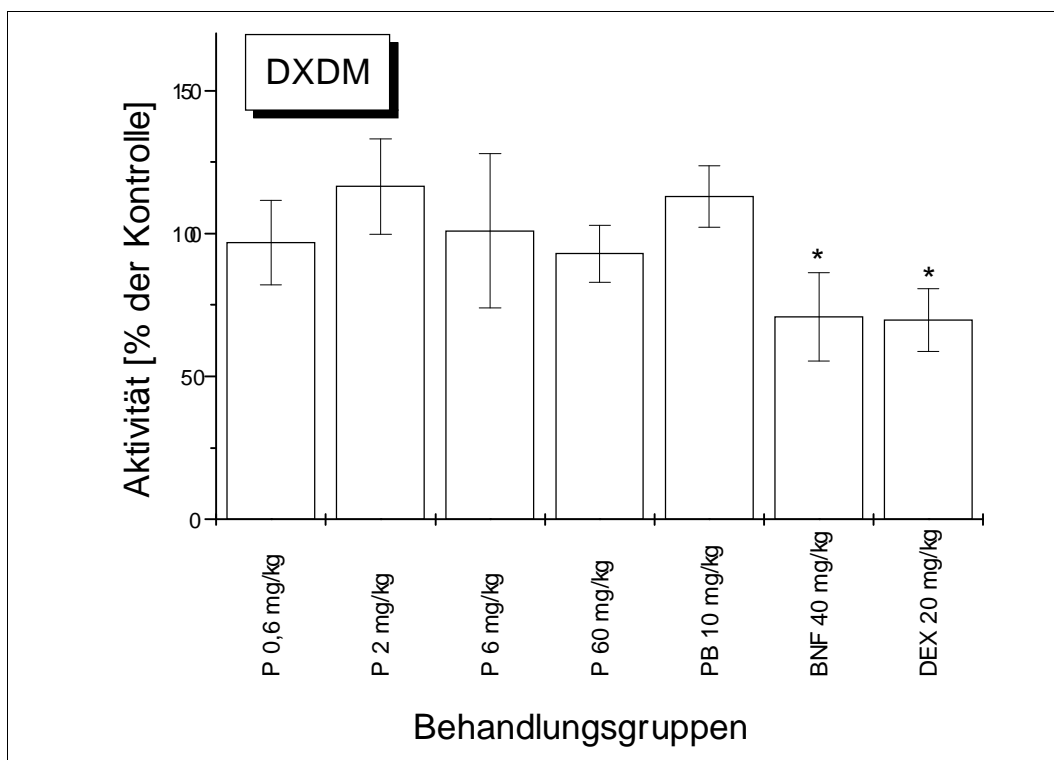


Abbildung 11: Aktivität der mikrosomalen DXDM der Leber männlicher Ratten nach 5-tägiger Behandlung mit Propiverin (P), Phenobarbital (PB), β -Naphthoflavin (BNF) und Dexamethason (DEX); Kontrollgruppen entsprechen 100% ($M \pm SD$; $N = 8$; * $p < 0,05$)

3.3.7. P-Nitrophenolhydroxylase (NPH)

Es wurden keine signifikanten Veränderungen der NPH-Aktivität durch die Behandlung mit Propiverin, Phenobarbital, β -Naphthoflavin oder Dexamethason festgestellt.

3.4. Ergebnisse der Wettbewerbsversuche

In einer zusätzlichen Untersuchung wurde geprüft, ob Propiverin drei der wichtigsten induzierbaren CYP-Isoformen *in vitro* hemmt. Dazu wurden gepoolte Mikrosomen von Ratten benutzt, die mit den entsprechenden Modellinduktoren behandelt worden waren (β -Naphthoflavon-behandelte Tiere für EROD, Phenobarbital-behandelte Tiere für PROD und Dexamethason-behandelte Tiere für ERDM).

Sowohl die EROD- als auch die ERDM-Aktivität waren *in vitro* nicht durch Propiverin in Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ (EROD) bzw. 0,2–2 $\mu\text{mol/l}$ (ERDM) beeinflussbar (Tab. 7 und 8).

Tabelle 7: Ergebnisse zur Beeinflussung der Ethylresorufin-O-Deethylase (EROD) durch Propiverin *in vitro*; gepoolte Mikrosomen von BNF-behandelten Tieren; M einer Doppelbestimmung

Ethylresorufin [μM]	EROD [nmol/min/mgEiweiß]	
	Kontrolle	+ 1 μM Propiverin
0,75	0,651	0,698
1,5	1,030	1,111
3,0	2,033	2,126
5,0	2,255	2,388
	$K_m = 3,9 \mu\text{M}$ $V_{\text{max}} = 4,2 \text{ nmol/min/mg}$	$K_m = 3,8 \mu\text{M}$ $V_{\text{max}} = 4,4 \text{ nmol/min/mg}$

Tabelle 8: Ergebnisse zur Beeinflussung der Erythromycin-N-Demethylase (ERDM; 0,4 mmol/l Erythromycin) *in vitro* durch Propiverin in verschiedenen Konzentrationen; Mikrosomen DEX-behandelter Tiere; M einer Doppelbestimmung

Propiverinkonzentration [μM]	Aktivität der ERDM [nmol/min/mgEiweiß]
0	1,260
0,2	1,002
0,5	0,992
1,0	1,132
2,0	1,105

Die *In vitro* Aktivität der PROD wurde durch Propiverin gehemmt. In Anwesenheit von 2 μM Propiverin verringerten sich sowohl K_m als auch V_{max} (Abb. 12 und 13, Tab. 20 im Anhang).

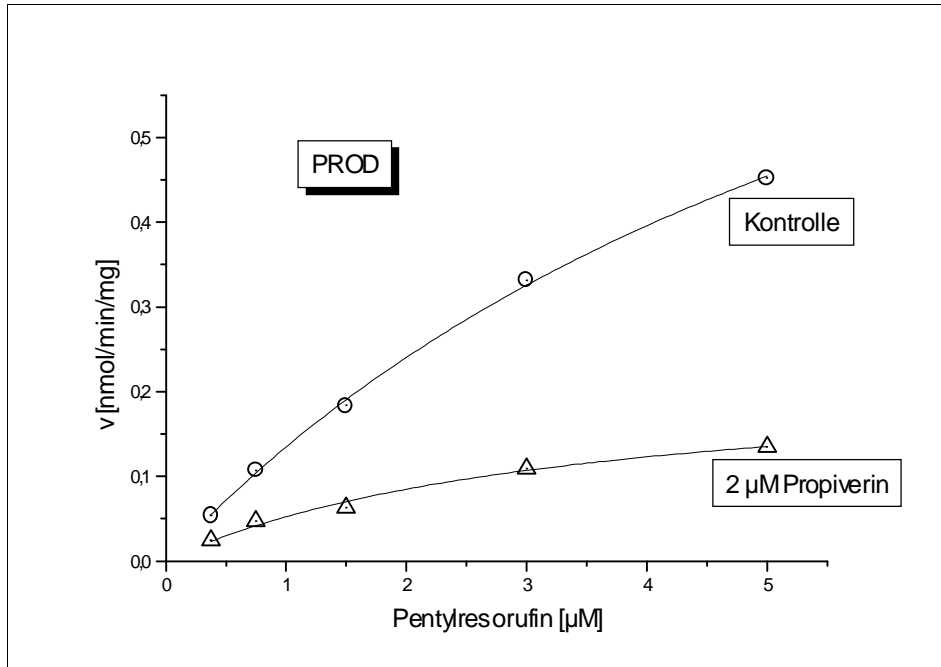


Abbildung 12: Einfluss von Propiverin (2 μM) auf die Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD) gepoolter Mikrosomen nach Behandlung mit Phenobarbital (3Tage; 80 mg/kg) (M von 6 Bestimmungen)

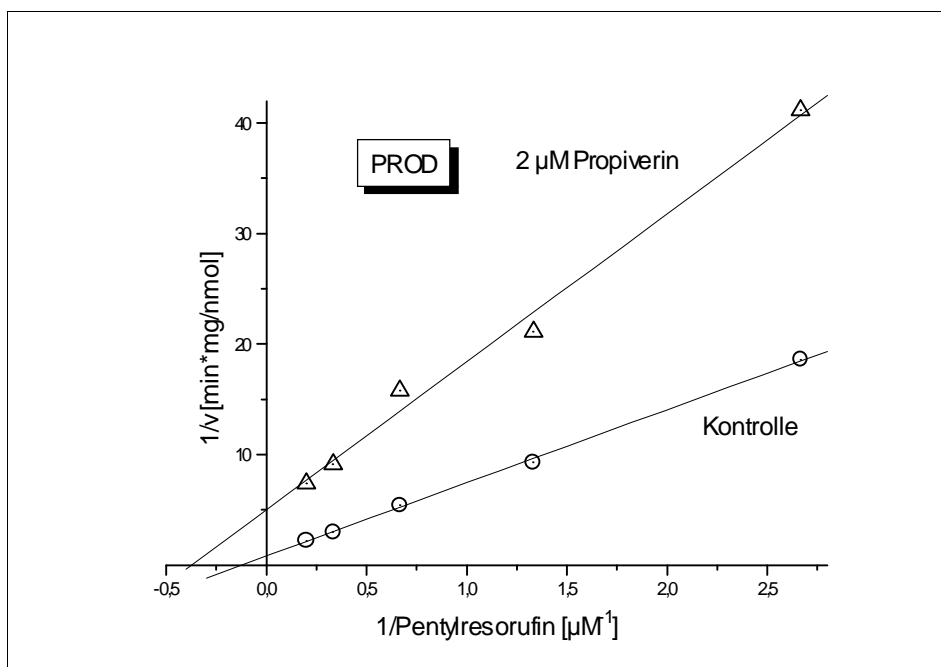


Abbildung 13: Lineweaver-Burk-Diagramm der in Abb. 12 dargestellten Ergebnisse zur Veranschaulichung von K_M und V_{max}

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit der PROD-Hemmung bei konstanter Substratkonzentration zeigt Abb. 14. Wegen der geringen Anzahl der verfügbaren Daten wurde lediglich die Größenordnung der halbmaximalen Hemmkonzentration IC_{50} geschätzt. Diese lag im Bereich von 0,5 $\mu\text{mol/l}$. Durch eine Konzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} der PROD zu ca. 75 % gehemmt (Abb. 14; Tab. 21 im Anhang).

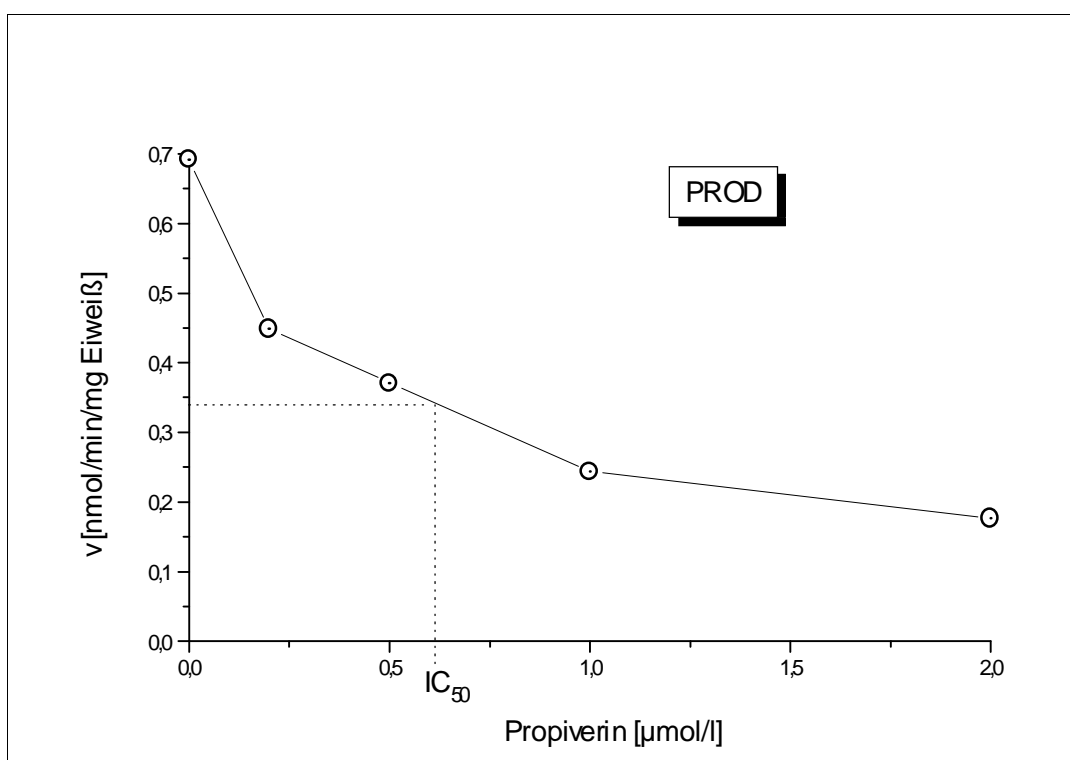


Abbildung 14: Einfluss von Propiverin (0,2–0,5–1–2 μM) auf die Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD; 5 $\mu\text{mol/l}$ Pentylresorufin) gepoolter Mikrosomen nach Behandlung mit 80 mg/kg Phenobarbital über 3Tage; (M einer Doppelbestimmung)

Ergänzend wurde der Einfluss der Hauptmetaboliten von Propiverin M2 (dealkyliertes Propiverin), M5 (N-Oxid von Propiverin) und M6 (N-Oxid von M2) auf die PROD-Aktivität gepoolter Mikrosomen Phenobarbital-behandelter Ratten untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche PROD-Hemmung durch M2 bei einer Konzentration von 1 und 2 $\mu\text{mol/l}$, während in Anwesenheit der Metaboliten M5 (2 und 5 μM) und M6 (2 μM) keine Hemmungswirkung zu verzeichnen war (Abb. 15–17; Tab. 22 im Anhang).

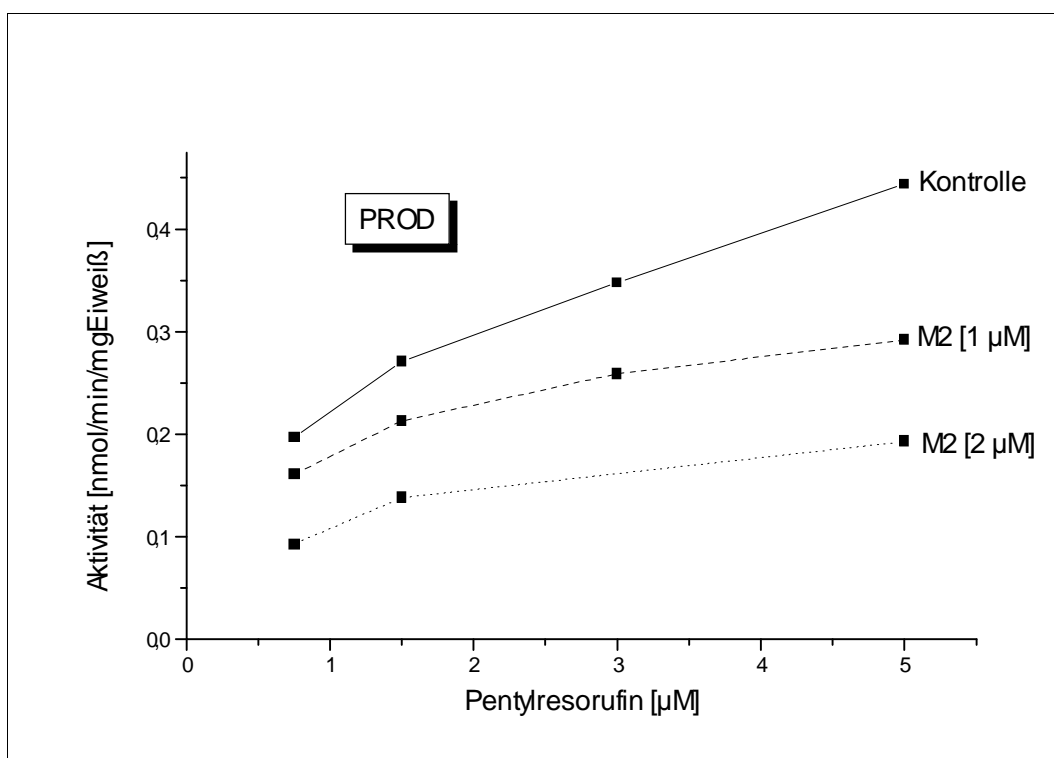


Abbildung 15: Wirkung des Propiverinmetaboliten M2 (1 bzw. 2 μM) auf die Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD) M einer Doppelbestimmung

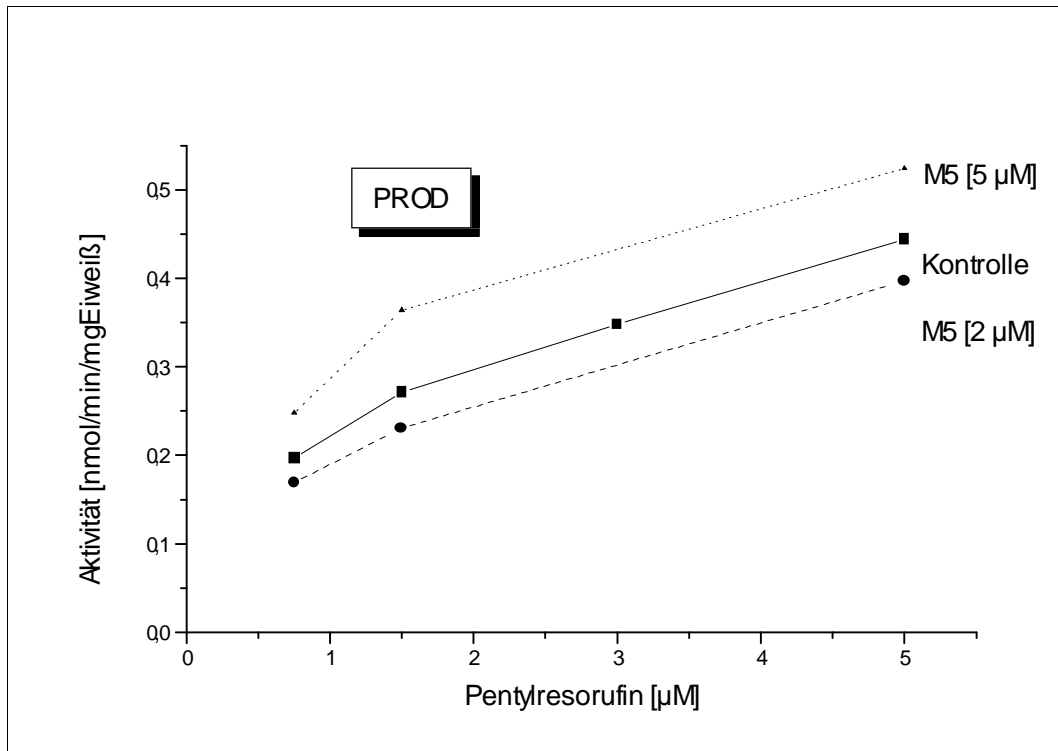


Abbildung 16: Wirkung des Propiverinmetaboliten M5 (2 bzw. 5 μM) auf die Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD) M einer Doppelbestimmung

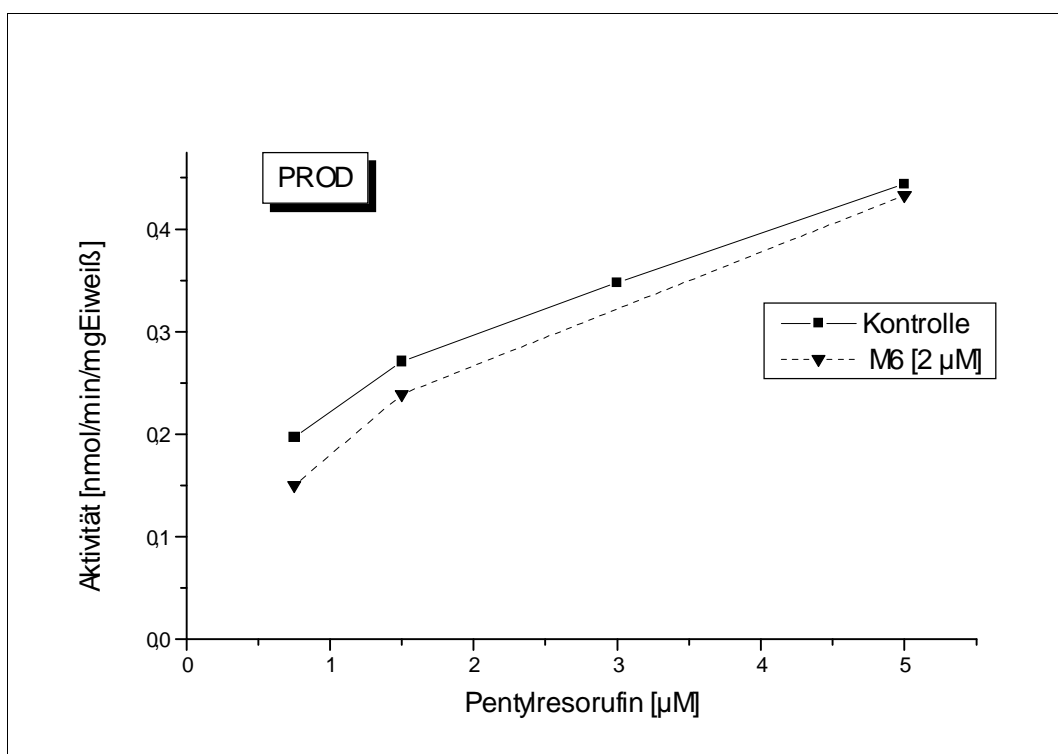


Abbildung 17: Wirkung des Propiverinmetaboliten M6 (2 μM) auf die Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD) M einer Doppelbestimmung

3.5. Wirkung von Propiverin auf die CYP2B-Expression

Wegen des starken Anstieges der PROD-Aktivität nach Propiverinbehandlung (60 mg/kg) wurde mittels Western-Blot der Gehalt an CYP2B-Protein in den betroffenen Mikrosomen bestimmt. Da die Wirkung von Phenobarbital auf das CYP2B bekannt war (Kemper 1998), dienten die Mikrosomen der entsprechenden Gruppe als zusätzlicher Vergleich.

Die Behandlung mit 60 mg/kg Propiverin führte zu einer deutlichen Zunahme des Gehaltes an CYP2B-Protein im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Induktion der CYP2B-Expression durch 10 mg/kg Phenobarbital in dieser Studie konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 18).

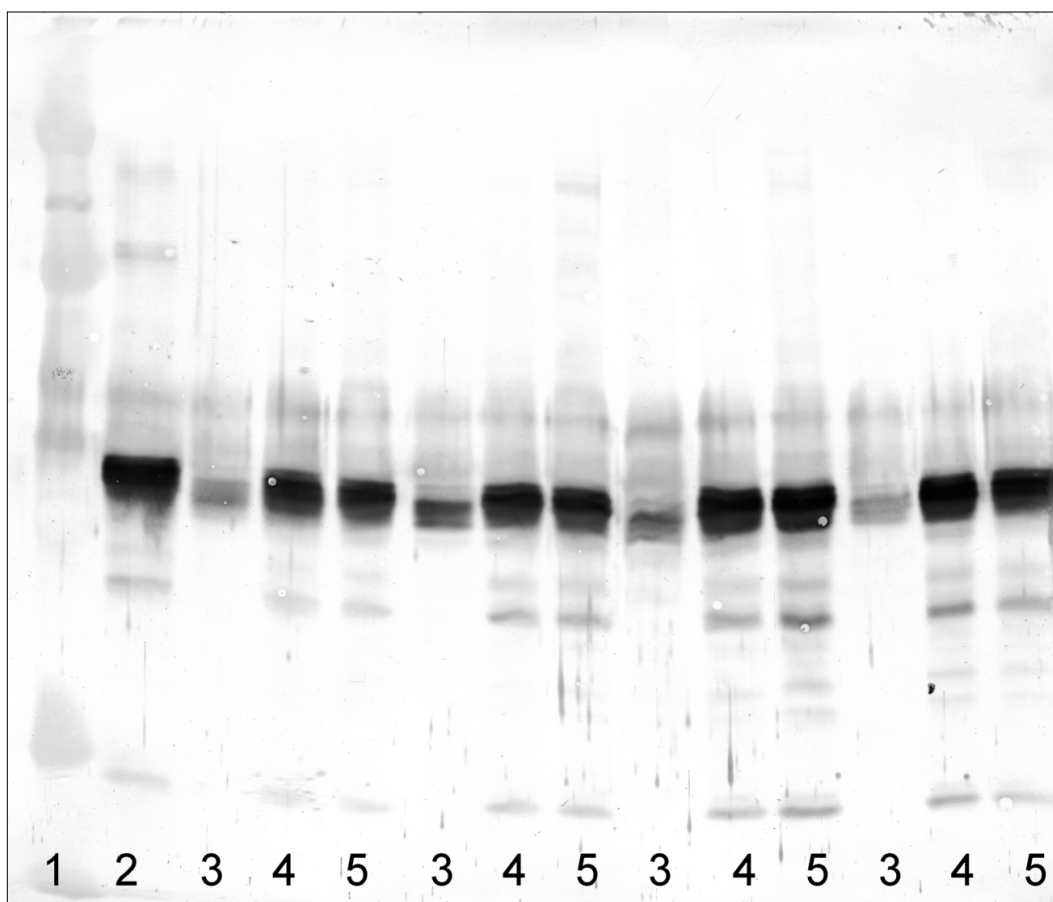


Abbildung 18: Western-Blot zum Nachweis von CYP2B-Protein der Mikrosomen.

- 1 Größenstandard (Rainbow Mark);
- 2 Positiv-Kontrolle (mitgelieferte Mikrosomen phenobarbitalbehandelter Ratten)
- 3 Kontrolltiere (Behandlung mit aqua dest.)
- 4 Propiverinbehandlung (60 mg/kg; 5 d);
- 5 Phenobarbitalbehandlung (10 mg/kg; 5d)

4. Diskussion

Vom Benzilsäurederivat Propiverin war neben seiner intensiven Verstoffwechslung bei Mensch und Ratte auch eine Wirkung auf das hepatische Cytochrom P450 bekannt. In vorausgegangenen Arbeiten führte eine Behandlung mit Propiverin in Dosen von 20 bzw. 60 und 120 mg/kg zu einer Erhöhung des relativen Lebergewichtes, einer Zunahme des Gehaltes an Cytochrom P450 und einer verstärkten Aktivität der Aminopyrin-N-Demethylase und der Anilinhydroxylase (vergl. Kap. 1.2). Das strukturverwandte Denaverin erwies sich bei der Ratte einerseits als Induktor vom Phenobarbitaltyp mit einer starken Erhöhung der Pentyresorufin-O-Depentylase-Aktivität und andererseits als Inhibitor sowohl der Aktivität des CYP2D, gemessen als Aktivität der Dextromethorphan-O-Demethylase, als auch der Expression dieses CYP-Enzymes.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung von Propiverin auf das hepatische CYP-System der Ratte durch die Untersuchung relativ spezifischer Enzymaktivitäten und den Vergleich mit bekannten Cytochrom-P450-Induktoren näher charakterisiert werden. Zugleich sollte durch die Überprüfung des Dosisbereiches von 0,6–60 mg/kg ein Schwellenwert ohne nachweisbare Enzyminduktion ermittelt und somit eine Aussage zur klinischen Sicherheit des seit vielen Jahren erfolgreich angewandten Medikamentes im Hinblick auf die Beeinflussung wichtiger fremdstoffmetabolisierender Enzyme getroffen werden.

4.1. Diskussion der Methode

Es stehen zahlreiche standardisierte *In-vitro*-Techniken zur Bestimmung der spezifischen am Metabolismus einer Substanz beteiligten CYP-Enzyme und zur Prüfung des induktiven bzw. inhibitorischen Potentials einer Verbindung zur Verfügung. Diese Versuche werden mit menschlichen oder tierischen Geweben (v.a. Leberschnitte, kultivierte Hepatozyten oder subzelluläre Fraktionen des Lebergewebes) oder geklonten Zellsystemen von Bakterien und Hefen, die spezifische CYP-Enzyme produzieren, durchgeführt (Gonzales und Korzekwa 1995, Waterman et al. 1995).

Der entscheidende Nachteil dieser Systeme liegt darin, dass sie den kompli-

zierten Verhältnissen *in vivo* nicht vollständig Rechnung tragen können. Die Regulation der Enzymaktivitäten unterliegt einer komplexen hormonellen Steuerung (Porter und Coon 1991, Morgan et al. 1998). Die Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz sowie der Metaboliten an und in der Leberzelle und die Verfügbarkeit der Substrate für das Enzym können hier ebenso wie die Möglichkeit der Beteiligung anderer Enzymsysteme am Umsatz der Testsubstanz nicht vollständig nachvollzogen werden. Dabei spielen Faktoren wie hepatischer Blutfluss, Plasmaproteinbindung und die Kapazität von Transportmechanismen eine besondere Rolle (Friedberg et al. 1999, Glue und Clement 1999, Schmid et al. 1999).

Wegen dieser Schwierigkeiten wird die Enzyminduktion häufig wie in dieser Studie mit einem *ex vivo* Versuch untersucht, wobei die zu untersuchende Substanz an Versuchstiere *in vivo* verabreicht und anschließend Änderungen der Aktivität mikrosomaler Enzyme *in vitro* bestimmt werden. Die Enzyminduktion erreicht dabei ein Maximum innerhalb von 2–5 Tagen (Parkinson 1996).

Zusätzlich zur Bestimmung der Aktivitäten können Änderungen der Ausprägung spezifischer CYP-Enzyme auch durch immunochemische Methoden mit Bestimmung des Gehaltes an Protein oder RNA (Western- oder Northern-Blotting) festgestellt werden. Diese Methoden eignen sich besonders zum Nachweis der Induktion durch Substanzen, die durch feste Bindung an das aktive Zentrum des Enzymes der enzymatischen Bestimmung entgehen (Parkinson 1996).

Die Dosierung von Propiverin wurde vom oberen therapeutischen Bereich (0,6 mg/kg) bis zu einem Bereich mit bereits festgestellter Wirkung auf das CYP (60 mg/kg) gewählt (Wengler et al. 1989), der aber unterhalb der bei Ratten über einen längeren Zeitraum vertragenen Dosis lag (Nakano et al. 1989).

Nach der Gewinnung der Mikrosomenfraktionen wurden diese über unterschiedliche Zeiträume gelagert. Mit einer wesentlichen Abnahme der Enzymaktivitäten war nach der Lagerung bei -80°C und zügiger Bestimmung nach dem Auftauen nicht zu rechnen (Yamazaki et al. 1997).

Wegen der zum Teil überlappenden Substratspezifität ist die Wahl einer reprä-

sentativen Reaktion für eine CYP-Isoform nicht immer unproblematisch. Die Wertung der untersuchten Enzymaktivitäten erfolgt im einzelnen bei der Besprechung der Ergebnisse.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Relatives Lebergewicht und mikrosomaler Proteingehalt

Die Gabe von Propiverin in einem Dosisbereich von 0,6 bis 6 mg/kg blieb ohne Einfluss auf das Körper- und relative Lebergewicht. Die Zunahme des relativen Lebergewichtes nach der Behandlung mit 60 mg/kg ging ohne signifikante Änderungen des mikrosomalen Proteingehaltes einher und war vor allem mit der Abnahme des Körpergewichtes zu erklären. Ähnliche Ergebnisse zeigten Untersuchungen zur subakuten (Nakano et al. 1989) und chronischen (Yamashita et al. 1990) Toxizität von Propiverin bei der Ratte. Dabei kam es nach 13- bzw. 52-wöchiger Behandlung zu einer Abnahme des Körpergewichtes ab einer Dosis von 50 mg/kg bei männlichen Tieren. Bei gleichzeitiger Zunahme des relativen Lebergewichtes kam es zu einer Hypertrophie und fettigen Degeneration der Hepatozyten und einer leichten Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums.

Der letale Ausgang der Behandlung mit 60 mg/kg Propiverin für ein Tier war nach Toxizitätsstudien mit der Tolerierung von 150 mg/kg über 13 Wochen (Nakano et al. 1989) unerwartet und wurde auf die anticholinergen Wirkungen z.B. auf Herz und Gefäßsystem mit interindividuellen Schwankungen der Verträglichkeit zurückgeführt.

4.2.2. Gesamt-CYP-Gehalt der Lebermikrosomen

Der Gesamtgehalt an Cytochrom P450 war in unserer Studie durch die Referenzsubstanzen und durch Propiverin in der höchsten Dosierung induzierbar. Die Werte der Kontrollgruppe und der höchsten Propiverin-Gruppe lagen im Bereich der von Wengler (Wengler 1989) ermittelten Werte.

Zu einem signifikanten Anstieg des Gesamtgehaltes an Cytochrom P450 nach Propiverinbehandlung kam es erst weit oberhalb des therapeutischen Bereiches (Abb. 3).

4.2.3. Enzymaktivitäten

Hauptanliegen dieser Studie war die differenzierte Untersuchung der Wirkung einer subakuten Behandlung mit Propiverin auf die Aktivität der für den Fremdstoffmetabolismus wichtigsten CYP-Isoformen in der Rattenleber. Dazu gehören die Mitglieder der Familien CYP1 (CYP1A), CYP2 (CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D und CYP2E) und CYP3 (CYP3A) (Gonzales & Lee 1996). Die Aktivitäten der einzelnen Enzyme wurden durch die Propiverinbehandlung in unterschiedlicher Weise beeinflusst.

4.2.3.1. EROD und PROD

Die Dealkylierung von Alkylresorufinen wird selektiv von einzelnen CYP-Isoformen katalysiert und häufig zur Bestimmung der Aktivität dieser Formen verwendet. CYP1A1 und CYP2B1 der Rattenleber zeigen nach Induktion durch 3-Methylcholanthren bzw. Phenobarbital eine Substratselektivität zu Ethyl- bzw. Pentylresorufin. Ohne Induktion von CYP1A wird die Ethylresorufin-O-Deethylierung hauptsächlich durch CYP2C6 bei unbehandelten Tieren und durch CYP2B1 nach Phenobarbitalbehandlung katalysiert. Pentylresorufin wird durch verschiedene CYP-Isoformen metabolisiert, hauptsächlich jedoch durch CYP1A und vor allem durch CYP2B nach entsprechender Induktion (Alterman et al. 1994, Burke et al. 1994).

Hervorzuheben ist die deutliche Induktion der PROD-Aktivität mit einem Anstieg auf das 33fache nach Gabe von 60 mg/kg Propiverin. Diese lag in der Größenordnung der charakteristischen PROD-Induktion durch 10 mg/kg Phenobarbital. Im Gegensatz zum starken Anstieg in der höchsten Dosierung blieb die PROD-Aktivität bis zur Dosis von 6 mg/kg Propiverin ohne signifikante Änderung (Abb. 4). Diese Ergebnisse sprachen für eine Induktion des CYP2B in der Rattenleber durch Propiverin ab einer Dosis oberhalb von 6 mg/kg.

Der dosisabhängige Anstieg der Aktivität der EROD nach Propiveringabe auf etwa das 5fache bei 60 mg/kg lag im Bereich des Wertes nach Phenobarbitalgabe und ließ sich ebenfalls mit der Induktion des CYP2B erklären (Alterman et al. 1994, Burke et al. 1994). Die zu erwartende Induktion von CYP1A durch β -

Naphthoflavon (Wattenberg et al. 1968) konnte durch den Anstieg der EROD auf das 16fache bestätigt werden und zeigte die Sensitivität dieser Studie gegenüber einer CYP1A-Induktion.

4.2.3.2. ECOD

Die Aktivität der Ethoxycumarin-O-Deethylase wird bei der Ratte durch multiple CYP-Isoformen der Subfamilien CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP3A und vor allem CYP1A1 katalysiert (Edwards et al., 1984). Die Wirkung von Phenobarbital und β -Naphthoflavon auf die Aktivität war mit den Ergebnissen anderer Arbeiten vergleichbar (Wortelboer et al. 1991). Propiverin (60 mg/kg) und Phenobarbital (10 mg/kg) induzierten die ECOD in ähnlichem Ausmaß, was für eine Erhöhung der Aktivität o.g. CYP-Isoformen sprach, wobei eine Aussage zur Beteiligung der einzelnen Enzyme nicht möglich war. Dexamethason hatte in unserer Arbeit keinen Einfluss auf die ECOD-Aktivität. Die Induktion durch β -Naphthoflavon war deutlich am stärksten und vor allem auf die Induktion des CYP1A zurückzuführen.

4.2.3.3. ERDM

Die N-Demethylierung von Erythromycin wird durch CYP3A-Isoformen katalysiert (Zhang und Thomas 1996). Der Anstieg der ERDM-Aktivität nach hochdosierter Propiverinbehandlung könnte ebenso wie die nicht ganz so starke Zunahme nach Phenobarbitalgabe mit einer für Induktoren vom Phenobarbitaltyp beschriebenen Erhöhung der CYP3A-Aktivität (Waxman und Azaroff 1992, Kemper 1998) zusammenhängen. Dexamethason führte als bekannter Induktor des CYP3A (Gonzalez 1989; Cooper 1993) zum deutlichsten Anstieg der ERDM-Aktivität. Durch klinisch relevante Dosen Propiverin wurde die Aktivität dieses Enzymes nicht beeinflusst (Abb. 7).

Dieses Ergebnis war wegen der herausragenden Rolle des CYP3A im Fremdstoffmetabolismus von besonderer Bedeutung. Beinahe die Hälfte aller Xenobiotika wird beim Menschen nach heutigem Wissen durch das CYP 3A4 metabolisiert, das einen Anteil von etwa 25–28 % am Gesamt-CYP-Gehalt der menschlichen Leber ausmacht (Guengerich 1995; Rendic und Di Carlo 1997).

4.2.3.4. DNDM

Am mikrosomalen Umsatz von Diazepam beteiligen sich die Enzyme der Subfamilien CYP2C und CYP3A. Wird die durch CYP2C katalysierte N-Demethylierung als Maß für die Aktivität dieser Subfamilie gemessen, ist die gleichzeitige 3-Hydroxylierung von Diazepam durch CYP3A zu beachten (Yasumori et al. 1993). Der geringe signifikante Anstieg der Diazepam-N-Demethylase nach Phenobarbital- und Propiveringabe (60 mg/kg) konnte auf eine geringe Erhöhung des CYP2C zurückgeführt werden. Die Induktion dieser Subfamilie durch Phenobarbital ist aus der Literatur bekannt (Waxman und Azaroff 1992, Kemper 1998).

4.2.3.5. DXDM

Die Aktivität der DXDM zur Abschätzung der Wirkung auf das CYP2D (Wu et al. 1993) wurde durch die Behandlung mit Propiverin nicht signifikant beeinflusst. Die scheinbar verminderte Aktivität des CYP2D nach der Behandlung mit Dexamethason wurde mit einer Induktion der durch CYP3A katalysierten Nebenwege der Reaktion (N-Demethylierung von Dextromethorphan und Dextrorphan) begründet (Walter et al. 1998).

Mit diesem Ergebnis unterscheidet sich Propiverin deutlich vom strukturverwandten Denaverin, das zu einer erheblichen Reduktion der CYP2D-Aktivität führte (Vogelgesang 1997).

4.2.3.5. NPH

Die fehlende Beeinflussung der NPH-Aktivität durch Propiverin und die Referenzsubstanzen sprach gegen eine Wirkung der verabreichten Substanzen auf das für diese Reaktion hauptsächlich verantwortliche CYP2E1 (Amato et al. 1998, Tassaneeyakul et al., 1993, Zerilli et al. 1998). Die Vermutung einer CYP2E-Induktion durch Propiverin, die sich aus der nachgewiesenen Zunahme der Anilinhydroxylase ergab (vergl. Kap 1.2.), konnte nicht bestätigt werden.

4.2.3.6. Induktionsmuster

Der Vergleich der Induktionsmuster der Referenzsubstanzen β -Naphthoflavon,

Phenobarbital und Dexamethason mit der Propiverinwirkung auf die Monoxygenaseaktivitäten zeigte eine große Ähnlichkeit zwischen Propiverin und Phenobarbital (Abb. 19). Dabei zeigte Propiverin nach hochdosierter Gabe (60 mg/kg) das typische Bild für einen Induktor vom Phenobarbital-Typ mit mit einer herausragenden Aktivitätszunahme des CYP2B, hier gemessen als Aktivität der PROD.

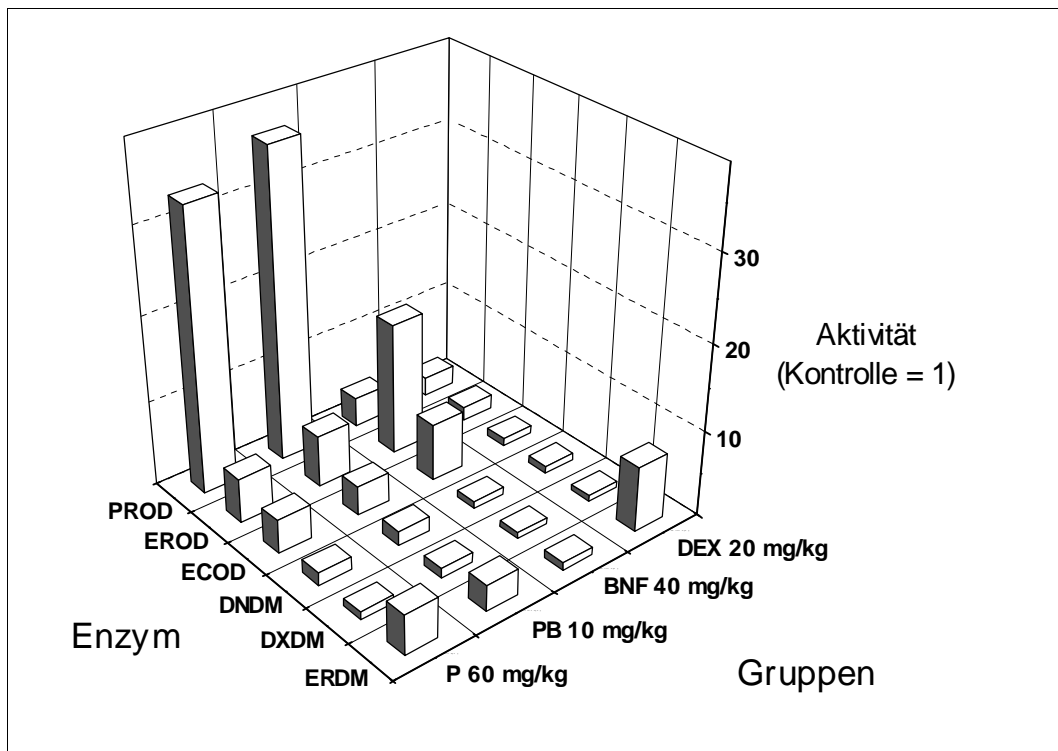


Abbildung 19: Induktionsmuster (Übersicht) nach Gabe von Propiverin (P), Phenobarbital (PB), β -Naphthoflavon (BNF) und Dexamethason (DEX) an männliche Ratten über 5 Tage im Verhältnis zur Kontrollgruppe (MW; N = 8); EROD: Ethylresorufin-O-Deethylase; PROD: Pentylresorufin-O-Depentylase; ECOD: Ethoxycumarin-O-Deethylase; DNDM: Diazepam-N-Demethylase; DXDM: Dextromethorphan-O- Demethylase; ERDM: Erythromycin-N-Demethylase

Dieses Induktionsverhalten von Propiverin wurde bisher nur aus Analogieschlüssen vermutet (Wengler 1989) und konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden.

Wegen der starken Zunahme der CYP2B-Aktivität wurde eine vermehrte Ex-

pression des CYP2B-Proteines vermutet. Diese konnte mittels Western Blot für die Behandlung mit 10 mg/kg Phenobarbital und 60 mg/kg Propiverin gezeigt werden.

Als Induktoren vom Phenobarbitaltyp sind verschiedene Substanzen ohne Strukturverwandtschaft bekannt (Thomas et al. 1981, Dannan et al. 1983, Kemper 1998). Im Gegensatz zu anderen Formen der CYP-Induktion (z.B. CYP1A durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder CYP2E durch niedermolekulare Substanzen) ist der Induktionsmechanismus vom Phenobarbital-Typ noch wenig aufgeklärt (Kemper 1998). Offensichtlich spielen neben einer hormonellen Regulation Vorgänge auf der Ebene der Transcription mit Beteiligung verschiedener nukleärer Rezeptoren eine Rolle (Jarukamjorn et al. 1999; Waxman 1999).

Bis zu einer Dosis von 2 mg/kg kam es zu keiner Induktion der gemessenen Enzymaktivitäten durch Propiverin. Zur Induktion der PROD-Aktivität war offensichtlich eine Schwellendosis oberhalb von 6 mg/kg notwendig. Andere Enzymaktivitäten (EROD und ECOD) waren bereits nach der Behandlung mit 6 mg/kg Propiverin erhöht. Mit dem vorliegenden Studiendesign war es wegen der überlappenden Substratspezifität der CYP-Enzyme nicht möglich zu differenzieren, ob es sich dabei um die Wirkung des CYP2B oder die Beteiligung anderer CYP-Isoformen (v.a. CYP1A bzw. CYP2C bei EROD und CYP2A, CYP2C und CYP3A bei ECOD) handelte. Da die Ergebnisse jedoch im Einklang mit der Hypothese der Phenobarbital-Typ-Induktion des Propiverin stehen, war diese Unterscheidung nicht notwendig.

4.2.4. Einfluss von Propiverin auf ausgewählte Enzymaktivitäten *in vitro*

Das Modell des *Ex-vivo*-Versuches mit einer Behandlung der lebenden Tiere und anschließender Messung der Enzymaktivitäten *in vitro* eignet sich nicht zur Erkennung möglicher kompetitiver Vorgänge. Daher wurde die Studie durch eine *In-vitro*-Versuchsreihe ergänzt.

Die durch Propiverin *in vivo* beeinflussten Cytochrom-P450-abhängigen Reaktionen der EROD, PROD und ERDM wurden zur näheren Charakterisierung der

Propiverinwirkung auf eine eventuelle *In-vitro*-Hemmung hin untersucht. Dazu wurden gepoolte Mikrosomen von mit β -Naphthoflavon, Phenobarbital bzw. Dexamethason behandelten Tieren mit einer induzierten Aktivität des CYP1A, CYP2B bzw. CYP3A (siehe oben) verwendet.

Wegen der fehlenden Beeinflussung der Dealkylierung von Ethylresorufin durch Propiverin (1 $\mu\text{mol/l}$) *in vitro* war eine Wirkung auf das CYP1A unwahrscheinlich (Alterman et al. 1994, Burke et al. 1994). Die untersuchte Konzentration entsprach etwa dem 4fachen des oberen therapeutischen Plasmaspiegels von Propiverin.

Die Interaktion von Propiverin (2 $\mu\text{mol/l}$) mit der PROD ist in Abb. 12 und 13 (Seite 34) dargestellt. Neben der starken Inhibition von V_{max} änderte sich auch K_m . Es handelte sich bei der Hemmung der PROD durch Propiverin folglich um ein komplexes Geschehen mit der Wirkung mehrerer Mechanismen. Die nähere Charakterisierung des Hemmungsmechanismus (kompetitiv, nicht kompetitiv, unkompetitiv) war aus den vorliegenden Daten nicht möglich (Ito et al. 1998) und auch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit.

Es war zu erwarten, dass in der Inkubationsmischung neben der Indikatorreaktion der PROD auch eine Metabolisierung von Propiverin stattfand. Entstehende Metaboliten könnten zur PROD-Hemmung beitragen. Die orientierende Untersuchung der Beeinflussung der PROD-Aktivität durch die Propiverin-Metaboliten M2 (Despropylpropiverin), M5 (Propiverin-N-Oxid) und M6 (N-Oxid von M2) zeigte eine solche Hemmung durch M2 bei einer Konzentration von 1 und 2 $\mu\text{mol/l}$.

Die halbmaximale Hemmkonzentration IC_{50} von Propiverin lag mit etwa 0,5 $\mu\text{mol/l}$ im Bereich der zweifachen therapeutischen Plasmakonzentration. Um klinisch relevante Interaktionen auszuschließen, scheinen weitere Untersuchungen angebracht (s.u.).

Gegen eine Beeinflussung des CYP3A der Ratte *in vitro* durch Propiverin in Konzentrationen zwischen 0,2 und 2 $\mu\text{mol/l}$ sprach der fehlende inhibitorische Effekt auf die ERDM-Aktivität der mit Dexamethason behandelten Tiere.

4.2.5. Klinische Bedeutung

Hauptanliegen dieser Studie war es, einen Beitrag zur Sicherheit in der klinischen Anwendung von Propiverin zu leisten. Die Interpretation von Ergebnissen tierexperimenteller Untersuchungen im Hinblick auf die Verhältnisse im menschlichen Organismus erfordert eine kritische Auseinandersetzung mit den Unterschieden und Gemeinsamkeiten des untersuchten Systems bei Mensch und Tier. Die Cytochrom-P450-Subfamilien ähneln in der katalytischen Aktivität und Spezifität zwischen Mensch und Ratte in unterschiedlichem Maße. Ein Vergleich ist bei CYP2E am besten, bei CYP1A relativ gut und bei CYP2D und CYP3A mit großer Vorsicht möglich. Die größten Probleme gibt es bei den Subfamilien CYP2A, CYP2B und CYP2C (Guengerich 1997). Ein Speziesvergleich der Wirkung von Induktoren auf die einzelnen Subfamilien ist noch schwieriger und weniger erforscht (Dogra et al. 1998).

Beim Menschen führen Induktoren vom Phenobarbitaltyp zu einer Induktion von hauptsächlich CYP3A4 (Guengerich 1999). Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus von beinahe der Hälfte der heute verwendeten Medikamente (Guengerich 1995).

Da die Wirkungen von Propiverin auf Enzymaktivitäten in Mikrosomen der Ratteleber erst nach Gabe des Vielfachen der empfohlenen Menge für den therapeutischen Gebrauch auftraten, werden diese in der Klinik von untergeordneter Bedeutung sein. Zur weiteren Klärung der klinischen Relevanz sollten sich *In-vivo*-Interaktionsbestimmungen mit selektiven CYP-Substraten, insbesondere für CYP3A, an gesunden Probanden anschließen.

Weiterhin sind bisher keine genauen Informationen über die am Propiverinabbau beteiligten Isoenzyme verfügbar. Daher könnte eine *In-vitro*-Untersuchung, beispielsweise mit rekombinanten humanen CYP-Isoformen, Hinweise auf den Einfluss anderer Induktoren und Inhibitoren auf den Propiverinmetabolismus geben.

4.3. Schlussfolgerungen

- Der mikrosomale Gesamtgehalt an Cytochrom P450 in der Rattenleber ändert sich nach 5-tägiger oraler Gabe von Propiverin in Dosen bis 6 mg/kg nicht. Eine Dosis von 60 mg/kg steigert den Gehalt auf etwa 190 %.
- Propiverin beeinflusst am stärksten die Aktivität der Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD) als Zeichen einer CYP2B-Induktion. Bei fehlendem Effekt bis 6 mg/kg kommt es bei 60 mg/kg zum ca. 30fachen Anstieg.
- Die CYP2B-Induktion durch 60 mg/kg Propiverin geht mit einer Erhöhung des Gehaltes an CYP2B-Protein einher.
- Im Dosisbereich von 6–60 mg/kg werden weitere Monooxygenaseaktivitäten dosisabhängig induziert: Die Gabe von 6 mg/kg oder mehr führt zu einem leichten Anstieg der Ethylresorufin-O-Deethylase (EROD) und Ethoxycumarin-O-Deethylase (ECOD); zusätzlich werden die Diazepam-N-Demethylase (DNM) und Erythromycin-N-Demethylase (ERDM) durch 60 mg/kg Propiverin in ihrer Aktivität erhöht.
- Hochdosierte (60 mg/kg) Propiverinbehandlung führt zu einem Induktionsmuster vom Phenobarbital-Typ
- Die Induktion des Cytochrom P450 (Gesamtgehalt und einzelne Aktivitäten) erfolgt dosisabhängig; als *no observed effect level* (NOEL) wurden 2 mg/kg Propiverin ermittelt.
- Das CYP2D wird durch Propiverin bis 60 mg/kg nicht beeinflusst.
- *In vitro* kommt es zu einer Hemmung der PROD durch Propiverin und seinen Metaboliten M2 (Despropylpropiverin).

5. Zusammenfassung

Das Blasenspasmolytikum Propiverin war aus der Literatur als Induktor von CYP-Enzymen in der Rattenleber bekannt. Die vorliegenden Daten gestatteten keine Aussagen zu den beeinflussten CYP-Subfamilien und zur Dosisabhängigkeit der Induktion.

In dieser Studie wurde die Beeinflussung der mikrosomalen Ethylresorufin-O-Deethylase (EROD), Ethoxycumarin-O-Deethylase (ECOD), Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD), Diazepam-N-Demethylase (DNNDM), Dextromethorphan-O-Demethylase (DXDM), p-Nitrophenolhydroxylase (NPH) und Erythromycin-N-Demethylase (ERDM) in der Leber männlicher Ratten nach Behandlung mit 0,6-60 mg/kg Propiverin über 5 Tage im Vergleich mit den bekannten CYP-Induktoren Phenobarbital, β -Naphthoflavon und Dexamethason untersucht.

Es zeigte sich, dass Propiverin in einer Dosierung bis 2 mg/kg weder die untersuchten Monooxygenaseaktivitäten noch den Gesamt-CYP-Gehalt beeinflusst.

Das Induktionsmuster nach der Behandlung mit Propiverin hatte mit einer herausragenden Induktion der PROD (33fach) sowie einer geringeren Erhöhung der EROD, ECOD, DNNDM und ERDM den Charakter einer Phenobarbital-Typ-Induktion. Die vermehrte CYP2B-Expression nach Gabe von 60 mg/kg Propiverin konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden.

Die DXDM als Maß für die CYP2D-Aktivität änderte sich durch Propiverinbehandlung im untersuchten Dosisbereich nicht.

Zusätzlich zeigten Propiverin und Despropylpropiverin *in vitro* eine Hemmung der PROD (halbmaximale Hemmkonzentration IC_{50} ca. 0,5 μ mol/l Propiverin); die EROD und ERDM blieben *in vitro* unbeeinflusst.

Zur Induktion der untersuchten Enzyme kam es erst nach Gabe des Vielfachen der empfohlenen Menge für den therapeutischen Gebrauch, daher ist in der klinischen Anwendung von Propiverin nicht mit Arzneimittelinteraktionen durch CYP-Induktion zu rechnen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Agundez JAG, Martinez C, Benitez J: Metabolism of aminopyrine and derivatives in man: In vivo study of monomorphic and polymorphic metabolic pathways. *Xenobiotica* 1995; 25: 417-427.
- [2] Alterman MA, Carvan MJ, Busbee DL: Ethoxyresorufin and pentoxyresorufin O-dealkylation by hepatic microsomes from female Fischer 344 rat: effects of age and diet. *Mech Ageing Dev* 1994; 77: 1–11.
- [3] Amato G, Longo V, Mazzaccaro A, Gervasi PG: Chlorzoxazone 6-Hydroxylase and *p*-Nitrophenol Hydroxylase as the Most Suitable Activities for Assaying Cytochrome P450 2E1 in Cynomolgus Monkey Liver. *Drug Metab Dispos* 1998; 26: 483–489.
- [4] Andersson KE: Advances in the pharmacological control of the bladder. *Exp Physiol* 1999; 84:195–213.
- [5] Andersson T, Miners JO, Veronese ME, Birkett DJ: Diazepam metabolism by human liver microsomes is mediated by both S-mephenytoin hydroxylase and CYP3A isoforms. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38: 131–137.
- [6] Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE et al.: Ketocozazole and Sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P-4503A and 2C9. *Xenobiotica* 1995; 25: 261–270.
- [7] Blau U, Retzke U: Treatment of the symptoms of urinary urge and urge incontinence with propiverin hydrochlorid. *Zentralbl Gynakol* 1984; 106: 981-987.
- [8] Borchert HH, Pipping H, Pfeiffer S: Metabolische Wechselwirkungen von Denaverin. *Pharmazie* 1985; 40: 720–722.
- [9] Borchert HH, Pipping H, Pfeifer S: Metabolische Wechselwirkungen von Propiverin und Triperiden. *Pharmazie* 1986; 41: 66–67.

- [10] Burke MD, Mayer RT: Differential effects of phenobarbitone and 3-methylcholanthrene induction on the hepatic microsomal metabolism and cytochrome-P-450-binding of phenoxazone and homologous series of its n-alkyl ethers (alkoxyresorufins).
Chem Biol Interactions 1983; 45: 243–258.
- [11] Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT: Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin o-dealkylation in human and rat liver. Biochem Pharmacol 1994; 48: 923–936.
- [12] Chapple CR: Muscarinic receptor antagonists in the treatment of overactive bladder. Urology 2000; 55(5A Suppl): 33–46.
- [13] Cooper KO, Reik LM, Jayyosi Z, Bandiera S, Kelley M, Ryan DE, Danniell R, McCluckey SA, Levin W, Thomas PE: Regulation of two members of the steroid-inducible cytochrome P450 subfamily (3A) in rats.
Arch. Biochem Biophys 1993; 301: 345–354.
- [14] Dannan GA, Guengerich FP, Kaminsky LS, Aust SD: Regulation of cytochrome P-450. Immunochemical quantitation of eight isozymes in liver microsomes of rats treated with polybrominated biphenyl congeners. J Biol Chem 1983; 258: 1282–1288.
- [15] De Morais SMF, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA: The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans.
J Biol Chem 1994; 269: 15419–15422.
- [16] Dogra SC, Whitelaw ML, May BK: Transcriptional activation of cytochrome P450 genes by different classes of chemical inducers.
Clin Exp Pharmacol Physiol 1998; 25: 1–9.
- [17] Dorschner W, Stolzenburg JU, Griebenow R, Halaska M, Schubert G, Murtz G, Frank M, Wieners F : Efficacy and Cardiac Safety of Propiverine in Elderly Patients - A Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Study.
Eur Urol 2000; 37: 702–708.

- [18] Draper AJ, Madan A, Parkinson A: Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes.
Arch Biochem Biophys 1997; 341: 47–61.
- [19] Dressel D: Wirkung von Denaverin auf die Aktivität und die Expression von Cytochrom P450-2D in Hepatozyten.
Biopharmakologische Diplomarbeit, Universität Greifswald 1998.
- [20] Edwards AM, Glistak ML, Lucas CM, Wilson PA: 7-Ethoxycoumarin-deethylase activity as a convenient measure of liver drug metabolizing enzymes: Regulation in cultured rat hepatocytes.
Biochem Pharmacol 1984; 33: 1537–1546.
- [21] Engel G, Hofmann U, Heidemann H, Cosme J, Eichelbaum M: Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation.
Clin Pharmacol Ther 1996; 59: 613–623.
- [22] Engel G, Walter R, Hessabi B, Scheuch E, Thümmeler D, Zanger U, Siegmund W: Influence of denaverin hydrochlorid on cytochrome P450 2D enzymes of rats. Naunyn-Schmiederberg's Arch Pharmacol 1998; 356: Suppl. R11.
- [23] Evans DAP: N-Acetyltransferase. Pharmacol Ther 1989; 42: 157–234.
- [24] Friedberg T, Pritchard MP, Bandera M, Hanlon SP, Wolf CR et al.: Merits and limitations of recombinant models for the study of human P450-mediated drug metabolism and toxicity: an intralaboratory comparison. Drug Metab Rev 1999; 31: 523–544.
- [25] Glue P, Clement RP: Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism – basic concepts and methods of assessment.
Cell Mol Neurobiol 1999; 19: 309–332.
- [26] Göber B, Dressler K, Franke P: The biotransformation of Propiverinhydrochloride. Pharmazie 1988; 43: 96–98.

- [27] Gonzalez FJ: The molecular biology of cytochrome P450s.
Pharmacol Rev 1989; 40: 243–288.
- [28] Gonzales FJ, Korzekwa KR: Cytochromes P450 expression systems.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995; 35: 369–390.
- [29] Gonzalez FJ, Lee YH: Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes. FASEB J 1996; 10: 1112–1117.
- [30] Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J Biol Chem 1949; 177: 751–766.
- [31] Greenlee WF, Poland A: An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo p-dioxin.
J Pharmacol Exp Ther 1978; 205: 596–605.
- [32] Greim H: Synthesesteigerung und Abbauhemmung bei der Vermehrung der mikrosmalen Cytochrome P-450 und b₅ durch Phenobarbital.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1970; 266: 261–275.
- [33] Guengerich FP: Cytochrome P450 enzymes. Am Sci 1993; 81: 440–447.
- [34] Guengerich FP: Human cytochrome P-450 enzymes. In: Ortiz de Monteliano PR (Hrsg.):
Cytochrome P-450. Plenum, New York 1995 (2. Aufl.): 473–535.
- [35] Guengerich FP: Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different spezies.
Chem Biol Interact 1997; 106: 161–182.
- [36] Guengerich FP: Cytochrome P-450 3A4: Regulation and role in drug metabolism. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39: 1–17.

- [37] Halaska M, Martan A, Voigt R, Kaplan F, Raus K, Masata J, Klemenc J: Tolerance and effectiveness of propiverine hydrochloride in 752 patients with symptoms of detrusor hyperactivity and increased sensitivity and irritability of the urinary bladder: results of a study monitoring drug utilization. *Ceska Gynecol* 1997; 62: 259–64.
- [38] Haruno A: Inhibitory effects of propiverine hydrochloride on the agonist-induced or spontaneous contractions of various isolated muscle preparations. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 815–817.
- [39] Haustein KO, Hüller G: On the pharmacokinetics and metabolism of propiverine in man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1988; 13: 81–90.
- [40] Hegde SS, Eglen RM: Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder. *Life Sci* 1999; 64: 419–428.
- [41] Honkakoski P, Negishi M: The structure, function, and regulation of cytochrome P450 2A enzymes. *Drug Metab Rev* 1997; 29: 977–996.
- [42] Hüller G, Haustein KO, Scheithauer S: Studies on the metabolic pattern of propiverine in urine after single administration. *Pharmazie* 1988; 43: 91–95.
- [43] Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y: Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 387–412.
- [44] Jarukamjorn K, Sakuma T, Miyaura JI, Nemoto N: Different regulation of the expression of mouse hepatic cytochrome P450 2B enzymes by glucocorticoid and phenobarbital. *Arch Biochem Biophys* 1999; 369: 89–99.
- [45] Kemper B: Regulation of cytochrome P450 gene transcription by phenobarbital. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 61: 23–64.
- [46] Knodell RG, Browne DG, Gwozdz GP, Brian WR, Guengerich FP: Differential inhibition of individual human liver cytochromes P-450 by cimetidine. *Gastroenterology* 1991;101:1680–1691.

- [47] Kyhse-Andersen J: Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984; 10: 203–209.
- [48] Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
- [49] Langner, S: Die Bindung des Blasenspasmodolytikums Propiverin und einiger seiner Metabolite an menschliche Serumproteine. Med. Diss., Greifswald 1998
- [50] Li AP, Maurel P, Gomez-Lechon MJ, Cheng LC, Jurima-Romet M: Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. *Chem Biol Interact* 1997; 107: 5–16.
- [51] Lin JH, Lu AY: Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998; 35: 361–390.
- [52] Madersbacher H, Halaska M, Voigt R, Alloussi S, Hofner K: A placebo-controlled, multicentre study comparing the tolerability and efficacy of propiverine and oxybutinin in patients with urgency and urge incontinence. *BJU Int* 1999; 84: 646–651.
- [53] Matsushima S, Inada H, Asai T, Naka M, Tanaka T: Propiverine hydrochlorid, an anti-pollakiuric agent, inhibits the activity of actomyosin ATP-ase from the urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 1997; 333: 93–97.
- [54] Mazur D, Gocking K, Wehnert J, Schubert G, Herfurth G Alken RG: Clinical and urodynamic effects of oral propiverine therapy in neurogenic urinary incontinence. A multicenter study for optimizing dosage. *Urologe A* 1994; 33: 447–452.
- [55] Meisel P, Langner S, Siegmund W: In vitro binding of propiverine hydrochloride and some of its metabolites to serum albumin in man. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 270–272.
- [56] Melchior H: Harninkontinenz im Alter. *Urologe B* 1996; 36: 435–440.

- [57] Meyer UA, Skoda RC, Zanger UM, Heim M, Broly F: The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism-molecular mechanisms. In: Kalow W (ed) Pharmacogenetics of Drug Metabolism. Pergamon, New York 1992: 609–623.
- [58] Meyer UA: Overview of enzymes of drug metabolism. J Pharmacokinet Biopharm 1996; 24: 449–459.
- [59] Mictonorm[®] Mictonetten^{®*}. Blasenspasmodika zur Behandlung der Harninkontinenz. Informationen der APOGEPHA für Arzt und Apotheker.
- [60] Morgan ET, Sewer MB, Iber H, Gonzalez FJ, Lee YH, Tukey RH, Okino S, Vu T, Chen YH, Sidhu JS, Omiecinski CJ: Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450. Drug Metab Dispos 1998; 26: 1232–1240.
- [61] Müller C, Siegmund W, Huupponen R, Kaila T, Franke G, Iisalo E, Zschiesche M: Kinetics of propiverine as assessed by radioreceptor assay in poor and extensive metabolizers of debrisoquine. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 1993; 18: 265–272.
- [62] Mäenpää J, Syngelmä T, Honkakoski P, Lang MA, Pelkonen O: Comparative studies on coumarin and testosterone metabolism in mouse and human livers: Differential inhibitions by the anti-P450Coh antibody and metyrapone. Biochem Pharmacol 1991; 42: 1229–1235.
- [63] Nakano S, Kuwata M, Hasegawa H, Irimura K, Maruden A, Morita K: Thirteen-week oral toxicity study of propiverine hydrochloride in rats. J Toxicol Sci 1989; 14 (Suppl 2): 13–59.
- [64] Nash T: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. Biochem J 1953; 55: 416–421.
- [65] Nebert DW, Petersen DD, Puga A: Human AH locus polymorphism and cancer: Inducibility of CYP 1A1 and other genes by combustion products and dioxin. Pharmacogenetics 1991; 1: 68–78.

- [66] Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R et al.: P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 1–42.
- [67] Niopas I, Toon S, Aarons L, Rowland M: The effect of cimetidine on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in humans. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55: 399–404.
- [68] Niwa T, Sato R, Yabusaki Y, Ishibashi F, Katagiri M: Contribution of human hepatic cytochrome P450s and steroidogenic CYP17 to the N-demethylation of aminopyrine. *Xenobiotica* 1999; 29: 187-193.
- [69] Noguchi K, Masuda M, Noguchi S, Kubota Y et al.: Long-term administration study of propiverine hydrochloride (BUP-4 tablets) in pollakiuria and urinary incontinence. *Hinyokika Kyo* 1998; 44: 687–693.
- [70] Nomura N, Kaneko S, Hamakawa T, Nagai M, Iriki M: Effects of propiverine hydrochloride (P-4) and its metabolites on urinary bladder function in anesthetized rats. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1989; 94: 173-180.
- [71] Ohashi K, Sakamoto K, Sudo T, Tateishi T, Fujimura A, Shiga T, Ebihara A: Effects of diltiazem and cimetidine on theophylline oxidative metabolism. *J Clin Pharmacol* 1993; 33:1233–1237.
- [72] Okada H, Sengoku J, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S: Clinical effect of propiverine in patients with urge or stress incontinence. Kobe University Incontinence Study Group. *Hinyokika Kyo* 1998; 44: 65–69.
- [73] Omura T, Sato R: The carbon-monoxide binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J Biol Chem* 1964; 239: 2379–2385.
- [74] Otto-Unger G: Treatment of the unstable bladder in children with the anticholinergic agent propiverin hydrochloride. *Z Urol Nephrol* 1985; 78: 145-152.

- [75] Parkinson A: An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials.
Toxicol Pathol 1996; 24: 48–57.
- [76] Pelkonen O, Mäenpää J, Taavitsainen A, Rautio A, Raunio H: Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes.
Xenobiotica 1998; 28: 1203–1253.
- [77] Potthast H, Schug B, Blume H (1996) Bioavailability study of Mictonorm[®] dragees [Apogepha Arzneimittel GmbH] after single dose administration in comparison to multiple dose administration. Bericht an die Apogepha vom Juli 1996
- [78] Reinke LA, Moyer MJ: P-Nitrophenol hydroxylation. A microsomal oxidation which is highly inducible by ethanol.
Drug Metab Disp 1985; 13: 548–552.
- [79] Rendic S, Di-Carlo FJ: Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors.
Drug Metab Rev 1997; 29: 413–580.
- [80] Riotte J, Mutschler E: The spasmolytic activity of propiverine and some of its structural analogs. Arzneimittelforschung 1987; 37: 300–302.
- [81] Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS, Song BJ: Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less.
Biochem Biophys Res Commun 1994; 205:1064–1071.
- [82] Schmid B, Bircher J, Preisig R, Kűpfer A: Polymorphic dextromethorphan metabolism: Co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. Clin Pharmacol Ther 1985; 38: 618–624.

- [83] Schmider J, Moltke LL, Shader RI, Harmatz JS, Greenblatt DJ: Extrapolating in vitro data on drug metabolism to in vivo pharmacokinetics: evaluation of the pharmacokinetic interaction between amitriptyline and fluoxetine. *Drug Metab Rev* 1999; 31: 545–560.
- [84] Schultz-Lampel D, Thüroff JW: Medikamente bei Miktionsstörungen im Alter. *Urologe B* 1996; 36: 444–448.
- [85] Schwantes U, Topfmeier P: Importance of pharmacological and physicochemical properties for tolerance of antimuscarinic drugs in the treatment of detrusor instability and detrusor hyperreflexia - changes for improvement of therapie. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1999; 37: 209-218.
- [86] Sharer JE, Wrighton SA: Identification of the human hepatic cytochromes P450 involved in the in vitro oxidation of antipyrine. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 487–494.
- [87] Siegmund W, Nigussie M, Tilahun K, Aitenfissu H, Franke G, Wengler A: Anticholinergic properties of propiverine and ist metabolites. *Pharmazie* 1990; 45: 67–68.
- [88] Siepman M, Nokhodian A, Thümmeler D, Kirch W: Pharmacokinetics and safety of propiverine in patients with fatty liver disease. *Eur J Clin Pharmacol* 1998; 54: 767-771.
- [89] Stohrer M, Madersbacher, H Richter R, Wehnert J, Dreikorn K: Efficacy and safety of propiverine in SCI-patients suffering from detrusor hyperreflexia – a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Spinal Cord* 1999; 37: 196–200
- [90] Sullivan J, Abrams P: Pharmacological management of incontinence. *Eur Urol* 1999; 36 (Suppl.1): 89–95.

- [91] Tassaneeyakul W, Veronese ME, Birkett DJ and Miners JO: High-performance liquid chromatographic assay for 4-nitrophenol hydroxylation, a putative cytochrome P4502E1 activity, in human liver microsomes. *J Chromatogr* 1993; 616: 73–78
- [92] Thomas PE, Reik LM, Ryan DE, Levin W: Regulation of three forms of cytochrome P-450 and epoxide hydrolase in rat liver microsomes. Effects of age, sex, and induction. *J Biol Chem* 1981; 256: 1044–1052.
- [93] Thümmler D: Study Report: Comparison of pharmacokinetics and safety of treatment with 15 mg propiverine hydrochloride t.i.d. in subjects with and without impaired hepatic function.
Bericht an die Apogepha vom Februar 1997
- [94] Tokuno H, Chowdhury JU, Tomita T: Inhibitory effects of Propiverin-verine on rat and guinea-pig urinary bladder muscle.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1993; 348: 659–662.
- [95] Vogelgesang S: Untersuchungen zur Beeinflussung ausgewählter hepatischer Enzyme des Arzneimittelstoffwechsels männlicher Ratten durch Denaverin und Tiracizin.
Med. Dissertation, Universität Greifswald 1997
- [96] Voigt R, Voigt P, Kunath H, Hasan A: Personal experiences with the conservative drug therapy of urgency symptoms in the female.
Z Urol Nephrol 1986; 79: 197-205.
- [97] Wada Y, Yoshida M, Kitani K, Kikukawa H, Ichinose A, Takahashi W, Gotoh S, Inadome A, Machida J, Ueda S: Comparison of the effects of various anticholinergic drugs on human isolated urinary bladder.
Arch Int Pharmacodyn Ther 1995; 330: 76–89.
- [98] Walter R., Cubukcu L, Scheuch E, Siegmund W: Influence of CYP3A induction on the dextromethorphan assay to measure CYP2D activity in rats. *Eur. J Clin Pharmacol* 1998; 54: A27

- [99] Waterman MR, Jenkins CM, Pikuleva I: Genetically engineered bacterial cells and applications. *Toxicol Lett* 1995; 82/83: 807–813
- [100] Wattenberg LW, Page MA, Leong JL: Induction of increased benzpyrene hydroxylase activity by flavones and related compounds. *Cancer Res* 1968; 28: 934–937.
- [101] Waxman DJ, Azaroff L: Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J* 1992; 281: 577–592.
- [102] Waxman DJ: P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR, and PPAR. *Arch Biochem Biophys* 1999; 369: 11–23.
- [103] Wehnert J, Sage S: Comparative studies of the effect of mictonorm (propiverin hydrochloride) and Spasuret (flavoxate hydrochloride) on the bladder detrusor muscle. *Z Urol Nephrol* 1989; 82: 259-263.
- [104] Wengler A, Schneider T, Zschesche M Siegmund W: Untersuchungen zum Metabolismus des Blasenspasmolytikums Propiverin (Mictonorm[®]) beim Menschen. *Pharmazie* 1988; 43: 652–653
- [105] Wengler A, Siegmund W, Klebingat KJ: Metabolismus von Propiverin in adulten und fetalen Humanlebermikrosomen. *Z Klin Med* 1989; 44: 221–224, 234.
- [106] Wengler A: Untersuchungen zum In-vitro-Metabolismus des Blasenspasmolytikums Propiverin [Mictonorm[®]] bei Mensch und Ratte. Dissertation, Universität Greifswald 1989.
- [107] WHO-Konsensuskonferenz: Harninkontinenz und Gesundheitswesen, Bonn, 20.-21.8.1997 *Urologe B* 1997; 37: 507–508.
- [108] Wilz G, Adler C, Gunzelmann T, Brähler E: Auswirkungen chronischer Belastungen auf die physische und psychische Befindlichkeit - Eine Prozeßanalyse bei pflegenden Angehörigen von Demenzkranken. *Z Gerontol Geriatr* 1999; 32: 255–265.

- [109] Wong LL: Cytochrome P450 monooxygenases.
Curr Opin Chem Biol 1998; 2: 263–268.
- [110] Wortelboer HM, DeKruif CA, van Iersel AAJ, Falke HE, Noordhoek J, Blaauboer BJ: Comparison of cytochrome P450 isoenzyme profiles in rat liver and hepatocyte cultures. The effects of models inducers on apoproteins and biotransformation activities.
Biochem Pharmacol 1991; 42: 381–391.
- [111] Wright AWE, Winzor DJ, Reilly PEB: Cimetidin: an inhibitor and an inducer of rat liver microsomal cytochrome P-450.
Xenobiotica 1991; 21: 193–203.
- [112] Wrighton SA, Maurel P, Schuetz EG, Watkins PB, Whitley B, Guzelian PS. Identification of the cytochrome P-450 induced by macrolide antibiotics in rat liver as the glucocorticoid responsive cytochrome P-450.
Biochem 1985; 24: 2171–2178.
- [113] Wrighton SA, VandenBranden M, Stevens JC, Shipley LA, Ring BJ: In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: Their use in drug development. Drug Metab Rev 1993; 25: 453–484.
- [114] Wrighton SA, Ring BJ: Inhibition of human CYP3A catalyzed 1'-hydroxy midazolam formation by ketoconazole, nifedipine, erythromycin, cimetidine, and nizatidine. Pharm Res 1994; 11: 921–924.
- [115] Wu D, Otton SV, Sproule BA, Busto U, Inaba T, Kalow W, Sellers EM: Inhibition of human cytochrome P450 2D6(CYP2D6) by methadone.
Br J Clin Pharmacol 1993; 35: 30–34.
- [116] Yamashita K, Kuwata M, Irimura K, Morinaga N, Kurokawa K, Ashizawa M: Fifty-two-week oral chronic toxicity study of propiverine hydrochloride in rats. J Toxicol Sci 1990; 15: 107–144.

- [117] Yamzaki H, Inoue K, Turvy CG, Guengerich FP, Shimada T: Effects of freezing, thawing, and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 1997; 25: 168–174.
- [118] Yasumori-T, Nagata-K, Yang-SK, Chen-LS, Murayama-N, Yamazoe-Y, Kato-R: Cytochrome P450 mediated metabolism of diazepam in human and rat: involvement of human CYP2C in N-demethylation in the substrate concentration-dependent manner. *Pharmacogenetics* 1993; 3: 291–301.
- [119] Yokoyama O, Miyazaki K, Ishida T, Fujita Y, Hisazumi H: Experience in the use of propiverine hydrochloride (P-4) for patients suffering from urinary frequency and/or incontinence. *Hinyokika Kyo* 1990; 36: 517–523.
- [120] Zerilli A, Lucas D, Dreano Y, Picart D, Berthou F: Effect of pyrazole and dexamethasone administration on cytochrome P450 2E1 and 3A isoforms in rat liver and kidney: lack of specificity of p-nitrophenol as a substrate of P450 2E1. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 652–657.
- [121] Zhang XJ, Thomas PE: Erythromycin as a specific substrate for cytochrome P4503A isozymes and identification of a high-affinity erythromycin N-demethylase in adult female rats. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 23–27.
- [122] Zwergel U, Wullich B, Rohde V, Zwergel T: Unerwünschte Pharmakoeffekte am unteren Harntrakt und bei der Therapie von Miktionsstörungen. *Urologe B* 1996; 36: 449–453.

7. Anhang

7.1. Bestimmungsmethoden

7.1.1. Bestimmung des Eiweißgehaltes der Mikrosomen

Biuret-Reagenzlösung: 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 6,0 g Seignettesalz (K,Na-tartrat) in 500 ml aqua dest. gelöst + 300 ml NaOH (10 %) + aqua dest. ad 1000 ml

Natrium-Desoxycholat: 50 mg/ml

Tabelle 9: Bestimmung des Eiweißgehaltes der Mikrosomen

Analysenansatz	0,2 ml Mikrosomensuspension (1 + 1 verdünnt mit Puffer) 0,2 ml Natrium-desoxycholat nach 5 min: 3,5 ml Biuret-Reagenz
Trübungsansatz	0,2 ml Mikrosomensuspension (1 + 1 verdünnt mit Puffer) 0,2 ml Natrium-desoxycholat nach 5 min: 3,5 ml NaOH 3 %
Eichansatz	0 - 4 - 8 - 16 - 24 mg/ml Humanserumalbumin in Puffer
Inkubation	30 min (Zimmertemperatur)
Messung	Spektrophotometer bei 560 nm gegen aqua dest.; d = 1 cm
Berechnung	Abzug der Werte des Trübungsansatzes vom Analysenansatz

7.1.2. Bestimmung des Gesamtgehaltes an Cytochrom P450

Tabelle 10: Bestimmung des Cytochrom-P-450-Gehaltes

Verdünnung	0,4 ml Mikrosomensuspension + 3,6 ml Phosphatpuffer
Kohlenmonoxid-Begasung	Überströmung der Proben mit Kohlenmonoxid für 60 s; dann Aufteilung auf 2 Küvetten: a) Referenzküvette ohne Zusatz b) Messküvette mit Spatelspitze Natriumdithionit
Messung	$\lambda_1 = 450 \text{ nm}$ (Maximum; bei BNF-Tieren: 448 nm) $\lambda_2 = 500 \text{ nm}$ (Nulllinie) • Überprüfung des Maximums (Spektrum 350 – 500 nm) • Mess- gegen Referenzküvette
Berechnung	nach LAMBERT-BEER: $\Delta E = c \cdot d \cdot \epsilon$ (d = 1 cm; $\Delta E = E_{\lambda_1} - E_{\lambda_2}$; $\epsilon = 91 \text{ l/mmol/cm}$) CYP [nmol/mg Eiweiß] = $\Delta E \cdot 109,89 / \text{Eiweißgehalt in mg/ml}$

7.1.3. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der einzelnen Aktivitäten (außer DXDM) erfolgte in 2 Versuchsreihen entsprechend der Behandlungsserien unter Mitführung von jeweils einer Eichreihe und 3 Leerwerten. Bei den Leerwerten wurde das Eiweiß vor Reaktionsstart denaturiert. Die Eichansätze enthielten statt des Substrates die entsprechende Eichlösung. Die Mikrosomensuspensionen der Eich- und Leerwerte wurden durch Poolen der Einzelproben gewonnen.

7.1.3.1. Gebrauchslösungen

Mikrosomensuspension: Verdünnung mit Puffer auf die entsprechende Konzentration

Kofaktorenmischung:

- 0,8 ml KCl 2 mol/l
- 0,8 ml MgCl₂ 0,1 mol/l
- 0,8 ml NADP-Na₂ 10 bzw. 40 mmol/l
- 1,6 ml Glucose-6-phosphat-Na₂ 0,03 mol/l
- 0,025 ml Glucose-6-phosphat-dehydrogenase Grad I (G6PD)
- Puffer auf 16 ml

Trichloressigsäure (TCA) 0,31 (ECOD) bzw. 1,22 mol/l

NASH-Reagenz: 15 g Ammoniumacetat + 0,04 ml Acetylaceton + 0,6 ml Eisessig + aqua bidest. ad 100,0 ml

7.1.3.2 EROD

Tabelle 11: Bestimmung der EROD-Aktivität

Substrat	7-Ethylresorufin 0,1 mmol/l in Methanol	<i>Konzentration in der Inkubationsmischung</i>
Analysen-ansatz	50 µl Substrat (Eindampfen bei 37°C) 0,2 ml Puffer 0,5 ml Kofaktorenmischung: KCl MgCl ₂ G6P G6PD 0,2 ml Mikrosomen	<i>5 µmol/l 0,1 mol/l 50mmol/l 2,5 mmol/l 1,5 mmol/l 1,3 U/ml 0,1 mgEiweiß/ml</i>
Eichansatz	0 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 nmol/ml Resorufin-Natriumsalz	
Vorinkubation	2 min (37°C)	
Reaktionsstart	0,1 ml NADP 2,5 mmol/l	<i>0,25 mmol/l</i>
Inkubation	5 min (37°C)	
Reaktions-abbruch	1,0 ml Methanol (LW: erst Methanol, dann NADP)	
Aufbereitung	Zentrifugation 10 min bei 4000 min ⁻¹	
Messung	Fluorimeter SFM 25 (Kontron, Neufahrn): Excitation 540 nm, Emission 585 nm , d = 1 cm	
Analyt	Resorufin	

7.1.3.3. ECOD

Tabelle 12: Bestimmung der ECOD-Aktivität

Substrat	7-Ethoxycumarin 20 mmol/l in Ethanol und Puffer (0,5 + 9,5)	<i>Konzentration in der Inkubationsmischung</i>	
Analysen-ansatz	25 µl Substrat	<i>0,5 mmol/l</i>	
	0,2 ml Puffer	<i>0,1 mol/l</i>	
	0,5 ml Kofaktorenmischung:	KCl	<i>50mmol/l</i>
		MgCl ₂	<i>2,5 mmol/l</i>
		G6P	<i>1,5 mmol/l</i>
		G6PD	<i>1,3 U/ml</i>
0,2 ml Mikrosomen	<i>0,1 mgEiweiß/ml</i>		
Ethanol (in der Substratlösung)	<i>1,2 Vol% (0,27 mol/l)</i>		
Eichansatz	0 - 0,5 - 1 - 2 - 4 nmol/ml 7-Hydroxycumarin (in NaOH und Puffer)		
Vorinkubation	2 min (37°C)		
Reaktionsstart	0,1 ml NADP 2,5 mmol/l	<i>0,25 mmol/l</i>	
Inkubation	10 min (37°C)		
Reaktions-abbruch	0,5 ml TCA 0,31 mol/l (LW: erst TCA, dann NADP)		
Aufbereitung	Zentrifugation 10 min bei 6000 min ⁻¹ ; 0,5 ml Überstand + 4 ml NaOH 0,02 mol/l		
Messung	Fluorimeter SFM 25 (Kontron, Neufahrn): Excitation 362 nm, Emission 450 nm , d = 1 cm		
Analyt	7-Hydroxycumarin		

7.1.3.4. PROD

Tabelle 13: Bestimmung der PROD-Aktivität

Substrat	7-Pentylresorufin 50 mmol/l in Methanol	<i>Konzentration in der Inkubationsmischung</i>
Analysenansatz	100 µl Substrat (Eindampfen bei 37°C) 0,2 ml Puffer 0,5 ml Kofaktorenmischung: KCl MgCl ₂ G6P G6PD 0,2 ml Mikrosomen	<i>5 µmol/l 0,1 mol/l 50mmol/l 2,5 mmol/l 1,5 mmol/l 1,3 U/ml 0,1 mgEiweiß/ml</i>
Eichansatz	0 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 nmol/ml Resorufin-Natriumsalz	
Vorinkubation	2 min (37°C)	
Reaktionsstart	0,1 ml NADP 2,5 mmol/l	<i>0,25 mmol/l</i>
Inkubation	10 min (37°C)	
Reaktionsabbruch	1,0 ml Methanol (LW: erst Methanol, dann NADP)	
Aufbereitung	Zentrifugation 10 min bei 3000 min ⁻¹	
Messung	Fluorimeter SFM 25 (Kontron, Neufahrn): Excitation 540 nm, Emission 585 nm , d = 1 cm	
Analyt	Resorufin	

7.1.3.5. DNDM

Tabelle 14: Bestimmung der DNDM-Aktivität

Substrat	Diazepam 1 mmol/l in Methanol	<i>Konzentration in der Inkubationsmischung</i>
Analysen- ansatz	0,2 ml Substrat (Eindampfen)	<i>0,2 mmol/l</i>
	0,2 ml Puffer	<i>0,1 mol/l</i>
	0,5 ml Kofaktorenmischung: KCl	<i>50mmol/l</i>
	MgCl ₂	<i>2,5 mmol/l</i>
	G6P	<i>1,5 mmol/l</i>
	G6PD	<i>1,3 U/ml</i>
	0,2 ml Mikrosomen	<i>1 mgEiweiß/ml</i>
Eichansatz	0 - 5 - 10 - 20 - 40 nmol/ml Formaldehyd in Puffer	
Vorinkubation	2 min (37°C)	
Reaktionsstart	0,1 ml NADP 10 mmol/l	<i>1 mmol/l</i>
Inkubation	20 min (37°C)	
Reaktions- abbruch	0,3 ml TCA 1,22 mol/l (LW: erst TCA, dann NADP)	
Aufbereitung	Zentrifugation 10 min bei 4000 min ⁻¹ ;	
	0,5 ml Überstand + 0,5 ml NASH-Reagenz; 40 min (37°C)	
Messung	Spektrophotometer Uvikon 931 (Kontron, Neufahrn): 412 nm gegen aqua dest.; d = 1 cm	
Analyt	Formaldehyd	

7.1.3.6. DXDM

Tabelle 15: Bestimmung der DXDM-Aktivität

Substrat	Dextromethorphan	<i>Konzentration in der Inkubationsmischung</i>	
Analysen- ansatz	0,1 ml Substrat	<i>0,2 mmol/l</i>	
	0,2 ml Puffer	<i>0,1 mol/l</i>	
	0,5 ml Kofaktorenmischung:	KCl	<i>50mmol/l</i>
		MgCl ₂	<i>2,5 mmol/l</i>
		G6P	<i>1,5 mmol/l</i>
	G6PD	<i>0,5 U/ml</i>	
	0,2 ml Mikrosomen	<i>1 mgEiweiß/ml</i>	
Eichansatz	0 - 1 - 2 - 3 - 5 - 10 - 20 - 40 nmol/ml Dextrophan		
Vorinkubation	2 min		
Reaktionsstart	0,1 ml NADP	<i>0,5 mmol/l</i>	
Inkubation	10 min (37°C)		
Reaktions- abbruch	0,5 ml NaOH		
Aufbereitung	Zusatz von 0,1 ml internem Standard (Diphenylpyralin); zweimalige Extraktion mit 3 ml Ether/Ethylacetat 90:10 (V/V); vollständiges Verdampfen (30–70° C Luftstrom) und erneute Lösung in Ethanol		
Messung	Gaschromatograph HP 5890 II; Säule HP 5 (Hewlett Packard, USA), Länge 30 m, innerer Durchmesser 0,53 mm; Injektortemperatur 290° C; Heizprogramm 265–290° C; Detektor NP-FID 290° C; Evaluation: Verhältnis zum internen Standard		
Analyt	Dextrophan		

7.1.3.8. ERDM

Tabelle 17: Bestimmung der ERDM-Aktivität

Substrat	Erythromycin 4 mmol/l in Ethanol und Puffer	<i>Konzentration in der Inkubationsmischung</i>
Analysen-ansatz	0,2 ml Puffer	<i>0,1 mol/l</i>
	0,5 ml Kofaktorenmischung: KCl	<i>50mmol/l</i>
	MgCl ₂	<i>2,5 mmol/l</i>
	G6P	<i>1,5 mmol/l</i>
	G6PD	<i>1,3 U/ml</i>
	NADP	<i>0,25 mmol/l</i>
	0,2 ml Mikrosomen	<i>1 mgEiweiß/ml</i>
Eichansatz	0 - 5 - 10 - 20 - 40 nmol/ml Formaldehyd in Puffer	
Vorinkubation	2 min (37°C)	
Reaktionsstart	0,1 ml Substrat 4 mmol/l	<i>0,4 mmol/l</i>
Inkubation	20 min (37°C)	
Reaktions-abbruch	0,3 ml TCA 1,22 mol/l (LW: erst TCA, dann Substrat)	
Aufbereitung	Zentrifugation 10 min 4000 min ⁻¹ , 0,5 ml Überstand + 0,5 ml NASH-Reagenz 40 min (37°C)	
Messung	Spektrophotometer Uvikon 931 (Kontron, Neufahrn): 412 nm gegen aqua dest.; d = 1 cm	
Analyt	Formaldehyd	

7.1.4. Untersuchungen zur Enzymkinetik

Untersucht wurde die Beeinflussung der Kinetik von EROD, PROD und ERDM durch die Anwesenheit von Propiverin. Zusätzlich wurde die Wirkung der Propiverinmetaboliten M2, M5 und M6. auf die PROD-Aktivität überprüft. Bei grundsätzlich gleichem Vorgehen wie oben änderten sich die Konzentrationen im Inkubationsansatz folgendermaßen:

7.1.4.1. EROD

Substratkonzentration

(7-Ethylresorufin): 0 - 0,75 - 1,5 - 3 - 5 µmol/l

Zugabe von Propiverin: 0 - 1 µmol/l

Mikrosomen aus Gruppe behandelt mit: β-Naphthoflavon

7.1.4.2. PROD

Substratkonzentration

(7-Pentylresorufin): 0 - 0,37 - 0,75 - 1,5 - 3 - 5 µmol/l

Zugabe von Propiverin: a) 0 - 2 µmol/l
b) 0 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 µmol/l (nur bei 5 µmol/l
Pentylresorufin)

Zugabe von M2: 0 - 1 - 2 µmol/l

Zugabe von M5: 0 - 2 - 5 µmol/l

Zugabe von M6: 0 - 2 µmol/l

Mikrosomen aus Gruppe behandelt mit: Phenobarbital¹

7.1.4.3. ERDM

Substratkonzentration

(Erythromycin): 0,4 mmol/l

Zugabe von Propiverin: 0 - 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 µmol/l

Mikrosomen aus Gruppe behandelt mit: Dexamethason

¹ Von Tieren aus einer anderen Studie: LEW-1A-Ratten, behandelt 3 Tage mit 80 mg/kg Phenobarbital

7.1.5. Puffer und Lösungen zum Western-Blot

Laemmli-Puffer 4fach:	3,125 ml	1M Tris pH6,8
	5,8 ml	Glycerin (87%ig)
	1 g	Natriumdodecylsulfat
	0,005 g	Bromphenolblau
	2,5 ml	β-Mercaptoethanol
	ad 12,5 ml	aqua dest.
Tankpuffer	60 g	Tris
	288 g	Glycin
	20 g	SDS
	ad 2 l	aqua dest.
Transferpuffer	5,8 g	Tris
	2,95 g	Glycin
	0,35 g	SDS
	200 ml	Methanol
	ad 1 l	aqua dest.
10 x TBS	80,0 g	Natriumchlorid
	2,0 g	Kaliumchlorid
	30,0 g	Tris
	in 80 ml aqua dest. lösen, auf pH 7,4 einstellen ad 1 l	aqua dest.
TBST-Puffer	100 ml	10 x TBS
	400 µl	Twenn 20
	ad 1 l	aqua dest.
BCIP-Lösung	0,1 g	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
	2 ml	Dimethylformamid
NBT-Lösung	100 mg	Nitroblau-Tertazoliumsals
	2 ml	Dimethylformamid
BCIP/NBT-Puffer	8,4 g	Natriumhydrogencarbonat
	203,3 mg	Magnesiumchlorid
	mit 5 N Natronlauge auf pH 9,8 einstellen ad 1l	aqua dest.
Färbereagenz	20 ml	BCIP/NBT-Puffer
	132 µl	NBT-Lösung
	66 µl	BCIP-Lösung

7.2. Ergebnistabellen

7.2.1. Protein- und Gesamt-Cytochrom-P450-Gehalt

Tabelle 18: Protein- und Gesamt-CYP-Gehalt der Lebermikrosomen männlicher Ratten ($M \pm SD$; $N = 8$) nach Behandlung mit Propiverin, Phenobarbital, β -Naphthoflavin und Dexamethason über 5 Tage

Behandlungsgruppe	Proteingehalt [mg/ml]	Gesamtgehalt CYP [nmol/mgEiweiß]
Kontrolle (aqua dest.)	21,47 \pm 1,73	1,101 \pm 0,211
Propiverin 0,6 mg/kg	21,76 \pm 1,73	1,056 \pm 0,118
Propiverin 2 mg/kg	22,29 \pm 2,16	1,040 \pm 0,104
Propiverin 6 mg/kg	18,64 \pm 2,45*	1,230 \pm 0,226
Propiverin 60 mg/kg ^a	21,38 \pm 3,12	2,072 \pm 0,308*
Phenobarbital 10 mg/kg	22,12 \pm 2,64	1,957 \pm 0,438*
Kontrolle (Kornöl)	19,48 \pm 4,23	1,206 \pm 0,150
β -Naphthoflavin 40 mg/kg	18,78 \pm 2,55	2,331 \pm 0,370*
Dexamethason 20 mg/kg ^a	15,36 \pm 3,36	1,004 \pm 0,215

*P < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe; ^aN = 7

7.2.2. Enzymaktivitäten

**Tabelle 19: : Mikrosomale Monooxygenaseaktivitäten männlicher Ratten nach Behandlung mit Propiverin, Phenobarbital, β -Naphthoflavon und Dexamethason über 5 Tage (M \pm SD; N = 8); EROD: Ethylresorufin-O-Deethylase; PROD: Pentylresorufin-O-Depentylase; ECOD: Ethoxycumarin-O-Deethylase; DNDM: Diazepam-N-Demethylase; DXDM: Dextromethorphan-O-Demethylase; NPH: p-Nitrophenolhydroxylase; ERDM: Erythromycin-N-Demethylase
* P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle; ¹ N = 7**

Behandlungsgruppe	EROD nmol/min/mg	ECOD nmol/min/mg	PROD pmol/min/mg	DNDM nmol/min/mg	DXDM nmol/min/mg	NPH nmol/min/mg	ERDM nmol/min/mg
Kontrolle (po)	0,103 \pm 0,021	0,782 \pm 0,149	4,3 \pm 1,1	1,296 \pm 0,650	0,323 \pm 0,072	1,246 \pm 0,479	0,229 \pm 0,083
P 0,6 mg/kg	0,101 \pm 0,025	0,743 \pm 0,286	3,5 \pm 1,2	1,269 \pm 0,469	0,313 \pm 0,048	1,409 \pm 0,289	0,228 \pm 0,096
P 2 mg/kg	0,113 \pm 0,012	0,613 \pm 0,097	5,4 \pm 1,7	1,176 \pm 0,375	0,376 \pm 0,054	1,427 \pm 0,205	0,317 \pm 0,122
P 6 mg/kg	0,144 \pm 0,040	1,024* \pm 0,160	5,3 \pm 1,8	1,628 \pm 0,458	0,326 \pm 0,087	1,317 \pm 0,301	0,357 \pm 0,087
P 60 mg/kg ¹	0,536* \pm 0,063	3,083* \pm 0,564	141,6* \pm 21,9	2,014* \pm 0,099	0,300 \pm 0,032	1,571 \pm 0,216	1,078* \pm 0,280
PB 10 mg/kg	0,624* \pm 0,076	2,668* \pm 0,389	155,8* \pm 65,7	2,245* \pm 0,177	0,365 \pm 0,035	1,709 \pm 0,200	0,702* \pm 0,150
Kontrolle (ip)	0,177 \pm 0,037	1,031 \pm 0,422	8,8 \pm 4,2	1,313 \pm 0,235	0,363 \pm 0,049	1,407 \pm 0,219	0,320 \pm 0,076
BNF 40 mg/kg	2,748* \pm 0,562	6,875* \pm 1,399	30,6* \pm 6,5	1,051* \pm 0,086	0,257* \pm 0,056	1,309 \pm 0,133	0,282 \pm 0,115
DEX 20 mg/kg ¹	0,287 \pm 0,181	0,919 \pm 0,335	19,7* \pm 2,5	1,476* \pm 0,146	0,253* \pm 0,040	1,584 \pm 0,152	2,445* \pm 0,515

7.2.3. Enzymkinetik

Tabelle 20: Ergebnisse zur Beeinflussung der Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD) durch Propiverin (2 μM) *in vitro*; gepoolte Mikrosomen von PB-behandelten Tieren¹; M einer Doppelbestimmung

Pentylresorufin [μM]	PROD [nmol/min/mgEiweiß]	
	Kontrolle	+ 2 μM Propiverin
0,375	0,0538	0,0243
0,75	0,1072	0,0473
1,5	0,1838	0,0633
3	0,3316	0,1094
5	0,4524	0,135
	$K_m = 7,3 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 1,12 \text{ nmol/min/mg}$	$K_m = 3,3 \mu\text{M}$ $V_{\max} = 0,22 \text{ nmol/min/mg}$

Tabelle 21: Ergebnisse zur Beeinflussung der Pentylresorufin-O-Depentylase (PROD, 5 $\mu\text{mol/l}$ Pentylresorufin) durch Propiverin (0 - 2 μM) *in vitro*; gepoolte Mikrosomen von PB-behandelten Tieren¹; M einer Doppelbestimmung

Propiverin [μM]	PROD [nmol/min/mgEiweiß]
0	0,6918
0,2	0,4485
0,5	0,3713
1	0,2439
2	0,1766

Tabelle 22: Ergebnisse zur Abschätzung der PROD-Hemmung durch Propiverin-Metaboliten M2, M5 und M6; Mikrosomen PB-induziert; M einer Doppelbestimmung

Pentylresorufin [μM]	PROD-Aktivitäten [nmol/min/mgEiweiß]					
	Kontrolle	M2		M5		M6
		1 μM	2 μM	2 μM	5 μM	2 μM
0,75	0,197	0,161	0,093	0,169	0,248	0,150
1,5	0,271	0,213	0,138	0,231	0,364	0,239
3,0	0,348	0,259	–	–	–	–
5,0	0,444	0,292	0,193	0,397	0,524	0,433

¹ Von Tieren aus einer anderen Studie: LEW-1A-Ratten, behandelt 3 Tage mit 80 mg/kg Phenobarbital

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. W. Siegmund für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und seine freundliche Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Dr. rer. nat. R. Walter, die mich freundlicherweise auch nach Beendigung ihrer Tätigkeit im Institut für Pharmakologie intensiv betreute.

Zahlreiche Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie halfen bei der Durchführung dieser Studie. Stellvertretend seien Frau Kaliwe, Frau Maybauer und Frau May genannt, die mich bei den Bestimmungen der Aktivitäten unterstützten. Allen danke ich herzlich für die angenehme Zusammenarbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ullmann
Vorname: Christoph
Geboren am: 10.08.1972
in: Oelsnitz/Vogtl.
Familienstand: ledig
Eltern: Dr. med. Eberhard Ullmann, Arzt
Ursula Ullmann, Krankenschwester

Ausbildung:

1979 – 1989 Polytechnische Oberschule in Bad Suderode
1989 – 1991 Erweiterte Oberschule, später Gymnasium in Quedlinburg
1991 – 1993 Zivildienst und Arbeit als Hilfspfleger in den Neinstedter Anstalten
1993 – 1999 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig und der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
1999 – 2000 Praktisches Jahr in Greifswald
2000 Staatsexamen
seit Juli 2000 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik I für Innere Medizin im Klinikum Quedlinburg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.