

**Glucuronidierung von Paracetamol durch menschliche
Lebermikrosomen in vitro**
**- Enzymkinetische Parameter und Einflüsse von kurzkettigen aliphatischen
Alkoholen sowie von Opiaten -**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Petra Boldt, geb. Eikermann
aus Köln

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. H. Käferstein
Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln
Toxikologie

2. Referent: Prof. Dr. U. Jaehde
Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn
Klinische Pharmazie

Tag der Promotion: 16. Januar 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr: 2006

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Rechtsmedizin der Universität zu Köln unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Käferstein in Kooperation mit dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn und Herrn Prof. Dr. U. Jaehde angefertigt.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. Käferstein gilt mein ganz besonderer Dank für die hervorragende Betreuung während der gesamten Promotionszeit. Ich danke ihm sehr für die Überlassung des interessanten Themas, die immer konstruktiven und motivierenden Gespräche und das stetige Fördern und Fordern.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. U. Jaehde bedanken für die aufmerksame Mitbetreuung dieser Promotion, seine Hilfestellungen und sein beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Mohr und Herrn Prof. Dr. D. Klingmüller danke ich für ihr Mitwirken in der Prüfungskommission.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin in Köln bedanke ich mich für die gute und freundliche Zusammenarbeit. Unter den vielen hilfsbereiten Kollegen im Labor gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. G. Sticht. Er konnte mir bei allen Problemen zur Versuchsdurchführung weiterhelfen und stets eine Lösung finden.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Familie und ganz besonders bei meinen Eltern für die Unterstützung und den steten Zuspruch während der Promotionszeit bedanken. Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Mann Patrick. Angefangen von der Idee, in der Toxikologie zu promovieren, hat er mich die ganze Zeit über stets motiviert, mir zugehört und mich begleitet.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Biotransformation	1
1.2 Glucuronidierung	1
1.3 Paracetamol	5
1.4 Opiate	6
1.4.1 Morphin	7
1.4.2 Codein	7
1.4.3 Dihydrocodein	8
1.5 Alkohole	9
1.5.1 Ethanol	9
1.5.2 Begleitalkohole	10
1.6 Enzymkinetik	11
1.6.1 Allgemeines über Enzyme	11
1.6.2 Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur	13
1.6.3 Umsatzgeschwindigkeit und Affinität - Bedeutung von V_{\max} und K_m	15
1.6.4 Enzyminhibition	16
1.7 Problemstellung und Ziel der Arbeit	18
2 Material und Methoden	21
2.1 Materialien	21
2.2 Analytik der Glucuronide mittels HPLC	23
2.2.1 Messbedingungen	23
2.2.2 Kalibrierung	25
2.2.3 Validierung	26
2.3 Enzymatische Glucuronidierung	30
2.4 Glucuronidierung von Paracetamol	33
2.4.1 Abhängigkeit von der Inkubationszeit	33
2.4.2 Abhängigkeit vom pH-Wert	33
2.4.3 Abhängigkeit von der Temperatur	34
2.4.4 Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration	34
2.4.5 Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration	35

2.5 Glucuronidierung von Paracetamol unter Einfluss von Alkoholen	35
2.6 Glucuronidierung von Paracetamol und Opiaten	37
2.7 Statistische Auswertung	38
2.7.1 Beschreibende Statistik	38
2.7.2 Beurteilende Statistik	40
2.8 Enzymkinetische Auswertung	41
2.8.1 Statistische Parameter	41
2.8.2 Kurvenanpassung	43
2.8.3 Vergleich verschiedener Modelle	43
2.8.4 Auswertung der Daten aus den Inkubationsversuchen	46
3 Ergebnisse	48
3.1 Analytik der Glucuronide mittels HPLC	48
3.1.1 Messbedingungen	48
3.1.2 Kalibrierung	49
3.1.3 Validierung	52
3.2 Enzymatische Glucuronidierung	55
3.3 Glucuronidierung von Paracetamol	56
3.3.1 Abhängigkeit von der Inkubationszeit	56
3.3.2 Abhängigkeit vom pH-Wert	58
3.3.3 Abhängigkeit von der Temperatur	60
3.3.4 Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration	62
3.3.5 Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration	64
3.3.6 Zusammenfassung	66
3.4 Glucuronidierung von Paracetamol unter Einfluss von Alkoholen	66
3.4.1 Einfluss der einzelnen Alkohole	67
3.4.2 Glucuronidierung ohne Inhibitor	84
3.4.3 Vergleich und Struktureinflüsse der Alkohole	85
3.4.4 Zusammenfassung	88
3.5 Glucuronidierung von Paracetamol und Opiaten	88
3.5.1 Einfluss der einzelnen Substanzen	88
3.5.2 Glucuronidierung ohne Inhibitor	99
3.5.3 Vergleich der Substanzen	100
3.5.4 Zusammenfassung	101

4 Diskussion	102
4.1 Allgemeines	102
4.2 Glucuronidierung von Paracetamol	102
4.2.1 Inkubationsbedingungen	103
4.2.2 Glucuronidierung von Paracetamol ohne Inhibitor	108
4.3 Glucuronidierung von Paracetamol unter Einfluss von Alkoholen	110
4.3.1 Inhibition durch die einzelnen Alkohole	110
4.3.2 Vergleich und Struktureinflüsse der Alkohole	112
4.3.3 Hemmtyp	116
4.3.4 Rückschlüsse auf Verhältnisse in vivo	119
4.3.5 Ausblick	121
4.4 Glucuronidierung von Paracetamol und Opiaten	122
4.4.1 Glucuronidierung ohne Inhibitor	122
4.4.2 Inhibition durch die einzelnen Substanzen	124
4.4.3 Vergleich und Struktureinflüsse der Substanzen	125
4.4.4 Hemmtyp	126
4.4.5 Rückschlüsse auf Verhältnisse in vivo	128
4.4.6 Ausblick	129
5 Zusammenfassung	130
6 Literatur	133
7 Anhang	139
7.1 Enzymkinetische Auswertung mit SPSS	139
7.2 Chromatogramme	141

Abkürzungsverzeichnis

AIC	Akaike Information Criterion
BtMVV	Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung
CG	Codein-6-glucuronid
CYP450	Cytochrom P450
DAD	Dioden-Array-Detektor
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K_i	Inhibitionskonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
M3G	Morphin-3-glucuronid
M6G	Morphin-6-glucuronid
MEOS	mikrosomales Ethanol oxidierendes System
NAD^+	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
n.b.	nicht bestimmbar
PG	Paracetamolglucuronid
r	Korrelationskoeffizient
r^2	Determinationskoeffizient
RE	relative Abweichung
RSD	relative Standardabweichung
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SH	Sulfhydril-Gruppen
SS	Summe der Abweichungsquadrate
UDPGA	Uridin-5'-diphospho-glucuronsäure
UGT	UDP-Glucuronyltransferase(n)
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit

1 Einleitung

1.1 Biotransformation

Die meisten Substanzen, die dem menschlichen Organismus von außen zugeführt werden oder durch den Stoffwechsel entstehen, durchlaufen eine Vielzahl von Metabolisierungsreaktionen. Die Stoffe, die nicht vom Organismus benötigt werden oder toxisch wirken, sollen dabei so verändert werden, dass sie besser ausgeschieden werden können. Haupteliminationsorgane sind die Lunge, die Galle und vor allem die Nieren. Damit eine Substanz über die Nieren ausgeschieden werden kann, muss sie wasserlöslich sein. Der Organismus besitzt viele Enzyme, die lipophile Substanzen in hydrophilere und damit leichter eliminierbare Metaboliten umwandeln. Diese Umwandlungsprozesse werden allgemein als Biotransformation bezeichnet. Sie erfolgt vor allem in der Leber, aber auch teilweise in Niere, Darm, Lunge, Haut oder Blut (Mutschler, 2001a).

Man unterscheidet zwei Phasen der Biotransformation. In Phase I erfolgt eine oxidative, reduktive oder hydrolytische Veränderung der Substanzen. Die größte Bedeutung für die oxidative Biotransformation besitzen Monooxygenasen, die Hämproteine vom Typ des Cytochrom P450 (CYP450) enthalten (Burchell et al., 1991). Die verschiedenen Enzyme werden in einzelne Familien und Unterfamilien eingeteilt.

Bei den Phase-II-Reaktionen erfolgt eine Konjugation mit einer körpereigenen Substanz, z.B. mit aktivierter Glucuronsäure, aktiviertem Sulfat oder Glycin (King et al., 2000a). Dadurch wird eine saure Gruppe in das Molekül eingeführt, die durch Salzbildung die Hydrophilie erhöht. Die sauren Konjugate können dann renal oder biliär gut ausgeschieden werden (Mutschler, 2001a).

1.2 Glucuronidierung

Die Glucuronidierung ist ein wichtiger Metabolisierungsschritt für viele verschiedene Substanzen im menschlichen Organismus (Mulder, 1992; Uchaipichat et al., 2004). Sie gehört zu den Phase-II-Reaktionen der Biotransformation. Durch Kopplung von aktivierter Glucuronsäure (Uridin-5'-diphospho-glucuronsäure, UDPGA) an das jeweilige Substrat wird dieses wasserlöslicher und kann damit besser über die Nieren ausgeschieden werden (King et al., 2000a). Denn die Glucuronsäure ist eine verhältnismäßig starke Säure, die zusätzlich

alkoholische OH-Gruppen enthält und daher sehr hydrophil ist. Die aktivierte Glucuronsäure entsteht durch Oxidation von Uridin-5'-diphospho-glucose (UDP-Glucose). Der dabei anfallende Wasserstoff wird auf Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD^+) übertragen (Lin und Wong, 2002). Abbildung 1.1 zeigt ein allgemeines Schema zur enzymatischen Glucuronidierung. In Abbildung 1.2 sind die Strukturformeln der Substanzen aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit glucuronidiert wurden.

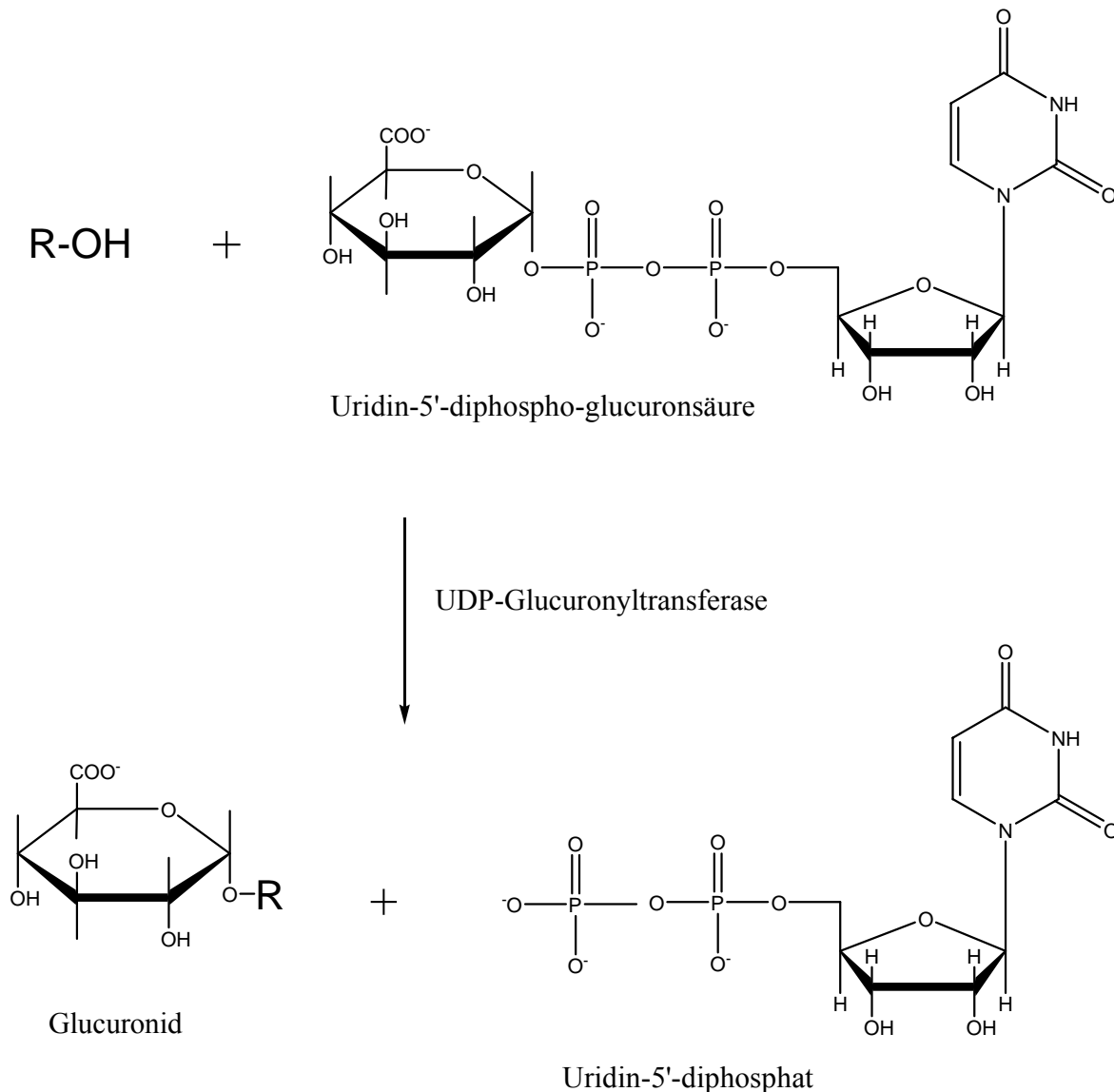
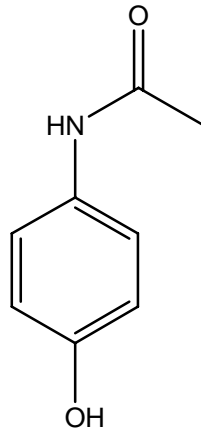
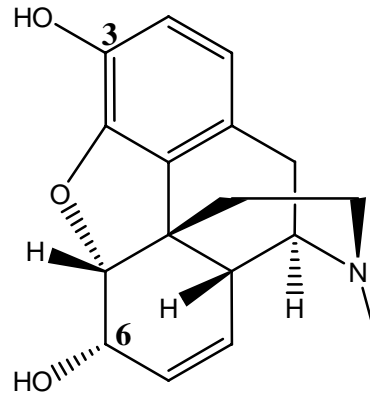


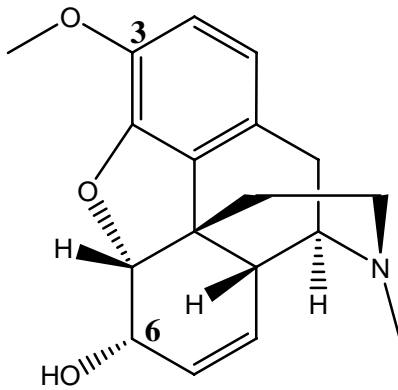
Abb. 1.1: Enzymatische Glucuronidierung



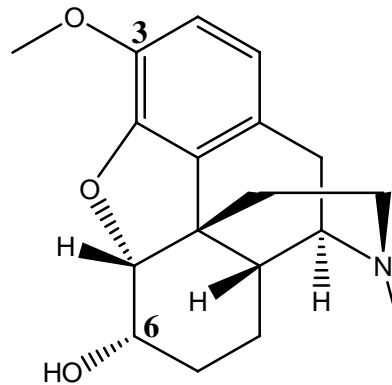
Paracetamol



Morphin



Codein



Dihydrocodein

Abb. 1.2: Strukturformeln von Paracetamol, Morphin, Codein und Dihydrocodein

Die Substrate für die Glucuronidierung können sehr unterschiedliche chemische Strukturen aufweisen. Die Kopplung mit Glucuronsäure erfolgt an einer nucleophilen Gruppe. Dies sind z.B. Alkohole, Phenole, Carbonsäuren oder Amine. Genauso wie körpereigene Substanzen (Steroidhormone, Gallensäuren) werden auch viele körperfremde Substanzen (Arzneistoffe, Drogen) glucuronidiert. Die entstandenen Glucuronide sind teilweise noch pharmakologisch aktiv, wie z.B. Östrogenglucuronid oder Morphin-6-glucuronid (King et al., 2000a). Sie können ausgeschieden oder hydrolytisch bzw. durch Glucuronidasen enzymatisch wieder gespalten und rückresorbiert werden. Dies ist oft der Fall, wenn Konjugate mit der Galle in den Darm gelangen. Man bezeichnet dies als enterohepatischen Kreislauf (Mutschler, 2001a). Diesen durchlaufen z.B. die Östrogenhormone.

Die Übertragung der Glucuronsäure erfolgt durch verschiedene Enzyme aus der Familie der UDP-Glucuronyltransferasen (UGT). Diese befinden sich hauptsächlich in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums der Lebermikrosomen (Lin und Wong, 2002). Die bei der fraktionierten Zentrifugation von Leberzellhomogenaten entstehenden Bruchstücke des endoplasmatischen Retikulums werden Mikrosomen genannt (Mikrosomenfraktion). Die daran gebundenen Enzyme heißen mikrosomale Enzyme. Da das aktive Zentrum von vielen mikrosomalen Enzymen (und auch der UGT) im Lumen des endoplasmatischen Retikulums liegt, müssen die Substrate durch Diffusion oder spezielle Carriersysteme dorthin gelangen, was die Reaktionsgeschwindigkeit verzögert. Dies führt zu einem bei In-vitro-Versuchen häufig auftretenden Phänomen, das als Latenz bezeichnet wird (Lin und Wong, 2002). Es bedeutet, dass die Enzymaktivität gesteigert werden kann, wenn die Membranintegrität beeinträchtigt wird (Soars et al., 2003). Dazu werden Detergenzien wie z.B. Brij 58 eingesetzt oder das antibiotische Peptid Alamethicin, welches Poren in die Membran formt. Dadurch wird die Diffusion der Substrate zum Enzym erleichtert.

Die verschiedenen glucuronidierenden Enzyme werden in zwei Hauptfamilien und mehrere Unterfamilien eingeteilt (Mackenzie et al., 1997). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Es gibt UGT mit einer sehr geringen Substratspezifität, die sehr viele verschiedene Substanzen umsetzen, ebenso gibt es Enzyme, die spezifisch nur sehr wenige Substanzen umsetzen (Tephly, 1990; Ebner und Burchell, 1993; King et al., 2000a). Auch hinsichtlich ihrer Umsatzgeschwindigkeiten und der Affinität zu den jeweiligen Substraten unterscheiden sich die UGT voneinander (Bock et al., 1993). Es gibt Enzyme, die verstärkt bei niedrigen Substratkonzentrationen arbeiten und sehr schnell gesättigt sind, ebenso wie solche, die vor allem bei hohen Substratkonzentrationen arbeiten (Court et al., 2001). Die Glucuronidierung von Paracetamol erfolgt hauptsächlich durch UGT der Unterfamilie 1A6 (King et al., 2000a), die von Opiaten durch Enzyme der Unterfamilie 2B7 (Court et al., 2003).

Das Enzymmuster an UGT ist von Mensch zu Mensch verschieden. Individuelle Unterschiede kommen durch Geschlecht, Alter, Rauchen, Alkoholkonsum, Lebererkrankungen und Arzneimittelkonsum (Enzyminduktion und Enzymhemmung) zustande (Lin und Wong, 2002). Ebenso gibt es auf genetischen Faktoren beruhende Unterschiede zwischen unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen (Pabba et al., 2002).

1.3 Paracetamol

Paracetamol ist ein häufig eingenommenes frei verkäufliches Analgetikum und Antipyretikum (z.B. Benuron[®]). Es wirkt hauptsächlich zentral über eine Hemmung der zerebralen Prostaglandinsynthese. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht endgültig geklärt. Die Einzeldosis liegt bei 500-1000 mg. Diese kann bis zu viermal täglich eingenommen werden, woraus sich eine maximale Tagesdosis von 4000 mg ergibt.

Paracetamol wird rasch und vollständig aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die Bioverfügbarkeit liegt zwischen 70 und 90 % (Novartis, 2002). Die Metabolisierung findet überwiegend in der Leber statt. Hauptmetabolit ist zu ca. 55 % das unwirksame Paracetamolglucuronid (PG), ca. 30 % werden durch die Arylsulfotransferase sulfatiert (Court et al., 2001; Pabba et al., 2002). Nur ca. 5 % einer Paracetamol-Dosis werden unverändert im Harn ausgeschieden. Die Plasmahalbwertszeit liegt bei 2-3 Stunden, die Elimination verläuft hauptsächlich über die Nieren.

Besonders bei hohen Paracetamol-Dosen können noch weitere Metaboliten von Paracetamol gebildet werden. Es erfolgt dann eine Oxidation über das CYP450-System zu N-Acetyl-p-benzochinonimin (Draganov et al., 2000). Daraus entsteht durch Reaktion mit Glutathion das Cystein-Konjugat, welches zu ca. 5 % ausgeschieden wird. Es kann aber auch weiter durch die N-Acetyltransferase zum Mercapturat umgewandelt werden. Auch dieses wird dann zu ca. 5 % mit dem Harn eliminiert.

Wenn nicht ausreichend Glutathion vorhanden ist, kann N-Acetyl-p-benzochinonimin kovalent an Sulfhydryl-Gruppen (SH) von Leberproteinen binden. Dies führt zu Leberzellschädigungen und -nekrosen. Daher ist Paracetamol in hohen Dosen hepatotoxisch (Rumack, 2004). Dosen von 8 g und mehr führen zu schweren und sogar tödlichen Leberschäden. Paracetamol wird häufig in hohen Dosen eingenommen (Howie et al., 1977; Lederman et al., 1983), sei es aus Versehen oder in suizidaler Absicht. Enzyminduktoren, die die CYP450-Synthese stimulieren, können die Lebertoxizität von Paracetamol erhöhen, da mehr von dem reaktiven Metaboliten N-Acetyl-p-benzochininimin gebildet wird. Bei gleichzeitiger Einnahme von Paracetamol und Enzyminduktoren wie z.B. Phenobarbital, Carbamazepin oder Rifampicin können daher auch bei sonst nicht toxischen Dosen Leberschäden auftreten.

Zur Therapie einer Paracetamol-Intoxikation nimmt man SH-Donatoren, wie z.B. N-Acetylcystein und Methionin. Diese fördern die Bildung von Glutathion, wodurch der

reaktive lebertoxische Metabolit N-Acetyl-p-benzochinonimin inaktiviert werden kann, bevor er an Leberproteine bindet.

Bei einer Beeinträchtigung der Glucuronidierung durch Interaktionen mit anderen Substanzen ist eine Verschiebung der Biotransformation hin zu einer vermehrten Bildung der anderen Metaboliten (und damit auch von N-Acetyl-p-benzochinonim) wahrscheinlich. Wenn die UGT also gehemmt oder von anderen Substraten in Anspruch genommen werden, kann eine erhöhte Lebertoxizität durch Paracetamol auftreten (Sonne et al., 1988; Somogyi et al., 1991).

1.4 Opiate

Opiate wirken an den so genannten Opiatrezeptoren. Diese kommen hauptsächlich im Zentralnervensystem, aber auch peripher vor. Es gibt verschiedene Subtypen, die man als μ -, κ - und δ -Rezeptoren bezeichnet (Mignat et al., 1995). Für die zentrale Analgesie sind vor allem die μ -Rezeptoren verantwortlich. Weitere zentrale Wirkungen sind Dämpfung des Hustenzentrums, Sedierung, Tranquillisierung, Euphorie und Atemdepression. Die wichtigste periphere Nebenwirkung der Opiate ist die spastische Obstipation. Im Falle einer relevanten Überdosierung tritt der Tod durch Atemlähmung ein. Bei einer akuten Intoxikation wird daher künstlich beatmet und der Opiatantagonist Naloxon eingesetzt.

Durch wiederholte Anwendung von Opiaten kann es zur Toleranzentwicklung und Abhängigkeit kommen. Dies ist besonders ein Problem in der Drogenszene. Die euphorische Wirkung und die schweren Entzugserscheinungen nach Absetzen von Opiaten führen zur physischen und psychischen Abhängigkeit. Aufgrund der Toleranzentwicklung müssen immer höhere Dosen eingenommen werden (Säwe et al., 1982). Durch die so genannte Substitutionstherapie wird versucht, die Kriminalität zu reduzieren und die Rückkehr in den normalen Alltag zu erleichtern. Dafür werden neben Methadon und Buprenorphin in Ausnahmefällen auch Codein und Dihydrocodein eingesetzt (Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung, BtMVV, 2005). Denn ihr Abhängigkeitspotenzial ist geringer als das von stärker wirksamen Opiaten (Mundipharma, 2003).

1.4.1 Morphin

Morphin ist natürlicher Bestandteil des Opiums. Es ist ein ausgeprägter μ -Rezeptor-Agonist. Als starkes zentral wirksames Analgetikum wird Morphin bei Operationen und Tumorschmerzen eingesetzt (z.B. MST Mundipharma[®]). Es kann parenteral, oral und rektal appliziert werden.

Die Einzeldosis beträgt üblicherweise 10-30 mg parenteral oder rektal und 30-60 mg oral. Als Tageshöchstdosis gelten 60-200 mg. Für gesunde nicht an Opiate gewöhnte Erwachsene liegt die letale Dosis zwischen 300 und 1000 mg. Im Rahmen einer tumorbedingten Schmerztherapie werden aber auch weitaus höhere Dosen eingenommen, die individuell festgelegt und bei entsprechender Gewöhnung vertragen werden.

Die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt verläuft rasch. Die Bioverfügbarkeit liegt nur bei 20-40 %, da Morphin in der Leber einem ausgeprägten First-pass-Effekt unterliegt (Mundipharma, 2001). Hauptmetabolit ist zu ca. 60 % das unwirksame Morphin-3-glucuronid (M3G), außerdem entsteht das analgetisch stark wirksame Morphin-6-glucuronid (M6G) (Aderjan und Skopp, 1998). Es wird ca. 8-10 mal mehr Morphin-3- als Morphin-6-glucuronid gebildet (King et al., 2000b). Weitere Stoffwechselprodukte sind Sulfatkonjugate, Normorphin und Morphin-N-oxid (Hand et al., 1987). Ca. 10 % einer Morphin-Dosis werden unverändert ausgeschieden. Die Halbwertszeit von Morphin liegt durchschnittlich zwischen 1,7 und 4,5 Stunden, wobei die Halbwertszeit der Glucuronide länger ist als die des freien Morphins. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend renal und zu ca. 10 % über die Galle.

1.4.2 Codein

Codein (3-Methylmorphin) kommt wie Morphin im Opium vor. Es wirkt zentral an den μ -Rezeptoren analgetisch und antitussiv. Codein ist ein deutlich schwächeres Analgetikum als Morphin und wird häufig mit nicht-opioiden Analgetika kombiniert (Sonne et al., 1988). Daher gibt es von Codein und Paracetamol viele Arzneistoffkombinationen (z.B. Dolomo TN[®], Paracetamol comp[®]). Auch als Hustenmittel wird Codein eingesetzt (z.B. Codicaps mono[®]). Ebenso ist es nach BtMVV (2005) zur Substitutionstherapie zugelassen.

Die Dosierung als Schmerzmittel in Kombination mit Paracetamol und bei Husten liegt üblicherweise bei 30-60 mg als Einzeldosis. Als Tageshöchstdosis gelten 240 mg, 500-1000 mg sind normalerweise für einen Erwachsenen toxisch. In der Substitutionstherapie dürfen

innerhalb von 30 Tagen maximal 40 000 mg verschrieben werden, was einer Tagesdosis von ca. 1330 mg entspricht (BtMVV 2005). Diese hohen Dosen werden aufgrund von Gewöhnung toleriert.

Codein wird nach oraler Gabe rasch resorbiert. Die Bioverfügbarkeit liegt zwischen 55 und 70 % (Fujisawa, 2002). In der Leber findet ein intensiver Metabolismus mit großen individuellen Unterschieden statt. Codein-6-glucuronid (CG) ist mit ca. 50 % der Hauptmetabolit und analgetisch wirksam (He et al., 1998; Vree et al., 2000). Weitere wichtige Metabolite des Codeins sind Morphin, Norcodein und vor allem die entsprechenden Konjugate (Glucuronide, Sulfate). Ca. 10 % einer Codein-Dosis werden unverändert ausgeschieden. Die Halbwertszeit von Codein liegt bei 3-5 Stunden. Die Ausscheidung verläuft größtenteils (90 %) renal.

1.4.3 Dihydrocodein

Dihydrocodein ist ein halbsynthetisches Opiat, es wird durch Hydrierung von Codein gewonnen. Wie Codein wirkt es zentral als μ -Rezeptor-Agonist analgetisch und antitussiv, ist allerdings etwa dreifach stärker analgetisch wirksam als Codein. Die relative Wirkungsstärke im Vergleich zu Morphin beträgt ca. 0,08-0,16 (Mundipharma, 2003). Therapeutisch wird Dihydrocodein als Analgetikum (z.B. DHC Mundipharma[®]) und Antitussivum (z.B. Paracodin[®]) eingesetzt. Genauso wie Codein ist es nach BtMVV (2005) als Substitutionsmittel für Opiatabhängige zugelassen.

In der Schmerztherapie werden 60-120 mg als Einzeldosis gegeben, die Tageshöchstdosis liegt bei 240 mg. Bei Husten beträgt eine Einzeldosis ca. 60 mg, die Tageshöchstdosis liegt bei 180 mg. Ab ca. 400 mg wirkt es toxisch, und es kann zur Atemdepression kommen. In der Substitutionstherapie dürfen wie beim Codein innerhalb von 30 Tagen maximal 40 000 mg verschrieben werden, was einer Tagesdosis von ca. 1330 mg entspricht (BtMVV, 2005). Es werden aber in Ausnahmefällen auch Tagesdosen bis zu 3000 mg verabreicht (Skopp et al., 1998), welche aufgrund von Gewöhnung vertragen werden.

Nach oraler Gabe wird Dihydrocodein rasch und fast vollständig resorbiert. Wegen einem ausgeprägten First-pass-Effekt liegt die Bioverfügbarkeit nur bei ca. 20 % (Mundipharma, 2003). Metabolite sind die Dihydrocodein-6-Konjugate (Glucuronid, Sulfat), wobei Dihydrocodein-6-glucuronid mit 30 % der Hauptmetabolit ist. Wie Morphin-6- und Codein-6-glucuronid besitzt auch Dihydrocodein-6-glucuronid eine Affinität zu den Opiatrezeptoren

und ist damit analgetisch wirksam (Aderjan und Skopp, 1998; Kirkwood et al., 1998). Weitere Metaboliten sind Nordihydrocodein und das stark analgetisch wirksame Dihydromorphin bzw. deren Konjugate (Kirkwood et al., 1998; Skopp et al., 1998; Balikova et al., 2001). Ca. 30 % der aufgenommenen Dosis Dihydrocodein werden unverändert ausgeschieden. Die Halbwertszeit beträgt 3,5-6 Stunden, die Ausscheidung erfolgt überwiegend über den Harn.

Da die Glucuronide von Morphin, Codein und Dihydrocodein die Hauptmetabolite sind, könnte es bei einer Hemmung der Glucuronidierung zu Wirkverlängerungen und damit gleichzeitig auch zu verstärkten Nebenwirkungen kommen (Somogyi et al., 1991).

1.5 Alkohole

1.5.1 Ethanol

Ethanol wird bereits im Mund, in der Speiseröhre und im Magen zu 10-20 % und im oberen Dünndarm zu 80-90 % durch Diffusion vom Organismus aufgenommen (Berghaus und Graß, 2003). Einfluss auf die Resorption haben dabei Getränkeart, Trinkgeschwindigkeit, Trinkmenge und Füllungszustand des Magen-Darm-Traktes. Die Verteilung erfolgt über den ganzen Organismus, und zwar vorrangig im Körperwasser (Schütz, 1983). Infolge einer akuten Ethanolintoxikation kommt es ab ca. 1,5-2 ‰ (g Ethanol / kg Blutmenge) zu einer stark verlängerten Reaktionszeit und zu Koordinationsstörungen. Bei noch höheren Konzentrationen kommt es zur Bewusstseinstörung. Eine Ethanolkonzentration von 3,5-4 ‰ führt zur Ateminsuffizienz und zum Koma und kann tödlich sein. Chronische Vergiftungserscheinungen sind zentralnervöse Störungen und vor allem Leberschädigungen (Mutschler, 2001b).

Der Hauptabbauweg für ca. 90-95 % des aufgenommenen Ethanols ist die Oxidation zu Acetaldehyd. Sie ist auf drei verschiedene Arten möglich und erfolgt größtenteils durch die Alkoholdehydrogenase in der Leber (Manatou und Carlson, 1992). Der Acetaldehyd wird durch die Aldehyddehydrogenase zu Essigsäure weiter oxidiert, welche überwiegend zu CO₂ und H₂O abgebaut wird. Der bei der Oxidation frei werdende Wasserstoff wird auf NAD⁺ übertragen. Die Metabolisierung über die Alkoholdehydrogenase ist weitestgehend

unabhängig von der Blutalkoholkonzentration und verläuft linear. Denn der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Reoxidation und damit die Bereitstellung von NAD^+ (Schütz, 1983).

Neben der Oxidation durch die Alkoholdehydrogenase ist auch eine Metabolisierung durch die Katalase, eine H_2O_2 abhängige Peroxidase, möglich (Mallach et al., 1987). Auch sie oxidiert Ethanol zu Acetaldehyd, NAD^+ ist an dieser Reaktion nicht beteiligt. Der Anteil der Peroxidase am Alkoholabbau liegt unter 20 %, sie arbeitet aber konzentrationsabhängig und daher verstärkt bei hohen Konzentrationen.

Weiterhin erfolgt der Abbau von Ethanol zu ca. 3-8 % oxidativ zu Essigsäure über CYP450-abhängige Monooxygenasen in den Lebermikrosomen, das so genannte MEOS (microsomal ethanol oxidizing system). Auch dieses System arbeitet konzentrationsabhängig und verstärkt bei höheren Konzentrationen (Mallach et al., 1987).

Sehr geringe Mengen von Ethanol (ca. 0,5 %) werden auch als Konjugate (Glucuronide, Sulfate) eliminiert (Schütz, 1983). Der restliche nicht biotransformierte Ethanol (ca. 5 %) wird unverändert im Urin, über die Atemluft oder den Schweiß ausgeschieden.

Die Blutalkoholkonzentration nimmt pro Stunde im Mittel um ca. 0,15 ‰ ab. Aufgrund der Eliminationskinetik 0. Ordnung kann man aus einem gemessenen Alkoholspiegel Rückrechnungen auf einen bestimmten Trinkzeitpunkt durchführen. Bei chronischer Alkoholfuhr kann die Eliminationskinetik von Ethanol allerdings verändert sein. Denn sowohl die Alkoholdehydrogenase als auch das CYP450 abhängige MEOS können durch häufige Ethanolzufuhr induziert werden (Lucas et al., 1990).

1.5.2 Begleitalkohole

Neben Ethanol sind in alkoholischen Getränken immer auch weitere Substanzen zu finden, die so genannten Begleitstoffe. Sie prägen den Geschmack eines Getränkes, und ihr Muster ist charakteristisch für verschiedene Getränkearten (Bonte und Busse, 1980; Iffland et al., 1982). Getränke mit einem hohen Gehalt an Begleitstoffen können bei starkem Konsum besonders intensive Katersymptome erzeugen (Bonte, 1987a). Die Begleitstoffanalyse erlaubt Rückschlüsse auf das Zeitintervall zwischen Getränkeaufnahme und Blutentnahme, ebenso ist sie nützlich zur Eingrenzung der Getränkeart. Daher ist sie wichtig für die Erstellung von forensischen Gutachten, z.B. bei Verkehrsdelikten unter Alkoholeinfluss.

Zu den Begleitstoffen gehören neben Aldehyden und Estern vor allem die Begleitalkohole. Es handelt sich um aliphatische Alkohole wie z.B. Methanol, n-Propanol, Isobutanol, n-Butanol oder Isopentanol. Sie werden auch als Fuselalkohole oder Fuselöl bezeichnet und entstehen als Nebenprodukte bei der alkoholischen Gärung aus Aminosäuren und Zuckern (Bonte, 1987b). Es gibt Getränke, die außer Methanol kaum Begleitalkohole enthalten, wie z.B. Wodka oder Korn. Dagegen kommen in Obstschnäpsen oder Whisky viele Begleitalkohole vor. Auch in Wein und Bier sind Begleitalkohole enthalten, jedoch in geringeren Mengen als bei den Obstschnäpsen. Längerkettige Begleitalkohole sind toxisch, indem sie sich z.B. in Membranen einlagern (McKarns et al., 1997; Strubelt et al., 1999). Bei Kumulation können sie die bekannten Erscheinungen einer Ethanolintoxikation verstärken.

Auch die Begleitalkohole werden im Magen-Darm-Trakt resorbiert. Sie lassen sich im Blut und im Urin nachweisen. Neben der Oxidation durch Alkoholdehydrogenase, Katalase und MEOS werden die Begleitalkohole ebenfalls glucuronidiert (Iwersen und Schmoldt, 1998). Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Glucuronidierung sind je nach Alkohol verschieden und von Jurowich et al. (2004) *in vitro* genauer untersucht worden. Generell lässt sich sagen, dass die Affinität zur UGT mit steigender Kettenlänge zunimmt. Primäre Alkohole werden stärker glucuronidiert als sekundäre und unverzweigte besser als verzweigte. Die Glucuronidierung von aliphatischen Alkoholen *in vivo* ist von Bank (2004) untersucht worden.

1.6 Enzymkinetik

1.6.1 Allgemeines über Enzyme

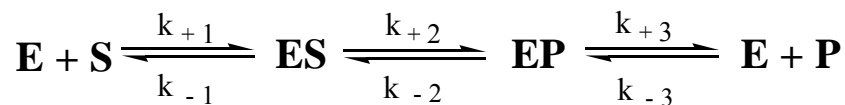
Enzyme sind katalytisch wirkende, komplex aufgebaute Proteine. Fast alle im Organismus ablaufenden Reaktionen bedürfen der Katalyse durch Enzyme. Diese lassen sich in verschiedene Familien aufteilen und kommen häufig als Isoenzyme vor. Isoenzyme sind unterschiedlich in ihrer Primär-, Sekundär- oder Tertiärstruktur, katalysieren aber trotzdem die gleiche Reaktion mit dem gleichen Substrat und dem gleichen Produkt (Leistner und Breckle, 1992). Sie sind unterschiedlich regulierbar. Es gibt Isoenzyme, die vermehrt bei niedrigen Substratkonzentrationen arbeiten, und solche, die erst bei hohen Substratkonzentrationen aktiv werden. Die Enzyme aus der Familie der UGT sind ein

Beispiel für Isoenzyme. Sie alle binden Glucuronsäure an ein oder mehrere Substrate, jedoch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.

Auch in ihrer Substratspezifität unterscheiden sich Isoenzyme. Jedes Enzym besitzt seine eigene Substratspezifität, d.h. es bindet nur eine oder mehrere bestimmte Substanzen an sein aktives Zentrum. Die Substratspezifität kann sehr eng oder auch sehr breit sein. Es gibt Enzyme, die sehr viele chemisch verschiedene Substrate umsetzen, und solche, die nur sehr wenige Substrate umsetzen. Die Reaktionen verlaufen dabei mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.

Enzyme können induzierbar sein. So kann es bei einem erhöhten Angebot an Substrat zur vermehrten Genexpression und Bildung des abbauenden Enzyms kommen. Dies kann z.B. durch Alkohol oder Arzneistoffe erfolgen, vor allem, wenn sie über einen längeren Zeitraum eingenommen werden.

Enzymatische Umsätze laufen nach folgendem allgemeinen Schema ab:



E ist das Enzym, S das Substrat und P das Produkt. Enzym und Substrat bilden den Enzym-Substrat-Komplex ES, der zum Enzym-Produkt-Komplex EP umgewandelt wird. Dieser zerfällt dann in Enzym und Produkt. Die Geschwindigkeitskonstanten k gelten für die jeweiligen Schritte der Hin- bzw. Rückreaktion.

Die Konstanten der Hinreaktion sind bei den meisten enzymatischen Reaktionen jeweils sehr viel größer als die der entsprechenden Rückreaktion. Wenn es sich um eine irreversible Substratumwandlung handelt, betragen die Werte von k_{-2} und k_{-3} sogar Null, da keine Rückumwandlung des Produktes in das Substrat stattfinden kann. Lediglich die Bindung des Substrates an das Enzym ist auch in diesem Fall reversibel. Bei enzymkinetischen Ansätzen geht man davon aus, dass die Umsetzung vom Enzym-Substrat-Komplex zum Enzym-Produkt-Komplex der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Wilson und Goulding, 1991).

Das Prinzip einer enzymatischen Katalyse besteht in der Reduktion der Aktivierungsenergie durch Stabilisierung des Übergangszustandes (Leistner und Breckle, 1992). Das Substrat muss die Energiebarriere des Übergangszustandes überwinden, um ins Produkt umgewandelt zu werden. Infolge der Erniedrigung der Barriere durch das Enzym erhöht sich der Anteil der

Moleküle, die an der Reaktion teilnehmen können. Die Bindung des Substrates erfolgt dabei an einer bestimmten Stelle des Enzyms, dem aktiven Zentrum. Für enzymatische Reaktionen werden meistens auch Co-Substrate benötigt, wie z.B. bei der Glucuronidierung UDPGA. Von ihr erfolgt die Übertragung der Glucuronsäure auf das Substrat. Im Organismus werden Co-Substrate meistens nur in sehr geringen Mengen gebraucht, da sie regeneriert werden können.

Bei einer enzymatischen Reaktion unterscheidet man drei verschiedene Phasen, die zeitlich nacheinander durchlaufen werden (Bisswanger, 1994a). In der sehr kurzen Anfangsphase bildet sich der Enzym-Substrat-Komplex, der Anteil an freien Enzymen nimmt ab. In dieser Phase ist die Umsatzgeschwindigkeit noch gering. In der zweiten Phase erreicht die Umsatzgeschwindigkeit ihren höchsten Wert. Die Konzentration an Enzym-Substrat-Komplex insgesamt ändert sich kaum. Denn es werden genauso viele neue Enzym-Substrat-Komplexe gebildet wie Substrate von den Enzymen zu Produkten umgewandelt werden. Da dieser Zustand einem Gleichgewicht ähnlich ist, wird er auch als Steady-state bezeichnet. In dieser Phase sind Substratabnahme und Produktbildung linear. Während der letzten Phase nimmt die Konzentration an Enzym-Substrat-Komplexen infolge der Erschöpfung des Substratüberschusses allmählich ab, daher sinkt die Umsatzgeschwindigkeit wieder.

1.6.2 Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur

Der pH-Wert ist wichtig für die Enzymkatalyse. Durch die Ausbildung von Kationen und Anionen beeinflusst er unter anderem die Ionisation funktioneller Gruppen der Aminosäuren am Enzym. Dadurch hat der pH-Wert Einfluss auf das aktive Zentrum und die Konformation des Enzyms und kann die Enzymaktivität beeinflussen. Auch am Substrat bzw. Co-Substrat bestimmt der pH-Wert den Ionisierungsgrad, was eine Anlagerung am aktiven Zentrum begünstigen oder erschweren kann. Daher arbeiten Enzyme bei einem bestimmten pH-Wert optimal (Wilson und Goulding, 1991). Beim pH-Optimum ist die Annäherung zwischen Enzym und Substrat maximal begünstigt, sei es durch kovalente Bindungen oder durch elektrostatische Effekte.

Neben dem pH-Wert hat auch die Temperatur einen wichtigen Einfluss auf enzymatische Reaktionen. Mit zunehmender Temperatur steigt die Reaktionsgeschwindigkeit (Wilson und Goulding, 1991). Grundlage der Temperaturabhängigkeit ist die Arrhenius-Gleichung:

$$k = A \cdot e^{-E_a / RT} \quad \text{Gleichung 1.1}$$

- k Geschwindigkeitskonstante der Reaktion [mol/min]
 A Konstante, repräsentiert die Wahrscheinlichkeit des Zustandekommens der Reaktion, enthält Komponenten für die Kollisionshäufigkeit und die Orientierung der Teilchen beim Zusammentreffen [mol/min]
 E_a Aktivierungsenergie [J/mol]
 R allgemeine Gaskonstante [8,314 J/mol/K]
 T Temperatur [K]

Durch Logarithmieren erhält man die Geradengleichung:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad \text{Gleichung 1.2}$$

Trägt man den Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten $\ln k$ gegen die reziproke absolute Temperatur $1/T$ in [K] auf, ergibt sich eine lineare Abhängigkeit. In diesem Diagramm ist $\ln A$ der Ordinatenabschnitt, und $-E_a/R$ die Steigung der Geraden. Auf diese Weise kann man die Aktivierungsenergie E_a für die jeweilige Reaktion berechnen.

Die Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Temperatur verläuft exponentiell. Meistens verdoppelt bis verdreifacht sich die Geschwindigkeit bei einer Temperaturerhöhung um jeweils 10 °C (Bisswanger, 1994b). Durch Temperaturerhöhung ist eine enzymkatalysierte Umsatzgeschwindigkeit allerdings nicht beliebig steigerbar, da eine zu hohe Temperatur zur Denaturierung des Enzyms führt. Dies bedeutet eine meist irreversible Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur und damit den Verlust der katalytischen Funktion. Für eine enzymatische Reaktion kann daher ein Temperaturmaximum bestimmt werden.

1.6.3 Umsatzgeschwindigkeit und Affinität - Bedeutung von V_{\max} und K_m

Für eine enzymatische Reaktion sind die Geschwindigkeit der Umsetzung und die Affinität zwischen Enzym und Substrat wichtig. Zur quantitativen Beschreibung benutzt man die Werte V_{\max} und K_m (Bisswanger, 1994a).

V_{\max} ist die maximale Geschwindigkeit der Gesamtreaktion, wenn alle Enzyme mit Substrat gesättigt sind. Sie wird in Menge Produkt pro Zeiteinheit und Enzymmenge angegeben und ist ein Maß dafür, wie schnell die enzymatische Reaktion abläuft. V_{\max} ist von der Enzymkonzentration abhängig.

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m ist die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ($V_{\max}/2$) erreicht wird, und hat die Dimension einer Molarität. Sie ist ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat.

V_{\max} und K_m stehen über die Michaelis-Menten-Gleichung miteinander in Beziehung:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Gleichung 1.3}$$

V Umsatzgeschwindigkeit [nmol/min]

V_{\max} maximale Umsatzgeschwindigkeit [nmol/min]

K_m Michaelis-Menten-Konstante [mM]

[S] Substratkonzentration [mM]

Zur graphischen Darstellung von K_m und V_{\max} benutzt man das Michaelis-Menten-Diagramm. In diesem wird die Substrat-Konzentration gegen die Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen. Bei einer konstant gehaltenen Menge Enzym und steigender Menge an Substrat erhält man eine Sättigungskurve. Wenn alle Enzyme mit Substrat gesättigt sind, ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) erreicht. Diesem Wert strebt die Kurve asymptotisch zu. Wird dieser Endwert mit geringer Substratkonzentration erreicht, ist die Kurve relativ steil. Der K_m -Wert ist dann klein, es besteht eine hohe Affinität zwischen Enzym und Substrat. Wenn die Affinität zwischen Enzym und Substrat gering ist, bedarf es einer hohen Substratkonzentration, um eine Sättigung des Enzyms zu erreichen. V_{\max} wird in diesem Fall sehr langsam erreicht, und die Kurve verläuft weniger steil. V_{\max} ist daher abhängig von der Affinität zwischen Substrat und Enzym.

Einfacher lassen sich K_m und V_{\max} im Lineweaver-Burk-Diagramm darstellen. Dieses wird häufig zur graphischen Auswertung und zur Bestimmung von K_m und V_{\max} benutzt. Dazu werden Substratkonzentration und Umsatzgeschwindigkeit doppelt reziprok gegeneinander aufgetragen, was zur Linearisierung des Michaelis-Menten-Diagrammes führt. Es ergibt sich eine Gerade, deren Steigung K_m/V_{\max} ist. Der Schnittpunkt mit der Abszisse ist der reziproke K_m -Wert, der Schnittpunkt mit der Ordinate der reziproke V_{\max} -Wert.

Die entsprechende Geradengleichung ergibt sich aus der doppelt reziproken Form der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 1.3). Daraus ergibt sich die Lineweaver-Burk-Gleichung. Sie lautet:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{Gleichung 1.4}$$

- V Umsatzgeschwindigkeit [nmol/min]
- V_{\max} maximale Umsatzgeschwindigkeit [nmol/min]
- K_m Michaelis-Menten-Konstante [mM]
- [S] Substratkonzentration [mM]

1.6.4 Enzyminhibition

Enzyminhibitoren verringern durch Bindung an ein Enzym dessen Fähigkeit, das Substrat in das Produkt umzuwandeln, und verlangsamen damit eine enzymatische Reaktion. Oft weisen Substrat und Inhibitor eine strukturelle Ähnlichkeit auf, dies ist allerdings keine Voraussetzung für einen Hemmstoff. Die Inhibitor-Konstante K_i charakterisiert die Inhibition. Sie beschreibt die Affinität zwischen Inhibitor und Enzym und ist daher ein Maß für das Inhibitionspotential eines Hemmstoffes (Cheng und Prusoff, 1973). Analog dem K_m -Wert hat auch der K_i -Wert die Dimension einer Molarität. Starke Inhibitoren haben einen niedrigen K_i -Wert und umgekehrt.

Es gibt verschiedene Arten der Inhibition (Wilson und Goulding, 1991; Bisswanger, 1994c):

Competitive Hemmung

Bei der kompetitiven Hemmung haben Substrat und Inhibitor eine Affinität zum aktiven Zentrum desselben Enzyms. Sie konkurrieren um die Bindung an das Enzym. Eine Erhöhung der Substratkonzentration verdrängt den Inhibitor und umgekehrt. Da durch hohe Substratkonzentrationen der Effekt des Inhibitors ausgeschaltet werden kann, erhöht sich der K_m -Wert zum scheinbaren K_{ms} -Wert. K_i entspricht daher der Inhibitor-Konzentration, die scheinbar den K_m -Wert verdoppelt. V_{max} ändert sich bei der kompetitiven Hemmung nicht. Im Lineweaver-Burk-Diagramm liegt der Schnittpunkt der Geraden auf der Ordinate.

Nichtcompetitive Hemmung

Der Inhibitor bindet in diesem Fall an das Enzym in der Nähe des aktiven Zentrums. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung, das Enzym kann das Substrat nicht mehr zum Produkt umsetzen. Da die Bindung des Inhibitors nicht am aktiven Zentrum erfolgt, sind Bindung von Hemmstoff und Substrat unabhängig voneinander. Deswegen kann der Hemmstoff auch nicht durch eine erhöhte Substratzugabe vom Enzym verdrängt werden. Der K_m -Wert ändert sich daher nicht, V_{max} ist jedoch kleiner als bei der ungehemmten Reaktion. Denn ständig wird ein bestimmter Prozentsatz an Enzymen der Reaktion entzogen. K_i ist die Inhibitor-Konzentration, die V_{max} halbiert. Im Lineweaver-Burk-Diagramm liegt der Schnittpunkt der Geraden auf der Abszisse.

Gemischte Hemmung

In den meisten Fällen liegt keine reine nichtcompetitive Hemmung vor. Die nichtcompetitive Hemmung ist vielmehr ein Sonderfall der gemischten Hemmung. Ein gemischter Hemmstoff kann an zwei Stellen an das Enzym binden.

Zum einen kommt es wie bei der nichtcompetitive Hemmung durch Anlagerung neben dem aktiven Zentrum zur Konformationsänderung im Enzym. Dadurch wird die Anlagerung des Substrates an das Enzym erschwert, sie ist aber dennoch (im Unterschied zur nichtcompetitive Hemmung) möglich. Ein Hemmstoff vom gemischten Typ erlaubt daher weiterhin die Bindung des Substrates an das Enzym, er reduziert aber die Affinität des

Substrates. Dadurch wird der K_m -Wert erhöht. Ebenso kann die Bindung des Substrates zum Konformationswechsel führen, welcher wiederum die Anlagerung des Inhibitors erschwert. Inhibitor und Substrat konkurrieren daher beim gemischten (wie beim kompetitiven) Hemmtyp um das Enzym. Der Inhibitor bindet aber nicht nur neben dem aktiven Zentrum an ein Enzym, sondern kann ebenfalls direkt an den Enzym-Substrat-Komplex binden. Daraus resultiert der Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex. Dieser Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex hat eine katalytische Aktivität, jedoch ist sie geringer als die der ungehemmten Reaktion. V_{max} ist daher durch die Einflüsse des Inhibitors reduziert. K_i gibt die Konzentration des Inhibitors an, die den V_{max} -Wert halbiert.

So haben Inhibitoren vom gemischten Typ Eigenschaften von kompetitiven und nichtkompetitiven Hemmstoffen. Der K_m -Wert wird erhöht, und gleichzeitig wird V_{max} verringert. Im Lineweaver-Burk-Diagramm liegt der Schnittpunkt der Geraden oberhalb des negativen Abszissenabschnitts.

Uncompetitive Hemmung

Bei diesem Hemmtyp bindet der Inhibitor ausschließlich an den Enzym-Substrat-Komplex. Die Bindungsstelle für den Hemmstoff wird erst in Wechselwirkung mit dem Substrat gebildet. Das Enzym kann dann aber das Substrat nicht mehr zum Produkt umsetzen, der Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex hat keine katalytische Aktivität. Die Wirkung des Hemmstoffes kann durch eine Erhöhung der Substratkonzentration nicht überspielt werden. Es vermindern sich sowohl K_m als auch V_{max} . Die Hemmkonstante K_i entspricht der Konzentration, die K_m und V_{max} halbiert. Im Lineweaver-Burk-Diagramm erhält man parallele Geraden ohne Schnittpunkt.

1.7 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Die enzymatische Glucuronidierung in der Leber ist eine wichtige Reaktion, um die Wasserlöslichkeit einer Substanz zu erhöhen. Da sehr viele verschiedene Substanzen glucuronidiert werden, kann es zu Konkurrenzen um die UGT kommen. Zu deren Charakterisierung bedient man sich der Enzymkinetik. Durch Bestimmung verschiedener Parameter (K_m , V_{max} , K_i , Hemmtyp) lässt sich abschätzen, inwiefern sich verschiedene

Substanzen gegenseitig in ihrer Metabolisierung behindern. Geeignet zur Bestimmung dieser Parameter sind In-vitro-Versuche, bei denen man mit den zu untersuchenden Substanzen und den jeweiligen Enzymen arbeitet.

Interessant für nähere Untersuchungen sind Substanzen, die auch in vivo häufig zusammen eingenommen werden und eine erhöhte Toxizität haben können, wenn ihr Abbau gehemmt wird. Dies ist bei Paracetamol und Alkoholen der Fall. Da bisher wenig über das Interaktionspotenzial von Begleitalkoholen bekannt ist, sind Untersuchungen mit diesen von besonderem Interesse.

Auch Opiate werden oft mit Paracetamol zusammen eingenommen, z.B. bei Erkältungen oder in der Schmerztherapie nach dem Stufenschema der WHO (Vree et al., 2000). In der Drogenszene ist Paracetamol häufig als Verschnittmittel in Straßenheroin zu finden. Da Morphin der Hauptmetabolit von Heroin ist, liegen auch bei Konsum von Straßenheroin Morphin und Paracetamol nebeneinander im Organismus vor. Aufgrund der intensiven Metabolisierung und Glucuronidierung von Morphin, Codein und Dihydrocodein sind Wechselwirkungen zwischen Paracetamol und diesen Opiaten zu erwarten.

Ziel dieser Arbeit war also, neue Erkenntnisse über die pharmakokinetischen Wechselwirkungen von Paracetamol mit Alkoholen und Opiaten zu gewinnen. Die Untersuchungen gliederten sich dabei in drei Teile:

1) Bei den Versuchen mit Paracetamol ohne Alkohole oder Opiate sollten enzymkinetische Daten (K_m , V_{max}) über die Glucuronidierung gewonnen werden. Dazu wurden menschliche Lebermikrosomen verwendet. Weiterhin sollten die Versuchsbedingungen optimiert werden, so dass der größtmögliche enzymatische Umsatz stattfinden konnte. Dies erfolgte durch die quantitative Bestimmung von Paracetamolglucuronid.

2) Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Paracetamol und Begleitalkoholen wurden Hemmversuche mit Paracetamol als Substrat und verschiedenen Alkoholen als Inhibitoren durchgeführt. Dazu wurden zehn verschiedene Alkohole mit einer Alkylkettenlänge von einem bis fünf C-Atomen eingesetzt. Die Menge des gebildeten Paracetamolglucuronids wurde alleine und in Anwesenheit jeweils eines Alkohols ermittelt. Aus den gewonnenen Daten sollten K_i und der Hemmtyp des Inhibitors bestimmt werden. Ebenso konnten Struktureinflüsse der Alkohole untersucht werden.

3) Die Interaktionen zwischen Paracetamol und Opiaten sollten näher charakterisiert werden. Dazu wurde Paracetamol alleine und in Gegenwart von Morphin, Codein oder Dihydrocodein glucuronidiert. Die enzymkinetischen Daten der Opiate als Inhibitoren der Paracetamol-Glucuronidierung konnten dadurch bestimmt werden. Durch gleichzeitige Messung der Opiatglucuronide wurden ebenfalls Daten zur enzymatischen Opiat-Glucuronidierung gewonnen. Auf diese Weise konnten auch die Eigenschaften von Paracetamol als Inhibitor der Opiat-Glucuronidierung ermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Chemikalien

Acetonitril	Merck, Darmstadt
Brij 58	Sigma, Steinheim
Codein	Sigma, Steinheim
Codeinglucuronid	Lipomed, Arlesheim, Schweiz
Dihydrocodeintartrat	Hospital- und Wohlfahrtsapotheke, Köln
Dihydrocodeinglucuronid	Mundipharma, Limburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isobutanol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Morphin-HCl	Merck, Darmstadt
Morphin-3-glucuronid	Lipomed, Arlesheim, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid 5 M	Merck, Darmstadt
n-Butanol	Merck, Darmstadt
n-Propanol	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Paracetamol	Sigma, Steinheim
Paracetamolglucuronid	Sigma, Steinheim
Perchlorsäure 70 % (m/V)	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure 85 % (m/V)	Merck, Darmstadt
p-Nitrophenolglucuronid	Sigma, Steinheim
Pooled Human Liver Microsomes (HLM) Chargen Nr. 20, 21 und 24 Proteinkonzentration 20 mg/ml in 250 mM Sucrose	GenTest, Massachusetts, USA

R-2-Butanol	Aldrich Chem. Co., Wisconsin, USA
S-2-Butanol	Aldrich Chem. Co., Wisconsin, USA
Salzsäure 5 M	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Uridin-5'-diphospho-glucuronsäure (UDPGA)	Sigma, Steinheim

Verbrauchsmaterialien und Geräte

Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Digitale Analysenwaage BP 121 S	Sartorius, Göttingen
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
HPLC-DAD	Hewlett Packard, Böblingen
pH-Meter Portamess	Knick, Berlin
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße Microtubes 1,5 ml Safety cap	Sarstedt, Nümbrecht
Spritze 20 µl Exmire-Microsyringe	Ito Corporation, Fuji, Japan
Spritze für HPLC 25 µl Microliter R	Hamilton Co., Reno, Nevada, USA
Vortex-Mischer Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Reinstwasseranlage	Membra Pure, Bodenheim
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg

Lösungen

Tris-Puffer 100 mM, pH 7,4 bzw. pH 9:

12,114 g Tris werden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, der gewünschte pH-Wert wird mit 5 M HCl eingestellt.

Glycin-Puffer 50 mM:

0,375 g Glycin werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, der gewünschte pH-Wert wird mit 5 M NaOH eingestellt.

Phosphat-Puffer 100 mM:

1,361 g KH_2PO_4 werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt, der gewünschte pH-Wert wird mit 5 M NaOH eingestellt.

7 % HClO_4 :

1 ml konzentrierte HClO_4 (70 %) wird mit Wasser auf 10 ml verdünnt.

1 M H_3PO_4 :

6,7 ml konzentrierte H_3PO_4 (85 %) werden mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

10 mM H_3PO_4 , pH 2,7:

10 ml 1 M H_3PO_4 werden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt, der gewünschte pH-Wert wird mit 5 M NaOH eingestellt.

2.2 Analytik der Glucuronide mittels HPLC

2.2.1 Messbedingungen

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (englisch: high performance liquid chromatography, HPLC) ist eine Form der Säulenchromatographie, bei der Druck angewendet wird. Zur Analytik der Glucuronide wurde ein HPLC-Gerät mit Dioden-Array-Detektor (DAD) aus folgenden Komponenten benutzt:

Geräteaufbau

Pumpe	HPLC 1050 DAD, Hewlett Packard
Entgaser	Degasys DG 1210, VDS Optilab
Injektionsschleife	manuell, max. 20 μl zum Einspritzen
Trennsäule	RP8, 25 cm Länge, 4 mm innerer Durchmesser, VDS Optilab
Packmittel	Nukleosil 100 C85, 5 μm mittlere Partikelgröße
Detektor	1040M DAD, Hewlett Packard
Auswertung	HP 79994A HPLC Chemstation, Hewlett Packard

Geräteeinstellung

Druck	259 bar
Fließgeschwindigkeit	1,7 ml/min
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	20 µl
Fließmittel	3,75 % Acetonitril 96,25 % 10 mM Phosphorsäure, pH 2,7

Standardmäßig wurde 10 mM Phosphorsäure, pH 2,7 mit 3,75 % Acetonitril als Fließmittel verwendet (System 1). Für die Morphin-Versuche und die Kalibrierung mit Morphin-3-glucuronid wurde zur besseren Trennung ein Fließmittel mit 2 % Acetonitril und 98 % 10 mM Phosphorsäure, pH 2,7 eingesetzt (System 2). Bei der Kalibrierung mit Codeinglucuronid wurden 7 % Acetonitril und 93 % 10 mM Phosphorsäure, pH 2,7 verwendet (System 3).

Detektionssystem

Zur Detektion der Glucuronide wurde ein DAD-Detektor verwendet. Die Wandlung in das elektronische Signal erfolgt dabei nicht durch einzelne Photomesszellen, sondern durch ein Diodenarray, eine Anordnung vieler einzelner Photodioden. Dadurch ist es möglich, verschiedene Wellenlängen gleichzeitig zu erfassen. Es besteht die Möglichkeit, von jedem Peak im Chromatogramm das gesamte UV/Vis-Spektrum aufzunehmen, was zur Identifizierung genutzt wird. Peakverunreinigungen können leicht erkannt werden. Man kann also mit einem DAD-Detektor Aussagen über Identität und Reinheit der untersuchten Substanz machen.

Bei den Messungen wurden die Spektren zwischen 200 und 320 nm aufgezeichnet. Zur Quantifizierung der Glucuronide wurde die Wellenlänge eingestellt, bei der die Substanzen ihre maximale Absorption aufweisen. Dies sind für die untersuchten Substanzen:

Paracetamolglucuronid	244 nm
Morphin-3-glucuronid	210 nm
Codeinglucuronid	210 nm
Dihydrocodeinglucuronid	210 nm

2.2.2 Kalibrierung

Eine Kalibrierung wurde mit Paracetamol-, Morphin-3- und Codeinglucuronid durchgeführt. Diese Glucuronide konnten in den Inkubationslösungen an der HPLC im Gegensatz zu Dihydrocodeinglucuronid störungsfrei detektiert werden. Die Kalibrierung erfolgte mit den Reinsubstanzen. Es wurden drei Stammlösungen folgender Konzentrationen hergestellt:

Paracetamolglucuronid	3,000 mM	(10,5 mg/10 ml)
Morphin-3-glucuronid	0,217 mM	(1,0 mg/10 ml)
Codeinglucuronid	0,210 mM	(1,0 mg/10 ml)

Mit der Kalibrierung sollte der ganze Messbereich der zu erwartenden Glucuronidkonzentrationen abgedeckt werden. Der kleinste und der größte Wert der Kalibrierreihe lagen deswegen jeweils unterhalb bzw. oberhalb der Werte aus den Inkubationslösungen.

Die Kalibrierungen wurden in folgenden Bereichen durchgeführt:

Paracetamolglucuronid	0,100 - 12,5 nmol
Morphin-3-glucuronid	0,108 - 2,889 nmol
Codeinglucuronid	0,105 - 2,804 nmol

Die Kalibratoren erhielt man durch entsprechende Verdünnungen der Stammlösung. Von jeder Verdünnungsstufe wurden drei Lösungen angefertigt. In diesen befanden sich neben den Glucuroniden auch alle restlichen Substanzen der Inkubationslösungen (außer den Mikrosomen) und der interne Standard p-Nitrophenolglucuronid. Die Kalibratoren wurden an der HPLC vermessen. Das Injektionsvolumen betrug 20 μ l, genau wie bei den Inkubationslösungen.

Nach Auftragen der gemessenen Peakflächen gegen die injizierte Menge Glucuronid wurde eine lineare Regression durchgeführt. Dadurch erhielt man die jeweilige Kalibriergerade, ebenso wie die dazugehörige Geradengleichung und den Korrelationskoeffizienten r. Für eine gute Korrelation sollte dieser möglichst größer als 0,99 sein. Die Geradengleichung beschreibt den mathematischen Zusammenhang zwischen Messwert und Menge des Analyten. Ist dieser bekannt, so kann der Gehalt von Proben mit unbekanntem

Konzentrationen bestimmt werden. Wenn das Verhältnis durch eine lineare Funktion beschrieben werden kann, so ist dies relativ einfach durchzuführen, da eine Gerade resultiert.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte nach Kromidas (2000) mit den Stammlösungen. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt. Die stärkste Verdünnung erzeugte kein messbares Signal mehr. Anschließend wurden die weniger stark verdünnten Lösungen gemessen, bis ein Peak des jeweiligen Glucuronids bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 zu detektieren war. Dies wurde als Nachweisgrenze festgelegt. Zur Erfassung der Bestimmungsgrenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von 9:1 zugrunde gelegt.

2.2.3 Validierung

Im Rahmen der Validierung wurden für Paracetamol-, Morphin-3- und Codeinglucuronid Untersuchungen zur Selektivität, Stabilität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision durchgeführt, ebenso erfolgten Maßnahmen zur Qualitätssicherung. Zugrunde gelegt wurden die SOP-Richtlinien von CESAR (2003).

Selektivität

Die Selektivität ist die Fähigkeit, alle interessierenden Analyten in einer Lösung ohne gegenseitige Störung nachzuweisen. Der auszuwertende Peak soll nur durch den Analyten entstehen und nicht von Störpeaks überlagert werden.

Zur Überprüfung der Selektivität wurden verschiedene Lösungen hergestellt. In den ersten drei befanden sich jeweils Paracetamol-, Morphin-3- oder Codeinglucuronid und die restlichen Substanzen der Inkubationslösungen. Damit sollte überprüft werden, ob die Substanzen die Detektion des jeweiligen Glucuronids störten. Da auch Paracetamol- und Morphin-3-glucuronid bzw. Paracetamol- und Codeinglucuronid nebeneinander detektiert

werden sollten, wurden eine vierte und fünfte Lösung angesetzt mit Paracetamol- und Morphin-3-glucuronid bzw. Paracetamol- und Codeinglucuronid und den restlichen Substanzen. Dabei sollte eine Basislinientrennung der Glucuronide erreicht werden, um sie gleichzeitig identifizieren und quantifizieren zu können.

Zusätzlich musste überprüft werden, ob die Glucuronide in den Inkubationslösungen nur auf enzymatischem Wege entstanden waren. Dazu wurde ein Mix aus Paracetamol, Morphin oder Codein mit allen restlichen Substanzen, allerdings ohne Mikrosomen hergestellt (Lösungen 6,7 und 8). Ebenso erfolgte ein weiterer Ansatz mit Mikrosomen, aber ohne die jeweiligen Substrate Paracetamol, Morphin oder Codein (Lösungen 9, 10 und 11) bzw. ohne das Co-Substrat UDPGA (Lösungen 12, 13 und 14). Die Lösungen 6-14 wurden für 4 Stunden bei 37,5 °C inkubiert.

Anschließend wurden alle Lösungen an der HPLC vermessen. In den Lösungen 1-5 sollten die Glucuronide ohne Überlagerungen gemessen werden können. In den Lösungen 6-14 durften sich keine Glucuronide gebildet haben.

Stabilität

Die Stabilität ist eine wichtige Voraussetzung für die Analytik. Sie musste überprüft werden, um sicherzustellen, dass die Glucuronide in den Lösungen sich nicht bis zur Bestimmung an der HPLC zersetzen.

Die Stabilität errechnete sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Stabilität (\%)} = \frac{\text{Peakfläche Glucuronid zum Zeitpunkt } x}{\text{Peakfläche Glucuronid zum Zeitpunkt } 0} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Zur Bestimmung der Stabilität wurden drei Lösungen aus den jeweiligen Glucuroniden Paracetamol-, Morphin-3- und Codeinglucuronid mit den restlichen Substanzen hergestellt. Sie wurden sofort (Zeitpunkt 0) und über einen Zeitraum von 4 Tagen mehrmals vermessen. Zwischendurch erfolgte die Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C. Der Gehalt der Lösungen durfte nicht wesentlich (max. 10 %) abnehmen.

Auch anhand der Inkubationslösungen, welche während eines Messzeitraumes mehrfach analysiert wurden (siehe Qualitätssicherung), konnte die Stabilität überprüft werden.

Wiederfindung

Die Wiederfindung ist die Ausbeute des Analyten nach allen Aufarbeitungsschritten im Vergleich zu einer nicht aufgearbeiteten Lösung. Idealerweise liegt sie bei 100 %. Da die Glucuronide direkt aus der Inkubationslösung ohne Aufarbeitung gemessen wurden, diente eine wässrige Stammlösung entsprechender Verdünnung als Vergleich.

Die Wiederfindung wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Wiederfindung (\%)} = \frac{\text{Peakfläche Inkubationslösung}}{\text{Peakfläche Stammlösung}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 2.2}$$

Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte für die Glucuronide bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen durch Dreifachbestimmung. Die gemessenen Konzentrationen der Analyten in den Inkubationslösungen mit den restlichen Substanzen sollten möglichst wenig von den Konzentrationen in den wässrigen Stammlösungen abweichen.

Genauigkeit

Richtigkeit und Präzision beurteilen zusammen die Genauigkeit einer Methode. Die Richtigkeit gibt dabei Aufschluss über systematische Fehler, die Präzision über zufällige Fehler.

Richtigkeit

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Abweichung des Messwertes vom Nominalwert. Zu ihrer Bestimmung wird die relative Abweichung (Relative Error, RE) zwischen der über die Kalibrierfunktion berechneten ($\text{Gluc}_{\text{calc}}$) und der nominalen, durch Einwaage bekannten (Gluc_{nom}) Glucuronidmenge ermittelt. Die relative Abweichung zwischen dem berechneten und dem nominalen Wert sollte nicht mehr als $\pm 15 \%$ sein.

Folgende Gleichung diente zur Berechnung der relativen Abweichung:

$$RE (\%) = \frac{Gluc_{calc} - Gluc_{nom}}{Gluc_{nom}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 2.3}$$

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurden Analyt-Lösungen verschiedener Konzentrationen verwendet. Anschließend wurden die Abweichungen zwischen gemessenen und nominalen Werten verglichen.

Präzision

Die Präzision gibt Aufschluss über die Streuung der Messwerte bei wiederholten Messungen während einen Tages (Intraday) und über mehrere Tage (Interday). Zu ihrer Bestimmung wurde die relative Standardabweichung (RSD) der Werte ermittelt. Diese sollte maximal 15 % betragen.

Die Bestimmung der Präzision erfolgte mit Lösungen verschiedener Analyt-Konzentrationen. Die Werte sollten dabei möglichst wenig voneinander abweichen.

Auch die Lösungen aus den Inkubationslösungen (siehe Qualitätssicherung) dienten zur Überprüfung der Interday-Präzision.

Qualitätssicherung während der Messung

Die Qualitätssicherung hilft dabei, gute und auswertbare Ergebnisse zu erhalten und Fehler im Detektionssystem während der Messung möglichst zu verhindern. Zur Qualitätssicherung wurden verschiedene Maßnahmen durchgeführt.

Vor jedem Messdurchgang wurde als erstes Tris-Puffer eingespritzt, um das Vorhandensein von störenden Restsubstanzen auf der Säule und damit Störpeaks auszuschließen bzw. zu erkennen.

Ebenso wurde mit Tris-Puffer gespült, wenn innerhalb einer Messreihe nach hohen detektierten Analyt-Konzentrationen Proben mit erwartetem kleineren Glucuronid-Gehalt vermessen wurden. Damit wurde sichergestellt, dass der gemessene Wert nicht durch Reste der vorherigen Probe verfälscht war.

Weiterhin musste sichergestellt werden, dass das Messsystem jeden Tag gleich eingestellt war. Dazu wurde die am ersten Messtag als erste vermessene Probe einer Messreihe an jedem weiteren Messtag vor den restlichen noch nicht vermessenen Proben erneut injiziert. Das Chromatogramm, die Peakfläche und die Retentionszeit wurden miteinander verglichen, wobei die Peakfläche um maximal 5 % abweichen durfte. So konnte gewährleistet werden, dass alle Proben auf die gleiche Weise vermessen wurden. Ebenso konnten dadurch nochmals die Stabilität und die Interday-Präzision überprüft werden.

2.3 Enzymatische Glucuronidierung

Die In-vitro-Glucuronidierung mit menschlichen Lebermikrosomen ist schon vielfach in der Literatur beschrieben worden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche lehnen sich vor allem an die Arbeiten von Jurowich et al. (2004), Iwersen und Schmoldt (1998) und Miners et al. (1988, 1990) an.

Die Inkubationen wurden in Microtubes-Hütchen durchgeführt und hatten ein Gesamtvolumen von 100 µl. In Tabelle 2.1 ist der Aufbau eines typischen Reaktionsansatzes zur Glucuronidierung von Paracetamol mit den einzelnen Komponenten dargestellt.

Tab. 2.1: Zusammensetzung der Inkubationslösungen

Assay-Bestandteil	Konzentration	Funktion
Mikrosomen	100 µg/100 µl	enthalten u.a. die UGT-Enzyme
Brij 58	10 µg/100 µl	Detergenz, zerstört die Membranen, damit die Enzyme frei vorliegen
MgCl ₂	100 mM	Mg-Ionen aktivieren die UGT
UDPGA	8 mM	Co-Substrat
Paracetamol	10 mM	Substrat
Tris-Puffer pH 9,0	100 mM	Reaktionsmedium, hält pH während der Reaktion konstant

Zuerst wurden Stammlösungen der verwendeten Substanzen (Paracetamol, UDPGA, MgCl₂ und Brij 58) in der erforderlichen Konzentration hergestellt. Dazu wurden die Substanzen direkt in Tris-Puffer pH 9,0 gelöst. Für die Inkubationen wurden sie entsprechend verdünnt. Es wurde ein Mix aus allen Substanzen außer den Mikrosomen mit einem Volumen von 90 µl hergestellt. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei der gewünschten Temperatur im Brutschrank vorinkubiert. Die Mikrosomen lagen als abgeteilte Lösungen von 10 µl (200 µg

Protein) vor. Sie wurden bis zu ihrer Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Inkubationsversuche wurde die benötigte Anzahl der Mikrosomenlösungen für 3 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von $10\text{ }\mu\text{l}$ 100 mM Tris-Lösung. Nach vorsichtigem Rühren wurden jeweils $10\text{ }\mu\text{l}$ ($100\text{ }\mu\text{g}$ Protein) zum Reaktionsansatz hinzu gegeben, so dass mit jeder abgeteilten Mikrosomenlösung zwei Inkubationen durchgeführt werden konnten. Anschließend wurde für die gewünschte Zeit im Brutschrank inkubiert.

Stop-Methode

Nach der erfolgten Glucuronidierung musste die enzymatische Reaktion gestoppt werden. Dazu wurden verschiedene Methoden ausprobiert:

- 1) Zugabe von $10\text{ }\mu\text{l}$ 7% HClO_4
- 2) Zugabe von $20\text{ }\mu\text{l}$ Methanol
- 3) Inkubation bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad für 5 Minuten

Es wurden jeweils zwei Inkubationslösungen mit Tris-Puffer pH 7,4 angesetzt, die wie in Tabelle 2.1 aufgelistet zusammengesetzt waren. Die UDPGA-Konzentration betrug allerdings nur 4 mM . Die Proben wurden für 30 Minuten im Brutschrank bei $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurden sie durch eine der drei Methoden gestoppt. Anschließend wurden die Proben für 1 Minute im Vortex geschüttelt, 5 Minuten in Eis gelegt und für 3 Minuten bei 2235 g zentrifugiert. Danach wurden die Proben an der HPLC vermessen, und noch einmal für 30 Minuten im Brutschrank bei $37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Bei der erneuten Messung an der HPLC durfte nicht mehr Paracetamolglucuronid detektiert werden als bei der ersten Messung.

Analytik

Nach dem Stoppen der enzymatischen Reaktion wurde der interne Standard p-Nitrophenolglucuronid ($10\text{ }\mu\text{l}$ einer 10 mM wässrigen Lösung) zu jedem Ansatz hinzu gegeben. Die Bestimmung der Glucuronide erfolgte nach dem Zentrifugieren direkt aus dem Überstand der Lösung. Dazu wurden $20\text{ }\mu\text{l}$ in die HPLC injiziert und die Peakflächen gemessen.

Durchführung der Inkubationen

Nach Entwicklung der Versuchsbedingungen und einer geeigneten Stop-Methode wurden die Inkubationen mit Paracetamol und die Inhibitionsversuche mit den Alkoholen und den Opiaten durchgeführt. Die Bestimmung jedes Wertes in allen Reaktionsansätzen mit Paracetamol und den Inhibitionsversuchen erfolgte durch 4 Parallelansätze gleicher Zusammensetzung. Das Volumen der Versuchslösungen betrug immer 100 µl, das Stoppen erfolgte durch Zugabe von 10 µl 7 % HClO₄, Vortexmischung, Eiskühlung und Zentrifugieren. Jeweils 20 µl wurden an der HPLC analysiert. Die Proben, die nicht mehr am Tag der Inkubation gemessen werden konnten, wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Um die Versuche, die sich über einen längeren Zeitraum erstreckten, durchführen zu können, musste mit mehreren Chargen der Lebermikrosomen gearbeitet werden. Denn die Firma GenTest stellt nur relativ geringe Chargengrößen her, und die Mikrosomen sind nicht unbegrenzt lagerfähig. Obwohl jede Charge aus mindestens 20 verschiedenen Spenderlebern gewonnen wird, kann das Enzymmuster von Charge zu Charge variieren.

Daher treffen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen enzymkinetischen Daten nur auf die jeweils verwendete Charge zu und können bei Verwendung anderer Chargen abweichen. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde innerhalb von Versuchsreihen immer mit der gleichen Charge gearbeitet.

Die Versuche zur Glucuronidierung von Paracetamol ohne Alkohole oder Opiate wurden mit der Charge Nr. 20 durchgeführt. Für die Inhibitionsversuche mit den Alkoholen als Hemmstoffe wurde die Charge Nr. 21 verwendet, bei den Opiaten die Chargen Nr. 21 und 24.

2.4 Glucuronidierung von Paracetamol

Zunächst wurden Untersuchungen zur Optimierung der Paracetamol-Glucuronidierung durchgeführt. Dazu wurden Lebermikrosomen der Charge 20 verwendet. Wenn nicht anders angegeben, waren die Inkubationslösungen wie in Tabelle 2.1 zusammengesetzt. Nach der Inkubation wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Proben wurden an der HPLC gemessen und die Peakflächen von Paracetamolglucuronid ermittelt.

Die Inkubationsbedingungen wurden in Bezug auf die Reaktionszeit, den pH-Wert, die Temperatur, die UDPGA (Co-Substrat)-Konzentration und die Paracetamol (Substrat)-Konzentration optimiert, worauf im Folgenden einzeln eingegangen werden soll.

2.4.1 Abhängigkeit von der Inkubationszeit

In dieser Versuchsreihe sollte ermittelt werden, wie lange die Proben am besten inkubiert werden, um einen möglichst hohen Umsatz an Paracetamolglucuronid ohne wesentliche Denaturierung der Enzyme zu erhalten. Dazu wurden mehrere Versuchslösungen mit Tris-Puffer pH 9,0 und einer UDPGA-Konzentration von 4 mM angesetzt und bei 37,5 °C für folgende Zeiten inkubiert:

0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 und 6 Stunden

Zur Bestimmung des 0-Wertes wurden die Ansätze sofort nach Zugabe der Mikrosomen gestoppt und vermessen.

2.4.2 Abhängigkeit vom pH-Wert

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden die Versuchslösungen bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Die Inkubation fand für 4 Stunden bei 37,5 °C mit einer UDPGA-Konzentration von 4 mM statt.

Es wurden drei verschiedene Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten hergestellt. Zur Ermittlung der Werte im schwach sauren bis neutralen Bereich wurde mit Phosphat-

Puffer gearbeitet. Tris-Puffer wurde im leicht alkalischen und Glycin-Puffer im stärker alkalischen Bereich verwendet.

Es wurde mit Puffern folgender pH-Werte inkubiert:

Phosphat-Puffer 100 mM	pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0
Tris-Puffer 100 mM	pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0
Glycin-Puffer 50 mM	pH 10,0; 11,0

2.4.3 Abhängigkeit von der Temperatur

In dieser Versuchsreihe wurde das Temperaturmaximum der Paracetamol-Glucuronidierung ermittelt. Die Inkubation wurde für 4 Stunden mit Tris-Puffer pH 9,0 und einer UDPGA-Konzentration von 4 mM bei folgenden Temperaturen durchgeführt:

Inkubation unter Eiskühlung	0 °C, 10 °C
Inkubation bei Raumtemperatur	22 °C
Inkubation im Brutschrank	30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C

2.4.4 Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration

Diese Versuchsreihe diente zur Bestimmung der UDPGA-Konzentration, bei der die größte Menge an Paracetamolglucuronid gebildet wurde. Ebenso sollte geklärt werden, ob hohe Konzentrationen des Co-Substrates hemmend auf die Glucuronidierung wirken.

Dazu wurden Inkubationen mit Tris-Puffer pH 9,0 bei 37,5 °C für 4 Stunden durchgeführt. Die UDPGA-Konzentrationen betragen jeweils:

1; 2; 4; 8 und 16 mM

2.4.5 Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration

Mit diesen Versuchen wurden die enzymkinetischen Parameter für die Glucuronidierung von Paracetamol bestimmt, indem steigende Substrat-Konzentrationen zu den Inkubationslösungen gegeben wurden. Wie bei der UDPGA sollte geklärt werden, ob hohe Paracetamol-Konzentrationen die Reaktion hemmen können.

Es wurde bei 37,5 °C für 4 Stunden in Tris-Puffer pH 9,0 und mit einer UDPGA-Konzentration von 8 mM inkubiert. Folgende Paracetamol-Konzentrationen wurden eingesetzt:

2,5; 5; 10; 15; 20 und 30 mM

2.5 Glucuronidierung von Paracetamol unter Einfluss von Alkoholen

Nach der Optimierung der Methode zur In-vitro-Glucuronidierung von Paracetamol wurden die Inhibitionsversuche mit den Alkoholen durchgeführt. Dazu wurden die Inkubationen immer mit den gleichen Konzentrationen an Reaktanden und unter den gleichen Versuchsbedingungen ausgeführt. Nur der jeweilige Inhibitor und die Konzentrationen des Inhibitors wurden verändert. Durch Messung von Paracetamolglucuronid in allen Versuchslösungen sollten die enzymkinetischen Daten der Inhibitoren gewonnen werden. Ebenso konnte untersucht werden, welchen Einfluss die Struktur der Alkohole hat.

Die Reaktionslösungen waren wie in Tabelle 2.1 zusammengesetzt. Sie wurden für 4 Stunden bei 37,5 °C mit Tris-Puffer pH 9,0 inkubiert. Die Alkohole wurden in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und ihre Hemmwirkung bei Paracetamol-Konzentrationen von 5, 10 und 20 mM untersucht. Die Alkohol-Stammlösungen wurden durch Verdünnung des jeweiligen Alkohols mit Tris-Puffer pH 9,0 hergestellt. Die einzelnen Alkohole wurden dann den Inkubationslösungen in der gewünschten Konzentration hinzu gegeben.

Weiterhin wurden Inkubationen mit 5, 10 und 20 mM Paracetamol ohne Alkohol durchgeführt. Daraus konnte man die enzymkinetischen Daten der Paracetamol-Glucuronidierung K_m und V_{max} ohne Inhibitor erhalten. Erst durch Bezug auf diese Werte konnten das Inhibitionspotenzial eines Alkohols richtig eingeschätzt und der K_i -Wert verlässlich bestimmt werden. Da K_m und V_{max} für die ungehemmte Reaktion einer Charge

immer gleich sein sollten, konnten die Werte innerhalb der Chargen und zwischen den verschiedenen Chargen verglichen werden.

Als Hemmstoffe der Paracetamol-Glucuronidierung wurden 10 verschiedene Alkohole mit einer Kettenlänge von einem bis fünf C-Atomen untersucht. Unter diesen befanden sich primäre und sekundäre, verzweigte und unverzweigte Alkohole. Die verwendeten Alkohole sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tab. 2.2: Alkohole in den Inhibitionsversuchen

Alkohol	Struktur		
Methanol	C1	primär	unverzweigt
Ethanol	C2	primär	unverzweigt
2-Propanol	C3	sekundär	unverzweigt
n-Propanol	C3	primär	unverzweigt
R-2-Butanol	C4	sekundär	unverzweigt
S-2-Butanol	C4	sekundär	unverzweigt
Isobutanol	C4	primär	verzweigt
n-Butanol	C4	primär	unverzweigt
Isopentanol	C5	primär	verzweigt
n-Pentanol	C5	primär	unverzweigt

Die Alkohole wurden in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Zum einen in der Nähe ihres eigenen K_m -Wertes, ebenso in einer niedrigeren und einer höheren Konzentration. Die K_m -Werte der Alkohole wurden in den Arbeiten von Jurowich (2002) durch Untersuchungen im eigenen Hause mit menschlichen Lebermikrosomen bestimmt. Sie reichten von 11,7 mM bei n-Pentanol bis zu 419,7 mM bei 2-Propanol.

Tabelle 2.3 listet die Konzentrationen der jeweiligen Alkohole in den Inkubationslösungen und die verwendeten Mikrosomenchargen auf.

Tab. 2.3: Konzentration der Alkohole und Angabe der Mikrosomencharge

Alkohol	Konzentration	Mikrosomencharge
Methanol, Ethanol, 2-Propanol	125; 250; 500 mM	21
n-Propanol, R-2-Butanol, S-2-Butanol	100; 150; 200 mM	21
n-Butanol, Isobutanol	25; 50; 100 mM	21
Isopentanol	5; 10; 20 mM	21
n-Pentanol	5; 10; 20 mM	20, 24
n-Pentanol	7,5; 15 mM	21

Bei allen Versuchen mit den Alkoholen wurde die Lebermikrosomen-Charge Nr. 21 verwendet. Nur n-Pentanol wurde zusätzlich mit den Chargen Nr. 20 und 24 untersucht. Über die enzymkinetischen Daten konnten die Chargen miteinander verglichen werden.

2.6 Glucuronidierung von Paracetamol und Opiaten

Auch Opiate als Hemmstoffe der Paracetamol-Glucuronidierung sollten untersucht werden. Dazu wurden Reaktionslösungen mit Morphin, Codein oder Dihydrocodein inkubiert und die Menge an gebildetem Paracetamolglucuronid bestimmt. Durch Messung der Opiatglucuronide konnte allerdings auch der Einfluss von Paracetamol auf die Opiat-Glucuronidierung gemessen werden. So fungierten Paracetamol und die Opiate Morphin, Codein und Dihydrocodein einerseits als Substrat und andererseits gleichzeitig als Inhibitoren in den Inkubationslösungen. Nach dem Stoppen der Reaktionen wurden sowohl Paracetamolglucuronid als auch die Opiatglucuronide bestimmt.

Die Versuchslösungen waren bis auf den pH-Wert des Puffers wie in Tabelle 2.1 zusammengesetzt. Sie wurden für 4 Stunden bei 37,5 °C und einer UDPGA-Konzentration von 8 mM inkubiert. Als Reaktionsmedium wurde Tris-Puffer mit dem pH-Wert 7,4 gewählt. Denn die Opiate waren bei pH 9,0 nicht genügend löslich, um eine geeignete Stammlösung ansetzen zu können. Die Stammlösungen aller verwendeten Substanzen wurden mit Tris-Puffer pH 7,4 hergestellt. Lediglich die Opiat-Stammlösungen wurden in einer Mischung aus Tris-Puffer pH 7,4 und 1,25 M Methanol angesetzt. Durch die Methanol-Zugabe wurde die Löslichkeit der Opiate verbessert. Für die Inkubationen wurden die Stammlösungen entsprechend verdünnt. Paracetamol wurde in den Konzentrationen 5, 10 und 20 mM eingesetzt. Die Opiate wurden in drei verschiedenen Konzentrationen in der Nähe ihrer K_m -Werte dazugegeben, die der Literatur entnommen wurden (Kirkwood et al., 1998; Court et al., 2003). Daraus resultierten folgende Opiatkonzentrationen, die in Tabelle 2.4 zusammen mit den verwendeten Mikrosomenchargen aufgelistet sind.

Tab. 2.4: Konzentration der Opiate und Angabe der Mikrosomencharge

Opiat	Konzentration	Mikrosomencharge
Morphin, Codein	2,5; 5; 10 mM	21, 24
Dihydrocodein	1,25; 2,5; 5 mM	24

Die Ausführung der meisten Inkubationen erfolgte mit der Lebermikrosomencharge Nr. 24. Zur Bestimmung der Parameter K_m und V_{max} bei dieser Charge wurden Reaktionen nur mit dem jeweiligen Substrat aber ohne Hemmstoff durchgeführt. Dies erfolgte durch alleinige Inkubation von entweder Paracetamol, Morphin oder Codein in den Konzentrationen 5, 10 und 20 mM. Dihydrocodein wurde in den Konzentrationen 1,25, 2,5 und 5 mM ohne Paracetamol inkubiert.

Mit der Charge Nr. 21 wurden zusätzliche Hemmversuche mit Morphin und Codein als Inhibitoren der Paracetamol-Glucuronidierung, aber ohne Messung der Opiatglucuronide durchgeführt.

2.7 Statistische Auswertung

Mit Hilfe der Statistik können gemessene Daten ausgewertet, interpretiert und verglichen werden. Dazu bedient man sich verschiedener Parameter, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

2.7.1 Beschreibende Statistik

Arithmetischer Mittelwert

Der arithmetische Mittelwert \bar{x} errechnet sich aus der Summe der Messwerte x_i geteilt durch die Anzahl der Werte n . Die mathematische Berechnung zeigt folgende Gleichung:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Gleichung 2.4

Standardabweichung

Die Standardabweichung (SD) ist die Wurzel aus der Summe der Quadrate der Differenzen zwischen den Einzelwerten und dem Mittelwert geteilt durch die Anzahl der Messungen minus 1. Sie hat die gleiche Einheit wie die gemessene Größe. Als Maß für die Streuung der Messwerte sollte sie möglichst klein sein. Mathematisch lässt sie sich wie folgt beschreiben:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

Relative Standardabweichung

Die relative Standardabweichung (RSD) ist gleich der Standardabweichung geteilt durch den Mittelwert multipliziert mit Hundert. Sie ist unabhängig von den Einheiten, in denen man misst. Je geringer die Streuung ist, desto näher liegt die relative Standardabweichung bei 0 %. Sie ist damit ein quantitatives Maß für die Präzision. Folgende Formel dient zur Berechnung:

$$RSD (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 2.6}$$

Standardfehler

Der Standardfehler (SE) beschreibt die Variabilität von Mittelwerten aus Stichproben mit dem gleichen Stichprobenumfang n und ist ein Maß für die Präzision der Schätzung des Erwartungswertes durch den Mittelwert. Damit gibt er die statistische Unsicherheit von Mittelwerten wieder und eignet sich zum Vergleich von Mittelwerten. Er berechnet sich aus der Standardabweichung nach Division durch die Wurzel aus n . Damit ist er immer kleiner als die Standardabweichung. Der Zusammenhang zwischen Stichprobenumfang und Standardfehler ist umgekehrt quadratisch. Um den Schätzfehler zu halbieren, muss der

Stichprobenumfang vervierfacht werden. Die folgende Gleichung gibt die mathematische Berechnung wieder:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 2.7}$$

Konfidenzintervall

Ein Konfidenzintervall ist ein Bereich zwischen zwei Zahlen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der der wahre Wert zwischen diesen beiden Zahlen liegt, wird in Prozent angegeben. So ist das 95-prozentige Konfidenzintervall derjenige Bereich, in dem der wahre Wert mit 95-prozentiger Sicherheit liegt.

2.7.2 Beurteilende Statistik

Korrelationsanalyse, Korrelationskoeffizient und Determinationskoeffizient

Durch die Korrelation wird überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen zwei Variablen besteht und gleichzeitig das Ausmaß der Abhängigkeit untersucht. Zur Beurteilung der Korrelation werden aus den gemessenen Daten Wertepaare gebildet und graphisch gegeneinander aufgetragen. Die Güte des Zusammenhangs wird durch den Korrelationskoeffizienten r charakterisiert. Er ist ein Maß für den linearen Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen und ist einheitslos. Wenn keine Korrelation besteht, hat er den Wert 0 , je näher er beim Wert 1 liegt, desto besser ist die Korrelation. Der Determinationskoeffizient bzw. das Bestimmtheitsmaß r^2 ist das Quadrat des Korrelationskoeffizienten r , es wird häufig anstelle von r angegeben.

Regressionsanalyse

Die Art des Zusammenhangs zwischen einer abhängigen Variablen y und einer unabhängigen Variablen x wird durch die Regression beschrieben. Mit der Regressionsanalyse kann man Zusammenhänge erkennen und abhängige Werte aus den unabhängigen vorhersagen. Es gibt verschiedene Arten der Regression, z.B. die lineare, nichtlineare oder die quadratische Regression.

Bei einer linearen Regression hängen die Werte linear voneinander ab. Daraus lässt sich folgende Regressionsgleichung ermitteln:

$$y = a \cdot x + b \qquad \text{Gleichung 2.8}$$

a = Steigung

b = Ordinatenabschnitt

Sind die Werte a und b bekannt, so kann durch Messung des Wertes x anhand der Regressionsgleichung der dazugehörige Wert y berechnet werden und umgekehrt.

2.8 Enzymkinetische Auswertung

Die enzymkinetische Auswertung aller Versuche erfolgte mit dem Programm Enzyme Kinetics Module 1.1/ Sigma Plot 2001 von SPSS Science. Mit diesem Programm konnten die erforderlichen enzymkinetischen Parameter berechnet und gleichzeitig statistisch ausgewertet werden. Auch die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit diesem Programm. Dazu wurden die Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burk-, Kalibrations-, Zeit-, pH- und Temperatur-Diagramme mit SPSS erstellt.

2.8.1 Statistische Parameter

Zum Entwerfen und Interpretieren der Daten und Diagramme wurden vom Programm verschiedene Parameter benutzt, die im Folgenden erklärt werden sollen.

Abweichung (Residuen, Residuals)

Die Abweichung gibt den vertikalen Abstand eines Messwertes von der gezogenen Regressionslinie an. Sie sollte möglichst klein sein.

Summe der Abweichungsquadrate (Sum of Squares of Residuals)

Die Summe der Abweichungsquadrate (SS) entsteht aus der Summe der Quadrate von allen Abweichungen der Messungen. Sie erlaubt Aussagen über die Güte der Anpassung. Kurven mit kleineren Werten passen besser zu den Daten als Kurven mit großen Werten. SS wird wie folgt berechnet:

$$SS = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Gleichung 2.9}$$

Standardabweichung der Abweichung ($S_{y,x}$, Residual Standard Deviation)

Die Standardabweichung der Abweichungen ist ein weiterer statistischer Parameter zur Einschätzung der Exaktheit der Daten. Sie gibt den Mittelwert der Abweichungen an, wenn die Werte an die jeweiligen Kurven angepasst werden. Je kleiner $S_{y,x}$ ist, desto besser sind die Daten. $S_{y,x}$ wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$S_{y,x} = \sqrt{\frac{SS}{n-p}} \quad \text{Gleichung 2.10}$$

n = Anzahl der Messungen

p = Anzahl der statistischen Parameter

2.8.2 Kurvenanpassung

Die Ergebnisse aus den Inkubationsversuchen wurden durch verschiedene Diagramme graphisch dargestellt. Die Anpassung der Kurven an die Daten erfolgte durch nichtlineare Regression. Diese bietet sich zur Auswertung von Daten an, die einer Sättigungskinetik unterliegen (wie z.B. enzymatische Reaktionen). Sie ist daher ein wichtiges Instrument zur Analyse biologischer Daten.

Die Kurvenanpassung (Curve Fitting) erfolgte unter Minimierung der Summe der Abweichungsquadrate (Sum of Least Squares). Dabei wird versucht, die Residuen und damit die Abweichungsquadrate zwischen den gemessenen und den berechneten Werten auf der Kurve zu minimieren. Auf diese Weise wird die bestmögliche Kurvenanpassung erhalten. Um eine gute Anpassung der Werte an ein Modell zu haben, sollte der Determinationskoeffizient r^2 laut SPSS Handbook Enzyme Kinetics (2001) größer als 0,85 sein.

Bei der graphischen Darstellung ist folgendes zu beachten: Das Enzymkinetikprogramm berücksichtigt zur bestmöglichen Anpassung alle Messpunkte. Daher kann es durchaus sein, dass einige Punkte nicht auf den Kurven bzw. Geraden liegen. Dies fällt besonders im Lineweaver-Burk-Diagramm auf. Durch die doppelt-reziproke Auftragung haben die Punkte mit niedrigen Substrat-Konzentrationen und Umsatzgeschwindigkeiten meist größere Fehlerbalken und liegen scheinbar schlechter auf den Geraden als die anderen Punkte. Betrachtet man dann allerdings das dazugehörige Michaelis-Menten-Diagramm, so passen diese Punkte genauso gut zu den Kurven wie die anderen. Das Lineweaver-Burk-Diagramm kann also eine schlechtere Anpassung der Messpunkte an die Geraden vortäuschen als in Wirklichkeit vorliegt, was aber durch die doppelt reziproke Achsenaufteilung zu erklären ist.

2.8.3 Vergleich verschiedener Modelle

Nach der enzymkinetischen Auswertung wurden von SPSS Enzymkinetik mehrere Modelle erstellt, die alle aus den Daten erhalten werden konnten. So wurden bei den Inhibitionsversuchen die jeweiligen enzymkinetischen Parameter (V_{\max} , K_m und K_i) abgeschätzt und die Diagramme (Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk) für die unterschiedlichen Hemmtypen erstellt. Anschließend musste geprüft werden, ob das jeweilige Inhibitionsmodell überhaupt für die gemessenen Werte in Frage kommt. Dazu eignet sich der Residuals Runs Test. Weiterhin sollte das Inhibitionsmodell bestimmt werden, das am besten

zu den ermittelten Daten passt. Hierfür ist unter anderem das Akaike Information Criterion (AIC) nützlich. Residuals Runs Test und AIC werden im Folgenden genauer erklärt.

Residuals Runs Test

Mit dem Residuals Runs Test kann man abschätzen, ob ein Enzymkinetikmodell zu den gemessenen Daten passt oder die Regressionskurve systematisch von diesen abweicht. Dazu müssen die Residuen der Messwerte betrachtet werden. Die Residuen sind die Abstände zwischen den gemessenen Werten und der errechneten Regressionskurve. Je nachdem, ob die jeweiligen Werte über oder unter der Regressionslinie liegen, haben sie ein positives oder negatives Vorzeichen. Bei einer guten Modellanpassung sollten die Residuen möglichst zufällig um die Datenkurve streuen. Positive und negative Residuen kommen gleichermaßen vor, und es darf kein Trend in eine Richtung zu erkennen sein.

Ein Durchlauf (run) ist eine Serie aufeinander folgender Messwerte, die alle über oder unter der Regressionskurve liegen, d.h. ihre Residuen sind alle positiv oder negativ. Mit jedem Vorzeichenwechsel der Residuen beginnt ein neuer Durchlauf. Wenn die Datenpunkte zufällig um die Regressionslinie verteilt sind, erwartet man bei einer Anzahl von n Messpunkten mindestens $n/2 + 1$ Durchläufe (Motulsky und Christopoulos, 2003). Wenn die tatsächliche Anzahl der Durchläufe kleiner als die erwartete Anzahl ist, passt das gewählte Modell nicht zu den Daten. Hat man z.B. 10 Messpunkte, so werden mindestens 6 Durchläufe erwartet. Liegen aber die ersten 5 Werte unterhalb der Regressionslinie und die weiteren 5 Werte darüber, so ergeben sich nur 2 Durchläufe. Dies bedeutet, dass die gemessenen Werte nicht zum gewählten Modell passen.

Der Residuals Runs Test vergleicht also die tatsächliche Anzahl der Durchläufe (Runs) mit der erwarteten Anzahl der Läufe und stellt fest, ob ein signifikanter Unterschied besteht. Als Prüfgröße erhält man den Runs Test p-Wert. Anhand dieses Wertes kann man die Frage beantworten, ob die Messwerte und das gewählte Modell zueinander passen. Wenn es weniger tatsächliche als erwartete Durchläufe gibt, erhält man einen Runs Test p-Wert unter 0,05, der Test ist nicht bestanden. Das Modell sollte verworfen werden, da die Daten systematisch von der Regressionskurve abweichen. Bei einem größeren Runs Test p-Wert kann das gewählte Modell zur Darstellung der Daten benutzt werden.

Akaike Information Criterion

Das Akaike Information Criterion ist sehr nützlich zum Vergleich verschiedener Enzymkinetikmodelle. Es dient zur Beurteilung der Güte der Anpassung der Modelle an die gemessenen Daten. Zum Vergleich verschiedener Modelle kann man anhand des AIC Aussagen treffen, welches Modell zu bevorzugen ist. So kann durch Vergleich der AIC-Werte verschiedener Inhibitionsmodelle ermittelt werden, wie sicher ein Modell von einem anderen abzugrenzen ist. Man erhält AIC aus folgender Gleichung:

$$AIC = n \cdot \ln\left(\frac{SS}{n}\right) + 2K \quad \text{Gleichung 2.11}$$

n Anzahl der Messwerte aus den Inkubationen

SS Summe der Abweichungsquadrate

K Anzahl der errechneten Modellparameter plus 1

(bei den enzymkinetischen Inhibitionsmodellen gibt es drei Modellparameter, nämlich V_{\max} , K_m und K_i)

Der korrigierte AIC-Wert (AIC_c) verbessert die Aussagekraft von AIC, wenn die Anzahl der Datenpunkte im Vergleich zu den zu bestimmenden Parametern klein ist. AIC_c erhält man folgendermaßen:

$$AIC_c = AIC + \frac{2K(K+1)}{n-K-1} \quad \text{Gleichung 2.12}$$

Bei der enzymkinetischen Auswertung mit SPSS Enzymkinetik erhält man zu jedem Modell das dazugehörige AIC_c . Dies ist ein dimensionsloser Zahlenwert mit positivem oder negativem Vorzeichen. Das Modell mit dem kleinsten AIC_c -Wert passt am besten zu den gemessenen Werten. So ist ein Modell mit einem Wert von -258 besser als ein Modell mit einem Wert von -250, ein Wert von +250 ist wiederum besser als ein Wert von +258.

Zum Vergleich von zwei verschiedenen Modellen bildet man die Differenz Δ der AIC_c -Werte. Dabei zählt nur die absolute, nicht die relative Differenz, so dass Modelle mit Werten von 200 und 208 sich genauso unterscheiden wie solche mit Werten von 1000 und 1008 und -250 und

-258. Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Modell das bessere ist, wird über folgende Gleichung berechnet:

$$\text{Wahrscheinlichkeit (\%)} = \frac{e^{0,5\Delta}}{1 + e^{0,5\Delta}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 2.13}$$

Wenn die Differenz zwischen 2 AIC-Werten Null ist, so sind beide Modelle mit 50-prozentiger Wahrscheinlichkeit gleich gut. Unterscheiden sich die Werte um zwei Zahlen, wobei Modell A den kleineren Wert hat, so ergibt sich aus Gleichung 2.13 eine 73-prozentige Wahrscheinlichkeit, dass Modell A das bessere ist, und eine 27-prozentige Wahrscheinlichkeit, dass Modell B besser ist. Mit anderen Worten kann man auch sagen, dass Modell A 2,7-fach ($73/27$) wahrscheinlicher ist als Modell B. Um ein Modell mit genügender Wahrscheinlichkeit (95 %) als das bessere bestimmen zu können, sollten sich die AIC-Werte um mindestens sechs Zahlenwerte unterscheiden. Dann ist das Modell mit dem kleineren Wert 19-fach ($95/5$) wahrscheinlicher als das andere Modell. Je näher die AIC-Werte beieinander liegen, desto schwieriger ist es, ein bestimmtes Modell als das bessere auszuwählen.

2.8.4 Auswertung der Daten aus den Inkubationsversuchen

Zu jedem ermittelten Datenpunkt aus der vierfachen Bestimmung mit den Inkubationslösungen wurden vom Enzymkinetik-Programm SPSS der Mittelwert und der Standardfehler berechnet. Die aus den eingegebenen Daten ermittelten Werte V_{\max} , K_m und K_i wurden mit ihrem Standardfehler und dem 95-prozentigen Konfidenzintervall angegeben.

Die Güte der Anpassung (Goodness of Fit) für das jeweilige Inhibitionsmodell wurde durch den Determinationskoeffizienten r^2 , die Summe der Abweichungsquadrate, die Standardabweichung der Residuen ($S_{y,x}$) und durch das AIC_c definiert.

Außerdem wurde zu jedem Modell der Residuals Runs Test durchgeführt. Wenn er nicht bestanden wurde, konnte das jeweilige Inhibitionsmodell ausgeschlossen werden.

Zur Veranschaulichung der enzymkinetischen Auswertung befindet sich im Anhang in Abbildung 7.1 eine Auflistung der Parameter, die mit dem Computer-Programm SPSS Enzymkinetik für alle Versuche berechnet wurden. In diesem Beispiel wurde Paracetamol mit R-2-Butanol als Inhibitor glucuronidiert.

Die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit dem Michaelis-Menten- und dem Lineweaver-Burk-Diagramm. Die Anpassung der Kurven an die jeweiligen Messwerte wurde über die Summe der kleinsten Abweichungsquadrate mithilfe der nichtlinearen Regression durchgeführt.

Der Modellvergleich und die Ermittlung des Hemmtyps erfolgten sowohl graphisch als auch rechnerisch durch Vergleich von r^2 und AIC_c .

3 Ergebnisse

3.1 Analytik der Glucuronide mittels HPLC

3.1.1 Messbedingungen

Paracetamol-, Morphin-3- und Codeinglucuronid erwiesen sich als gut detektierbare Substanzen. Mit dem gewählten System aus HPLC und DAD-Detektor konnten sie am Maximum ihrer Absorption (244 nm bzw. 210 nm) auch in den Inkubationslösungen einwandfrei identifiziert und quantifiziert werden. Dihydrocodeinglucuronid war als Reinsubstanz ebenfalls gut zu detektieren. Der Peak in den Versuchslösungen wurde jedoch von einer anderen Substanz überlagert, die ebenfalls durch die Inkubation entstand.

Die Retentionszeiten der Substanzen in System 1 (3,75 % Acetonitril in 10 mM Phosphorsäure, pH 2,7) waren:

Paracetamolglucuronid	2,9 min
p-Nitrophenolglucuronid	4,0 min
Paracetamol	4,7 min
Codeinglucuronid	8,2 min
Codein	9,7 min
Dihydrocodeinglucuronid	8,2 min
Dihydrocodein	10,6 min

In System 2 (2 % Acetonitril in 10 mM Phosphorsäure, pH 2,7) wurden die Substanzen zu folgenden Retentionszeiten detektiert:

Morphin-3-glucuronid	3,1 min
Paracetamolglucuronid	3,5 min
p-Nitrophenolglucuronid	4,4 min
Morphin	4,7 min
Paracetamol	5,4 min

Die Chromatogramme enthielten keine relevanten Störpeaks, die den Nachweis der Analyten hätten beeinträchtigen können. Im Anhang sind in den Abbildungen 7.2 bis 7.6 Chromatogramme dargestellt. Das Chromatogramm 7.2 zeigt eine Inkubation mit Paracetamol und Codein, 7.3 eine Inkubation mit Paracetamol und Morphin. Die Chromatogramme 7.4, 7.5 und 7.6 sind Vergrößerungen. Auf der Abbildung 7.4 sind Paracetamolglucuronid und der interne Standard zu erkennen (und Paracetamol daneben), Abbildung 7.5 zeigt den Peak von Codeinglucuronid (und Codein daneben), Abbildung 7.6 einen Morphin-3-glucuronid-Peak (mit Paracetamolglucuronid und p-Nitrophenolglucuronid daneben).

Die Auswertung der Peaks erfolgte über die Fläche. Denn diese ist unabhängig von der Retentionszeit, welche sich im Laufe des Messzeitraumes für die Proben geringfügig verschieben konnte.

3.1.2 Kalibrierung

Nach Messung der Kalibrierlösungen an der HPLC wurden die Peakflächen gegen die Menge des Analyten aufgetragen. Nach Durchführung einer linearen Regression erhielt man die Regressionsgleichungen. Über diese erfolgte die Berechnung der Glucuronide in den Inkubationslösungen.

In den Abbildungen 3.1, 3.2 und 3.3 sind die Kalibriergeraden von Paracetamol-, Morphin-3- und Codeinglucuronid dargestellt. Zusätzlich sind der Determinationskoeffizient r^2 und die Steigung angegeben. Da die Kalibriergeraden durch den Koordinatenursprung gelegt wurden, beträgt der Ordinatenabschnitt Null.

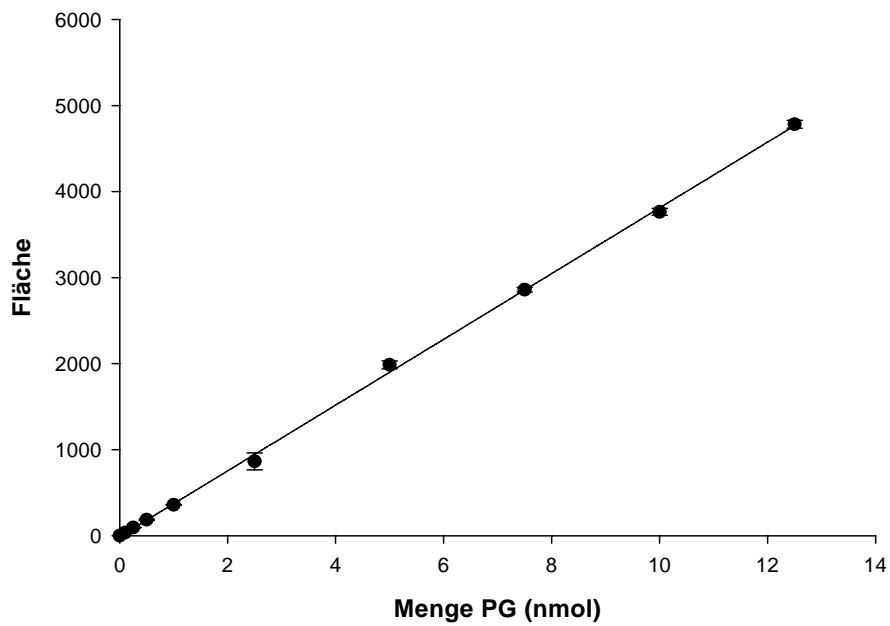


Abb. 3.1: Kalibriergerade von PG; r^2 : 0,998; Steigung: $380,9 \pm 3,1$

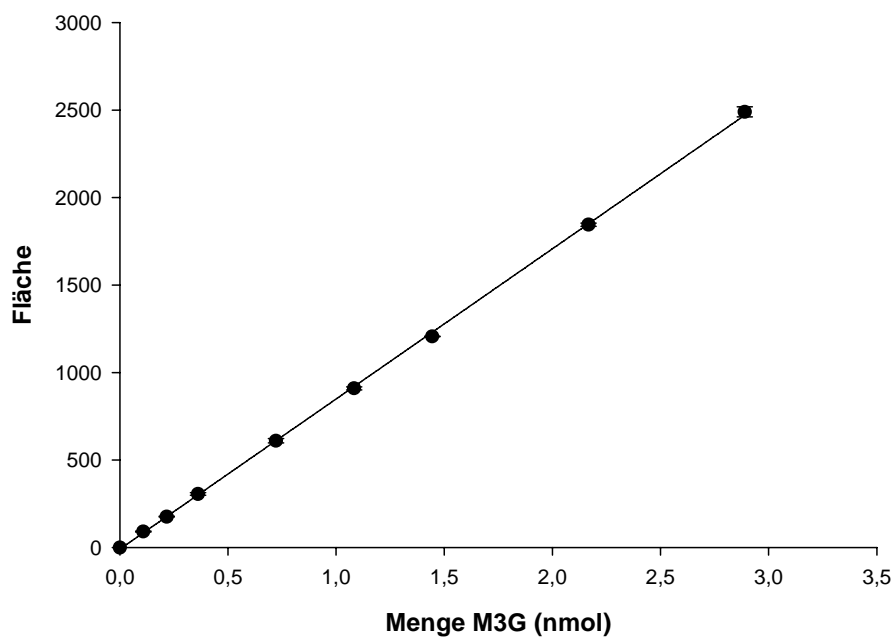


Abb. 3.2: Kalibriergerade von M3G; r^2 : 0,999; Steigung: $853,3 \pm 4,5$

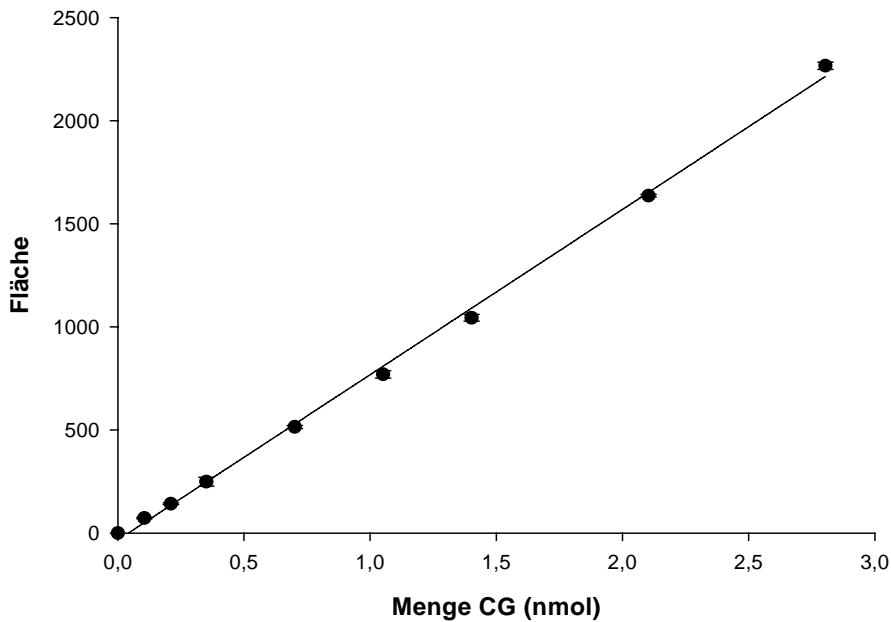


Abb. 3.3: Kalibriergerade von CG; r^2 : 0,997; Steigung: $783,3 \pm 9,3$

Der Determinationskoeffizient r^2 lag bei allen Geraden über dem geforderten Wert von 0,99. Daher bestand eine gute Korrelation zwischen der Peakfläche und der Menge des Glucuronids. Der Zusammenhang war linear.

Der interne Standard p-Nitrophenolglucuronid wurde in die Berechnungen nicht miteinbezogen, da er die Präzision nicht verbesserte.

Die in den Inkubationslösungen gebildeten Glucuronidmengen lagen zwischen folgenden Werten:

Paracetamolglucuronid	0,210 nmol - 10,418 nmol
Morphin-3-glucuronid	0,376 nmol - 2,070 nmol
Codeinglucuronid	0,173 nmol - 1,231 nmol

Diese Werte wurden von den Kalibrierlösungen vollständig abgedeckt. Alle Messungen aus den Inkubationslösungen lagen demnach im Kalibrationsbereich.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die kleinsten von der HPLC noch detektierbaren Mengen der Glucuronide zur Bestimmung der Nachweisgrenze bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 waren folgende:

Paracetamolglucuronid	0,026 nmol
Morphin-3-glucuronid	0,012 nmol
Codeinglucuronid	0,013 nmol

Zur Festlegung der Bestimmungsgrenze bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 9:1 ergaben sich folgende Mengen an Glucuroniden:

Paracetamolglucuronid	0,078 nmol
Morphin-3-glucuronid	0,036 nmol
Codeinglucuronid	0,039 nmol

3.1.3 Validierung

Selektivität

Die Bestimmung der Selektivität erfolgte mit mehreren Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung. Nach Vermessen der verschiedenen Lösungen an der HPLC konnte eine ausreichende Selektivität festgestellt werden.

Die Glucuronide konnten gut detektiert werden. Auch Paracetamolglucuronid und Morphin-3-glucuronid bzw. Paracetamolglucuronid und Codeinglucuronid konnten nebeneinander bestimmt werden, da sich ihre Retentionszeiten ausreichend voneinander unterschieden. Somit war eine gleichzeitige Messung von Paracetamolglucuronid und den Opiatglucuroniden Morphin-3- und Codeinglucuronid in den später durchgeführten Inhibitionsversuchen möglich.

In den Lösungen ohne Mikrosomen bzw. ohne Substrate oder Co-Substrat konnten keine Glucuronide von Paracetamol, Morphin bzw. Codein detektiert werden. Damit war bewiesen, dass die Glucuronide nur auf enzymatischem Weg gebildet wurden.

In den Abbildungen 7.2 bis 7.6 im Anhang sind die Chromatogramme und die einzelnen Peaks dargestellt.

Stabilität

Für die Untersuchungen zur Stabilität wurden drei Lösungen mit Paracetamol-, Morphin-3- bzw. Codeinglucuronid an mehreren Tagen hintereinander gemessen. Die Glucuronide erwiesen sich dabei als sehr stabile Substanzen. Bei Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C über 4 Tage nahm der Gehalt der Analyt-Lösungen nicht ab. So war es möglich, Proben bis zu 4 Tage nach Durchführung der Inkubation zu vermessen. Paracetamolglucuronid war in Vorversuchen auch nach 7 Tagen Lagerung noch stabil. In der Tabelle 3.1 sind die Werte für die einzelnen Glucuronide angegeben.

Tab. 3.1: Stabilität der Glucuronide in den Analytlösungen bei 4 °C (n = 1)

Lagerungszeit	Stabilität der Analytlösungen		
	PG	M3G	CG
2 h	101,55 %	98,43 %	96,89 %
24 h = 1 Tag	99,45 %	100,58 %	104,54 %
72 h = 3 Tage	102,33 %	106,90 %	100,59 %
96 h = 4 Tage	101,66 %	103,52 %	105,16 %

Wiederfindung

Zur Ermittlung der Wiederfindung wurden Lösungen aus den Glucuroniden und den restlichen Substanzen mit wässrigen Stammlösungen entsprechender Konzentration verglichen. Die Wiederfindung war für alle drei Glucuronide sehr hoch. Die Detektion der Glucuronide wurde demnach nicht durch die restlichen Substanzen gestört. Tabelle 3.2 zeigt die Werte für die einzelnen Glucuronide.

Tab. 3.2: Wiederfindung der Glucuronidbestimmung (n = 3)

Substanz	Menge (nmol)	Wiederfindung
PG	0,75	100,74 %
	7,5	99,82 %
M3G	0,22	96,75 %
	2,2	100,04 %
CG	0,21	100,73 %
	2,1	101,55 %

Richtigkeit

Die Bestimmung der Richtigkeit erfolgte mit Analyt-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen. Nach Messung dieser Lösungen an der HPLC wurden die Gehalte mittels der Kalibrierfunktion berechnet ($\text{Gluc}_{\text{calc}}$). Dieser Wert wurde mit dem aus der Einwaage bekannten Gehalt (Gluc_{nom}) verglichen und die relative Abweichung in Prozent ermittelt. Diese lag für alle drei Glucuronide unter 10 %, überwiegend sogar unter 5 %. Damit war die Richtigkeit gewährleistet, denn die Abweichung darf laut CESAR (2003) 15 % nicht übersteigen. Die Tabelle 3.3 listet die Werte der einzelnen Glucuronide auf.

Tab. 3.3 Richtigkeit der Glucuronidbestimmung

Substanz	n	Gluc_{nom} (nmol)	$\text{Gluc}_{\text{calc}}$ (nmol)	RE
PG	6	0,750	0,701	-6,52 %
	4	2,500	2,522	0,87 %
	8	4,500	4,326	-3,87 %
	7	7,500	7,350	-2,00 %
M3G	3	1,084	1,051	-2,96 %
	4	2,167	2,046	-5,60 %
CG	4	1,052	0,955	-9,20 %
	6	2,103	2,006	4,60 %

Präzision

Durch wiederholte Messungen der Analyt-Lösungen an einem Tag oder an mehreren Tagen hintereinander wurden die Intraday- und die Interday-Präzision ermittelt. Die relative Standardabweichung der Messwerte um ihren Mittelwert lag bei der Intraday-Präzision zwischen 0,4 und 4,6 % und bei der Interday-Präzision zwischen 0,8 und 7,2 %. Die Methode

erwies sich damit als präzise genug, da die relative Standardabweichung unter 15 % lag (CESAR, 2003). In der Tabelle 3.4 sind die Werte für die einzelnen Glucuronide aufgelistet.

Tab. 3.4: Präzision der Glucuronidbestimmung

Substanz	Menge (nmol)	Intraday		Interday	
		n	RSD	n	RSD
PG	0,750	3	4,64 %	6	5,53 %
	2,500	2	0,59 %	4	1,90 %
	4,500	4	4,33 %	8	7,15 %
	7,500	2	1,09 %	7	4,93 %
M3G	1,084	2	0,42 %	3	0,77 %
	2,167	2	1,12 %	4	4,58 %
CG	1,052	2	2,23 %	4	3,39 %
	2,103	4	1,70 %	6	1,38 %

Qualitätssicherung während der Messung

Durch die Qualitätssicherung konnten Fehler während des Messvorgangs erkannt bzw. vermieden werden. Dadurch erhielt man gut analysierbare und zuverlässige Werte. Das Spülen mit Tris-Puffer gewährleistete, dass keine Verschleppung aus einem Ansatz in den nächsten auftreten konnte. Durch das wiederholte Messen der ersten Probe am Anfang eines neuen Messdurchlaufes konnte zusätzlich die Stabilität der Glucuronide über den ganzen Messzeitraum noch einmal überprüft werden. Ebenso diente der Vergleich der Werte aus dieser Probe zur nochmaligen Bestätigung einer genügenden Interday-Präzision.

3.2 Enzymatische Glucuronidierung

Die Inkubationen mit den Lebermikrosomen waren gut durchführbar. Alle Inkubationslösungen hatten die gleiche Zusammensetzung, und es wurde mit den gleichen Konzentrationen an Reaktanden gearbeitet.

Nach Durchführung der Inkubationen musste eine geeignete Stop-Methode gefunden werden, die die Enzyme vollständig inaktivierte. Das gemessene Paracetamolglucuronid durfte nur während der Inkubation gebildet werden, in der Lagerungszeit bis zur Messung mussten weitere enzymatische Aktivitäten ausgeschlossen sein.

Die Ergebnisse der Versuche zur Ermittlung der geeigneten Stop-Methode sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tab. 3.5: Vergleich der Stop-Methoden bei der Glucuronidierung von Paracetamol

Stop-Methode	nmol PG/mg Protein (Assay 1)		nmol PG/mg Protein (Assay 2)	
	1. Messung	2. Messung	1. Messung	2. Messung
HClO ₄	7,88	8,17	8,80	8,73
Methanol	7,68	13,84	8,84	14,27
Erhitzen (60 °C)	7,57	11,77	10,83	12,38

Die Zugabe von 20 µl Methanol oder das Erhitzen auf 60 °C im Wasserbad für 5 Minuten reichten nicht aus, um die Enzyme ausreichend zu denaturieren. Nach erneuter Inkubation im Brutschrank wurde bei der zweiten Messung deutlich mehr Paracetamolglucuronid gefunden als bei der ersten Messung. Die Zugabe von 10 µl 7 % HClO₄ erwies sich allerdings als ausreichend, um die enzymatische Reaktion irreversibel zu stoppen. Auch nach erneuter Inkubation wurde nicht mehr Paracetamolglucuronid detektiert. Deswegen wurden alle weiteren Reaktionslösungen mit dieser Methode gestoppt. Anschließend wurden die Proben für eine Minute im Vortex geschüttelt, 5 Minuten in Eis gelegt und für 3 Minuten bei 2235 g zentrifugiert. Nach dem Stoppen der Reaktion war eine aufwändige Probenaufbereitung nicht nötig, da die Glucuronide direkt aus der Inkubationslösung analysiert werden konnten.

Der interne Standard p-Nitrophenolglucuronid wurde zur späteren Berechnung der gebildeten Glucuronidmengen nicht miteinbezogen, da er die Präzision nicht verbesserte. Er wurde aber trotzdem zu jedem Ansatz gegeben, um eventuelle Pipettier- oder Injektionsfehler erkennen zu können.

3.3 Glucuronidierung von Paracetamol

3.3.1 Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Inkubationslösungen in dieser Versuchsreihe wurden alle unterschiedlich lange bei 37,5 °C mit Tris-Puffer pH 9,0 inkubiert und die Menge des gebildeten Paracetamolglucuronids gemessen. In der Probe zur Bestimmung des 0-Wertes wurde kein Paracetamolglucuronid gefunden. In der kurzen Zeit zwischen Starten der Reaktion durch

Hinzugabe der Mikrosomen und dem direkten Stoppen der Reaktion durch 10 μ l 7 % HClO_4 wurde keine detektierbare Menge Paracetamolglucuronid gebildet.

In den anderen Reaktionslösungen war Paracetamolglucuronid entstanden. Nach Messung an der HPLC wurde die Menge Paracetamolglucuronid in nmol/mg Enzym gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Daraus resultierte das Diagramm in Abbildung 3.4.

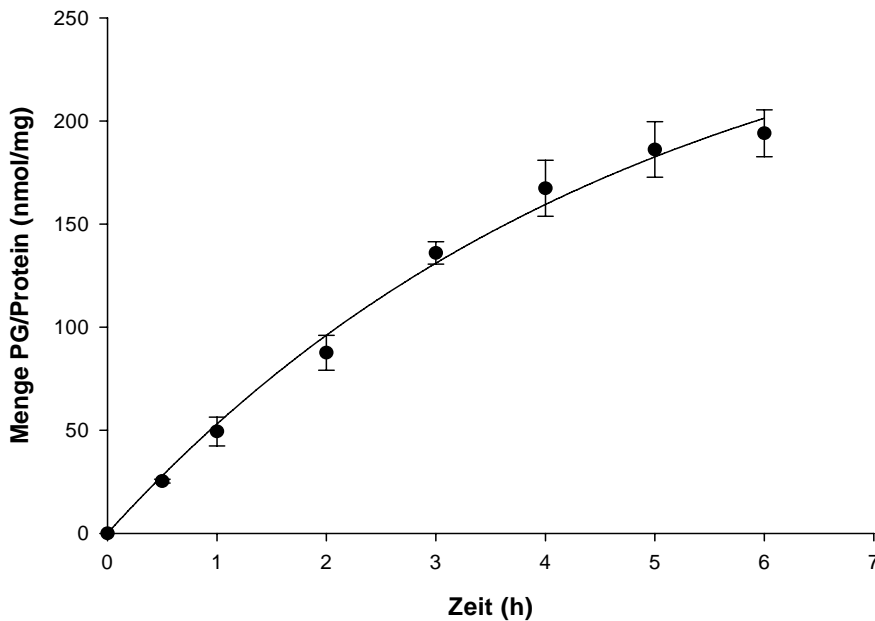


Abb. 3.4: Glucuronidierung von Paracetamol in Abhängigkeit von der Inkubationszeit Inkubation über 6 Stunden

Das Diagramm zeigt den typischen Verlauf einer Sättigungskinetik. Man kann erkennen, dass über die Inkubationszeit von 6 Stunden steigende Mengen Paracetamolglucuronid gebildet wurden. Die Kurve steigt zunächst mit einer Bildungsgeschwindigkeit von etwa 50 nmol Paracetamolglucuronid / mg Enzym / h an und flacht dann bei ca. 4-5 Stunden auf etwa 20 nmol/mg/h ab. Nach einer vierstündigen Inkubation sind ca. 170 nmol/mg gebildet worden, nach 6 Stunden Inkubation ca. 200 nmol/mg.

Bis zu einer Inkubationszeit von 4 Stunden steigt die Kurve linear an. Trägt man nur die Werte bis zu 4 Stunden in ein Diagramm, so erhält man in Abbildung 3.5 eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,98.

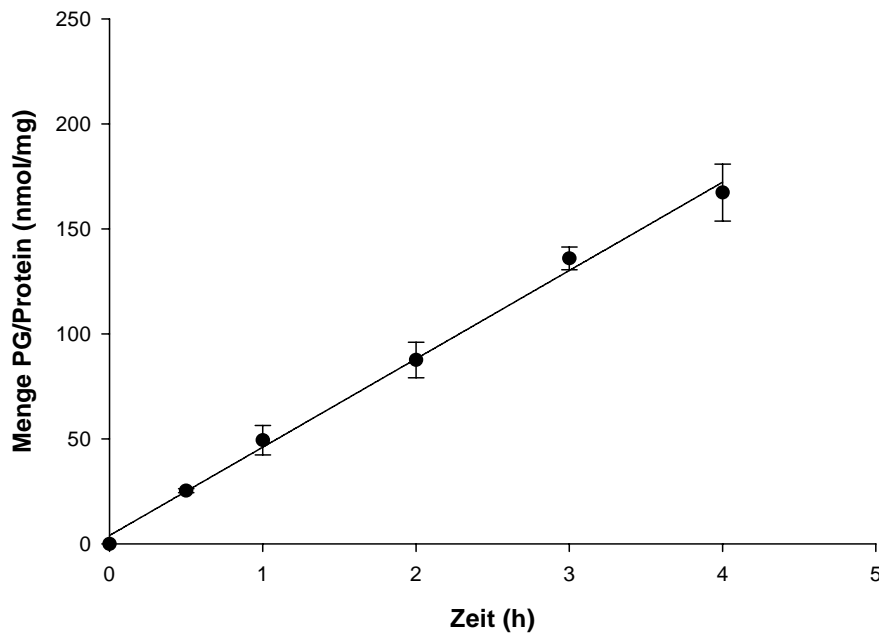


Abb. 3.5: Glucuronidierung von Paracetamol in Abhängigkeit von der Inkubationszeit
Inkubation über 4 Stunden

Alle Versuchslösungen wurden daher für 4 Stunden inkubiert, um eine möglichst große Menge an Paracetamolglucuronid zu erhalten.

3.3.2 Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Inkubation dieser Reaktionslösungen fand bei verschiedenen pH-Werten mit drei verschiedenen Puffern für 4 Stunden bei 37,5 °C statt. Die Menge Paracetamolglucuronid in nmol, die pro Minute von 1 mg Enzym gebildet wurde, ist die Umsatzgeschwindigkeit. Diese wurde gegen den pH-Wert des verwendeten Puffers aufgetragen. Abbildung 3.6 zeigt den Verlauf der pH-Kurve.

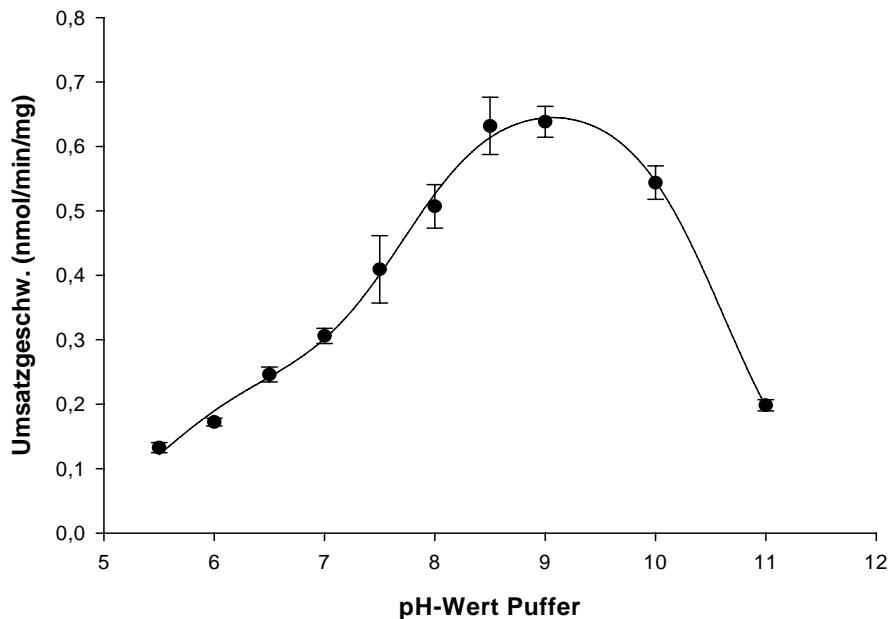


Abb. 3.6: Glucuronidierung von Paracetamol in Abhängigkeit vom pH-Wert

Das Diagramm zeigt eine glockenförmige Kurve mit einem flachen Anstieg zum Maximum und einem steileren Abfall nach Durchlaufen des Maximums. Das Maximum der pH-Kurve liegt bei pH 9,0. Bei diesem pH-Wert ist die Umsatzgeschwindigkeit am größten, sie beträgt ca. 0,65 nmol/min/mg. Vom Maximum ausgehend fällt die Kurve zum alkalischen Bereich sehr schnell ab. Eine Erhöhung des pH-Wertes um 2 Einheiten auf 11,0 führt zu einem starken Abfall der Umsatzgeschwindigkeit auf ca. 0,2 nmol/min/mg. Bei niedrigeren pH-Werten als 9,0 fällt die Kurve flacher ab als im alkalischen Bereich. Bei 2 Einheiten unter dem Maximum, nämlich pH 7,0 liegt die Umsatzgeschwindigkeit noch bei ca. 0,3 nmol/min/mg.

Die Kurve enthält 3 Wendepunkte. Diese entsprechen den pKa-Werten der Aminosäuren, die im aktiven Zentrum des Enzyms liegen und an der Reaktion beteiligt sind. In diesem Fall sind es drei Aminosäuren mit folgenden pKa-Werten:

pKa 1: $5,50 \pm 0,25$

pKa 2: $7,73 \pm 0,15$

pKa 3: $10,61 \pm 0,08$

Die größte Umsatzgeschwindigkeit wurde mit dem bei Raumtemperatur (25 °C) auf pH 9,0 eingestellten Tris-Puffer erreicht. Allerdings wurden die Proben bei 37,5 °C inkubiert. Da der

pH-Wert von der Temperatur abhängig ist, lag bei 37,5 °C ein anderer pH-Wert vor als bei 25 °C. Zur Überprüfung des pH-Wertes bei 37,5 °C wurden jeweils zwei Versuchslösungen auf ca. 40 °C erhitzt und während des Abkühlens der pH-Wert verfolgt. Daraus ergab sich, dass der pH-Wert bei 37,5 °C um 0,3 Einheiten kleiner war als bei Raumtemperatur. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung wurde daher bei einem pH-Wert von 8,7 in der Inkubationslösung erreicht.

Um hohe Umsätze zu erzielen, wurden alle Inkubationen mit Tris-Puffer pH 9,0 durchgeführt. Lediglich die Versuche mit den Opiaten wurden mit Tris-Puffer pH 7,4 durchgeführt, da die Opiate bei pH 9,0 nicht ausreichend löslich waren, um eine geeignete Stammlösung ansetzen zu können.

3.3.3 Abhängigkeit von der Temperatur

In dieser Versuchsreihe sollte die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Glucuronidierung näher untersucht werden. Dazu wurden die Reaktionslösungen bei verschiedenen Temperaturen in Tris-Puffer pH 9,0 für 4 Stunden inkubiert und die Menge des gebildeten Paracetamolglucuronids an der HPLC quantifiziert. Anschließend wurden die Umsatzgeschwindigkeiten bei den jeweiligen Temperaturen ermittelt und in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 3.7).

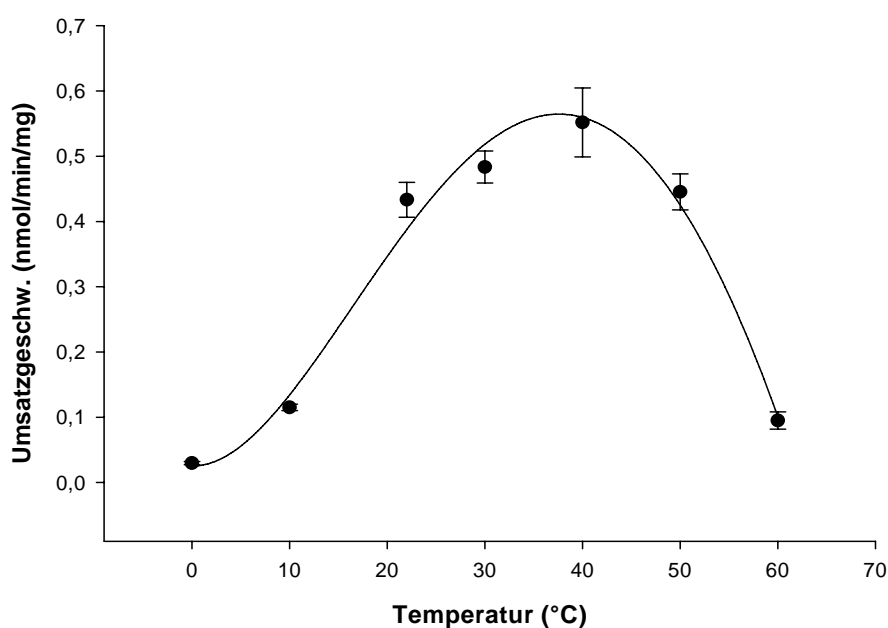


Abb. 3.7: Glucuronidierung von Paracetamol in Abhängigkeit von der Temperatur

Auch die Temperatur-Kurve zeigt einen glockenförmigen Verlauf. Das Maximum der Kurve liegt bei 37,5 °C. Bei dieser Temperatur wird eine Umsatzgeschwindigkeit von ca. 0,55 nmol/min/mg erhalten. Der Anstieg der Kurve verläuft flacher als der Abfall nach Durchlaufen des Maximums. Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60 °C führt über die Inkubationszeit von 4 Stunden nur noch zu sehr kleinen Umsatzgeschwindigkeiten von ca. 0,1 nmol/min/mg. Bei Temperaturen um die 20 °C findet noch ein guter Umsatz mit einer Geschwindigkeit von 0,3 nmol/min/mg statt. Bei 10 °C allerdings ist die Umsatzgeschwindigkeit mit 0,1 nmol/min/mg fast gleich niedrig wie bei 60 °C, bei 0 °C ist sie mit ca. 0,05 nmol/min/mg am geringsten.

Aus dem aufsteigenden Ast der Temperaturkurve konnte die Aktivierungsenergie für die Paracetamol-Glucuronidierung ermittelt werden. Dazu wurde in einem weiteren Diagramm (Abbildung 3.8) die reziproke absolute Temperatur ($1/T$ in °K) gegen den Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten ($\ln k$) aufgetragen. Mithilfe der logarithmierten Arrhenius-Gleichung (Gleichung 1.2) wurde die Aktivierungsenergie aus der Steigung der Geraden berechnet. Diese lag für die enzymatische Glucuronidierung von Paracetamol bei 64176 J/mol.

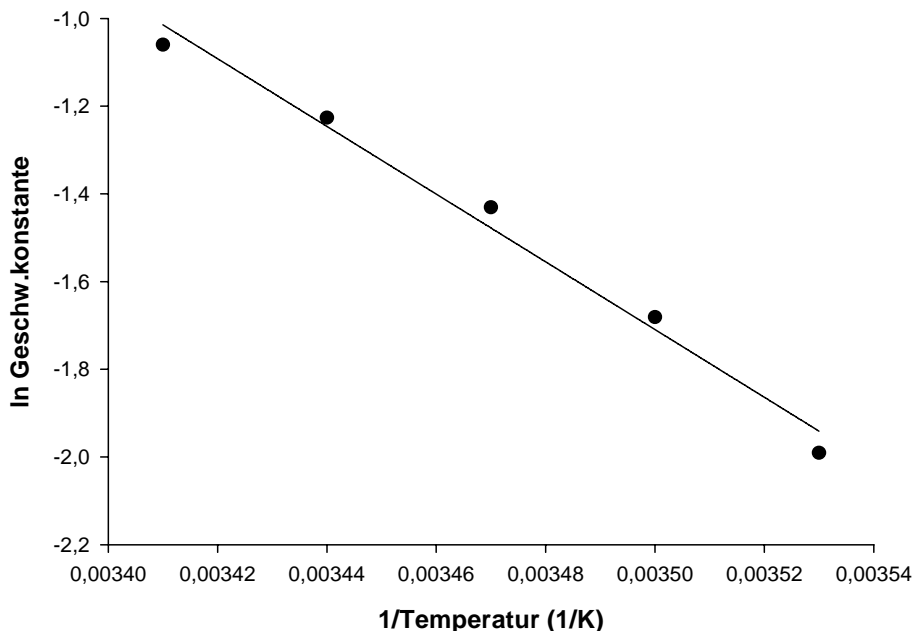


Abb. 3.8: Glucuronidierung von Paracetamol in Abhängigkeit von der Temperatur Arrhenius-Diagramm

Um auch in Bezug auf die Temperatur beim Maximum zu arbeiten, wurden alle Inkubationen bei 37,5 °C durchgeführt.

3.3.4 Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration

Die Inkubation der Reaktionslösungen fand mit unterschiedlichen Konzentrationen des Co-Substrates UDPGA bei 37,5 °C in Tris-Puffer pH 9,0 für 4 Stunden statt. Dadurch konnten die enzymkinetischen Parameter für UDPGA bestimmt werden. Ebenso wurde untersucht, ob UDPGA in hohen Konzentrationen hemmend auf die Glucuronidierung von Paracetamol wirkt.

Nach Bestimmung der Paracetamolglucuronid-Menge bei den unterschiedlichen UDPGA-Konzentrationen wurden daraus die jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten ermittelt. Anschließend wurden diese im Michaelis-Menten- und im Lineweaver-Burk-Diagramm gegen die Konzentration der UDPGA aufgetragen (Abbildungen 3.9 und 3.10).

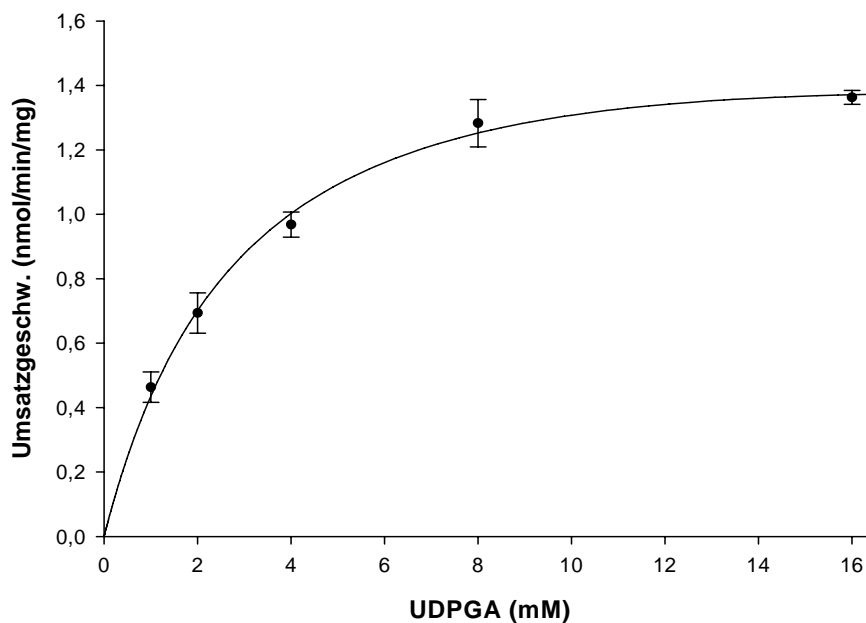


Abb. 3.9: Glucuronidierung von Paracetamol in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration
Michaelis-Menten-Diagramm

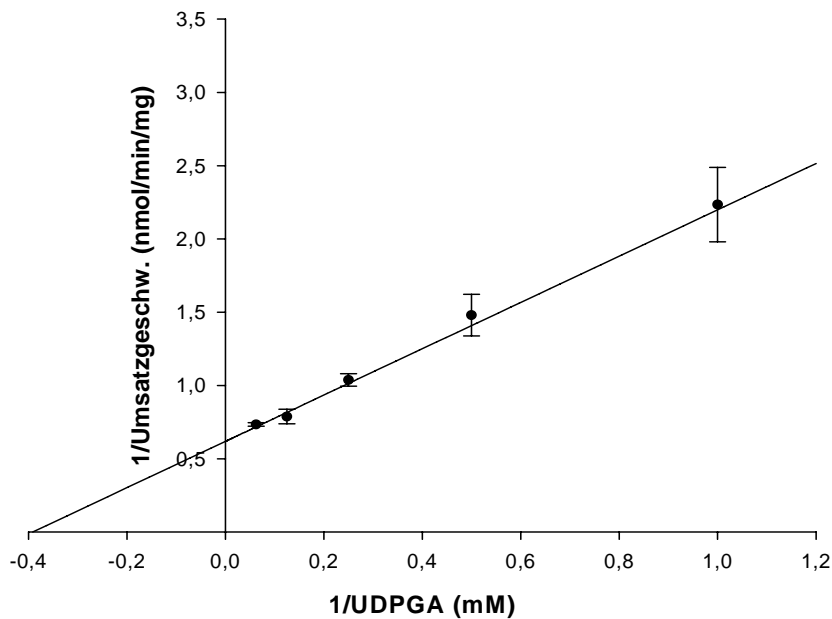


Abb. 3.10: Glucuronidierung von Paracetamol in Abhängigkeit von der UDPGA-Konzentration
Lineweaver-Burk-Diagramm

Im Michaelis-Menten-Diagramm erhält man eine typische Sättigungskinetik, wie sie für enzymatische Reaktionen charakteristisch ist. Anfangs steigt die Kurve relativ steil an, eine Erhöhung der UDPGA-Konzentration führt zu deutlich größeren Umsatzgeschwindigkeiten. Bis zu einer UDPGA-Konzentration von 8 mM kann man die Umsatzgeschwindigkeit der Reaktion durch Erhöhung der UDPGA-Menge wesentlich steigern. Bei 8 mM beträgt sie ca. 1,3 nmol/min/mg. Verdoppelt man die Konzentration der UDPGA auf 16 mM, so resultiert daraus nur eine minimal erhöhte Umsatzgeschwindigkeit von ca. 1,35 nmol/min/mg.

Die Streuung der Messwerte um die Gerade im Lineweaver-Burk-Diagramm ist nur sehr gering. Die Gerade resultiert aus dem reziproken Auftragen der Werte. An den jeweiligen Achsenabschnitten kann man die Werte $1/K_m$ und $1/V_{max}$ ablesen.

Die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} wurden durch nichtlineare Regression berechnet. Man erhält folgende Werte:

$$K_m \quad 2,56 \pm 0,35 \text{ mM}$$

$$V_{max} \quad 1,62 \pm 0,07 \text{ nmol/min/mg}$$

Bei einer Steigerung der UDPGA-Konzentration auf 16 mM konnte keine Inhibition festgestellt werden. Somit wirkte sich UDPGA bis zu dieser Konzentration nicht hemmend auf die enzymatische Glucuronidierung von Paracetamol aus.

Für die weiteren Versuche wurde eine UDPGA-Konzentration von 8 mM eingesetzt. Bei dieser Konzentration liegt bereits eine ausreichende Sättigung der Enzyme mit dem Co-Substrat vor.

3.3.5 Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration

Durch diese Versuchsreihe sollten die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} für die Paracetamol-Glucuronidierung ermittelt werden. Dies erfolgte durch Inkubation mit steigenden Paracetamol-Konzentrationen und 8 mM UDPGA bei 37,5 °C in Tris-Puffer pH 9,0 für 4 Stunden. Es sollte herausgefunden werden, ob die Glucuronidierung von Paracetamol einer Sättigungskinetik unterliegt oder eine Substrathemmung auftritt.

Die Umsatzgeschwindigkeiten bei den jeweiligen Paracetamol-Konzentrationen wurden ermittelt und im Michaelis-Menten- und im Lineweaver-Burk-Diagramm in den Abbildungen 3.11 und 3.12 graphisch aufgetragen.

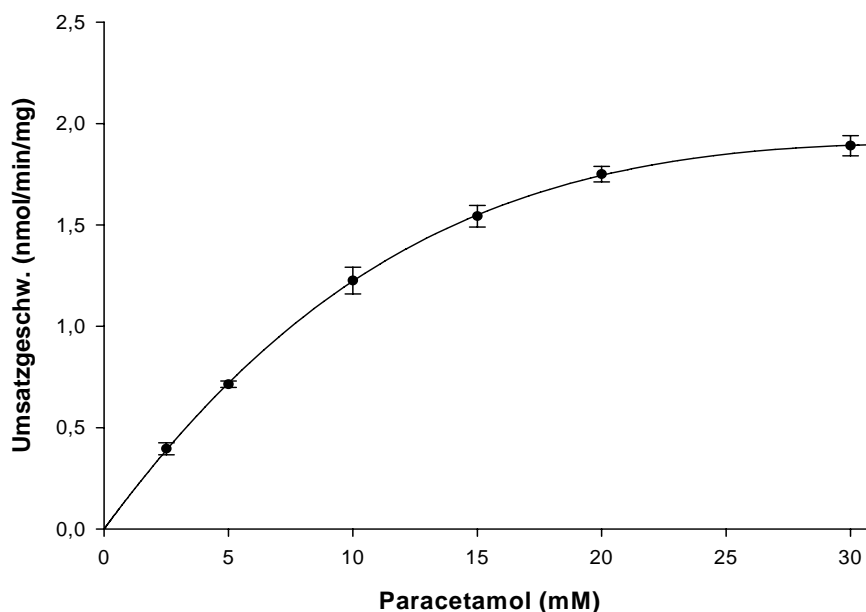


Abb. 3.11: Glucuronidierung von Paracetamol in Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration
Michaelis-Menten-Diagramm

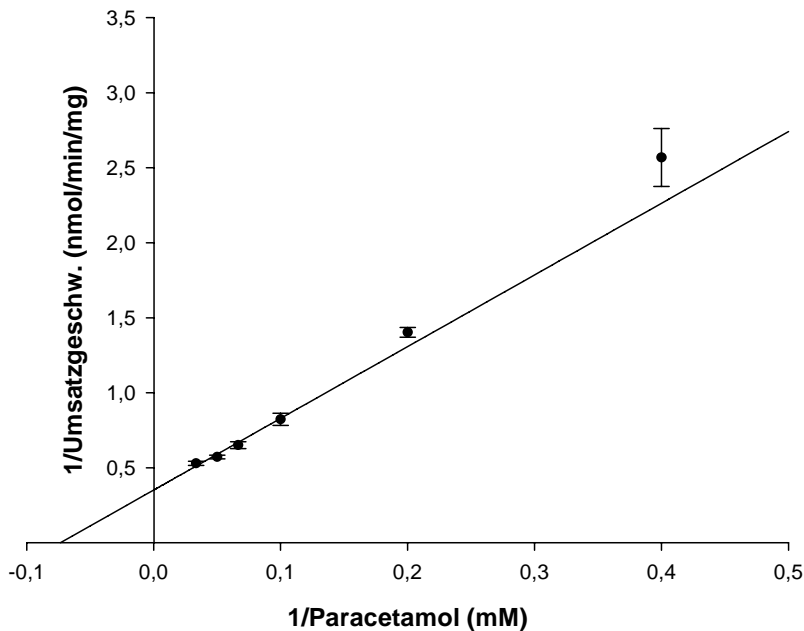


Abb. 3.12: Glucuronidierung von Paracetamol in Abhängigkeit von der Paracetamol-Konzentration
Lineweaver-Burk-Diagramm

Im Michaelis-Menten-Diagramm ist eine typische Sättigungskinetik zu erkennen. Nach steilerem Anstieg flacht die Kurve bei höheren Paracetamol-Konzentrationen ab. Bei niedrigen Paracetamol-Konzentrationen kann man die Umsatzgeschwindigkeiten durch eine Erhöhung der Substrat-Konzentration deutlich steigern. Von 0,4 nmol/min/mg bei 2,5 mM verdoppelt sich die Umsatzgeschwindigkeit auf ca. 0,8 nmol/min/mg bei 5 mM. Ab einer Paracetamol-Konzentration von 20 mM kann man die Umsatzgeschwindigkeit allerdings nicht mehr wesentlich steigern. Sie liegt bei 20 mM bei ca. 1,75 nmol/min/mg, und bei 30 mM bei ca. 1,9 nmol/min/mg.

Das Lineweaver-Burk-Diagramm zeigt die Gerade, die vom Enzymkinetik-Programm durch die Datenpunkte gelegt wurde. Die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} wurden rechnerisch durch nichtlineare Regression ermittelt und hatten folgende Werte:

$$K_m \quad 13,62 \pm 1,57 \text{ mM}$$

$$V_{max} \quad 2,85 \pm 0,15 \text{ nmol/min/mg}$$

Bei einer Steigerung der Paracetamol-Konzentration auf bis zu 30 mM konnte keine Substrat-Inhibition festgestellt werden. Daher hemmte Paracetamol bis zu dieser Konzentration die eigene Glucuronidierung nicht.

In den folgenden Inhibitionsversuchen mit den Alkoholen und den Opiaten wurden Paracetamol-Konzentrationen von 5, 10 und 20 mM eingesetzt, um verschiedene Bereiche der Sättigungsfunktion (siehe Michaelis-Menten-Diagramm) abdecken zu können.

3.3.6 Zusammenfassung

Durch die vorherigen Versuche wurden enzymkinetische Daten zur Glucuronidierung von Paracetamol gewonnen und die Versuchsbedingungen hinsichtlich Inkubationszeit, pH-Wert, Inkubationstemperatur, Co-Substrat und Substrat-Konzentration optimiert. Die besten Bedingungen für die Glucuronidierung waren eine Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37,5 °C unter Verwendung von Tris-Puffer pH 9,0 und einer UDPGA-Konzentration von 8 mM. Paracetamol sollte bei den Hemmversuchen in den Konzentrationen 5, 10 und 20 mM eingesetzt werden. Unter diesen Bedingungen wurden alle Inhibitionsversuche mit den Alkoholen durchgeführt.

Bei den Opiaten wurde allerdings unter ansonsten unveränderten Bedingungen Tris-Puffer pH 7,4 als Reaktionsmedium verwendet. Denn die Opiate waren bei pH 9,0 nicht ausreichend löslich, um eine geeignete Stammlösung ansetzen zu können. Die Enzymaktivität der ungehemmten Reaktion liegt bei diesem pH-Wert bei ca. 60 % der Maximalaktivität.

3.4 Glucuronidierung von Paracetamol unter Einfluss von Alkoholen

Nach der Inkubation mit verschiedenen Alkoholen als Inhibitoren wurde in allen Versuchslösungen aus der gebildeten Menge an Paracetamolglucuronid die jeweilige Umsatzgeschwindigkeit berechnet. Diese wurde gegen die Paracetamol-Konzentration im Michaelis-Menten- und im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen. Damit konnte die Enzymhemmung durch jeden Alkohol graphisch dargestellt werden.

Da die eingesetzten Paracetamol-Konzentrationen an drei verschiedenen Punkten der Enzymsättigungskurve lagen (am steilen Anstieg, an der Mitte der Kurve und im

Sättigungsbereich), konnte man im Michaelis-Menten-Diagramm die Enzymhemmung erkennen. Die Sättigungskurven unter Einwirkung eines Alkohols lagen unterhalb der ungehemmten Kurve und verliefen flacher.

Im Lineweaver-Burk-Diagramm konnte man aus dem Schnittpunkt der Geraden den Hemmtyp bestimmen. Aus den Werten ohne Inhibitor ($I = 0$) wurden die reziproken K_m - und V_{max} -Werte für die ungehemmte Reaktion ermittelt. Zusätzlich wurde der K_i -Wert des jeweiligen Alkohols berechnet. Am Verlauf der Geraden in Anwesenheit der Alkohole war zu erkennen, dass sich die K_m - und die V_{max} -Werte durch Zugabe steigender Konzentrationen der Alkohole änderten.

3.4.1 Einfluss der einzelnen Alkohole

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Inhibitionsversuche mit den einzelnen Alkoholen dargestellt. Dazu werden die Michaelis-Menten- und die Lineweaver-Burk-Diagramme abgebildet, bei welchen die beste Kurvenanpassung aller Werte mit dem kleinsten r^2 erfolgte. In den Diagrammen ist I die Inhibitor (Alkohol)-Konzentration in mM. Es werden jeweils r^2 und der K_i -Wert in mM angegeben, ebenso K_m (mM) und V_{max} (nmol/min/mg) für die ungehemmte Reaktion ($I = 0$).

Methanol

Methanol wurde verglichen mit Paracetamol in sehr hohen Konzentrationen (125, 250 und 500 mM) als Inhibitor eingesetzt. Trotzdem zeigte sich keine detektierbare Hemmung der Glucuronidierung von Paracetamol. Die Umsatzraten im Michaelis-Menten- und im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildungen 3.13 und 3.14) liegen sehr dicht beieinander. Im Lineweaver-Burk-Diagramm sieht man keinen gemeinsamen Schnittpunkt der Geraden. Methanol hatte also auch bei sehr hohen Konzentrationen keinen messbaren Einfluss auf die Glucuronidierung von Paracetamol, eine Bestimmung von K_i und eine Zuordnung zu einem bestimmten Hemmtyp waren daher nicht möglich.

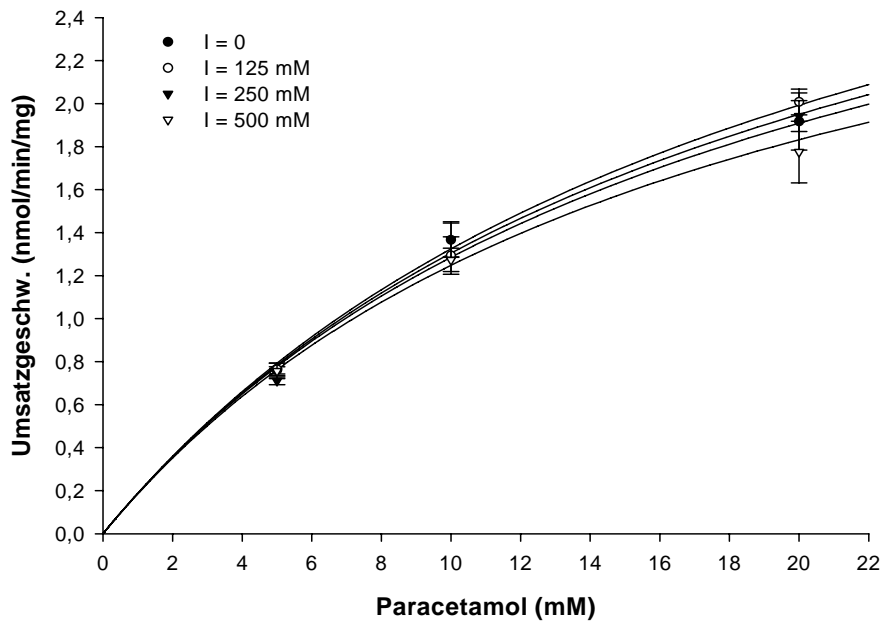


Abb. 3.13: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Methanol-Konzentrationen
Michaelis-Menten-Diagramm

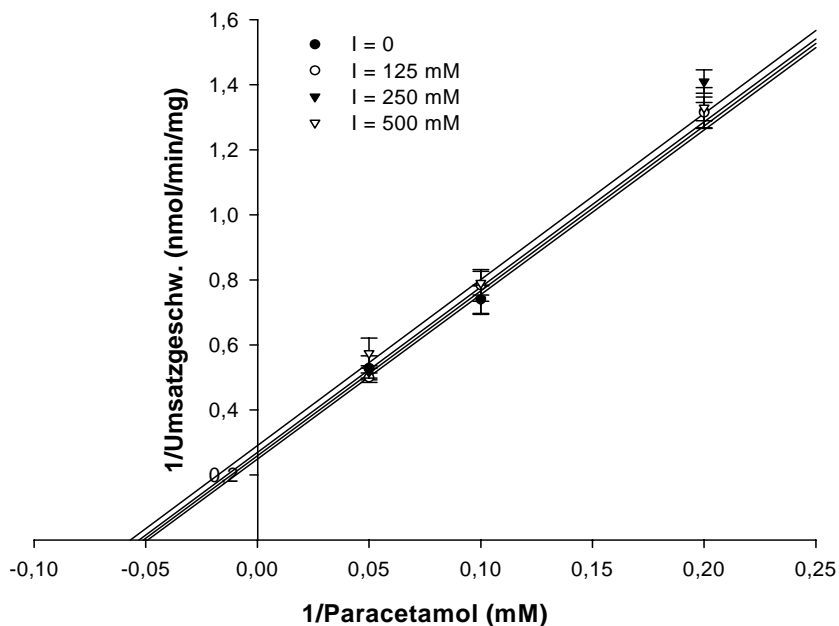


Abb. 3.14: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Methanol-Konzentrationen
Lineweaver-Burk-Diagramm

$r^2: 0,916$ $I = 0: K_m: 17,56 \pm 5,71 \text{ mM}$ $V_{\max}: 3,63 \pm 0,66 \text{ nmol/min/mg}$

Ethanol

Bei Ethanol wurden ähnliche Ergebnisse wie bei Methanol erhalten. Trotz den im Vergleich zu Paracetamol hohen Konzentrationen von 125, 250 und 500 mM war auch hier keine Inhibition zu erkennen. Die einzelnen Werte in den Diagrammen (Abbildungen 3.15 und 3.16) liegen sehr dicht beieinander. So hatte auch Ethanol in den hier eingesetzten Konzentrationen keine messbare Hemmwirkung auf die Glucuronidierung von Paracetamol, K_i und Hemmtyp konnten nicht bestimmt werden.

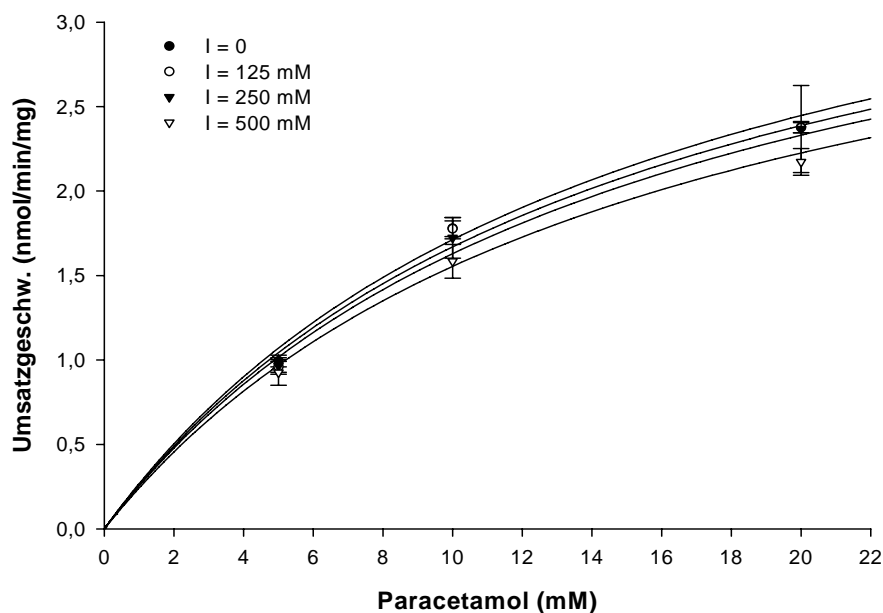


Abb. 3.15: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Ethanol-Konzentrationen
Michaelis-Menten-Diagramm

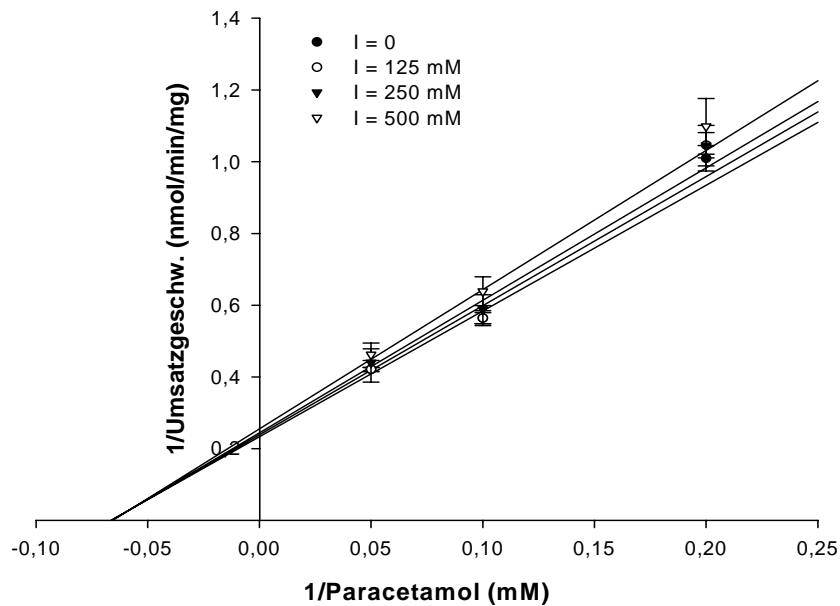


Abb. 3.16: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Ethanol-Konzentrationen
Lineweaver-Burk-Diagramm

r^2 : 0,904 I = 0: K_m : $14,44 \pm 2,27$ mM V_{max} : $4,14 \pm 0,34$ nmol/min/mg

2-Propanol

2-Propanol wurde in den gleichen Konzentrationen wie Methanol und Ethanol den Inkubationslösungen hinzugefügt. Im Unterschied zu diesen war allerdings bei 2-Propanol eine ausgeprägte Hemmung schon ab 125 mM zu erkennen. Die Inhibitionskurven im Michaelis-Menten-Diagramm (Abbildung 3.17) verlaufen deutlich unterhalb der Kurve mit der ungehemmten Reaktion. Auch im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 3.18) sind die einzelnen Geraden gut zu unterscheiden. Ihr Schnittpunkt weist auf einen gemischten Hemmtyp hin. Der K_i -Wert von 2-Propanol beträgt 340,54 mM.

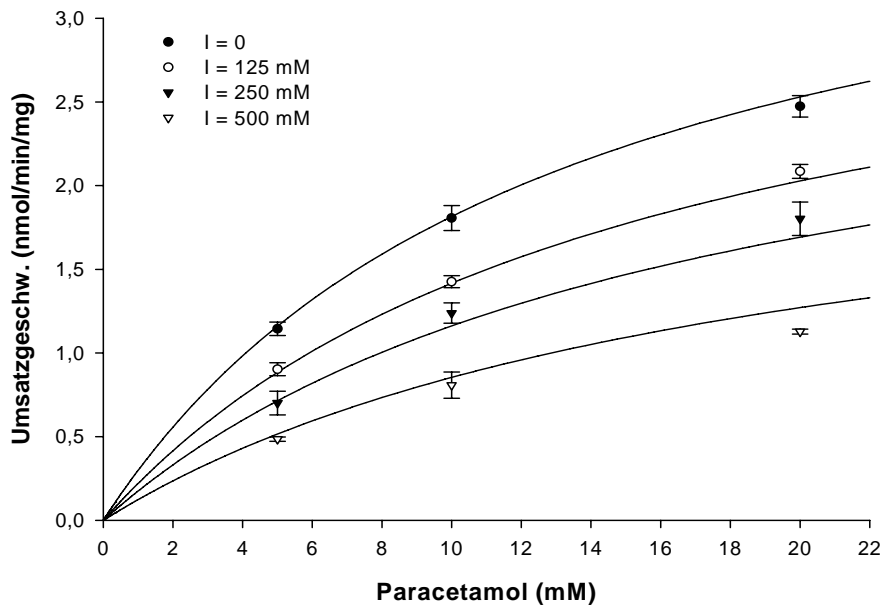


Abb. 3.17: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener 2-Propanol-Konzentrationen
Michaelis-Menten-Diagramm

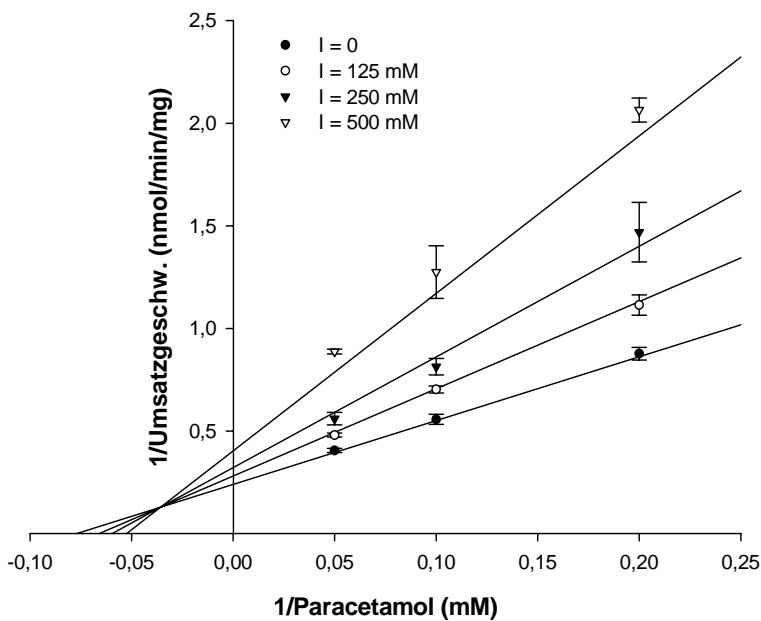


Abb. 3.18: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener 2-Propanol-Konzentrationen
Lineweaver-Burk-Diagramm

$r^2: 0,958$ $K_i: 340,54 \pm 88,09$ mM
 $I = 0: K_m: 12,98 \pm 1,96$ mM $V_{max}: 4,17 \pm 0,31$ nmol/min/mg

n-Propanol

n-Propanol wurde in geringeren Konzentrationen als Hemmstoff eingesetzt, nämlich mit 100, 150 und 200 mM. Auch bei n-Propanol war eine Inhibition deutlich zu erkennen. Dies zeigen die Inhibitionskurven und die Geraden im Michaelis-Menten- bzw. Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildungen 3.19 und 3.20). Der Schnittpunkt der Geraden weist auf einen gemischten Hemmtyp hin. Der K_i -Wert von n-Propanol wurde mit 282,81 mM bestimmt.

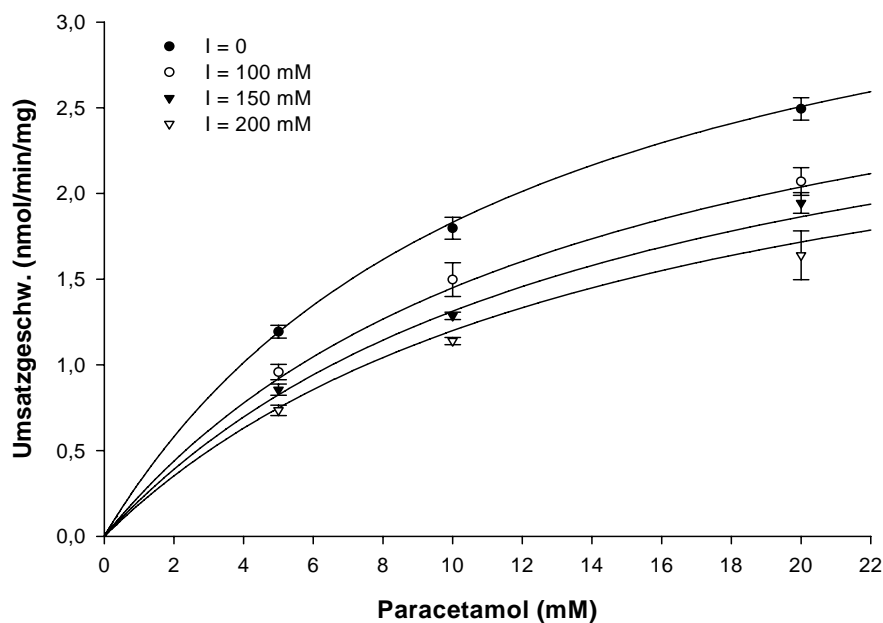


Abb. 3.19: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Propanol-Konzentrationen
Michaelis-Menten-Diagramm

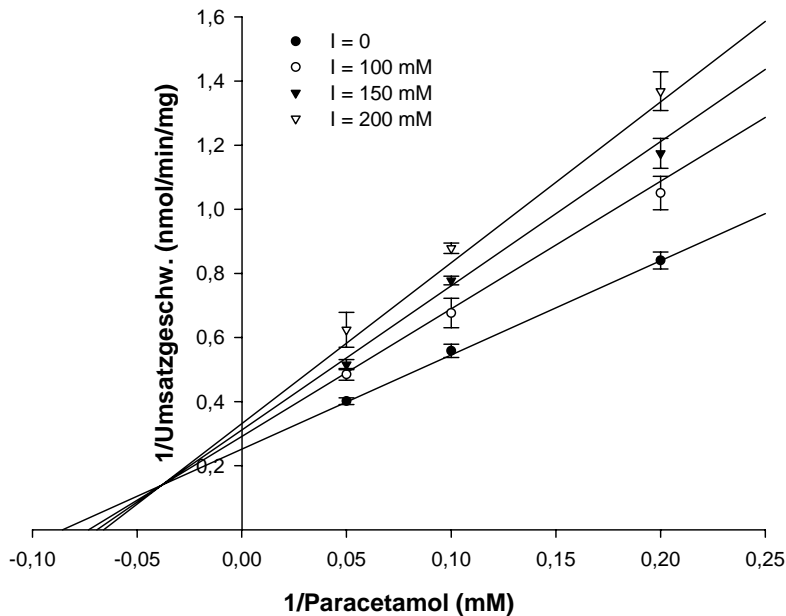


Abb. 3.20: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Propanol-Konzentrationen
Lineweaver-Burk-Diagramm

r^2 : 0,943 K_i : $282,81 \pm 92,78$ mM
 I = 0: K_m : $11,67 \pm 1,88$ mM V_{max} : $3,97 \pm 0,31$ nmol/min/mg

R-2-Butanol / S-2- Butanol

Bei den beiden sekundären Butanolen wurden die gleichen Konzentrationen wie bei n-Propanol verwendet. Beide hemmten die Glucuronidierung von Paracetamol. Schon bei einer Konzentration von 100 mM liegen die Inhibitionskurven im Michaelis-Menten-Diagramm deutlich unterhalb der Kurven mit der ungehemmten Reaktion (Abbildungen 3.21 und 3.23). Im Lineweaver-Burk-Diagramm ist bei beiden Alkoholen ein gemischter Hemmtyp zu erkennen (Abbildungen 3.22 und 3.24). Die K_i -Werte der Alkohole liegen sehr nahe beieinander. Sie betragen 162,31 mM für R-2-Butanol und 152,31 mM für S-2-Butanol. Damit konnte kein Unterschied zwischen den beiden Butanolen hinsichtlich des Hemmtyps und der Inhibitionskonstante festgestellt werden. Im Anhang sind in Abbildung 7.1 als Beispiel für die enzymkinetische Auswertung die Parameter aufgelistet, die bei den Versuchen mit R-2-Butanol erhalten wurden.

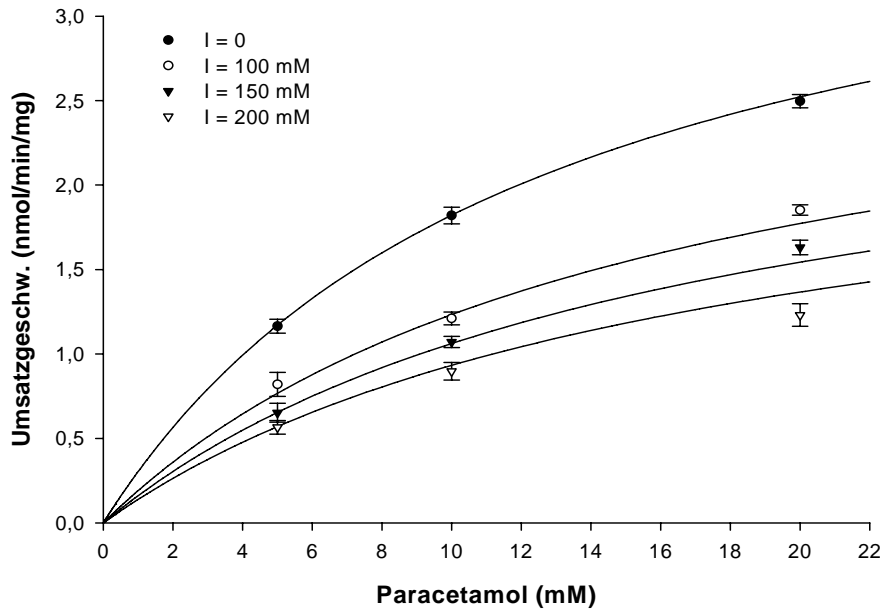


Abb. 3.21: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener R-2-Butanol-Konzentrationen
Michaelis-Menten-Diagramm

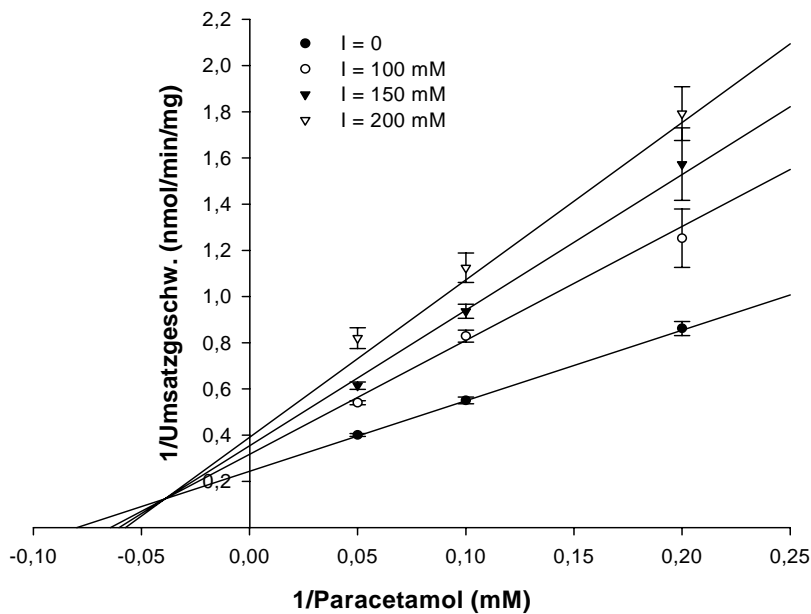


Abb. 3.22: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener R-2-Butanol-Konzentrationen
Lineweaver-Burk-Diagramm

$r^2: 0,966$ $K_i: 162,31 \pm 33,69$ mM
 $I = 0: K_m: 12,51 \pm 1,66$ mM $V_{max}: 4,10 \pm 0,27$ nmol/min/mg

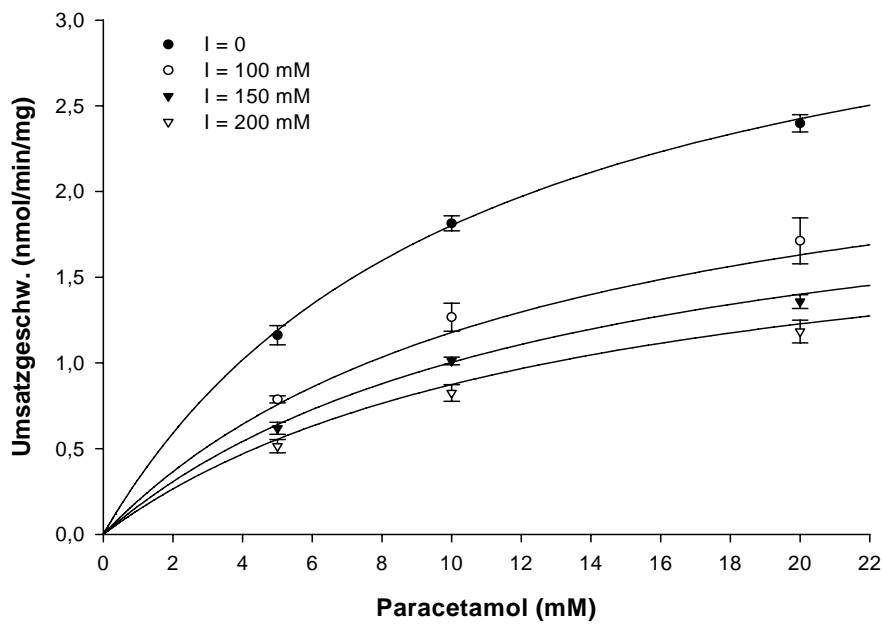


Abb. 3.23: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener S-2-Butanol-Konzentrationen
Michaelis-Menten-Diagramm

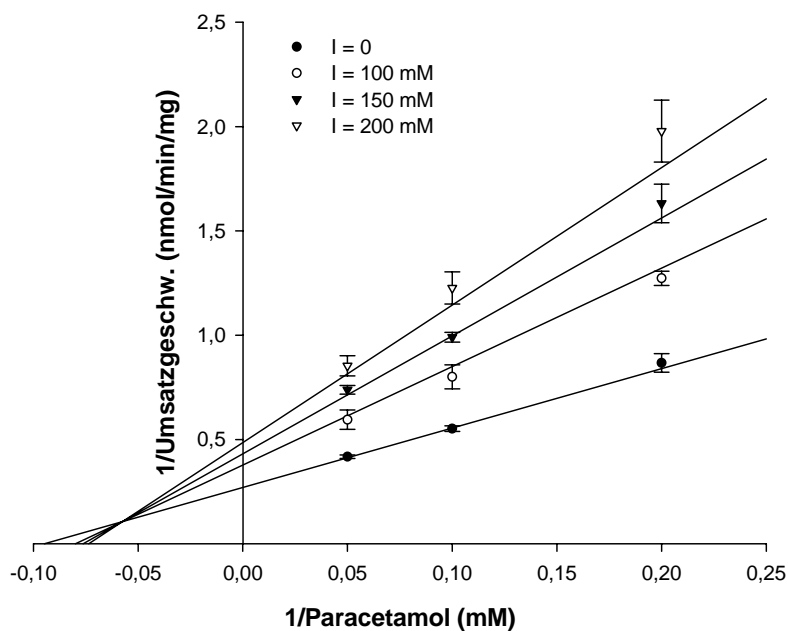


Abb. 3.24: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener S-2-Butanol-Konzentrationen
Lineweaver-Burk-Diagramm

$r^2: 0,953$ $K_i: 152,31 \pm 38,36$ mM
 $I = 0: K_m: 10,55 \pm 1,61$ mM $V_{max}: 3,70 \pm 0,26$ nmol/min/mg

Isobutanol

Isobutanol wurde in den Konzentrationen 25, 50 und 100 mM als Hemmstoff eingesetzt. Auch dieser Alkohol beeinträchtigte die Glucuronidierung von Paracetamol. Das Michaelis-Menten-Diagramm ist in Abbildung 3.25 aufgelistet. Im Lineweaver-Burk-Diagramm in Abbildung 3.26 deutet sich ein gemischter Hemmtyp an. Der K_i -Wert von Isobutanol wurde mit 58,56 mM bestimmt.

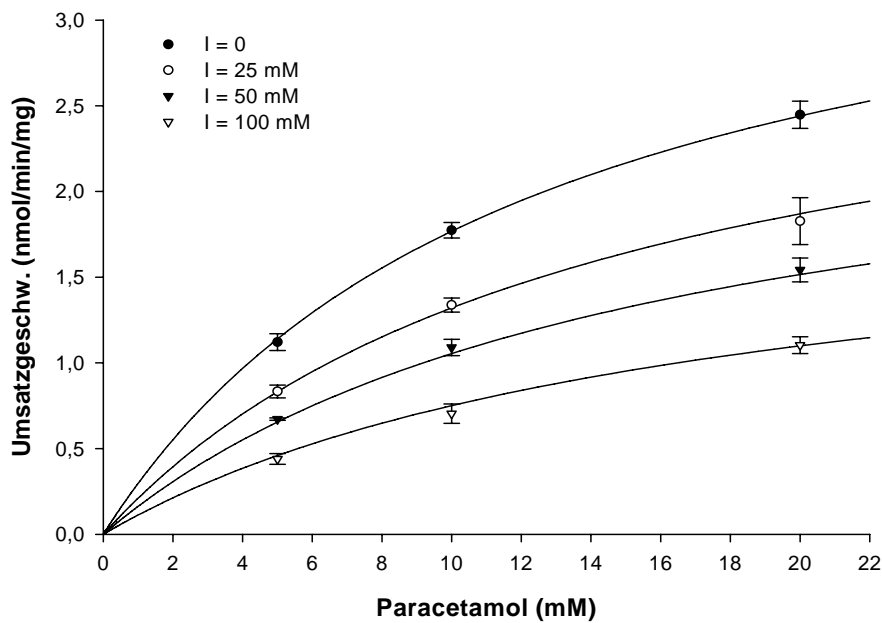


Abb. 3.25: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Isobutanol-Konzentrationen
Michaelis-Menten-Diagramm

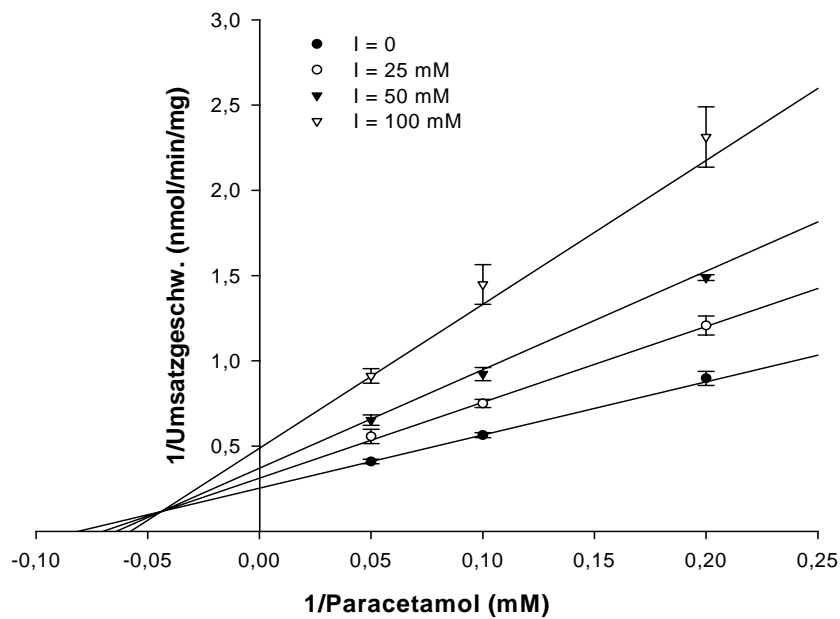


Abb. 3.26: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Isobutanol-Konzentrationen
Lineweaver-Burk-Diagramm

r^2 : 0,961 K_i : $58,56 \pm 14,34$ mM

$I = 0$: K_m : $12,28 \pm 1,78$ mM V_{max} : $3,94 \pm 0,28$ nmol/min/mg

n-Butanol

n-Butanol wurde in den gleichen Konzentrationen wie Isobutanol untersucht. Wie bei den anderen Alkoholen lag auch hier eine Hemmung vom gemischten Typ vor. Dies sieht man in der Abbildung 3.28. Der ermittelte K_i -Wert liegt bei 38,94 mM. Abbildung 3.27 zeigt das Michaelis-Menten-Diagramm.

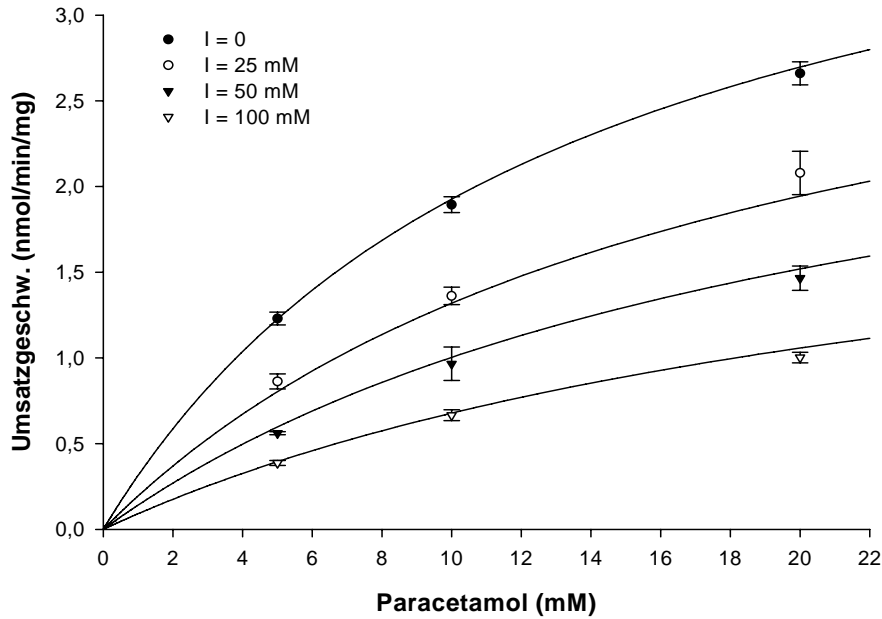


Abb. 3.27: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Butanol-Konzentrationen
Michaelis-Menten-Diagramm

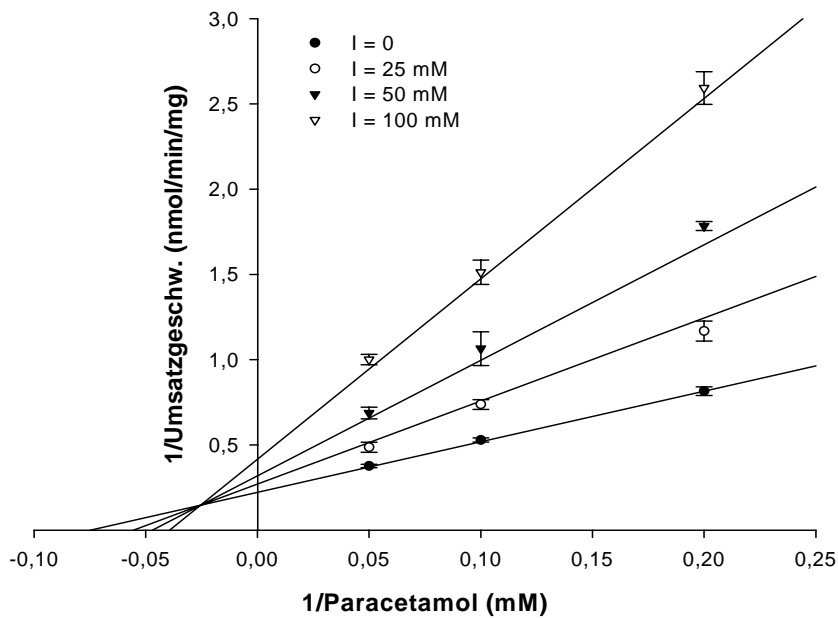


Abb. 3.28: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Butanol-Konzentrationen
Lineweaver-Burk-Diagramm

$$r^2: 0,967 \quad K_i: 38,94 \pm 8,13 \text{ mM}$$

$$I = 0: K_m: 13,32 \pm 1,96 \text{ mM} \quad V_{\max}: 4,49 \pm 0,33 \text{ nmol/min/mg}$$

Isopentanol

Isopentanol wurde in den gleichen Konzentrationen wie Paracetamol eingesetzt, nämlich 5, 10 und 20 mM. Bei diesen im Vergleich mit den anderen Alkoholen geringen Konzentrationen war schon eine starke Inhibition der Paracetamol-Glucuronidierung zu erkennen. Das Michaelis-Menten-Diagramm ist in Abbildung 3.29 dargestellt. Auch Isopentanol erwies sich als gemischter Hemmstoff (Abbildungen 3.30). Der K_i -Wert des Isopentanol liegt bei 17,89 mM.

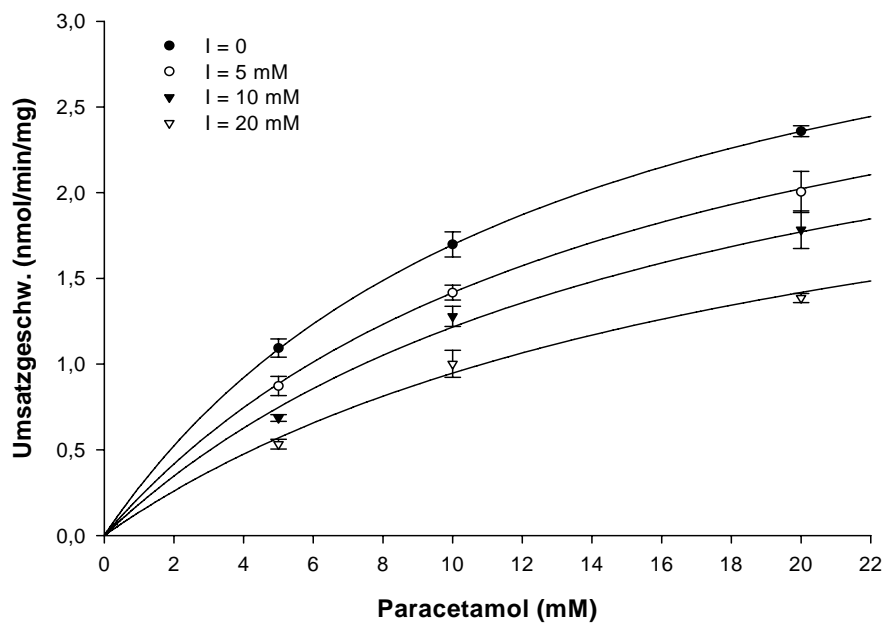


Abb. 3.29: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Isopentanol-Konzentrationen
Michaelis-Menten-Diagramm

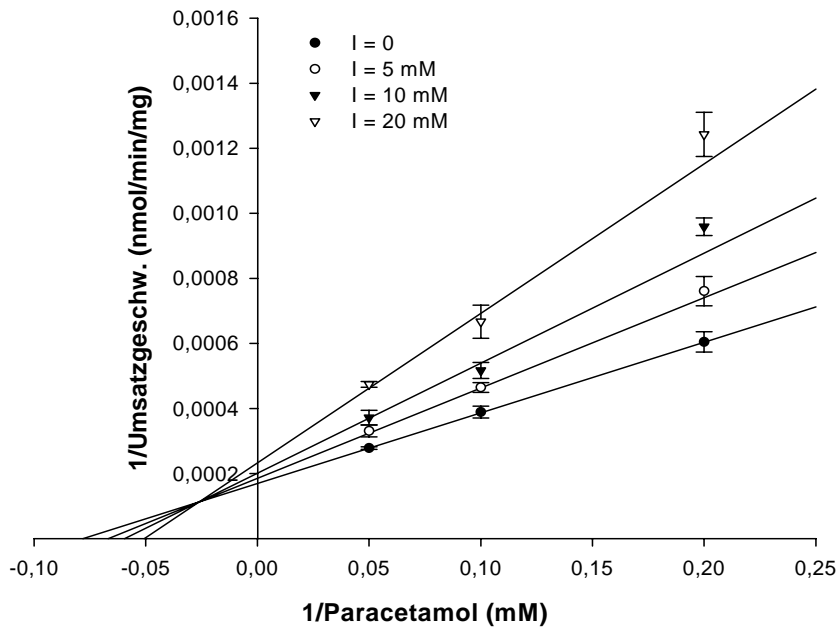


Abb. 3.30: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Isopentanol-Konzentrationen
Lineweaver-Burk-Diagramm

$$r^2: 0,951 \quad K_i: 17,89 \pm 5,23 \text{ mM}$$

$$I = 0: K_m: 12,78 \pm 2,00 \text{ mM} \quad V_{\max}: 3,87 \pm 0,30 \text{ nmol/min/mg}$$

n-Pentanol

n-Pentanol wurde mit drei verschiedenen Mikrosomen-Chargen (Lot 20, 21 und 24) als Inhibitor untersucht. Dadurch sollte geklärt werden, ob die Ergebnisse, die man bei der Verwendung der verschiedenen Chargen erhält, miteinander verglichen werden können.

n-Pentanol erwies sich bei allen drei Chargen als sehr starker Hemmstoff. Ebenso deutete sich bei allen Chargen ein gemischter Hemmtyp an. Die K_i -Werte liegen mit 6,39 mM (Lot 20), 5,73 mM (Lot 21) und 4,59 mM (Lot 24) sehr nahe beieinander. Zur Bestimmung des Hemmtyps und der Inhibitionskonstanten K_i bestand also kein Unterschied zwischen den Chargen. Die graphischen Darstellungen zeigen die Abbildungen 3.31 bis 3.36.

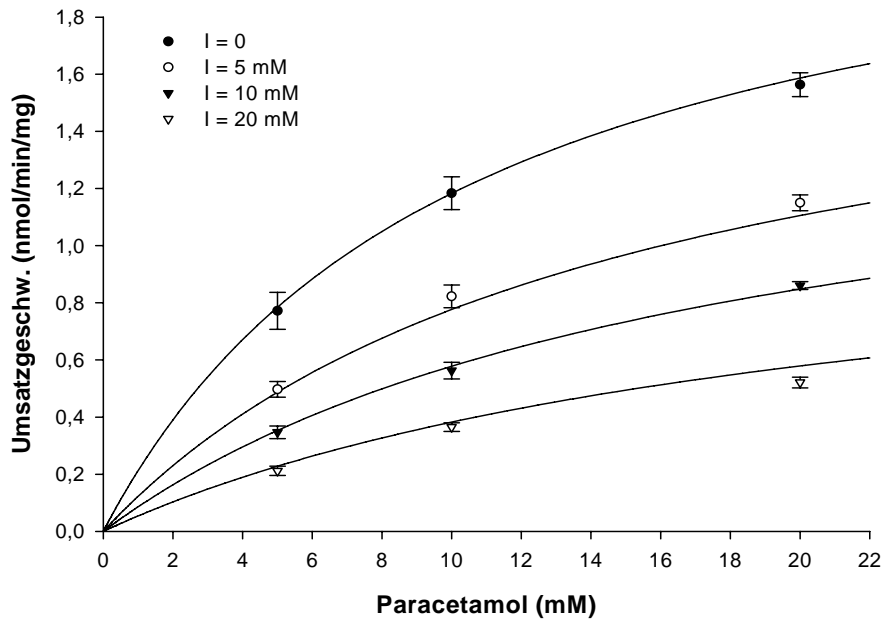


Abb. 3.31: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Pentanol-Konzentrationen (Lot 20)
Michaelis-Menten-Diagramm

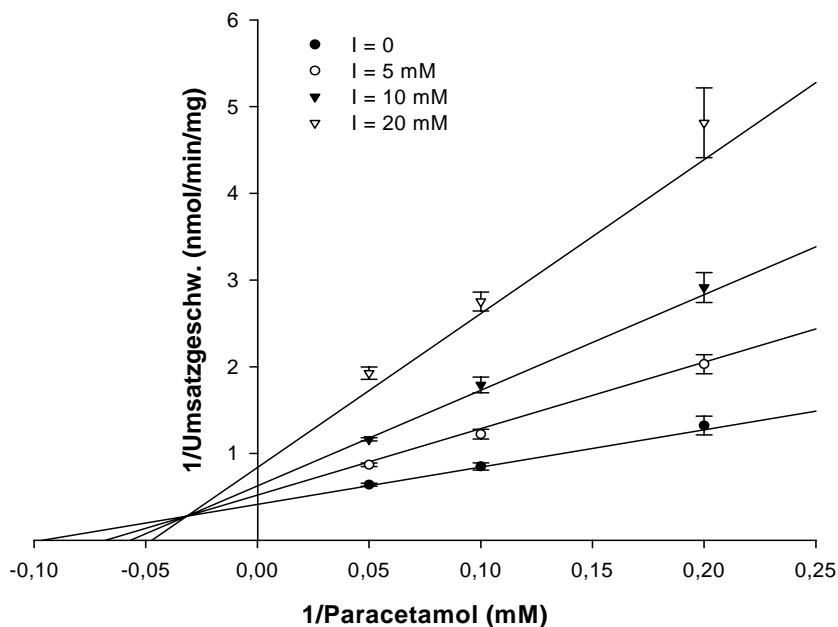


Abb. 3.32: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Pentanol-Konzentrationen (Lot 20)
Lineweaver-Burk-Diagramm

$$r^2: 0,971 \quad K_i: 6,39 \pm 1,24 \text{ mM}$$

$$I = 0: K_m: 10,35 \pm 1,38 \text{ mM} \quad V_{\max}: 2,41 \pm 0,15 \text{ nmol/min/mg}$$

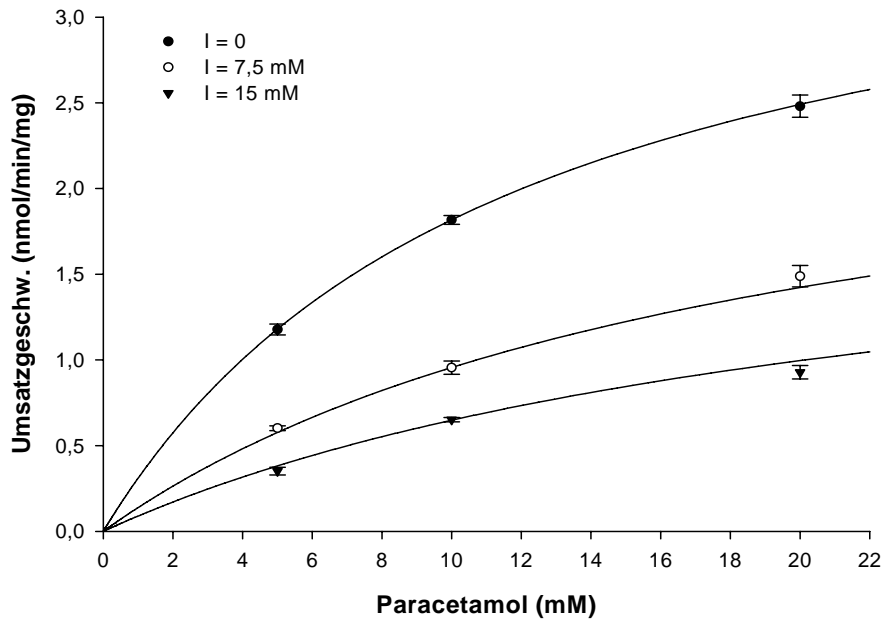


Abb. 3.33: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Pentanol-Konzentrationen (Lot 21)
Michaelis-Menten-Diagramm

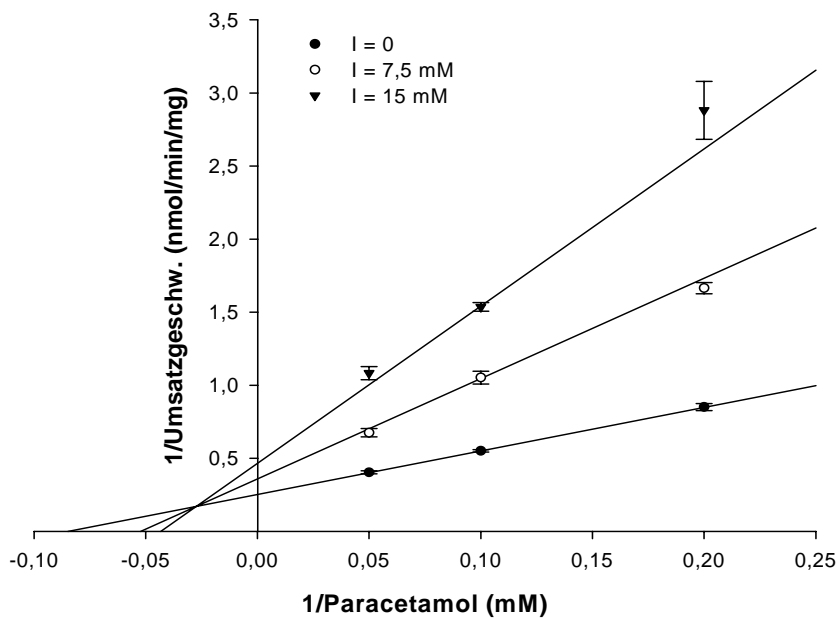


Abb. 3.34: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Pentanol-Konzentrationen (Lot 21)
Lineweaver-Burk-Diagramm

$r^2: 0,986$ $K_i: 5,73 \pm 0,87$ mM

$I = 0: K_m: 11,77 \pm 1,20$ mM $V_{max}: 3,96 \pm 0,19$ nmol/min/mg

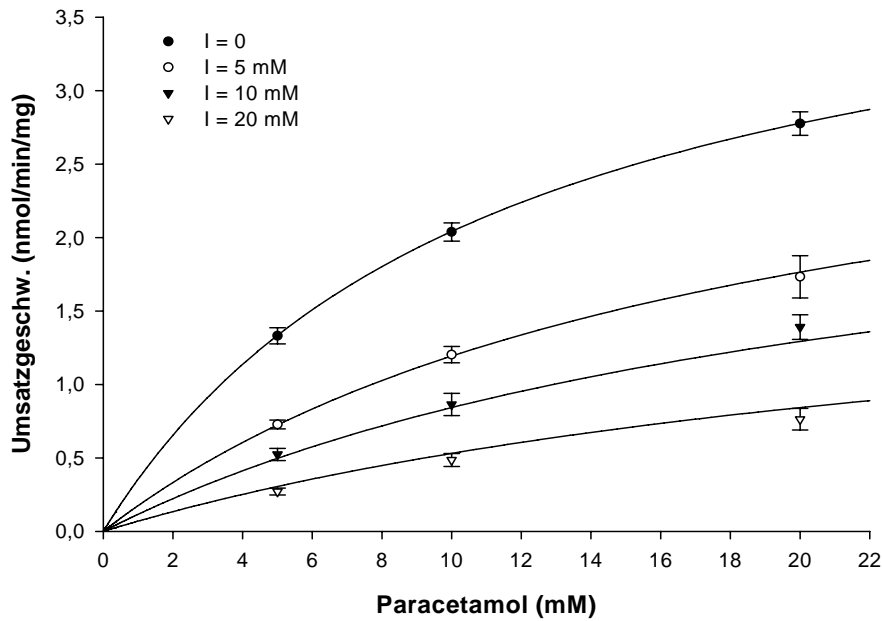


Abb. 3.35: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Pentanol-Konzentrationen (Lot 24)
Michaelis-Menten-Diagramm

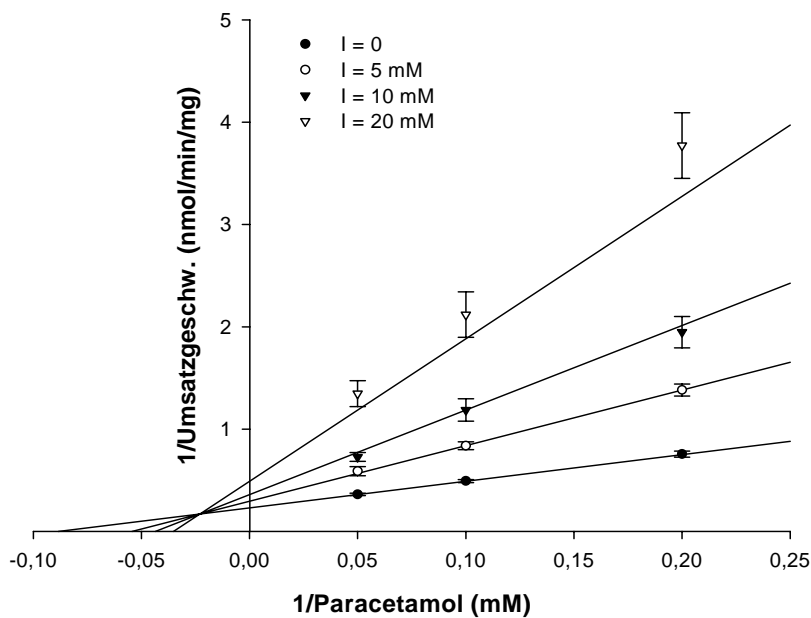


Abb. 3.36: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener n-Pentanol-Konzentrationen (Lot 24)
Lineweaver-Burk-Diagramm

$$r^2: 0,966 \quad K_i: 4,59 \pm 2,63 \text{ mM}$$

$$I = 0: K_m: 11,29 \pm 1,72 \text{ mM} \quad V_{\max}: 4,34 \pm 0,31 \text{ nmol/min/mg}$$

3.4.2 Glucuronidierung ohne Inhibitor

Bei allen Inhibitionsversuchen wurden auch Inkubationen nur mit Paracetamol ohne Alkohol durchgeführt, um die Werte K_m und V_{max} für die ungehemmte Paracetamol-Glucuronidierung zu erhalten.

Dabei ist folgendes zu beachten: Die Werte K_m und V_{max} für die ungehemmte Reaktion ($I = 0$), die bei den einzelnen Alkoholen aufgelistet wurden, sind vom Enzymkinetikprogramm SPSS unter Berücksichtigung aller Messwerte (der ungehemmten und auch der gehemmten Reaktionen) berechnet worden. Am Lineweaver-Burk-Diagramm (z.B. in Abb. 3.36) ist dies gut nachvollziehbar. Die unterste Gerade entspricht der Glucuronidierung ohne Alkohol. Diese Linie muss allerdings mit den anderen drei Geraden der gehemmten Reaktionen einen einzigen gemeinsamen Schnittpunkt bilden. Dafür werden vom Enzymkinetikprogramm alle Messwerte berücksichtigt. Der Verlauf jeder einzelnen Geraden wird so angepasst, dass insgesamt betrachtet die Residuen aller Werte möglichst gering sind und die Datenpunkte zueinander passen.

Dies erklärt auch, warum die Geraden bei den verschiedenen Alkoholkonzentrationen auf den ersten Blick nicht immer optimal durch die Datenpunkte verlaufen. Berücksichtigt man allerdings alle Werte und die Tatsache, dass sich die Geraden in nur einem Punkt schneiden müssen, so ist der Verlauf der Geraden nachzuvollziehen.

Aus diesem Grund können die Werte von V_{max} und K_m etwas abweichen, wenn man die $I = 0$ -Werte alleine zur Berechnung heranzieht. Erstellt man nur mit diesen Daten ein Lineweaver-Burk-Diagramm, so erhält man geringfügig andere Achsenabschnitte. Denn diese Linie muss keinen gemeinsamen Schnittpunkt mit anderen Geraden im Diagramm haben und wird daher besser an die Datenpunkte angepasst.

Zur Ermittlung von V_{max} und K_m der Glucuronidierung ohne Inhibitor wurden daher nur die Daten der ungehemmten Reaktion zur Berechnung herangezogen. Die auf diese Weise erhaltenen Parameter werden in Tabelle 3.6 aufgelistet. Mit der Charge Nr. 21 wurden die meisten Untersuchungen durchgeführt. Zusätzlich sind noch die Werte aufgelistet, die bei den Untersuchungen mit den Chargen Nr. 20 und 24 erhalten wurden.

Tab. 3.6: Glucuronidierung von Paracetamol ohne Inhibitor (Lot 21, 20 und 24)

Inkubationslösung-Nr.	Lot Nr.	K_m [mM] \pm SE	V_{max} [nmol/min/mg] \pm SE
1	21	17,56 \pm 5,71	3,63 \pm 0,66
2	21	14,44 \pm 2,27	4,14 \pm 0,34
3	21	12,35 \pm 1,88	4,01 \pm 0,30
4	21	11,74 \pm 1,65	3,95 \pm 0,27
5	21	12,18 \pm 1,30	4,02 \pm 0,21
6	21	10,57 \pm 1,34	3,68 \pm 0,21
7	21	12,79 \pm 1,94	4,02 \pm 0,30
8	21	12,94 \pm 1,57	4,38 \pm 0,26
9	21	12,60 \pm 1,82	3,84 \pm 0,27
10	21	11,64 \pm 1,25	3,93 \pm 0,20
11	20	13,62 \pm 1,57	2,85 \pm 0,15
12	20	10,15 \pm 2,13	2,36 \pm 0,22
13	24	11,36 \pm 1,64	4,35 \pm 0,30

In allen Assays wurde Paracetamol in vergleichbarer Weise glucuronidiert. Unter der Verwendung der Charge Nr. 21 lagen die K_m -Werte zwischen 10,57 und 17,56 mM mit einem Median von 12,5 mM und die V_{max} -Werte zwischen 3,63 und 4,38 nmol/min/mg mit einem Median von 4,0 nmol/min/mg.

Beim Vergleich der Chargen bestand beim K_m -Wert kein erkennbarer Unterschied. Die K_m -Werte der Chargen Nr. 20 und 24 liegen im Wesentlichen in dem Bereich, der durch Charge Nr. 21 vorgegeben wurde. Betrachtet man die Umsatzgeschwindigkeiten, so waren die V_{max} -Werte, die mit der Charge Nr. 20 erhalten wurden, mit 2,36 und 2,85 nmol/min/mg etwas kleiner als die Werte der anderen Chargen, die um 4 nmol/min/mg lagen.

3.4.3 Vergleich und Struktureinflüsse der Alkohole

Vergleicht man die Ergebnisse der Inhibitionsversuche miteinander, so sind Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Alkoholen zu erkennen. Alle Alkohole (außer Methanol und Ethanol) waren vom gemischten Hemmtyp. Bei diesem Inhibitionstyp erfolgte die beste Kurvenanpassung der Daten mit dem größten r^2 . In den Lineweaver-Burk-Diagrammen kann man erkennen, dass durch steigende Alkoholkonzentrationen die K_m -Werte erhöht und die V_{max} -Werte erniedrigt wurden.

In der nachfolgenden Tabelle 3.7 sind noch einmal alle ermittelten K_i -Werte der untersuchten Alkohole zusammengefasst, die mit der Charge Nr. 21 erhalten wurden. Die Alkohole sind nach strukturellen Gesichtspunkten aufgelistet. Oben stehen die primären unverzweigten

Alkohole, dann folgen die primären verzweigten Alkohole und anschließend die sekundären Alkohole. In Tabelle 3.8 werden die drei mit verschiedenen Chargen ermittelten K_i -Werte von n-Pentanol gegenübergestellt.

Tab. 3.7: K_i -Werte der Alkohole - Lot 21

Alkohol	K_i [mM] \pm SE
Methanol	n.b.
Ethanol	n.b.
n-Propanol	282,81 \pm 92,78
n-Butanol	38,94 \pm 8,13
n-Pentanol	5,73 \pm 0,87
Isobutanol	58,56 \pm 14,34
Isopentanol	17,89 \pm 5,23
2-Propanol	340,54 \pm 88,09
R-2-Butanol	162,31 \pm 33,69
S-2-Butanol	152,31 \pm 38,36

Tab. 3.8: K_i -Werte von n-Pentanol - Vergleich von Lot 20, 21 und 24

Lot-Nr.	K_i [mM] \pm SE
20	6,39 \pm 1,24
21	5,73 \pm 0,87
24	4,59 \pm 2,63

Insgesamt wurden mit der Charge Nr. 21 K_i -Werte zwischen 5,73 und 340,54 mM ermittelt. Man kann erkennen, dass die Struktur des jeweiligen Alkohols den K_i -Wert deutlich beeinflusste. Dabei waren die Kettenlänge, die Verzweigung der Alkylkette und die Stellung der OH-Gruppe von Bedeutung.

Alkylkettenlänge

In dieser Arbeit wurden Alkohole bis zu einer Alkylkettenlänge von maximal 5 C-Atomen untersucht. Neben Methanol und Ethanol wurden zwei Propanole, vier Butanole und zwei Pentanole untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Kettenlänge der Alkohole sehr wichtig für die Eigenschaften als Inhibitor ist. So hatten Methanol und Ethanol als kurzkettenige Alkohole keinen messbaren Einfluss auf die Glucuronidierung von Paracetamol. Bei den beiden Propanolen konnte eine Hemmung gemessen werden, jedoch mit sehr hohen K_i -Werten von

340,54 mM für 2-Propanol und 282,81 mM für n-Propanol. Die K_i -Werte der Butanole waren schon deutlich niedriger, sie liegen zwischen 162,31 mM für R-2-Butanol und 38,94 mM für n-Butanol. Die stärksten Hemmstoffe waren die beiden Alkohole mit der längsten Alkylkette. Die beiden Pentanole haben mit 17,89 mM für Isopentanol und 5,73 mM für n-Pentanol die kleinsten K_i -Werte und hemmten daher die Bildung von Paracetamolglucuronid am meisten.

Verzweigung der Alkylkette

Die meisten der untersuchten Alkohole hatten eine unverzweigte Alkylkette, nur Isobutanol und Isopentanol waren verzweigte Alkohole. Die verzweigten Alkohole erwiesen sich als schwächere Hemmstoffe als ihre unverzweigten Analoga. Isobutanol mit einem K_i von 58,56 mM hemmte weniger stark als n-Butanol mit einem K_i von 38,94 mM, aber immer noch deutlich stärker als die 2-Butanole (K_i 162,31 bzw., 152,31 mM). Auch Isopentanol hat mit 17,89 mM einen größeren K_i -Wert als n-Pentanol mit 5,73 mM. Die Differenz der K_i -Werte zwischen Isobutanol und n-Butanol ist allerdings größer als die zwischen Isopentanol und n-Pentanol.

Stellung der OH-Gruppe

Als sekundäre Alkohole wurden 2-Propanol und R-/S-2-Butanol untersucht, die restlichen Alkohole waren primäre Alkohole. Vergleicht man die sekundären Alkohole mit den primären Alkoholen gleicher Kettenlänge, so fällt auf, dass die sekundären Alkohole schwächer hemmten als die primären. Dies zeigt sich durch die höheren K_i -Werte von 2-Propanol im Vergleich mit n-Propanol, und von R- und S-2-Butanol im Vergleich zu n- und Isobutanol. Der Unterschied der K_i -Werte zwischen 2- und n-Propanol mit 340,54 bzw. 282,81 mM ist allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den Butanolen. Die K_i -Werte für R- und S-2-Butanol mit 162,31 bzw. 152,31 mM sind deutlich höher als die von n- und Isobutanol mit 38,94 bzw. 58,56 mM.

3.4.4 Zusammenfassung

Alle Alkohole waren vom gemischten Hemmtyp. Unterschiede bestanden zwischen dem Ausmaß der Hemmung, was an den um fast zwei Zehnerpotenzen auseinander liegenden K_i -Werten zu erkennen ist. Man kann erkennen, dass ein Alkohol die Glucuronidierung von Paracetamol am stärksten hemmte, wenn er langkettig, primär und unverzweigt ist. Das wichtigste Kriterium war die Kettenlänge, danach folgte die Stellung der OH-Gruppe, während die Verzweigung der Alkylkette bei den hier untersuchten Alkoholen den geringsten Einfluss hatte.

3.5 Glucuronidierung von Paracetamol und Opiaten

Die drei Opiate Morphin, Codein und Dihydrocodein wurden als Hemmstoffe der Paracetamol-Glucuronidierung untersucht. Wie bei den Alkoholen erfolgte dies durch Messung des in den Reaktionslösungen gebildeten Paracetamolglucuronids und Umrechnung in die jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten. Durch gleichzeitige Messung der Opiatglucuronide konnte auch der Einfluss des Paracetamols auf die Glucuronidierung der Opiate gemessen werden. Auch hier erfolgte eine Umrechnung in die jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten. Zur graphischen Darstellung wurden das Michaelis-Menten- und das Lineweaver-Burk-Diagramm verwendet. Es sollten Hemmtyp und der dazugehörige K_i -Wert bestimmt werden.

3.5.1 Einfluss der einzelnen Substanzen

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit den einzelnen Substanzen sind im Folgenden dargestellt. Analog der Darstellung bei den Alkoholen sind die Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramme abgebildet, bei denen die bestmögliche Anpassung aller Daten erfolgte. I ist die jeweilige Inhibitor-Konzentration in mM. Wie bei den Alkoholen werden r^2 , K_i (mM) und K_m (mM) und V_{max} (nmol/min/mg) für die ungehemmte Reaktion ($I = 0$) angegeben.

Morphin als Inhibitor der Paracetamol-Glucuronidierung

Morphin als Inhibitor der Paracetamol-Glucuronidierung wurde mit den Chargen Nr. 21 und 24 untersucht. Es wurde in den Konzentrationen 2,5, 5 und 10 mM eingesetzt, also etwas niedriger als Paracetamol mit 5, 10 und 20 mM. Schon bei einer Konzentration von 2,5 mM war eine Hemmung der Glucuronidierung zu erkennen. Dies sieht man an den flacheren Sättigungskurven im Michaelis-Menten- und an den auseinander liegenden Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildungen 3.37 bis 3.40). Der Schnittpunkt der Geraden weist auf einen gemischten Hemmtyp hin, er liegt allerdings sehr nahe an der Ordinate. Im Vergleich zur ungehemmten Reaktion wurden die K_m -Werte durch steigende Morphin-Konzentrationen mit beiden Chargen deutlich erhöht, die V_{max} -Werte aber nur geringfügig erniedrigt. Der K_i -Wert von Morphin beträgt 9,07 mM bei Charge Nr. 21 und 11,44 mM bei Charge Nr. 24. Hinsichtlich des Hemmtyps und der Inhibitionskonstanten K_i bestand beim Morphin kein Unterschied zwischen den beiden Chargen.

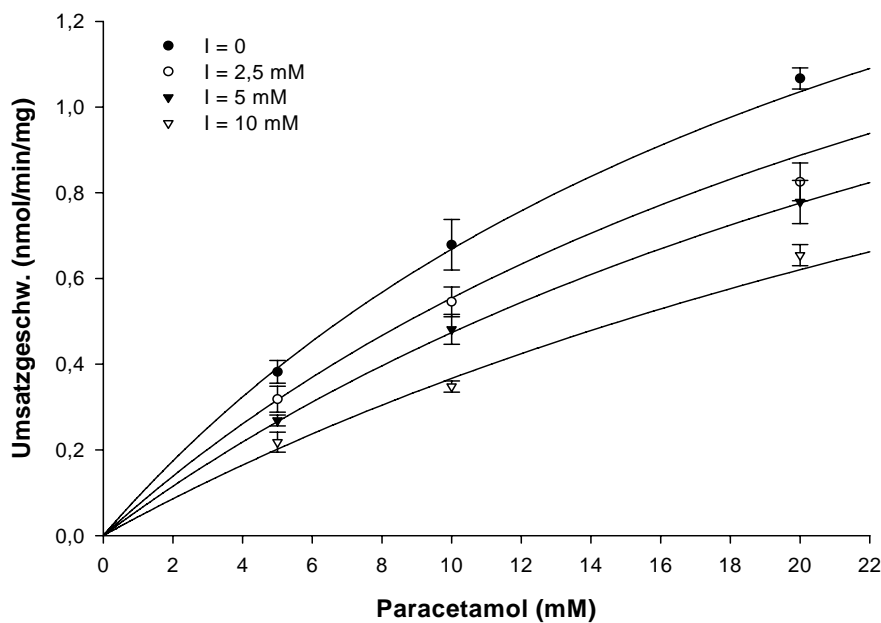


Abb. 3.37: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Morphin-Konzentrationen (Lot 21)
Michaelis-Menten-Diagramm

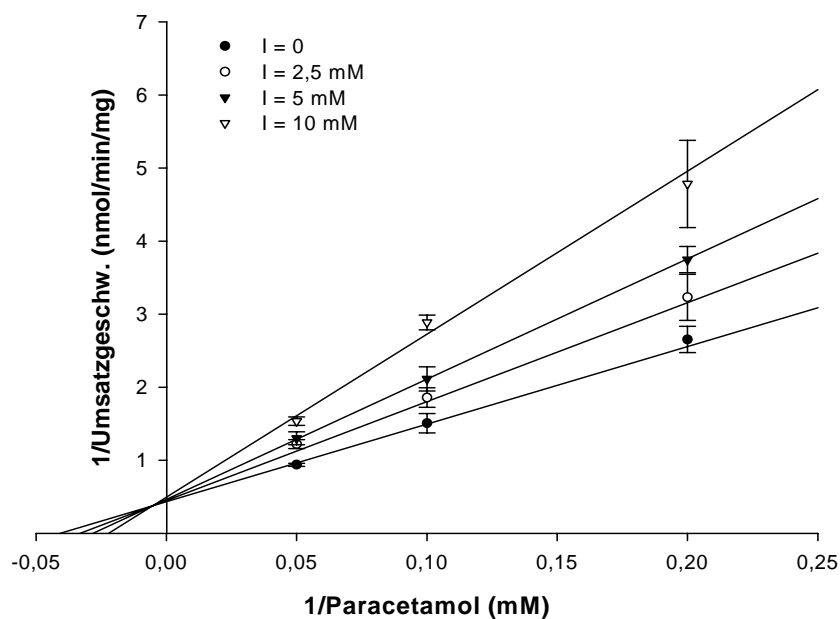


Abb. 3.38: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Morphin-Konzentrationen (Lot 21)
Lineweaver-Burk-Diagramm

r^2 : 0,940 K_i : $9,07 \pm 3,16$ mM

$I = 0$: K_m : $24,40 \pm 5,97$ mM V_{max} : $2,30 \pm 0,35$ nmol/min/mg

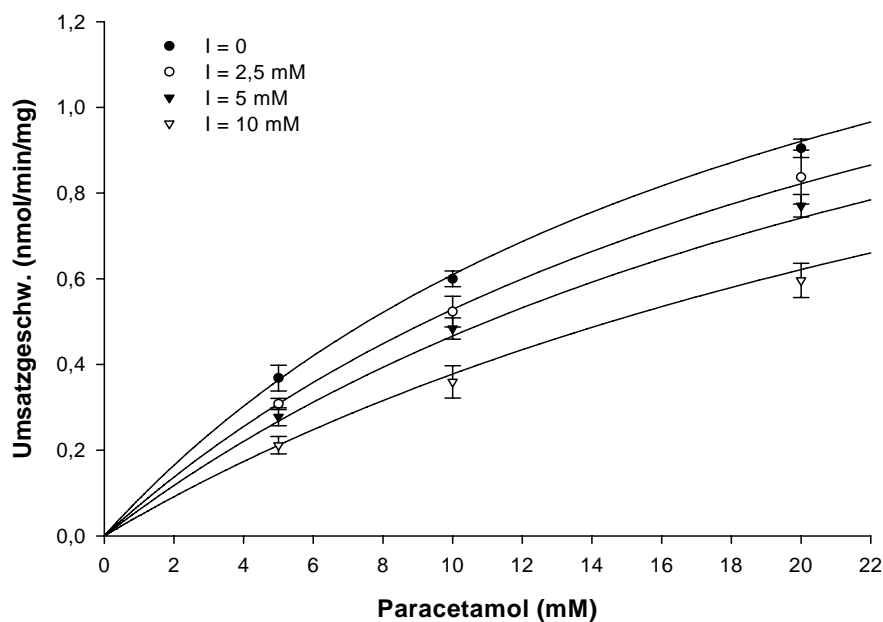


Abb. 3.39: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Morphin-Konzentrationen (Lot 24)
Michaelis-Menten-Diagramm

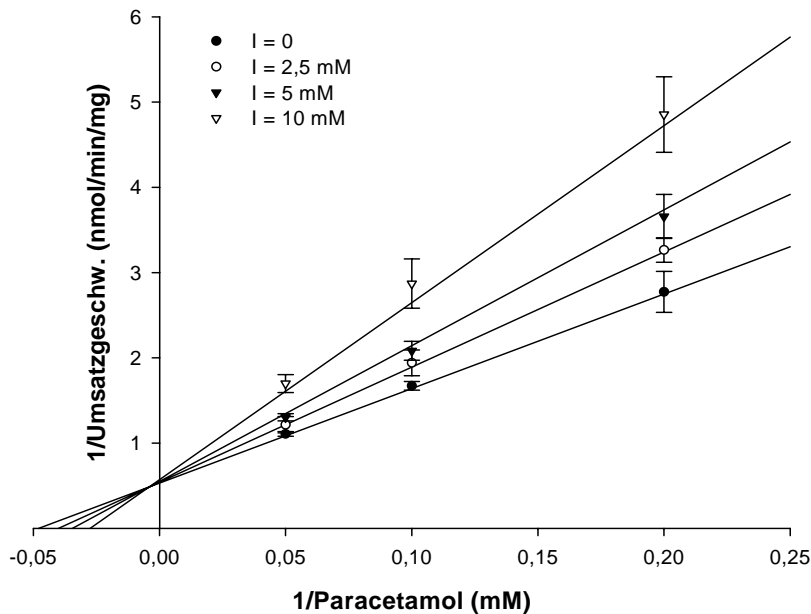


Abb. 3.40: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Morphin-Konzentrationen (Lot 24)
Lineweaver-Burk-Diagramm

$$r^2: 0,935 \quad K_i: 11,44 \pm 4,32 \text{ mM}$$

$$I = 0: K_m: 20,84 \pm 4,65 \text{ mM} \quad V_{\max}: 1,88 \pm 0,25 \text{ nmol/min/mg}$$

Codein als Inhibitor der Paracetamol-Glucuronidierung

Auch Codein als Inhibitor wurde mit den Chargen Nr. 21 und 24 untersucht. Es wurde wie Morphin in den Konzentrationen 2,5, 5 und 10 mM eingesetzt. Codein hemmte die Bildung von Paracetamolglucuronid ebenfalls schon bei einer Konzentration von 2,5 mM. In den Abbildungen 3.41 bis 3.44 sieht man die graphische Darstellung der Werte. Aus dem Schnittpunkt der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm kann man erkennen, dass es sich um einen gemischten Hemmtyp handelt. Jedoch liegt der Schnittpunkt wie bei Morphin nahe an der Ordinate. Der mit der Charge Nr. 21 ermittelte K_i -Wert beträgt 8,52 mM, mit der Charge Nr. 24 ergibt sich ein K_i -Wert von 10,69 mM. Auch beim Codein wurde kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Chargen festgestellt.

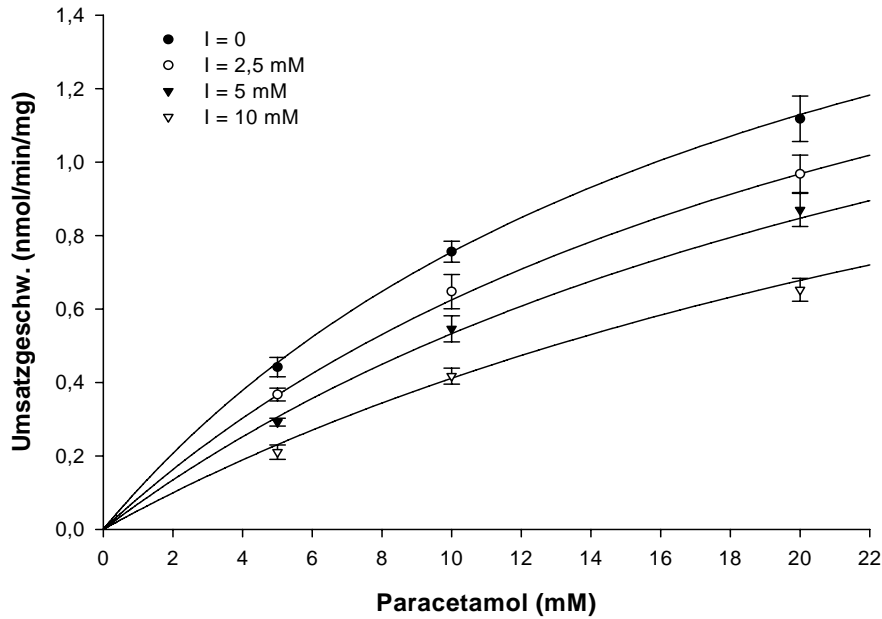


Abb. 3.41: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Codein-Konzentrationen (Lot 21)
Michaelis-Menten-Diagramm

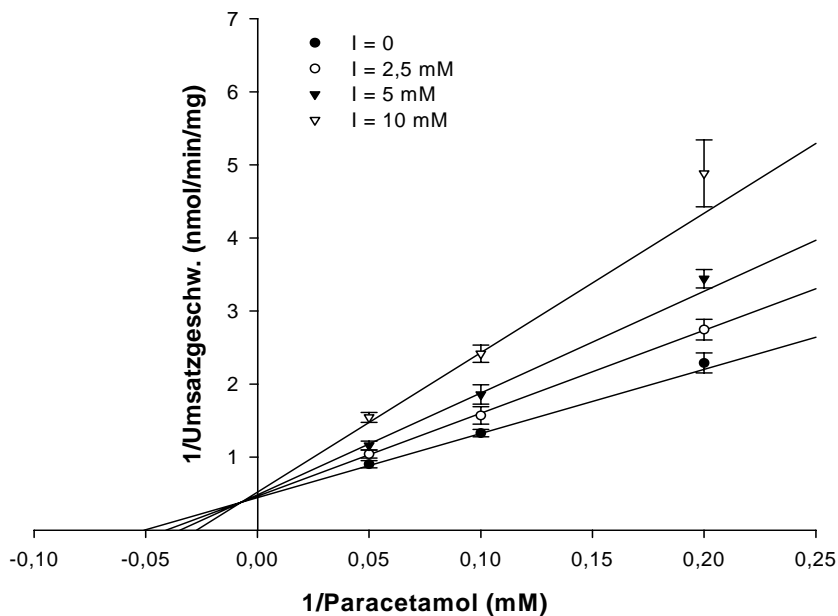


Abb. 3.42: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Codein-Konzentrationen (Lot 21)
Lineweaver-Burk-Diagramm

$$r^2: 0,945 \quad K_i: 8,52 \pm 2,65 \text{ mM}$$

$$I = 0: K_m: 19,65 \pm 4,01 \text{ mM} \quad V_{\max}: 2,24 \pm 0,26 \text{ nmol/min/mg}$$

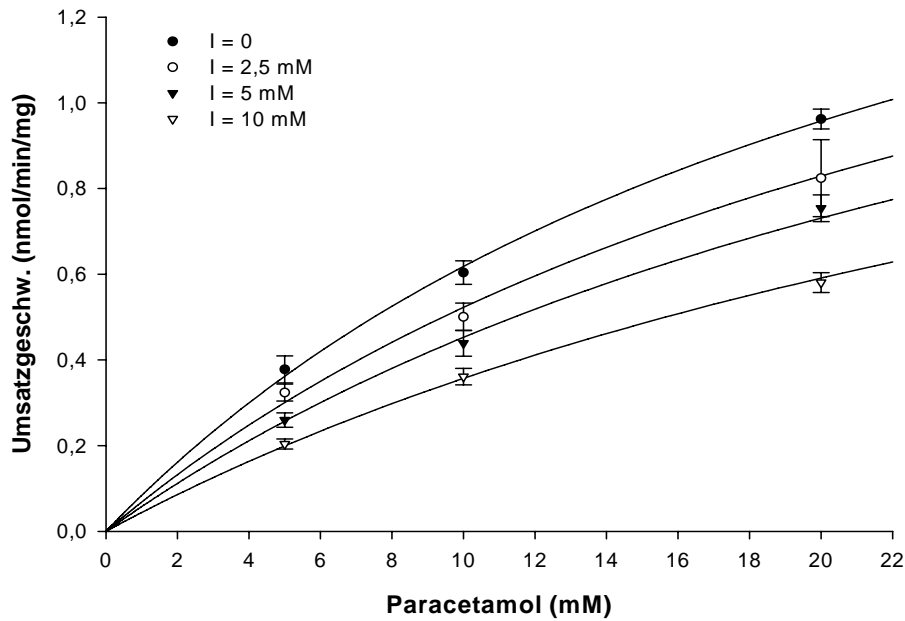


Abb. 3.43: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Codein-Konzentrationen (Lot 24)
Michaelis-Menten-Diagramm

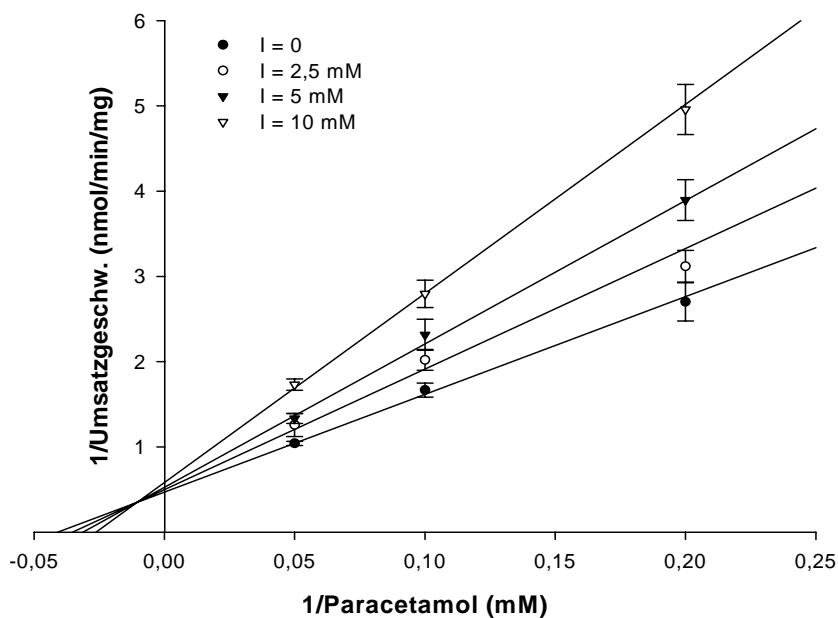


Abb. 3.44: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Codein-Konzentrationen (Lot 24)
Lineweaver-Burk-Diagramm

$r^2: 0,928$ $K_i: 10,69 \pm 4,26$ mM
 $I = 0: K_m: 24,33 \pm 6,24$ mM $V_{max}: 2,12 \pm 0,34$ nmol/min/mg

Dihydrocodein als Inhibitor der Paracetamol-Glucuronidierung

Dihydrocodein konnte nur mit der Charge 24 untersucht werden, da die Charge 21 nicht mehr in der dafür benötigten Menge zur Verfügung stand. Es wurde in den Konzentrationen 1,25, 2,5 und 5 mM als Inhibitor eingesetzt. Schon beim Einsatz von 1,25 mM Dihydrocodein im Reaktionsansatz wurde die Glucuronidierung von Paracetamol deutlich gehemmt. Auch beim Dihydrocodein handelte es sich um einen gemischten Hemmstoff (graphische Darstellung in Abbildungen 3.45 und 3.46), obwohl der Schnittpunkt der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm nahe an der Ordinate liegt. Der mit der Charge Nr. 24 ermittelte K_i -Wert des Dihydrocodein beträgt 4,02 mM.

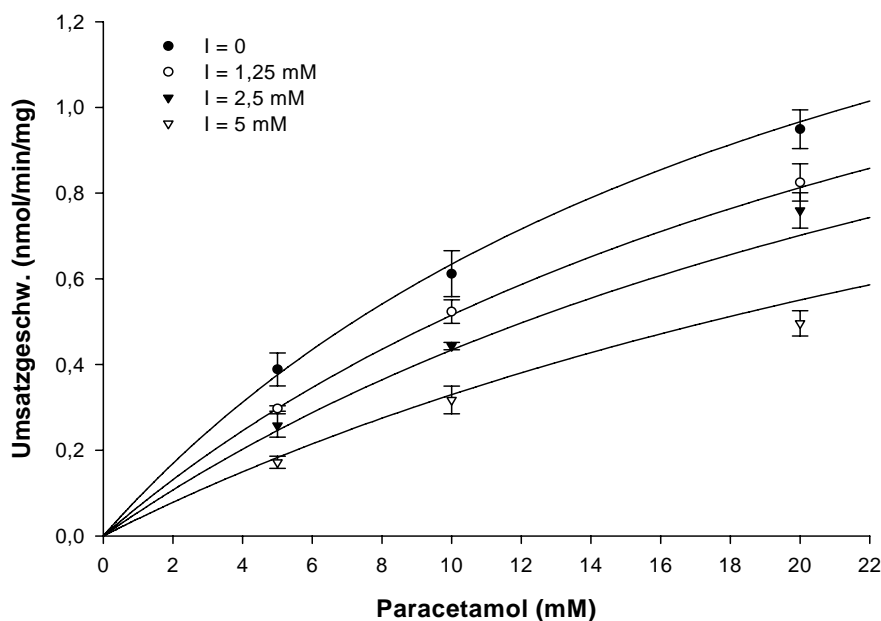


Abb. 3.45: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Dihydrocodein-Konzentrationen (Lot 24)
Michaelis-Menten-Diagramm

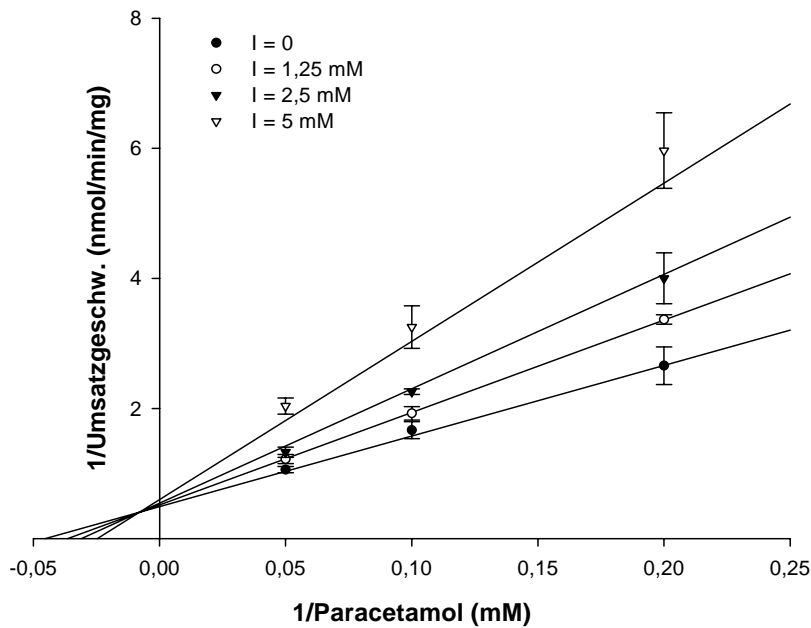


Abb. 3.46: Glucuronidierung von Paracetamol in Gegenwart verschiedener Dihydrocodein-Konzentrationen (Lot 24)
Lineweaver-Burk-Diagramm

$$r^2: 0,928 \quad K_i: 4,02 \pm 1,44 \text{ mM}$$

$$I = 0: K_m: 22,01 \pm 5,53 \text{ mM} \quad V_{\max}: 2,03 \pm 0,31 \text{ nmol/min/mg}$$

Paracetamol als Inhibitor der Morphin-Glucuronidierung

Die Bestimmung der Morphin-3-Glucuronidierung erfolgte mit der Charge Nr. 24. Zur Auswertung wurde die Menge an gebildetem Morphin-3-glucuronid ohne Paracetamol und in Anwesenheit von Paracetamol bestimmt und in die Umsatzgeschwindigkeiten umgerechnet. Im Michaelis-Menten- und im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildungen 3.47 und 3.48) wurden diese gegen die Konzentration von Morphin aufgetragen. Paracetamol war in diesem Fall der Inhibitor. Man kann erkennen, dass eine Hemmung der Morphin-Glucuronidierung durch Paracetamol bereits bei einer Paracetamol-Konzentration von 5 mM erfolgte. Paracetamol erwies sich als gemischter Hemmstoff der Morphin-Glucuronidierung. Im Lineweaver-Burk-Diagramm liegt der Schnittpunkt der Geraden jedoch fast auf der Ordinate. Der K_i -Wert von Paracetamol als Inhibitor der Morphin-Glucuronidierung beträgt 14,19 mM.

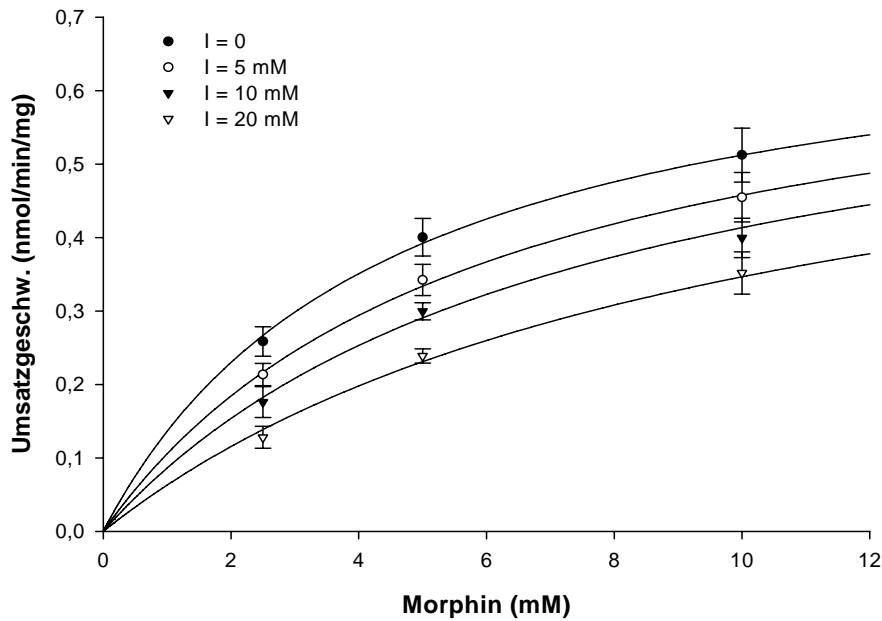


Abb. 3.47: Glucuronidierung von Morphin in Gegenwart verschiedener Paracetamol-Konzentrationen (Lot 24)
Michaelis-Menten-Diagramm

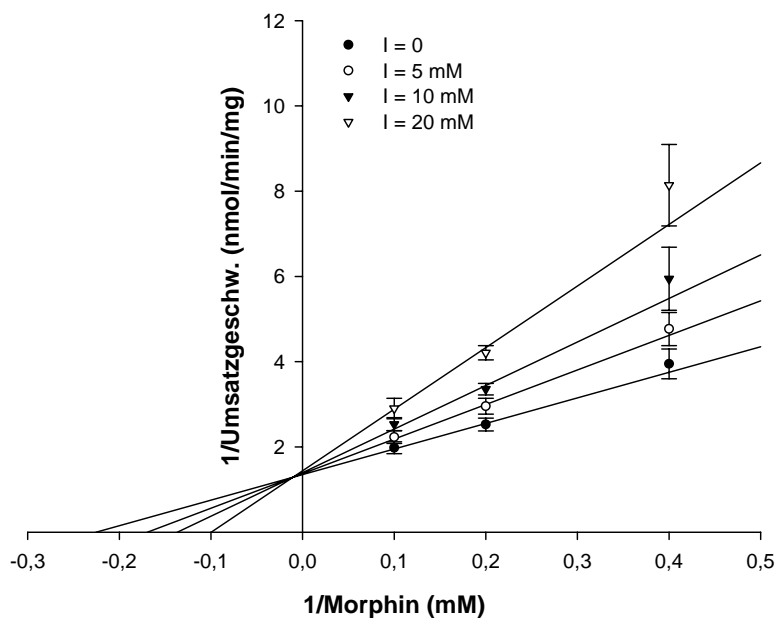


Abb. 3.48: Glucuronidierung von Morphin in Gegenwart verschiedener Paracetamol-Konzentrationen (Lot 24)
Lineweaver-Burk-Diagramm

$$r^2: 0,877 \quad K_i: 14,19 \pm 5,80 \text{ mM}$$

$$I = 0: K_m: 4,43 \pm 1,03 \text{ mM} \quad V_{\max}: 0,74 \pm 0,07 \text{ nmol/min/mg}$$

Paracetamol als Inhibitor der Codein-Glucuronidierung

Wie beim Morphin erfolgte auch die Bestimmung des Codeinglucuronids mit der Charge Nr. 24. Die gemessene Menge Codeinglucuronid wurde in die jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten umgerechnet und graphisch aufgetragen (Abbildungen 3.49 und 3.50). Paracetamol erwies sich ebenfalls als Inhibitor der Codein-Glucuronidierung. Wie beim Morphin lag auch beim Codein ein gemischter Hemmtyp vor, auch wenn sich die Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm fast auf der Ordinate schneiden. Der K_i -Wert von Paracetamol als Inhibitor der Codein-Glucuronidierung liegt bei 17,28 mM.

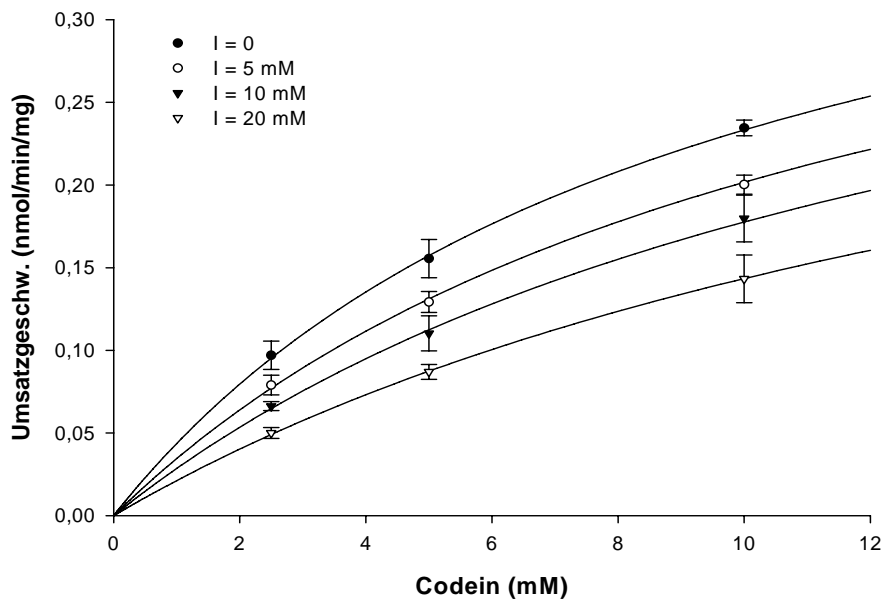


Abb. 3.49: Glucuronidierung von Codein in Gegenwart verschiedener Paracetamol-Konzentrationen (Lot 24)
Michaelis-Menten-Diagramm

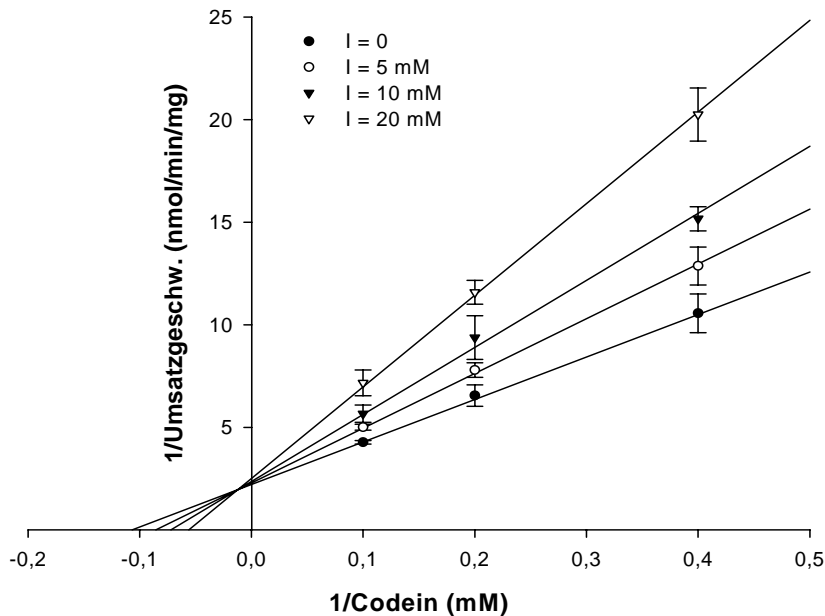


Abb. 3.50: Glucuronidierung von Codein in Gegenwart verschiedener Paracetamol-Konzentrationen (Lot 24)
Lineweaver-Burk-Diagramm

$$r^2: 0,929 \quad K_i: 17,28 \pm 6,07 \text{ mM}$$

$$I = 0: K_m: 9,35 \pm 2,11 \text{ mM} \quad V_{\max}: 0,45 \pm 0,06 \text{ nmol/min/mg}$$

Paracetamol als Inhibitor der Dihydrocodein-Glucuronidierung

In den Inkubationslösungen mit Dihydrocodein und Paracetamol erfolgte die Bildung von Paracetamolglucuronid und auch von Dihydrocodeinglucuronid. Dihydrocodeinglucuronid konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen in den Inkubationslösungen aber nicht einwandfrei detektiert werden, da sein Peak von einem anderen Peak überlagert wurde, der ebenfalls durch die Inkubation entstand. Das UV-Spektrum war zwar der Reinsubstanz sehr ähnlich, stimmte aber nicht vollkommen überein. Auch die Retentionszeit war gegenüber der Reinsubstanz leicht verschoben. Deswegen konnte weder eine sichere Identifizierung noch eine Quantifizierung des Dihydrocodeinglucuronids erfolgen. Auffallend war allerdings, dass sich der Peak des „Dihydrocodeinglucuronids“ durch eine Erhöhung der Paracetamol-Konzentration nicht verkleinerte. Paracetamol schien daher auf die Bildung dieses Peaks keinen messbaren Einfluss zu haben.

3.5.2 Glucuronidierung ohne Inhibitor

Wie bei den Alkoholen wurden Inkubationen nur mit Substrat ohne Inhibitor durchgeführt, um K_m und V_{max} für die ungehemmte Reaktion bestimmen zu können. Auch hier gilt, dass die Werte, die bei den Diagrammen aufgelistet wurden, unter Berücksichtigung aller Datenpunkte vom Programm errechnet wurden. Um die Parameter der Glucuronidierung ohne Inhibitor zu erhalten, wurden daher nur die Daten der ungehemmten Reaktionen verwendet. Die enzymkinetischen Parameter sind in folgender Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Tab. 3.9: Glucuronidierung von Paracetamol, Morphin und Codein ohne Inhibitor

Substanz	Lot Nr.	K_m [mM] \pm SE	V_{max} [nmol/min/mg] \pm SE
Paracetamol	21	25,22 \pm 7,25	2,36 \pm 0,43
Paracetamol	21	19,82 \pm 5,37	2,23 \pm 0,35
Paracetamol	24	19,50 \pm 3,67	1,78 \pm 0,19
Paracetamol	24	24,06 \pm 5,60	2,11 \pm 0,31
Paracetamol	24	20,60 \pm 7,39	1,92 \pm 0,41
Morphin	24	4,62 \pm 1,49	0,75 \pm 0,10
Codein	24	9,44 \pm 2,48	0,45 \pm 0,07

Paracetamol wurde in allen Versuchen mit Mikrosomen der Chargen 21 und 24 ausreichend glucuronidiert, um eine Inhibition durch die Opiate feststellen zu können. Es wurden K_m -Werte zwischen 19,50 und 25,22 mM ermittelt. Auch die V_{max} -Werte liegen bei allen Bestimmungen dicht zusammen, sie befinden sich zwischen 1,78 und 2,36 nmol/min/mg.

Die K_m -Werte der Opiate mit 4,62 mM für Morphin und 9,44 mM für Codein sind kleiner als die ermittelten Werte für Paracetamol. V_{max} dagegen liegt bei Paracetamol mit um 2 nmol/min/mg deutlich über den Werten der Opiate mit 0,74 nmol/min/mg für Morphin und 0,45 nmol/min/mg für Codein.

Zwischen den Chargen Nr. 21 und 24 konnte sowohl für K_m als auch für V_{max} kein Unterschied bei der Glucuronidierung von Paracetamol festgestellt werden. Die Parameter liegen mit K_m -Werten um 21,8 mM und V_{max} -Werten um 2 nmol/min/mg sehr nahe beieinander.

Bei den Inkubationen mit Morphin war zu erwarten, dass sich sowohl Morphin-3- als auch Morphin-6-glucuronid bildeten. Tatsächlich waren auch in den Proben mit Morphin zwei Peaks mit identischem UV-Spektrum zu detektieren, wovon der eine aufgrund der verfügbaren Reinsubstanz sicher als Morphin-3-glucuronid identifiziert werden konnte. Das

Verhältnis der Peakflächen zueinander lag bei ca. 10 : 1. Da allerdings Morphin-6-glucuronid als Reinsubstanz nicht zugänglich war, konnte weder eine absolut sichere Identifizierung noch eine enzymkinetische Auswertung erfolgen.

3.5.3 Vergleich der Substanzen

Die Opiate Morphin, Codein und Dihydrocodein erwiesen sich als gemischte Hemmstoffe der Paracetamol-Glucuronidierung. Paracetamol seinerseits war ebenfalls ein gemischter Hemmstoff der Glucuronidierung von Morphin und Codein. Bei diesem Hemmtyp war r^2 jeweils am größten. Die Schnittpunkte in allen Diagrammen lagen allerdings sehr nahe an der Ordinate. An den Achsenabschnitten der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm ist zu erkennen, dass der K_m -Wert durch die Inhibitoren erhöht und der V_{max} -Wert erniedrigt wurden, wie es bei gemischten Inhibitoren der Fall ist. Jedoch wurde K_m deutlich stärker erhöht als V_{max} erniedrigt.

Einfluss der Opiate auf die Glucuronidierung von Paracetamol

Alle Opiate erwiesen sich als starke Hemmstoffe der Paracetamol-Glucuronidierung. Bei Morphin und Codein konnte hinsichtlich Hemmtyp und K_i -Wert kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Chargen Nr. 21 und Nr. 24 festgestellt werden. In der folgenden Tabelle 3.10 sind noch einmal die K_i -Werte der Opiate zusammengefasst.

Tab. 3.10: K_i -Werte der Opiate - Lot 21 und 24

Opiat	Lot Nr.	K_i [mM] \pm SE
Morphin	21	9,07 \pm 3,16
Morphin	24	11,44 \pm 4,32
Codein	21	8,52 \pm 2,65
Codein	24	10,69 \pm 4,26
Dihydrocodein	24	4,02 \pm 1,44

Die ermittelten K_i -Werte von Morphin und Codein um 10 mM unterscheiden sich kaum. Beide Opiate beeinträchtigten daher die Glucuronidierung von Paracetamol in derselben Größenordnung. Dihydrocodein mit einem K_i -Wert von 4,02 mM erwies sich dagegen als

deutlich stärkerer Hemmstoff. Insgesamt wurden durch alle Opiate die K_m -Werte wesentlich stärker erhöht als die V_{max} -Werte erniedrigt.

Einfluss von Paracetamol auf die Glucuronidierung der Opiate

Paracetamol erwies sich als Inhibitor der Glucuronidierung von Morphin und Codein. In der Tabelle 3.11 sind noch einmal die ermittelten K_i -Werte aufgeführt.

Tab. 3.11: K_i -Werte von Paracetamol - Lot 24

Inhibitor der Glucuronidierung von:	K_i [mM] \pm SE
Morphin	14,19 \pm 5,80
Codein	17,28 \pm 6,07

Bei der Hemmung der Morphin-Glucuronidierung wurde ein K_i -Wert von 14,16 mM für Paracetamol ermittelt, bei der Codein-Glucuronidierung beträgt der K_i -Wert 17,41 mM. Paracetamol war demnach ein etwas stärkerer Hemmstoff der Morphin- als der Codein-Glucuronidierung, auch wenn die K_i -Werte nahe beieinander liegen.

3.5.4 Zusammenfassung

Die untersuchten Substanzen erwiesen sich als Inhibitoren vom gemischten Hemmtyp mit starkem kompetitiven Anteil, das Ausmaß der Hemmung und damit die K_i -Werte waren allerdings unterschiedlich. Im Vergleich mit den Opiaten war Paracetamol ein etwas schwächerer Hemmstoff der Opiat-Glucuronidierung als umgekehrt. Die Bildung von Paracetamolglucuronid wurde durch die Opiate stärker beeinträchtigt als die Bildung der Opiatglucuronide durch Paracetamol.

Somit konnten für die Opiate und Paracetamol in den hier durchgeführten Inkubationsversuchen gleichzeitig deren Eigenschaften als Substrate und Inhibitoren der Glucuronidierung ermittelt werden.

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden Paracetamol und die Opiate Morphin, Codein und Dihydrocodein mit menschlichen Lebermikrosomen glucuronidiert. Die beschriebenen Inkubationsversuche erwiesen sich als gut durchführbar. Es wurden ausreichend Glucuronide gebildet, um sie an der HPLC anschließend sicher zu bestimmen. Die Glucuronidierung mit menschlichem Lebermikrosomen und die Analytik der Glucuronide an der HPLC sind schon häufig in der Literatur beschrieben worden (Miners et al., 1988, 1990; Lau und Critchley, 1994; Hufschmid et al., 1995; Brunner und Bai, 1999). Auch mit tierischen Lebermikrosomen z.B. vom Affen (Rane et al., 1984), Hund (King et al., 2000b) oder der Ratte (Puig und Tephly, 1986) fanden schon viele Untersuchungen statt. Da jedoch die Enzymmuster und die Glucuronidierungskapazitäten zwischen Mensch und Tier unterschiedlich sind, wurden die Versuche in dieser Arbeit mit menschlichen Lebermikrosomen durchgeführt. Es wurden käufliche Mikrosomen verwendet, die aus mehreren Spenderlebern erhalten wurden (Pooled Human Liver Microsomes) und nicht nur von einem einzigen Spenderorgan stammten.

4.2 Glucuronidierung von Paracetamol

Zur Optimierung der Glucuronidierung von Paracetamol wurden verschiedene Kriterien untersucht. Dadurch konnten Daten zur Charakterisierung des Enzymsystems gewonnen werden.

Bei der Glucuronidierung von Paracetamol ohne Alkohole oder Opiate als Inhibitoren wurden die enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} bestimmt. Dazu wurden die Reaktionslösungen mit verschiedenen Substrat-Konzentrationen unter Verwendung der Mikrosomenchargen Nr. 20, 21 und 24 und Puffer pH 9,0 inkubiert. Ebenso wurde Paracetamol in Puffer pH 7,4 mit den Chargen Nr. 21 und 24 glucuronidiert. Die dadurch erhaltenen enzymkinetischen Parameter konnten innerhalb der gleichen Charge und zwischen den verschiedenen Chargen bei dem jeweiligen pH-Wert miteinander verglichen werden.

4.2.1 Inkubationsbedingungen

Inkubationszeit

Die Glucuronidierung von Paracetamol folgte über einen Zeitraum von 4 Stunden einem linearen Verlauf. Innerhalb dieses Zeitraumes befindet sich die Steady-state-Phase einer enzymatischen Reaktion (Bisswanger, 1994a). Die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes ändert sich nicht, und die Umsatzgeschwindigkeit erreicht ihren maximalen Wert. Nach ungefähr 5-6 Stunden führte auch eine Verlängerung der Inkubationszeit nicht mehr zu deutlich höheren Umsätzen. Es wäre möglich, dass die Enzyme unter den gegebenen Inkubationsbedingungen nach dieser Zeit mehr und mehr inaktiviert wurden. Die Mikrosomen wären dann nach 4 Stunden Inkubationszeit nicht mehr ausreichend stabil, um noch weiteres Paracetamolglucuronid zu bilden. Deswegen weist die Zeit-Umsatz-Kurve der Paracetamol-Glucuronidierung eine Sättigungsfunktion auf.

Miners et al. (1990) beobachteten mit den von ihnen eingesetzten menschlichen Lebermikrosomen bei der Glucuronidierung von Paracetamol lineare Reaktionszeiten bis zu einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden. Bei den Untersuchungen von Jurowich (2002) zur Glucuronidierung von Alkoholen folgten die Reaktionszeiten über eine Stunde und teilweise länger einem linearen Verlauf. Takeda et al. (2005) zeigten, dass die Glucuronidierung von Morphin mit menschlichen Lebermikrosomen über einen Zeitraum von 8 Stunden linear war.

pH-Wert

Bei der Bestimmung des pH-Optimums wurden die größten Umsatzgeschwindigkeiten erreicht, wenn Tris-Puffer pH 9,0 als Reaktionsmedium verwendet wurde, der bei Raumtemperatur (25 °C) auf den erforderlichen pH-Wert eingestellt worden war. Damit resultierte ein pH-Optimum von 8,7 in der Inkubationslösung bei 37,5 °C.

Man kann daraus folgern, dass die UGT in den hier verwendeten Mikrosomen ihr Umsatzoptimum erst im leicht alkalischen Bereich erreichen. Ein pH von 8,7 entspricht nicht dem physiologischen pH. Im Lumen des endoplasmatischen Retikulums, in dem sich das aktive Zentrum der UGT befindet, liegt ein pH von 7,1 vor (Alkharfy und Frye, 2001). Erst durch In-vitro-Experimente kann daher durch Variation des pH-Wertes das eigentliche Optimum des Enzyms für die untersuchte Reaktion bestimmt werden, obwohl das Enzym in

vivo nicht bei diesem pH-Wert arbeitet. Die Bestimmung des pH-Optimums ist allerdings von vielen Faktoren abhängig. Daher müssen die Bedingungen, die zur Ermittlung von enzymkinetischen Parametern benutzt werden, immer genau angegeben werden. Die ermittelten Werte gelten dann auch nur für das angewandte System.

Es kommt durchaus vor, dass das *in vitro* ermittelte pH-Optimum nicht dem physiologischen pH entspricht. So bestimmten Pacifici et al. (1988) in ihren Untersuchungen mit menschlichen Lebermikrosomen von einer einzelnen Spenderleber nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 37 °C für die Sulfotransferase ein pH-Optimum von 9,0. Für die Paracetamol-Glucuronidierung ermittelten sie ein pH-Optimum von 7,5. Während die Enzymaktivität bei pH 6,5 nur bei einem Drittel der Maximalaktivität bei pH 7,5 lag, betrug sie bei pH 9,0 noch zwei Drittel der Maximalaktivität. Auch andere Autoren stellten fest, dass die UGT im leicht alkalischen pH-Bereich höhere Umsatzgeschwindigkeiten aufweist. Bei der Glucuronidierung von Paracetamol mit menschlichen Lebermikrosomen fanden Alkharfy und Frye (2001) um 15 % größere Glucuronidierungsraten bei pH 7,4 im Vergleich zu pH 7,1. Dies stimmt sehr genau mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, denn bei pH 7,4 in der Reaktionslösung war die Umsatzgeschwindigkeit ca. 18 % größer als bei pH 7,1.

Der pH-Wert hat einen sehr wichtigen Stellenwert für enzymatische Inkubationsversuche. Er bestimmt die Ladung der Aminosäuren und damit die Konformation des Enzyms. Aus den Wendepunkten der pH-Kurve konnte man die pKa-Werte der ionischen Gruppen von Aminosäuren ablesen, die sich im aktiven Zentrum befinden. Deren Protonierungszustand ist für die enzymatische Reaktion ausschlaggebend. Es wurden die pKa-Werte von drei ionischen Gruppen ermittelt mit Werten von 5,5, 7,7 und 10,6. Der pKa-Wert von 5,5 könnte der Seitenkette der Glutaminsäure zugeordnet werden, der Wert 7,7 der Seitenkette des Histidins und der Wert 10,6 der Seitenkette des Tyrosins. Deren pKa-Werte mit 4,3, 6,0 bzw. 10,1 für die freie Aminosäure kommen den ermittelten pKa-Werten am nächsten (Stryer, 1994; Wikipedia, 2005). Rückschlüsse auf die an der Katalyse beteiligten Gruppen sind allerdings nur bedingt möglich, da sich die pKa-Werte ionisierter Gruppen bei isolierten Aminosäuren nach Einbau in ein Protein sehr verändern können (Bisswanger, 1994d). Sind diese Aminosäuren Bestandteil eines aktiven Zentrums, so können sich die pKa-Werte noch stärker verändern (Wikipedia, 2005). Meistens liegen die pKa-Werte dann etwas mehr im Basischen. So hat Glutaminsäure als Proteinbestandteil einen pKa-Wert von 4,2-4,5 und Histidin einen pKa-Wert von 6,7-7,1. Tyrosin hat als Proteinbestandteil mit einem pKa-Wert von 9,7-10,1 einen ähnlichen Wert wie in freier Form.

Der pH-Wert hat nicht nur Einfluss auf das Enzym, sondern auch auf den Ladungszustand von Substrat und Co-Substrat. Je nach Ionisierungsgrad kann daher eine Annäherung zwischen Enzym, Substrat und Co-Substrat begünstigt oder erschwert sein. So kann allein durch eine Änderung des pH-Wertes eine enzymatische Reaktion stark beeinflusst werden. Bei einem pH von 8,7 ist davon auszugehen, dass die schwache Säure Paracetamol mit einem pKa-Wert von 9,5 schon zu einem größeren Teil ionisiert vorliegt als im neutralen Bereich. Dies könnte die Annäherung zwischen Substrat und Enzym fördern. Daher beeinflusst der pH-Wert maßgeblich die Affinität zwischen Substrat und Enzym bzw. den K_m -Wert. Ein für eine Reaktion ermitteltes pH-Optimum gilt daher auch immer nur für das untersuchte Substrat, in diesem Fall für Paracetamol. Andere Substrate der UGT können von diesen bei einem ganz anderen pH-Wert optimal umgesetzt werden. Puig und Tephly (1986) ermittelten mit Lebermikrosomen der Ratte ein pH-Optimum der Morphin-Glucuronidierung bei 8,1. Säwe et al. (1982) erhielten bei der Glucuronidierung von Morphin mit menschlichen Lebermikrosomen sogar ein Plateau konstanter Glucuronidierungsraten zwischen pH 8,5 und 10. Morphin wurde von diesen Autoren in Konzentrationen von 5 bzw. 3 mM eingesetzt. Diese liegen im Bereich der K_m -Werte, die von den beiden Autoren und auch in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden.

Um eine maximale Ausbeute an Paracetamolglucuronid zu erhalten, wurden die Inhibitionsversuche mit den Alkoholen bei dem unphysiologischen, jedoch optimalen pH von 8,7 durchgeführt. Es ist es in der Enzymkinetik durchaus üblich, Untersuchungen am pH-Optimum durchzuführen, auch wenn dieses nicht dem physiologischen pH-Wert in vivo entspricht (Wilson und Goulding, 1991).

Für die Inhibitionsversuche mit den Opiaten wurde mit Tris-Puffer pH 7,4 gearbeitet, so dass in den Reaktionslösungen ein pH von 7,1 vorlag, der die Verhältnisse in vivo widerspiegelt. Dieser pH wurde gewählt, weil die Opiate bei pH 9,0 nicht ausreichend löslich waren, um eine geeignete Stammlösung ansetzen zu können.

Temperatur

Auch die Temperatur hat einen wichtigen Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion. In den durchgeführten Untersuchungen wurde ein Temperatur-Maximum bei 37,5 °C ermittelt. Dies entspricht den Verhältnissen in vivo. Wurde in Bezug auf den pH-Wert der Reaktion in den Versuchen mit den Lebermikrosomen noch ein

Optimum bei einem unphysiologischen Wert ermittelt, so lag das Temperaturmaximum bei einem physiologischen Wert. Die meisten Inkubationen anderer Autoren wurden bei 37 °C durchgeführt (Miners et al., 1990; Court et al., 2003; Jurowich et al., 2004). Für die nachfolgenden Inhibitionsversuche im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer Inkubationstemperatur von 37,5 °C gleichzeitig am Temperaturmaximum und bei physiologischen Werten gearbeitet.

Das Temperaturmaximum einer enzymatischen Reaktion wird durch zwei entgegen gesetzte Effekte bestimmt. Einerseits steigt die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen mit zunehmender Temperatur, andererseits werden die Enzyme zunehmend irreversibel denaturiert (Bisswanger, 1994b). Durch Erhöhung der Temperatur vor Durchlaufen des Maximums steigt die Anzahl der Substratmoleküle, die ausreichend Energie haben, an der enzymatischen Reaktion teilzunehmen. Nach Durchschreiten des Temperaturmaximums beginnen die Destabilisierung und die anschließende irreversible Denaturierung der Enzyme durch Zerstörung der Proteinstruktur. Dies zeigte sich durch den flacheren Anstieg der Temperaturkurve zwischen 10 und 30 °C und den steilen Abfall jenseits von 45 °C.

Aus dem aufsteigendem Ast konnte die Aktivierungsenergie zu 64 176 J/mol bestimmt werden. In der Literatur wird für enzymatische Reaktionen meist eine Aktivierungsenergie von 40 000 – 50 000 J/mol (Bisswanger, 1994b) angegeben. Der hier ermittelte Wert ist um einiges größer. Der Übergangszustand der Enzymkatalyse befindet sich demnach auf einem energetisch sehr hohen Niveau. Daher ist trotz Enzymkatalyse eine hohe Energiedifferenz zu überwinden, um Paracetamol in Paracetamolglucuronid umzuwandeln.

UDPGA-Konzentration

Bei den Versuchen mit verschiedenen UDPGA-Konzentrationen erhielt man eine typische Sättigungsfunktion. Ab einer Konzentration von 8 mM UDPGA wurde die Umsatzgeschwindigkeit auch durch eine weitere Steigerung der Co-Substrat-Konzentration nicht mehr wesentlich erhöht. Denn alle verfügbaren Bindungsstellen der Enzyme hatten anscheinend bei dieser Konzentration das Co-Substrat gebunden, die Enzyme waren gesättigt. Eine weitere Erhöhung der UDPGA-Konzentration führte allerdings auch nicht zur Enzymhemmung. Mit dem Einsatz einer UDPGA-Konzentration von 8 mM in den

Hemmversuchen konnte daher eine ausreichende Enzymsättigung erreicht werden. Diese ist nötig, wenn die maximale Enzymaktivität erreicht werden soll (Bansal und Gessner, 1980).

Der ermittelte K_m -Wert der UDPGA liegt bei 2,56 mM. In der Literatur werden niedrigere, aber auch höhere K_m -Werte für UDPGA angegeben. So betrug er bei Miners et al. (1990) in Versuchen mit menschlichen Lebermikrosomen und Paracetamol 0,679 mM. Jurowich (2002) ermittelte in ihren Arbeiten einen etwas größeren K_m -Wert von 5,1 mM mit n-Pentanol als Substrat. Court et al. (2001) fanden bei ihren Untersuchungen zur Glucuronidierung von Paracetamol mit menschlichen Lebermikrosomen K_m -Werte zwischen 1,3 und 0,8 mM.

Die V_{max} -Werte lagen bei Court et al. (2001) zwischen 1,9 und 8,1 nmol/min/mg. Damit kommen die von ihnen ermittelten Werte denen in dieser Arbeit gefundenen (V_{max} 1,62 nmol/min/mg) am nächsten. Es ist aber zu beachten, dass K_m und V_{max} von den jeweiligen Inkubationsbedingungen abhängig sind. Darauf könnten die unterschiedlichen Literaturdaten beruhen.

Einfluss weiterer Parameter

Auch weitere im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersuchte Reaktionsbedingungen haben Einfluss auf die Enzymaktivität. So ist es verständlich, dass bei Verwendung einer größeren Menge an Mikrosomen mehr Glucuronide gebildet werden können. Weiterhin können bei In-vitro-Versuchen Substanzen eingesetzt werden, die die Diffusion der Substrate an die Enzyme erleichtern. Dazu gehören Detergenzien wie z.B. Brij 58, die die Membranintegrität beeinträchtigen. Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass Alamethicin die Diffusion der Substrate zur UGT noch besser ermöglicht, indem es durch Einlagerung Poren in die Membran formt (Fisher et al., 2000a). Alkharfy und Frye (2001) stellten bei der Glucuronidierung von Paracetamol mit menschlichen Lebermikrosomen fest, dass die Zugabe von Brij 58 in einer Konzentration von 100 μ g/mg Protein die Enzymaktivität verdoppelte, während Alamethicin in einer Konzentration von 70-300 μ g/mg Protein sie verdreifachte. Um Vergleiche zu den Arbeiten von Jurowich (2002) aus eigenem Hause anstellen zu können, wurden die Inkubationen mit der gleichen Menge an Mikrosomen (100 μ g) und Brij 58 durchgeführt. Dieses wurde in der Konzentration von 0,1 mg/mg Protein eingesetzt. Bei dieser Konzentration wird die Enzymaktivität um ca. 25 % im Vergleich zur Paracetamol-Glucuronidierung mit nicht aktivierten Mikrosomen erhöht (Miners et al., 1990).

4.2.2 Glucuronidierung von Paracetamol ohne Inhibitor

Bei der Inkubation mit steigenden Paracetamol-Konzentrationen ergab sich eine typische Sättigungsfunktion. Für Paracetamol konnte in diesen Versuchen keine Substrathemmung festgestellt werden.

Die erhaltenen K_m -Werte aus den Inkubationen mit Tris-Puffer pH 9,0 und den Chargen Nr. 20, 21 und 24 lagen alle im Bereich zwischen 10,15 und 17,56 mM. Die meisten Werte befanden sich sogar zwischen 10,15 und 14,44 mM, lediglich ein Wert war mit 17,56 mM etwas größer als die restlichen. Sowohl innerhalb der gleichen Charge als auch zwischen den verschiedenen Chargen stimmten die K_m -Werte gut überein. Die V_{max} -Werte lagen zwischen 2,36 und 4,38 nmol/min/mg, wobei die Werte der Charge Nr. 20 mit 2,36 und 2,85 nmol/min/mg geringer waren als die Werte der Chargen 21 und 24 zwischen 3,63 und 4,38 nmol/min/mg.

Bei den Inkubationen mit Tris-Puffer pH 7,4 und den Chargen Nr. 21 und 24 lagen die K_m -Werte zwischen 19,50 und 25,22 mM, V_{max} zwischen 1,78 und 2,36 nmol/min/mg. Die Werte zwischen den beiden Chargen stimmten gut überein. Die enzymkinetischen Parameter der Glucuronidierung von Paracetamol mit Puffer pH 7,4 unterschieden sich von denen, die bei Inkubation mit Puffer pH 9,0 erhalten wurden. Die K_m -Werte waren ungefähr 1,8-fach größer, die V_{max} -Werte nur etwa halb so groß. Dies ist verständlich, denn eine Inkubation mit Puffer pH 7,4 entspricht nicht dem Optimum der Paracetamol-Glucuronidierung. Daher ist die Affinität ebenso wie die maximale Umsatzrate niedriger.

Miners et al. (1990) ermittelten in ihren Versuchen mit verschiedenen menschlichen Lebermikrosomen für die Glucuronidierung von Paracetamol bei 37 °C mit Puffer pH 7,4 K_m -Werte zwischen 5,96 und 8,24 mM und V_{max} -Werte zwischen 2,98 und 5,84 nmol/min/mg. Court et al. (2001) erhielten in ihren Untersuchungen mit menschlichen Lebermikrosomen von verschiedenen Spenderlebern für die Glucuronidierung von Paracetamol mit Puffer pH 7,5 bei 37 °C K_m -Werte zwischen 6,0 und 54,4 mM, wobei allerdings 6 Werte zwischen 8,1 und 10,4 mM lagen. Die V_{max} -Werte befanden sich zwischen 1,3 und 11,7 nmol/min/mg. Auch hier lagen 6 Werte enger beieinander, und zwar zwischen 3,1 und 5,8 nmol/min/mg. Damit waren die K_m -Werte aus den Untersuchungen der beiden Autoren mit um die 6-10 mM etwas mehr als um die Hälfte kleiner als die Werte um die 21 mM aus den Untersuchungen dieser Arbeit mit Puffer pH 7,4. Die V_{max} -Werte aus den Untersuchungen der beiden Autoren mit um die 3-6 nmol/min/mg waren etwas mehr als die Hälfte größer als die Werte dieser

Arbeit um die 2 nmol/min/mg. Insgesamt passen die Werte, die von Court et al. (2001) und Miners et al. (1990) ermittelt wurden, gut zu den Werten aus dieser Arbeit, auch wenn die beiden Autoren große individuelle Unterschiede feststellten.

Vergleicht man die Werte, die mit den verschiedenen Chargen erhalten wurden, so waren die enzymkinetischen Parameter der Chargen Nr. 21 und 24 sehr ähnlich. Dies trifft sowohl für die Untersuchungen mit Puffer pH 9,0 als auch für die mit Puffer pH 7,4 zu. Die K_m -Werte der Charge Nr. 20 bei der Inkubation mit Puffer pH 9,0 passen gut zu den Werten der Chargen Nr. 21 und 24. Lediglich die V_{max} -Werte der Charge Nr. 20 waren etwas kleiner als die Werte der anderen beiden Chargen.

Auch bei den Untersuchungen zur Glucuronidierung von Paracetamol mit verschiedenen menschlichen Lebermikrosomen durch Miners et al. (1990) und Court et al. (2001) unterschieden sich die K_m -Werte weniger als V_{max} . Zu den gleichen Ergebnissen kamen auch Jurowich et al. (2004).

Anscheinend sind K_m (und auch K_i), die beide die Affinität zwischen einem Enzym und seinem Substrat (bzw. einem Inhibitor) widerspiegeln, nicht so stark von der getesteten Lebermikrosomencharge abhängig. Denn sie sind im Gegensatz zu V_{max} von der Enzymkonzentration unabhängig. Da bei den verwendeten Lebermikrosomen nur die Proteinmenge, aber nicht die Enzymmenge bekannt ist, kann der Gehalt an UGT in den Lebermikrosomen von Charge zu Charge unterschiedlich sein. Fisher et al. (2000b) haben in ihrer Arbeit interindividuelle Differenzen bei der In-vitro-Glucuronidierung von Paracetamol, Morphin und Estradiol untersucht. Die Umsatzgeschwindigkeiten der Glucuronidierung von Morphin unterschieden sich um den Faktor 2,8, die von Paracetamol um den Faktor 7 und die von Estradiol sogar um den Faktor 30. Durch diese individuellen Unterschiede ist die Aussagekraft von Untersuchungen begrenzt, die nur mit einer oder wenigen Lebern durchgeführt werden. Gründe für die individuellen Unterschiede bei der Glucuronidierung, die sich auch in vivo feststellen lassen, sind unter anderem Alter, Geschlecht, Erkrankungen (Leberzirrhose) und genetische Faktoren (Miners und Mackenzie, 1991). Weiterhin können beispielsweise eine Einnahme bestimmter Arzneimittel oder Rauchen zu einer Überexpression der UGT führen (Mulder, 1992). Die Affinitätsparameter sind allerdings nicht durch Arzneimitteleinnahme oder Rauchen zu beeinflussen, so dass man vergleichbare Ergebnisse mit verschiedenen Chargen erhält.

Analog den Untersuchungen mit UDPGA gilt auch bei Paracetamol, dass die enzymkinetischen Parameter nur für das benutzte System gelten. Zudem ist beim Vergleich

mit Werten aus der Literatur zu beachten, ob die Parameter mit isolierten Enzymen (Bock et al., 1993), Hepatozyten (Moldeus, 1978; Xu et al., 1997) oder mit Lebermikrosomen (Miners et al., 1990) ermittelt wurden. Bei der Verwendung einzelner Enzyme werden meistens andere K_m -Werte erhalten als bei der Verwendung von Lebermikrosomen. So ermittelten Court et al. (2001) durch Inkubation mit Puffer pH 7,4 die Aktivitäten von drei verschiedenen menschlichen UGT (1A1, 1A6 und 1A9), die alle Paracetamol in unterschiedlichem Ausmaß glucuronidierten. Die K_m -Werte lagen bei 9,4, 2,2 bzw. 20,9 mM, für die Lebermikrosomen wurden von ihnen überwiegend Werte zwischen 8 und 10 mM erhalten, was ungefähr dem Mittelwert aus den drei K_m -Werten der isolierten Enzyme entspricht.

Bei einem Gemisch an Enzymen misst man den Gesamteffekt aller Enzyme. Dieser setzt sich aus den Affinitäten und Umsatzgeschwindigkeiten der einzelnen Enzyme zusammen. So können viele Substrate von mehreren UGT umgesetzt werden, allerdings mit unterschiedlichen Affinitäten (King et al., 2000a). Je nachdem mit welchem isolierten Enzym man die Glucuronidierung durchführt, können die Werte größer oder kleiner sein als unter Verwendung eines Enzymgemisches, wie es in Lebermikrosomen vorkommt (Court et al., 2001). Die mit isolierten Enzymen erhaltenen Werte gelten nur für dieses eine Enzym, welches dadurch näher charakterisiert werden kann. Wird die Glucuronidierung allerdings mit Lebermikrosomen oder Hepatozyten durchgeführt, so ergeben sich die enzymkinetischen Parameter aus einem Gemisch verschiedener UGT. Dies spiegelt die Verhältnisse in vivo besser wieder, da in den Lebermikrosomen verschiedene UGT vorhanden sind.

4.3 Glucuronidierung von Paracetamol unter Einfluss von Alkoholen

4.3.1 Inhibition durch die einzelnen Alkohole

Methanol hatte keinen messbaren Einfluss auf die Glucuronidierung von Paracetamol. Obwohl es in sehr hohen Konzentrationen (bis zu 500 mM) eingesetzt wurde, konnten keine Interaktionen festgestellt werden. Dies könnte durch die äußerst geringe Affinität des Methanols zur UGT erklärt werden. Methylglucuronid konnte bei der Glucuronidierung mit Rattenmikrosomen von Iwersen und Schmoldt (1998) in geringen Mengen detektiert werden, in den Untersuchungen von Jurowich et al. (2004) mit menschlichen Mikrosomen wurde es nicht gefunden.

Ähnlich sieht es beim Ethanol aus. Auch die Zugabe dieses Alkohols in Konzentrationen bis zu 500 mM hatte keinen Einfluss auf die Glucuronidierung von Paracetamol. Wie Methanol hat auch Ethanol nur eine sehr geringe Affinität zur UGT. Ethylglucuronid konnte in den Versuchen von Jurowich et al. (2004) detektiert werden, in den von Iwersen und Schmoldt (1998) nicht. Auch Manatou und Carlson (1992) fanden bei ihren In-vitro-Untersuchungen zur Ethanol-Glucuronidierung mit Lebermikrosomen von Ratten und Hasen kein Ethylglucuronid.

Obwohl in vivo beim Menschen eine Glucuronidierung von Methanol und Ethanol stattfindet und die Glucuronide auch im Harn nachweisbar sind (Bonte, 1987c; Bank, 2004), konnte in dieser Arbeit keine Beeinträchtigung der Paracetamol-Glucuronidierung durch diese beiden Alkohole festgestellt werden. Anscheinend führten die hohen Methanol- und Ethanol-Konzentrationen aber auch nicht zur Denaturierung der Enzyme. Denn es konnte keine Abnahme von V_{\max} unter Zugabe dieser Alkohole festgestellt werden.

Alle weiteren acht untersuchten Alkohole (2- und n-Propanol; R-2-, S-2-, Iso- und n-Butanol; Iso- und n-Pentanol) hatten dagegen messbare Einflüsse auf die Glucuronidierung von Paracetamol. Die K_i -Werte und damit das Ausmaß der Hemmung waren jedoch sehr unterschiedlich. Dabei spielte die Struktur des jeweiligen Alkohols eine bedeutende Rolle.

Mit Ethanol als Hemmstoff auf den Metabolismus anderer Substanzen sind schon viele Untersuchungen durchgeführt wurden. So wurde eine Beeinflussung des Metabolismus und besonders der Glucuronidierung von Morphin und Codein durch Ethanol von Bodd et al. (1986a, 1986b, 1986c) in isolierten Ratten-Hepatozyten beobachtet. Als zugrunde liegender Mechanismus wurde eine verminderte UDPGA-Synthese vermutet. Xu et al. (1997) untersuchten den Einfluss von Ethanol auf den Metabolismus von Codein und Ethylmorphin, ebenfalls mit isolierten Hepatozyten von Ratten. Auch bei ihren Untersuchungen hemmte Ethanol die Glucuronidierung, was sie ebenfalls auf eine verminderte UDPGA-Synthese zurückführten. Aber auch direkte Einflüsse von Ethanol auf die UGT zogen die Autoren als Erklärung in Betracht.

Zur Glucuronidierung von kurzkettigen aliphatischen Alkoholen und zur Hemmung der Glucuronidierung anderer Substrate durch diese Alkohole gibt es dagegen bisher noch sehr wenige Untersuchungen. Bei den Arbeiten von Jurowich et al. (2004) hemmten sich Ethanol und Isopentanol und n-Pentanol und Isopentanol gegenseitig kompetitiv in ihrer Glucuronidierung. Bei den Untersuchungen mit Rattenlebermikrosomen von Iwersen und Schmoldt (1998) ergaben sich ebenfalls kompetitive Hemmungen zwischen Isopentanol und

Testosteron. Ebenso beeinträchtigte Isopentanol die Glucuronidierung von Morphin, p-Nitrophenol und Androsteron.

4.3.2 Vergleich und Struktureinflüsse der Alkohole

Bis auf Methanol und Ethanol hatten alle untersuchten Alkohole messbare Einflüsse auf die Glucuronidierung von Paracetamol. Ordnet man die Alkohole nach kleiner werdenden K_i -Werten (siehe Tabelle 4.1), so hatte 2-Propanol mit 340,54 mM den höchsten in dieser Arbeit ermittelten K_i -Wert. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Affinität zwischen UGT und 2-Propanol vorlag, auch wenn sie nur äußerst gering war. Über n-Propanol, die vier untersuchten Butanole bis zu Iso- und n-Pentanol wurden die K_i -Werte mit zunehmender Kettenlänge immer kleiner. Während n-Propanol mit einem K_i von 282,81 mM noch ein ähnlich schwacher Hemmstoff wie 2-Propanol war, so hatten die 2-Butanole mit einer um ein C-Atom verlängerten Alkylkette schon deutlich kleinere K_i -Werte. Mit 162,31 mM (R-2-Butanol) und 152,31 mM (S-2-Butanol) waren die 2-Butanole zwar auch noch schwache Hemmstoffe, jedoch hemmten sie die Glucuronidierung von Paracetamol doppelt so stark wie die Propanole. Die primären Butanole hatten deutlich kleinere K_i -Werte als die sekundären Butanole. Mit einem K_i von 58,56 mM für Isobutanol und 38,94 mM für n-Butanol waren diese beiden Alkohole stärkere Inhibitoren als die beiden sekundären Butanole und die Propanole. Die am stärksten hemmenden Alkohole waren allerdings die beiden Pentanole. Der K_i -Wert von Isopentanol von 17,89 mM ist sehr klein. n-Pentanol hemmte die Glucuronidierung von Paracetamol am meisten. Es hatte mit 5,73 mM (Lot 21) den kleinsten ermittelten K_i -Wert aller hier getesteten Alkohole. Damit war es ein starker Hemmstoff, seine Affinität zum Enzym lag in der Größenordnung des Co-Enzyms UDPGA.

Die Struktur des jeweiligen Alkohols war für das Inhibitions Potenzial sehr wichtig. Die Kettenlänge hatte den stärksten Einfluss. Sowohl bei den primären als auch bei den sekundären und verzweigten Alkoholen verringerte sich der K_i -Wert mit steigender Kettenlänge sehr deutlich.

Der Unterschied zwischen primären und sekundären Alkoholen wurde mit zunehmender Kettenlänge größer. Bei den Propanolen zeigte sich zwar schon, dass primäre Alkohole stärker hemmten als sekundäre, doch war die Differenz im K_i -Wert von 57,73 mM zwischen 2- und n-Propanol viel kleiner als bei den Butanolen. Denn der Unterschied im K_i -Wert

zwischen R-2-Butanol und n-Butanol lag bei 123,37 mM, der zwischen S-2-Butanol und n-Butanol bei 113,37 mM.

Auch der Einfluss der Verzweigung schien von der Kettenlänge abhängig zu sein. Insgesamt waren die Differenzen zwischen verzweigten und unverzweigten Alkoholen jedoch nicht so ausgeprägt wie die zwischen primären und sekundären Alkoholen. So bestand zwischen den beiden 2-Butanolen und n-Butanol eine größere Differenz im K_i -Wert (123,37 mM zu R-2 bzw. 113,37 mM zu S-2-Butanol) als zwischen Isobutanol und n-Butanol (19,62 mM).

An den Butanolen konnte man erkennen, dass die Verzweigung des Alkohols weniger Einfluss auf die Hemmwirkung hatte als die Stellung der OH-Gruppe. Denn der verzweigte primäre Alkohol Isobutanol hemmte immer noch stärker als die beiden unverzweigten sekundären Alkohole R- und S-2-Butanol. Da das unverzweigte n-Pentanol und das verzweigte Isopentanol die Glucuronidierung von Paracetamol am meisten hemmten, hatte die Verzweigung eines Alkohols weniger Einfluss als die Kettenlänge. Das verzweigte Isopentanol war ein stärkerer Hemmstoff als das unverzweigte n-Butanol, und die sekundären 2-Butanole waren stärkere Hemmstoffe als das primäre n-Propanol. Dies belegt deutlich, dass die Kettenlänge von größerer Bedeutung war als die Verzweigung der Alkylkette oder die Stellung der OH-Gruppe.

Aus diesen Beobachtungen kann man folgern, dass Alkohole mit langen Alkylketten anscheinend stärker mit den UGT interagieren können als kurzkettige Alkohole. Dies gilt sowohl für unverzweigte als auch für verzweigte, genauso wie für primäre und sekundäre Alkohole. Mit zunehmender Kettenlänge steigt die Lipophilie des Alkohols. Es ist anzunehmen, dass mit steigender Lipophilie die Anlagerung an das Enzym erleichtert ist und mehr hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Alkohol und Enzym ausgebildet werden können. Dadurch würde die Glucuronidierung von Paracetamol beeinträchtigt.

Auch die Verzweigung der Alkohole war von Bedeutung, wobei unverzweigte Alkohole stärker hemmten als verzweigte Alkohole mit der gleichen Kettenlänge. Die Verzweigung der Alkylkette bestimmt die räumliche Anordnung und die Größe des Alkoholmoleküls. Ein verzweigter Alkohol ist voluminöser als ein unverzweigter. Deshalb könnte eine Anlagerung an die UGT erschwert sein, wodurch weniger Interaktionen auftreten als bei einem unverzweigten Alkohol.

Ebenso war die Stellung der OH-Gruppe bei den Alkoholen wichtig und hatte großen Einfluss auf das Interaktionspotenzial. Denn primäre Alkohole hemmten stärker als die sekundären mit der gleichen Alkylkettenlänge. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die OH-Gruppe bei

primären Alkoholen besser zugänglich ist als bei sekundären. Man könnte daraus schließen, dass die Affinität zu den Enzymen hauptsächlich durch die OH-Gruppe bestimmt wird. Denn auf diese Gruppe wird die Glucuronsäure bei der Glucuronidierung von Paracetamol und Alkoholen übertragen. Ist die OH-Gruppe wie bei den sekundären Alkoholen schwerer zugänglich, so ist anscheinend die Affinität zu den UGT stark herabgesetzt, was sich an den deutlich niedrigeren K_i -Werten der sekundären Alkohole widerspiegelt.

Die K_i -Werte von R-2- und S-2-Butanol unterschieden sich nur um genau 10 mM, wobei S-2-Butanol den kleineren Wert hatte. Daher konnte nur ein unbedeutender Unterschied zwischen den beiden stereochemisch unterschiedlichen 2-Butanolen festgestellt werden. Anscheinend ist die sterische Anordnung nicht sehr wichtig für die Interaktion zwischen der UGT und den 2-Butanolen. Die Glucuronidierung von anderen komplexeren Substanzen wie Oxazepam oder Naproxen kann allerdings stereoselektiv in unterschiedlichem Ausmaß erfolgen (Miners und Mackenzie, 1991).

Insgesamt waren für das Inhibitions Potenzial der untersuchten Alkohole die Kettenlänge und damit die Lipophilie das wichtigste Merkmal. Danach folgte die freie Zugänglichkeit der OH-Gruppe, die strukturelle Geradlinigkeit des Alkoholmoleküls war das schwächste Kriterium.

Erwartungsgemäß entsprachen die strukturellen Einflüsse der Alkohole bei den hier durchgeführten Hemmversuchen den Ergebnissen von Jurowich (2002). Auch bei der Glucuronidierung der Alkohole war die Kettenlänge das wichtigste Kriterium, gefolgt von der Stellung der OH-Gruppe. Eine Verzweigung der Alkylkette hatte den geringsten Einfluss auf die Glucuronidierung. Bei Toxizitätsuntersuchungen von aliphatischen Alkoholen bis zu einer Alkylkettenlänge von 8 C-Atomen durch McKarns et al. (1997) und Strubelt et al. (1999) spielten die strukturellen Einflüsse Lipophilie, Stellung der OH-Gruppe und Verzweigung der Alkylkette eine ähnliche Rolle wie in dieser Arbeit.

Die aus den Inhibitionsversuchen ermittelten K_i -Werte der Alkohole sind in der gleichen Größenordnung wie die von Jurowich et al. (2004) bestimmten K_m -Werte. Zur Verdeutlichung sind die Werte in nachfolgender Tabelle 4.1 nebeneinander aufgeführt. Die K_m -Werte von Jurowich et al. (2004) wurden mit der Charge Nr. 16 bestimmt, die K_i -Werte mit der Charge Nr. 21.

Tab. 4.1: K_i und K_m -Werte der untersuchten Alkohole

Alkohol	Struktur	K_m [mM] \pm SE (Lot 16) Jurowich et al., 2004	K_i [mM] \pm SE (Lot 21) eigene Untersuchungen
Methanol	prim. unverzw.	n.b.	n.b.
Ethanol	prim. unverzw.	373,4 \pm 47,6	n.b.
2-Propanol	sek. unverzw.	419,7 \pm 50,1	340,5 \pm 88,1
n-Propanol	prim. unverzw.	208,5 \pm 25,5	282,8 \pm 92,8
R-2-Butanol	sek. unverzw.	211,0 \pm 32,3	162,3 \pm 33,7
S-2-Butanol	sek. unverzw.	197,8 \pm 17,3	152,3 \pm 38,4
Isobutanol	prim. verzw.	43,7 \pm 3,5	58,6 \pm 14,3
n-Butanol	prim. unverzw.	50,8 \pm 6,6	38,9 \pm 8,1
Isopentanol	prim. verzw.	13,3 \pm 2,0	17,9 \pm 5,2
n-Pentanol	prim. unverzw.	13,8 \pm 1,8	5,7 \pm 0,9

Für Methanol konnten weder K_m - noch K_i -Wert ermittelt werden. Bei Ethanol konnte von Jurowich et al. (2004) ein K_m von 373,4 mM bestimmt werden, in den hier durchgeführten Versuchen aber kein K_i -Wert. Die K_m -Werte der Propanole liegen weit auseinander, sie unterscheiden sich um 211,2 mM. Daraus kann man folgern, dass die Stellung der OH-Gruppe für die Affinität zu den UGT, die die Alkohole glucuronidieren, von Bedeutung ist, wobei bevorzugt das primäre n-Propanol umgesetzt wird. Für das Inhibitions Potenzial scheint die Stellung der OH-Gruppe weniger Einfluss zu haben. Denn die K_i -Werte liegen näher beieinander als die K_m -Werte und unterscheiden sich nur um 57,7 mM. Allerdings ist beim Vergleich der Werte die gleiche Tendenz festzustellen, da 2-Propanol sowohl einen größeren K_m - als auch einen größeren K_i -Wert hat.

Bei R- und S-2-Butanol sind die beiden K_i -Werte genauso wie die K_m -Werte ungefähr gleich groß, sie unterscheiden sich um 10 bzw. 13,2 mM. Es fällt jedoch auf, dass die Werte für S-2-Butanol in beiden Untersuchungen jeweils niedriger liegen. Damit hatte S-2-Butanol eine etwas höhere Affinität zur UGT als R-2-Butanol. Die Differenz der K_i -Werte zwischen den beiden primären Butanolen ist mit 19,7 mM etwas größer als die zwischen den K_m -Werten mit 7,1 mM. n-Butanol hat einen kleineren K_i -Wert als Isobutanol, aber einen etwas größeren K_m -Wert. Da die Werte jedoch alle nahe beieinander liegen, scheint die Verzweigung der Alkylkette weder einen Einfluss auf die Affinität zu den UGT, noch auf die Eigenschaft als Inhibitor bei den Butanolen zu haben. Zwischen den K_m -Werten von n-Pentanol und Isopentanol besteht kein Unterschied, da die Differenz zwischen diesen Werten nur 0,5 mM war. Zwischen den K_i -Werten war die Differenz mit 12,2 mM größer. Bei den um ein C-Atom längeren Pentanolen hatte demnach die Verzweigung der Alkylkette Auswirkungen auf die Inhibitionsstärke, jedoch nicht auf die Affinität zur UGT.

Insgesamt sind sich die K_i - und die K_m -Werte sehr ähnlich. Beide Werte sind ein Maß für die Affinität der Alkohole zu den Enzymen, und zwar zu denen, die Alkohole glucuronidieren (K_m) und denen, die (auch) Paracetamol glucuronidieren (K_i). Zu beiden haben die Alkohole eine ähnlich große Affinität.

4.3.3 Hemmtyp

Von wesentlichem Interesse war, den Hemmtyp der Alkohole zu bestimmen. Beim gemischten Inhibitionsmodell bestand die größte Korrelation zwischen den einzelnen Datenpunkten. Die einzelnen Geraden in den jeweiligen Lineweaver-Burk-Diagrammen (Abbildungen 3.18, 3.20, 3.22, 3.24, 3.26, 3.28, 3.30, 3.32, 3.34 und 3.36) schneiden sich in einem gemeinsamen Punkt, jedoch liegt dieser weder auf der Ordinate noch auf der Abszisse. Zur Abgrenzung von anderen Hemmtyp-Modellen (competitiv, nichtcompetitiv, uncompetitiv) kann man aber auch andere Kriterien heranziehen, wie das AIC_c , die Summe der Abstandsquadrate und die Standardfehler der ermittelten Parameter K_m und V_{max} .

Vor allem die AIC_c -Werte bieten sich sehr gut zum Vergleich verschiedener Modelle untereinander an (Motulsky und Christopoulos, 2003). Sie sind für die einzelnen Alkohole (außer Methanol und Ethanol) bei dem jeweiligen Hemmtyp zusammen mit den r^2 -Werten in Tabelle 4.2 aufgelistet. Der jeweils größte r^2 - und der kleinste AIC_c -Wert sind hervorgehoben.

Tab. 4.2: r^2 - und AIC_c -Werte der Untersuchungen mit Alkoholen

Inhibitor	Parameter	Hemmtyp			
		gemischt	nichtcompetitiv	competitiv	uncompetitiv
2-Propanol (Lot 21)	r^2 AIC_c	0,95832 -192,57	0,95688 -193,45	0,95225 -188,55	0,93065 -170,64
n-Propanol (Lot 21)	r^2 AIC_c	0,94346 -187,96	0,94217 -189,37	0,93824 -186,22	0,92428 -176,44
R-2-Butanol (Lot 21)	r^2 AIC_c	0,96644 -208,87	0,96485 -209,15	0,95752 -200,06	0,93334 -178,43
S-2-Butanol (Lot 21)	r^2 AIC_c	0,95337 -196,43	0,95236 -197,90	0,93665 -188,22	0,92116 -173,72
Isobutanol (Lot 21)	r^2 AIC_c	0,96141 -200,01	0,96034 -201,20	0,95273 -192,78	0,93324 -176,20
n-Butanol (Lot 21)	r^2 AIC_c	0,96668 -192,56	0,96391 -191,23	0,96261 -189,54	0,92816 -158,19
Isopentanol (Lot 21)	r^2 AIC_c	0,95053 -192,78	0,94845 -193,30	0,94760 -192,505	0,92668 -176,38
n-Pentanol (Lot 20)	r^2 AIC_c	0,97071 -248,52	0,96698 -245,26	0,96458 -241,90	0,92962 -208,93
n-Pentanol (Lot 21)	r^2 AIC_c	0,98585 -173,84	0,98225 -168,40	0,98142 -166,74	0,94407 -127,07
n-Pentanol (Lot 24)	r^2 AIC_c	0,96643 -184,32	0,96307 -182,24	0,96199 -180,86	0,92242 -146,62

Deutliche Unterschiede zwischen den AIC_c -Werten lagen beim uncompetitiven Hemmtyp im Vergleich zu den Werten der anderen drei Hemmtypen vor. Damit konnte dieser Hemmtyp für die Alkohole sicher ausgeschlossen werden.

Die AIC_c -Werte des gemischten und des nichtcompetitiven Hemmtyps lagen bei allen Alkoholen sehr nahe beieinander, sie unterschieden sich meistens nur um 2-3 Zahlenwerte. Nur bei n-Pentanol, das mit der Charge Nr. 21 untersucht wurde, war die Differenz mit 5 Zahlenwerten etwas größer. Da zur Unterscheidung von zwei Hemmtypen mit 95-prozentiger Sicherheit die AIC_c -Werte um mindestens 6 Zahlenwerte auseinander liegen müssen, konnte aufgrund des AIC_c -Wertes keine klare Unterscheidung zwischen diesen Hemmtypen getroffen werden. Im Gegensatz zu r^2 war sogar bei sechs Alkoholen der AIC_c -Wert beim nichtcompetitiven Hemmtyp kleiner als beim gemischten.

Der AIC_c -Wert des competitiven Hemmtyps war ebenfalls bei einigen Alkoholen nicht viel größer als der vom gemischten Hemmtyp. Bei R-2-, S-2- und Isobutanol ebenso wie bei n-Pentanol, welches mit den Chargen Nr. 20 und 21 untersucht wurde, waren die Differenzen größer als 6 Zahlenwerte, so dass für diese Alkohole mit 95-prozentiger Sicherheit eine competitive Hemmung ausgeschlossen werden konnte.

Somit war eine exakte Bestimmung des Hemmtyps aufgrund der AIC_c -Werte nicht möglich. Allerdings konnten der uncompetitive Hemmtyp bei allen Alkoholen und der competitive Hemmtyp bei einigen Alkoholen mit genügender Sicherheit ausgeschlossen werden. Unter der Annahme, dass alle untersuchten Alkohole gleichartige Einflüsse haben und damit Inhibitoren vom gleichen Hemmtyp sind, könnte man den competitiven Hemmtyp ebenfalls für alle Alkohole ausschließen. Daher blieben als mögliche Hemmtypen nur noch das gemischte und das nichtcompetitive Modell übrig.

Zur Darstellung in den Lineweaver-Burk-Diagrammen und bei der Berechnung der Enzymkinetikparameter wurde der gemischte Hemmtyp zugrunde gelegt. Denn bei diesem Modell müssen sich die Geraden zwar wie beim competitiven oder nichtcompetitive Hemmtyp in einem Punkt schneiden, jedoch muss dies nicht auf der Ordinate oder der Abszisse sein. Vielmehr wird vom Enzymkinetik-Programm der Schnittpunkt erstellt, bei dem die bestmögliche Anpassung an die gemessenen Werte vorliegt.

Insofern spiegelt der gemischte Hemmtyp die Verhältnisse am besten wieder. Bei Annahme dieses Hemmtyps lassen sich die Interaktionen gut erklären. Denn da die Alkohole selber auch von menschlichen Lebermikrosomen glucuronidiert werden können, ist eine Konkurrenz um die Bindungsstelle zwischen Paracetamol und den Alkoholen möglich (competitive Effekte). Die Konzentration, in der die Substanzen vorliegen, ist dabei sehr wichtig. Es kann aber auch sein, dass die Alkohole an anderen Stellen als dem aktiven Zentrum mit den UGT interagieren oder an das Enzym binden, wenn Paracetamol schon im aktiven Zentrum ist. Dadurch wird die Glucuronidierung von Paracetamol erschwert (nichtcompetitive / gemischte Effekte). Die Bindung des Alkohols kann also am aktiven Zentrum des Enzyms, an einer benachbarten Stelle oder am Enzym-Substrat-Komplex stattfinden. Dies erklärt die unterschiedlichen Effekte eines gemischten Hemmstoffes.

Weiterhin ist zu beachten, dass es sich bei den menschlichen Lebermikrosomen um ein Gemisch aus vielen Enzymen und damit auch vielen UGT handelt. In den Inhibitionsversuchen mit Lebermikrosomen wurde der Gesamteffekt der Inhibition gemessen, der sich aus mehreren Einzeleffekten zusammensetzen kann.

Von Paracetamol ist bekannt, dass es von sehr vielen UGT umgesetzt werden kann. Court et al. (2001) identifizierten jedoch in ihren Untersuchungen mit verschiedenen isolierten glucuronidierenden Enzymen UGT1A1, UGT1A6 und UGT1A9 als die UGT, die die größte Aktivität bei der Paracetamol-Glucuronidierung aufweisen. Die UGT1A9 hat ein breites

Substratspektrum und kann daher auch aliphatische Alkohole glucuronidieren (King et al., 2000a). An dieser UGT könnte eine Konkurrenz zwischen Alkohol und Paracetamol auftreten. Ebenso kann es Enzyme geben, die nur Paracetamol, aber keine Alkohole glucuronidieren. Allerdings könnten die Alkohole, auch wenn sie keine Substrate für diese UGT sind, trotzdem die Glucuronidierung von Paracetamol inhibieren, indem sie Wechselwirkungen mit den Enzymen eingehen, die die Konformation des Enzyms verändern. Jurowich (2002) vermutete in ihren Untersuchungen genauso wie Iwersen und Schmoltdt (1998), dass die Alkohole nur von einem Enzym oder mehreren sehr ähnlichen UGT in den verwendeten Lebermikrosomen glucuronidiert werden. Dieses Enzym scheint allerdings auch Paracetamol zu glucuronidieren. Denn wäre es spezifisch für die Glucuronidierung von Alkoholen, so hätte man vermutlich gar keinen Einfluss der Alkohole auf die Glucuronidierung von Paracetamol messen und damit auch keine K_i -Werte ermitteln können.

4.3.4 Rückschlüsse auf Verhältnisse in vivo

Über Interaktionen zwischen Ethanol und Paracetamol in vivo ist in der Literatur schon häufig berichtet worden (Draganov et al., 2000; Rumack, 2004). Dabei zeigte sich vor allem eine verstärkte Leberschädigung unter Einwirkung hoher Dosen Ethanol und gleichzeitiger Einnahme von Paracetamol. Tredger et al. (1985, 1986) stellten in Versuchen mit Mäusen fest, dass sich die Lebertoxizität einer Dosis Paracetamol verstärkte, wenn die Tiere vorher über 28 Tage täglich eine Alkoholinfusion von 15 g/kg bekamen. Auch bei Menschen kann regelmäßiger Alkoholkonsum zu einer erhöhten Leberschädigung durch Paracetamol führen, selbst wenn nur moderate Mengen Alkohol getrunken und eine normale Dosis Paracetamol eingenommen werden (Draganov et al., 2000). Die Interaktion kommt aufgrund eines Mangels an UDPGA zustande. Dieser entsteht wiederum durch eine Abnahme der NAD^+ -Konzentration infolge der Oxidation des Ethanols durch die Alkoholdehydrogenase (Aw und Jones, 1983). So ist durch die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit noch einmal bestätigt worden, dass Wechselwirkungen zwischen Ethanol und Paracetamol offenbar nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß auf einer Hemmung der UGT beruhen.

Durch die Hemmung der Glucuronidierung von Paracetamol durch aliphatische kurzkettige Alkohole, die größtenteils als Begleitalkohole in alkoholischen Getränken enthalten sind, in vitro ist auch in vivo mit einer erhöhten Lebertoxizität zu rechnen, wenn gleichzeitig Paracetamol eingenommen und Alkohol getrunken werden. Da der Metabolismus von

Paracetamol hinsichtlich der Glucuronidierung beeinträchtigt ist, werden die anderen Stoffwechselfvorgänge vermehrt stattfinden. Dies kann auch zu einer verstärkten Bildung des lebertoxischen Metaboliten N-Acetyl-p-benzochinonimin führen. Durch die begrenzte Menge an Glutathion in der Leber könnte es zur Anhäufung dieses Metaboliten und zur vermehrten Bindung an Leberproteine kommen (Draganov et al., 2000). Die eingesetzten Alkohol-Konzentrationen in den In-vitro-Versuchen waren sehr hoch, vor allem die von Methanol und Ethanol. Da auch diese beiden Alkohole wie alle anderen untersuchten Alkohole in vivo glucuronidiert werden, muss man davon ausgehen, dass solche hohen Konzentrationen durchaus in den Leberzellen auftreten.

Vor allem bei missbräuchlicher Zufuhr von Alkohol oder bei Suizidversuchen mit Paracetamol kann es auch in vivo zu sehr hohen Konzentrationen an den hier untersuchten Substanzen kommen. In der Literatur gibt es Berichte von erhöhter Lebertoxizität bei gleichzeitiger Aufnahme von Paracetamol und Alkohol, die in vivo bei Menschen beobachtet wurden. Man fasst diese Beobachtungen unter dem Begriff Alkohol-Paracetamol-Syndrom zusammen (Draganov et al., 2000).

Durch eine anzunehmende Hemmung der Glucuronidierung der höheren Alkohole durch Paracetamol seinerseits ist damit zu rechnen, dass die Leber, aber auch andere Organe, durch die Alkohole geschädigt werden. Wenn diese nämlich nur verlangsamt abgebaut werden, kann es zur Kumulation der Begleitalkohole kommen (Iwersen und Schmoldt, 1998). Zur Lebertoxizität von aliphatischen Alkoholen sind bereits In-vitro-Untersuchungen durchgeführt worden. McKarns et al. (1997) untersuchten aliphatische Alkohole mit einer Kettenlänge von bis zu 8 C-Atomen. Sie setzten sie in Konzentrationen bis 500 mM ein. Bei Methanol und Ethanol wurden Konzentrationen von maximal 5 bzw. 2 M verwendet. Strubelt et al. (1999) untersuchten die Lebertoxizität von verschiedenen aliphatischen Alkoholen mit maximal 5 C-Atomen. Alle Alkohole wurden in der Konzentration von 65,1 mM eingesetzt. In beiden Untersuchungen schädigten die Alkohole die Leberzellen durch Beeinträchtigung der Membranintegrität.

Bei der Begleitstoffanalyse in der Forensik ist an die Einnahme von Paracetamol zu denken. Durch die Interaktionen mit Paracetamol könnte es zu einem veränderten Begleitstoffalkoholmuster kommen, welches bei der Bestimmung von Getränkeart oder Rückschlüssen auf den Trinkzeitpunkt bedacht werden muss. Für eine Beurteilung sind vor allem n-Propanol, Iso- und 2-Butanol wichtig, da sie die entscheidenden Marker sind (Gill, 2005). Da n-Propanol und 2-Butanol nur zu einem geringen Anteil glucuronidiert werden

(Jurowich et al., 2004), hat eine Hemmung der Glucuronidierung durch Paracetamol vermutlich nur geringe Auswirkungen auf die Konzentration dieser Alkohole im Blut. Anders sieht es bei Isobutanol aus. Da dieser Alkohol zu einem wesentlich größeren Anteil glucuronidiert wird, könnte eine Hemmung durch Paracetamol zu deutlich höheren Blutspiegeln an Isobutanol führen.

4.3.5 Ausblick

Durch die In-vitro-Versuche mit menschlichen Lebermikrosomen sind auf molekularer Ebene Wechselwirkungen zwischen Paracetamol und Begleitalkoholen nachgewiesen worden. Nähere Untersuchungen könnten mit einzelnen Enzymen durchgeführt werden, um zu klären, an welchen Enzymen genau es zu Interaktionen kommt. Es wäre auch möglich, die Alkoholglucuronide zu messen, um den Einfluss von Paracetamol auf die Glucuronidierung der Alkohole zu untersuchen. Interessant wären auch ähnliche Versuche mit längerkettigen Alkoholen. Schließlich kommen Begleitalkohole mit einer Kettenlänge von bis zu 12 C-Atomen in alkoholischen Getränken vor (Bonte, 1987a). Sie könnten die Glucuronidierung von Paracetamol noch stärker hemmen als die hier untersuchten Pentanole.

Für die Untersuchung der Verhältnisse in vivo wären Untersuchungen bei chronischem Alkoholmissbrauch oder Trinkversuche prinzipiell geeignet. Dabei müssten Getränke mit hohem Begleitstoffgehalt und gleichzeitig Paracetamol eingenommen und die Glucuronide von Paracetamol und den Alkoholen im Blut und im Urin bestimmt werden. Allerdings müssten solche Versuche erst von einer Ethikkommission genehmigt werden, was kaum zu erwarten ist. Ein weiteres Problem ist, dass im Rahmen von In-vivo-Versuchen mit Probanden derart hohe Mengen nicht eingenommen werden, wie sie z.B. bei chronischem Alkoholmissbrauch oder bei einzelnen Personen im starken Rauschzustand auftreten. In-vitro-Versuche sind daher die einzige realistische Möglichkeit, derartige Wechselwirkungen systematisch zu untersuchen.

4.4 Glucuronidierung von Paracetamol und Opiaten

4.4.1 Glucuronidierung ohne Inhibitor

Morphin und Codein wurden wie Paracetamol von den verwendeten Lebermikrosomen der Charge Nr. 24 glucuronidiert. Unterschiede bestanden jedoch bei der Affinität und der Umsatzgeschwindigkeit. Betrachtet man die K_m -Werte, so stellt man fest, dass Morphin mit einem K_m von 4,62 mM die größte Affinität zu den glucuronidierenden Enzymen hatte. Codein mit einem K_m von 9,44 mM hatte eine etwas niedrigere Affinität, am kleinsten war sie bei Paracetamol mit einem K_m um die 22,5 mM. Bei V_{max} zeigte sich, dass Paracetamol mit ca. 2,1 nmol/min/mg am schnellsten umgesetzt wurde, gefolgt von Morphin (0,75 nmol/min/mg) und zuletzt Codein (0,45 nmol/min/mg). So hatten die Opiate eine höhere Affinität zu den glucuronidierenden Enzymen, wurden aber langsamer umgesetzt als Paracetamol.

Takeda et al. (2005) glucuronidierten Morphin mit menschlichen Lebermikrosomen durch Inkubation für 4 Stunden bei 37 °C mit Tris-Puffer pH 7,8. Sie ermittelten einen K_m -Wert von 1,2 mM und ein V_{max} von 0,27 nmol/min/mg. In den Arbeiten von Yue et al. (1990) mit menschlichen Lebermikrosomen wurde Codein mit Tris-Puffer pH 7,4 bei 37 °C für 30 min glucuronidiert. Sie erhielten ein K_m von 2,21 mM und ein V_{max} von 0,54 nmol/min/mg. Damit sind die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten K_m -Werte von Morphin und Codein etwas größer als die von den genannten Autoren gefundenen.

Coffman et al. (1997) führten In-vitro-Untersuchungen zur Glucuronidierung mit isolierter menschlicher UGT2B7 durch. In ihren Versuchen inkubierten sie mit dem einzelnen Enzym verschiedene Substanzen für 60 Minuten bei 37 °C. Bei Morphin wurde Tris-Puffer pH 8,4 verwendet, bei Codein Tris-Puffer pH 7,7. Codein hatte mit 1,8 mM einen fast doppelt so hohen K_m -Wert wie Morphin mit 1,0 mM. Auch bei den eigenen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit war der K_m -Wert von Codein etwa doppelt so groß. Die Affinitäten zu den mikrosomalen Enzymen war allerdings wesentlich geringer als die zu der isolierten UGT2B7 aus den Untersuchungen von Coffman et al. (1997).

Auch von Court et al. (2003) wurden Morphin und Codein unter Verwendung von menschlichen Lebermikrosomen und isolierter UGT2B7 in vitro glucuronidiert. Dabei wurde bei 37 °C unter Verwendung von Phosphat-Puffer pH 7,5 und Alamethicin (50 µg/mg Protein bei Morphin und 100 µg/mg Protein bei Codein) inkubiert. Der K_m -Wert der Morphin-3-

Glucuronidierung mit menschlichen Lebermikrosomen war mit 4,3 mM größer als der von Codein mit 2,6 mM. Für die Morphin-6-Glucuronidierung wurde ein K_m -Wert von 2,4 mM ermittelt. Bei der Verwendung von isolierter UGT2B7, die hauptsächlich die Opiate glucuronidiert, waren die erhaltenen K_m -Werte erwartungsgemäß kleiner (Morphin-3-Glucuronidierung: 0,67 mM, Morphin-6-Glucuronidierung: 0,63 mM, Codein-Glucuronidierung: 0,4 mM). Damit waren die ermittelten K_m -Werte der Morphin-3-Glucuronidierung bei diesen Autoren im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen und denen von Coffman et al. (1997) größer als die der Codein-Glucuronidierung.

Miners et al. (1988) untersuchten die Morphin-3-Glucuronidierung mit menschlichen Lebermikrosomen aus vier verschiedenen Spenderlebern. Nach der enzymkinetischen Auswertung stellten sie fest, dass die Glucuronidierung einer biphasischen Kinetik folgte. Daraus leiteten sie ab, dass mindestens zwei verschiedene UGT an der Morphin-3-Glucuronidierung beteiligt sind. Die eine besitzt eine hohe Affinität bei einer niedrigen Kapazität, die andere eine niedrige Affinität bei einer hohen Kapazität. Für die UGT mit hoher Affinität ermittelten sie einen mittleren K_m -Wert von 0,005 mM und ein V_{max} von 0,3 nmol/min/mg, die entsprechenden Werte für die UGT mit niedriger Affinität waren 1,20 mM und 10,85 nmol/min/mg. Diese Werte verdeutlichen erneut, wie sehr sich enzymkinetische Parameter unterscheiden können, je nachdem ob sie mit einem Gemisch an Enzymen z.B. in Lebermikrosomen oder mit einzelnen Enzymen bestimmt werden. Dabei ist dann auch wieder sehr wichtig, welches Enzym verwendet wurde.

In den Inkubationslösungen wurde nur Morphin-3-glucuronid quantitativ gemessen. Allerdings wurde in den Proben ein weiterer Peak detektiert. Bei diesem Peak scheint es sich um Morphin-6-glucuronid zu handeln, denn er wurde nur in Anwesenheit von Morphin und Mikrosomen gebildet. Das UV-Spektrum stimmte mit dem von Morphin und Morphin-3-glucuronid überein. Die Retentionszeit passt zu den Angaben in der Literatur, denn Morphin-3-glucuronid wurde in den Inkubationslösungen zeitlich vor dem anderen Peak detektiert, wie es auch in der Literatur für Morphin-3- und Morphin-6-glucuronid beschrieben ist (Svensson et al., 1982; King et al., 2000b). Ebenso war das Verhältnis zwischen dem Peak von Morphin-3-glucuronid und diesem Peak ca. 10 : 1, was auch bei anderen Autoren gefunden wurde (Court et al., 2003) und den Verhältnissen *in vivo* entspricht (Aderjan und Skopp, 1998). Da aber keine Reinsubstanz zur Verfügung stand, konnte nicht mit 100-prozentiger Sicherheit bewiesen werden, dass es sich bei diesem Peak um Morphin-6-glucuronid handelt. Daher

konnte nur der K_m -Wert für die Bildung von Morphin-3-glucuronid und der Einfluss von Paracetamol auf dessen Glucuronidierung ermittelt werden.

4.4.2 Inhibition durch die einzelnen Substanzen

Morphin und Codein hemmten die Glucuronidierung von Paracetamol fast im gleichen Ausmaß. Mit K_i -Werten von 9,07 und 11,44 mM für Morphin und 8,52 und 10,69 mM für Codein erwiesen sie sich als starke Hemmstoffe. Dihydrocodein war in den Versuchen mit einem K_i -Wert von 4,02 mM der stärkste Inhibitor und hemmte daher die Glucuronidierung von Paracetamol noch etwas stärker als n-Pentanol. Auch Paracetamol seinerseits hemmte die Glucuronidierung der Opiate. Mit K_i -Werten von 14,19 mM bei Morphin und 17,28 mM bei Codein war es allerdings ein schwächerer Hemmstoff. Beim Vergleich der Mikrosomenchargen Nr. 21 und 24 konnten hinsichtlich des K_i -Wertes und des Hemmtyps von Morphin und Codein wie beim n-Pentanol keine Unterschiede festgestellt werden.

Bei Morphin war der K_m -Wert kleiner als sein K_i -Wert. Demnach ist die Affinität von Morphin zum Enzym für seine eigene Glucuronidierung etwas größer als sein Inhibitions Potenzial. Umgekehrt ist es beim Paracetamol, dessen K_i -Wert kleiner war als der ermittelte K_m -Wert. Insgesamt lagen die K_m - und K_i -Werte von Paracetamol und den Opiaten wie bei den Alkoholen nahe beieinander.

Auch andere Autoren führten Inhibitionsversuche mit Opiaten und Paracetamol durch und stellten Interaktionen fest. So wurde die Umsatzgeschwindigkeit der Paracetamol-Glucuronidierung bei Miners et al. (1990) durch Morphin gesenkt. In den Untersuchungen von Bolanowska und Gessner (1978) hemmte Morphin die Glucuronidierung von Paracetamol nichtcompetitiv. Ebenso hemmte Morphin mit einem K_i von 3,6 mM die Glucuronidierung von Codein in menschlichen Lebermikrosomen, während Codein weniger Einfluss auf die Glucuronidierung von Morphin hatte (Yue et al., 1990). Allerdings war die Hemmung der Codein-Glucuronidierung durch Morphin vom kompetitiven Hemmtyp.

Es gibt noch weitere Arzneistoffe, die die Glucuronidierung von Paracetamol in menschlichen Lebermikrosomen in vitro hemmten. So erwies sich Probenecid mit einem K_i von 1,67 mM als kompetitiver Inhibitor der Paracetamol-Glucuronidierung (von Moltke et al., 1993). Auch Oxazepam, Tetracyclin, Östrogene und Corticosteroide hemmten die Glucuronidierung von Paracetamol (Dybing, 1976; Bolanowska und Gessner, 1978). Daher gibt es offenbar viele

Substanzen, die mit der Glucuronidierung von Paracetamol interagieren, was besonders dann ein Problem sein kann, wenn viele Medikamente gleichzeitig eingenommen werden müssen. Ob eine Beeinflussung der Glucuronidierung von Dihydrocodein durch Paracetamol stattfindet, wurde durch die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt, da Dihydrocodeinglucuronid nicht einwandfrei identifiziert werden konnte. Kirkwood et al. (1998) allerdings untersuchten den Einfluss von Paracetamol mit menschlichen Lebermikrosomen. Dabei hemmte es in Konzentrationen von 0,05 und 0,5 mM die Glucuronidierung von Dihydrocodein (1,5 mM) nicht. Oxazepam hingegen hemmte in Konzentrationen von 0,5 mM die Glucuronidierung um mehr als 50 %, während Diclofenac dies schon in einer Konzentration von 0,05 mM tat.

4.4.3 Vergleich und Struktureinflüsse der Substanzen

Betrachtet man die K_i -Werte der untersuchten Opiate, so erwiesen sich alle als starke Hemmstoffe der Paracetamol-Glucuronidierung. Demnach haben die Opiate ein großes Interaktionspotenzial. Interessant ist, dass zwischen Morphin und Codein kein Unterschied festgestellt werden konnte. Man hätte erwarten können, dass Morphin, welches an der Position 6 und an der Position 3 eine OH-Gruppe aufweist, ein stärkerer Hemmstoff wäre als Codein, welches nur an der Position 6 über eine OH-Gruppe verfügt. Da dies allerdings nicht der Fall ist, scheint die Anzahl und die Stellung der OH-Gruppen keinen Einfluss auf das Inhibitionspotenzial zu haben. In vivo wird kaum Morphin-3,6-diglucuronid gebildet (Aderjan und Skopp, 1998). Daher könnte man annehmen, dass nur eine OH-Gruppe ins aktive Zentrum der UGT passt, weshalb sich Morphin und Codein als gleich starke Inhibitoren erwiesen. Durch die Hydrierung der ungesättigten Bindung beim Codein wurde das Inhibitionspotenzial größer, denn Dihydrocodein erwies sich als stärkerer Hemmstoff als die anderen beiden Opiate. Die Hydrierung findet in der Nähe der OH-Gruppe statt, wodurch anscheinend die Affinität zur UGT erhöht wird.

Auf die Affinität und die Umsatzgeschwindigkeit der Glucuronidierung der Opiate hatte die O-Methylierung beim Codein mehr Einfluss. Denn die Affinität zu den UGT wurde dadurch herabgesetzt. Dies ist verständlich, da die freien OH-Gruppen wichtig sind für die Glucuronidierung. Morphin kann an den Positionen 3 und 6 im Molekül glucuronidiert werden, Codein nur an Position 6. Da der K_m -Wert von Morphin kleiner ist als der von Codein, hat die freie phenolische OH-Gruppe an der Position 3 des Morphins anscheinend

eine höhere Affinität zu den UGT als die nichtphenolische OH-Gruppe an der Position 6 des Codeins und wird daher bevorzugt umgesetzt. Aus diesem Grund wird auch mehr Morphin-3- als Morphin-6-glucuronid gebildet.

Paracetamol hatte unter den getesteten Reaktionsbedingungen größere K_i - und K_m -Werte als die Opiate. Codein und Morphin scheinen daher eine größere Affinität zu den glucuronidierenden Enzymen zu haben als Paracetamol. Daher ist es auch verständlich, dass dieses die Opiat-Glucuronidierung weniger stark hemmte als umgekehrt.

In der Literatur finden sich Untersuchungen zur Glucuronidierung verschiedener Opiate. Dabei führte eine N-Alkylierung zu einer stärkeren Affinität für die UGT, denn die Opiate Buprenorphin und Nalorphin hatten bei Coffman et al. (1997) kleinere K_m -Werte (0,024 bzw. 0,26 mM) als Morphin und Codein (1,0 bzw. 1,8 mM). Dies wird durch eine größere Hydrophobie infolge der N-Alkylierung erklärt, denn auch bei den Alkoholen steigt die Affinität zu den glucuronidierenden Enzymen mit der Lipophilie.

4.4.4 Hemmtyp

Auch bei den Inhibitionsversuchen mit den Opiaten bestand besonderes Interesse, den Hemmtyp zu bestimmen. Die größte Korrelation in den Diagrammen lag beim gemischten Modell vor. Allerdings erwies sich die Festlegung auf einen Typ noch schwieriger als bei den Alkoholen. Denn in den Lineweaver-Burk-Diagrammen (Abbildungen 3.38, 3.40, 3.42, 3.44, 3.46, 3.48 und 3.50) fällt sofort auf, dass sich die Linien fast auf der Ordinate schneiden, was bei einem kompetitiven Hemmstoff der Fall ist. In Tabelle 4.3 sind die Werte r^2 und AIC_c der untersuchten Substanzen aufgelistet. Das größte r^2 und das kleinste AIC_c sind jeweils hervorgehoben.

Tab. 4.3: r^2 - und AIC_c -Werte der Untersuchungen mit Opiaten

Inhibitor	Parameter	Hemmtyp			
		gemischt	nichtcompetitiv	competitiv	uncompetitiv
Morphin (Lot 21)	r^2	0,93722	0,93554	0,93710	0,91635
	AIC_c	-252,54	-253,77	-254,95	-241,26
Morphin (Lot 24)	r^2	0,93481	0,93279	0,93475	0,91704
	AIC_c	-262,70	-263,74	-265,16	-253,63
Codein (Lot 21)	r^2	0,94548	0,94308	0,94521	0,92091
	AIC_c	-251,78	-252,20	-254,04	-236,42
Codein (Lot 24)	r^2	0,92783	0,92679	0,92742	0,91059
	AIC_c	-254,22	-256,03	-256,45	-246,44
Dihydrocodein (Lot 24)	r^2	0,92834	0,92642	0,92801	0,90399
	AIC_c	-252,49	-253,72	-254,76	-240,94
Paracetamol (bei Morphin, Lot 24)	r^2	0,87711	0,86835	0,87694	0,84203
	AIC_c	-293,88	-293,07	-296,31	-284,32
Paracetamol (bei Codein, Lot 24)	r^2	0,92873	0,92609	0,92855	0,90506
	AIC_c	-391,38	-392,12	-393,75	-380,11

Der Wert r^2 war bei allen untersuchten Substanzen für das gemischte Inhibitionsmodell am größten. Bei Betrachtung der AIC_c -Werte war allerdings das competitive Inhibitionsmodell am wahrscheinlichsten, da die Werte am kleinsten waren. Jedoch war eine Entscheidung für ein Inhibitionsmodell aufgrund der AIC_c -Werte nicht möglich, da sich die Werte beim gemischten, nichtcompetitiven und competitiven Hemmtyp um maximal 3 Zahlenwerte unterschieden. Nur eine uncompetitive Hemmung konnte ausgeschlossen werden, die AIC_c -Werte waren deutlich um mehr als 6 Zahlenwerte größer.

Wie bei den Alkoholen wurde zur Darstellung in den Lineweaver-Burk-Diagrammen und bei der Berechnung der Enzymkinetikparameter der gemischte Hemmtyp zugrunde gelegt. Ein gemischter Hemmstoff hat sowohl Eigenschaften eines competitiven wie eines nichtcompetitiven Inhibitors. Da auch die Opiate gute Substrate für die UGT sind, kann man von einer direkten Konkurrenz um die Bindungsstelle ausgehen. Aber auch nichtcompetitive Wechselwirkungen erscheinen aufgrund der starken Affinitäten der Substrate zu den UGT möglich. Dies wird beim Zugrundelegen eines gemischten Hemmtyps berücksichtigt.

Von den Opiaten ist mittlerweile bekannt, von welchen UGT sie bevorzugt umgesetzt werden. Dabei ist die UGT2B7 am wichtigsten (Kirkwood et al., 1998; Lin und Wong, 2002; Takeda et al., 2005). Paracetamol wird durch dieses Enzym nicht umgesetzt. An diesem Enzym kann es dann wahrscheinlich nur zu nichtcompetitiven Wechselwirkungen kommen, indem Paracetamol in der Nähe des aktiven Zentrums bindet und dadurch die Umsetzung der Opiate erschwert. Aber Opiate werden auch von UGT aus der Familie 1 umgesetzt (King et al.,

2000a; Stone et al., 2003) genauso wie Paracetamol, das hauptsächlich von UGT1A6 glucuronidiert wird (Court et al., 2001). An diesen Enzymen wäre dann eine direkte Konkurrenz der Substrate um die Enzymbindungsstelle möglich. Wie bei den Alkoholen ist auch bei den Opiaten zu bedenken, dass die Inhibitionsversuche im Rahmen dieser Arbeit mit einem Enzymgemisch durchgeführt wurden. Als Ergebnis kann nur der Gesamteffekt gemessen werden. Aussagen über die Glucuronidierung an einzelnen Enzymen sind nur möglich, wenn die jeweiligen Enzyme vor den Untersuchungen isoliert werden (Court et al., 2003).

4.4.5 Rückschlüsse auf Verhältnisse in vivo

In den Inhibitionsversuchen konnten Interaktionen zwischen Paracetamol und den Opiaten Morphin, Codein und Dihydrocodein *in vitro* nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann auch *in vivo* durch diese Opiate die Lebertoxizität von Paracetamol erhöht sein. Denn sie erwiesen sich als sehr starke Hemmstoffe der Paracetamol-Glucuronidierung. Ebenfalls ist auch eine Interaktion durch Paracetamol auf den Metabolismus der Opiate möglich. Durch die gehemmte Bildung der unwirksamen Glucuronide Morphin-3- und Codeinglucuronid könnte es zu einer Wirkverlängerung der Opiate kommen (Somogyi et al., 1991).

Die Opiate hemmten die Glucuronidierung von Paracetamol stärker als die kurzkettigen aliphatischen Alkohole. Nur die Pentanole hatten einen K_i -Wert in der Größenordnung der Opiate. Deswegen kann man von einer stärkeren Lebertoxizität durch Interaktion mit Opiaten als mit Alkoholen rechnen. Aufgrund der hohen Dosen, in denen Opiate teilweise appliziert werden und der relativ kleinen K_i -Werte sind Interaktionen mit Paracetamol möglich.

In den Untersuchungen von Sonne et al. (1988) hatte Codein allerdings keinen Effekt auf die Pharmakokinetik von Paracetamol. Die Plasma- und Urinkonzentrationen von Paracetamol und seinen Metaboliten bei alleiniger Gabe von Paracetamol und bei einer Kombination von Paracetamol und Codein waren sehr ähnlich. Auch Paracetamol seinerseits hatte keinen Effekt auf den Metabolismus von Codein *in vivo* (Somogyi et al., 1991). Die Dosen von Paracetamol und Codein in den beiden Untersuchungen entsprachen einer Normaldosis (30 mg Codein und 1g Paracetamol). Von daher scheint eine Kombination therapeutischer Dosen von Paracetamol und den Opiaten Morphin, Codein und Dihydrocodein sicher und effektiv. Bei

bestimmungsgemäßem Gebrauch von z.B. Dolomo TN[®] oder Paracodin[®] ist mit keinen nennenswerten Interaktionen zu rechnen. Wenn kein Effekt in vivo beobachtet wird, bedeutet das aber nicht, dass nicht doch Wechselwirkungen auf enzymatischer Ebene stattfinden können (Miners und Mackenzie, 1991).

Anders sind die Verhältnisse bei der Hochdosis-Schmerztherapie von Tumorpatienten. Dabei werden wesentlich höhere Opiatmengen gegeben (Säwe et al., 1982). Ebenso werden in der Substitutionstherapie nach BtMVV (2005) mit Codein und Dihydrocodein teilweise sehr hohe Mengen verordnet (Aderjan und Skopp, 1998), wobei tödliche Intoxikationen beschrieben wurden (Skopp et al., 1998). Ein zusätzlicher Beigebrauch anderer Opiate und Analgetika findet häufig statt. Auch in der illegalen Drogenszene, in der Straßenheroin häufig mit Paracetamol verschnitten ist, werden in vivo hohe Dosen eingenommen. Bei hohen Dosen an Opiaten und Paracetamol könnten dann auch in vivo messbare Interaktionen auftreten (Sonne et al., 1988). Vor allem bei gleichzeitiger Einnahme vieler Arzneistoffe könnte es zu Leberschädigungen kommen, wenn die Glucuronidierung von Paracetamol gehemmt wird.

4.4.6 Ausblick

Bei der Glucuronidierung von Paracetamol und den Opiaten Morphin, Codein und Dihydrocodein konnten Wechselwirkungen auf molekularer Ebene festgestellt werden. Bei den In-vitro-Versuchen mit menschlichen Lebermikrosomen traten messbare Interaktionen auf. Da nicht klar ist, an welchen UGT genau es zu den Inhibitionen kommt, könnten Versuche mit isolierten Enzymen durchgeführt werden. Dies könnte erklären, warum in vivo bisher bei normalen Konzentrationen wenig Interaktionen beobachtet werden konnten. Von Interesse wäre sicherlich auch eine gleichzeitige Detektion von Morphin-6-glucuronid, da dieses stark analgetisch wirksam ist (Fisher et al., 2000b).

Da Versuche mit gesunden Probanden schon gemacht wurden, wären für in vivo Untersuchungen die Bestimmung von Plasma- und Urinspiegeln von Hochdosis-Analgetika-Patienten oder Opiatabhängigen interessant. Bei diesen Patienten könnten die hier in vitro gemessenen Interaktionen auch in vivo auftreten, was sich in einer erhöhten Lebertoxizität des Paracetamol oder auch höheren Plasmaspiegeln der Opiate äußern könnte.

5 Zusammenfassung

Die Glucuronidierung ist ein wichtiger Metabolisierungsschritt im menschlichen Organismus für viele Arzneistoffe, Drogen und körpereigene Stoffwechselprodukte. Durch verschiedene Isoenzyme in den Lebermikrosomen wird Glucuronsäure an die jeweilige Substanz gebunden, wodurch diese wasserlöslicher wird. Da sehr viele Stoffe glucuronidiert werden, kann es zu Konkurrenzen um die Enzyme und verschiedenartigen Interaktionen kommen, welche in dieser Arbeit näher untersucht wurden.

Der Hauptmetabolit von Paracetamol ist Paracetamolglucuronid, es wird aber auch in geringem Ausmaß ein lebertoxischer Metabolit gebildet. Eine Hemmung der Glucuronidierung durch andere Substanzen kann zu einer erhöhten Lebertoxizität führen, da eine größere Menge von diesem Metaboliten gebildet wird. Bei der Schmerztherapie von Tumorpatienten oder im Drogenmilieu werden häufig Paracetamol und Opiate zusammen eingenommen, welche ebenfalls in großem Ausmaß glucuronidiert werden. Auch eine Einnahme von Paracetamol und Alkohol kommt oft vor. Von besonderem Interesse sind gerade auch in jüngster Zeit die Begleitalkohole, über deren genaue Metabolisierung noch wenig bekannt ist. Auch sie werden, im Gegensatz zu Ethanol, hauptsächlich glucuronidiert.

Daher ist bei einer gleichzeitigen Einnahme von Paracetamol und Alkoholen oder Opiaten mit Interaktionen zu rechnen. Um diese näher zu charakterisieren wurden In-vitro-Versuche mit menschlichen Lebermikrosomen durchgeführt und die Glucuronide an der HPLC detektiert.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Inkubationsbedingungen für Paracetamol näher untersucht und optimiert. Eine Inkubationszeit von 4 Stunden erwies sich als optimal, um eine ausreichende Menge an Paracetamolglucuronid ohne relevante Denaturierung der Enzyme zu erhalten. Das pH-Optimum der glucuronidierenden Enzyme wurde unter Verwendung von Tris-Puffer pH 9,0 als Reaktionsmedium erreicht, woraus ein pH-Wert von 8,7 in der Reaktionslösung bei der Inkubationstemperatur resultierte. Das Temperaturmaximum lag bei 37,5 °C. Damit befand sich das Temperaturmaximum der glucuronidierenden Enzyme bei einem physiologischen Wert, das pH-Optimum allerdings nicht. Der K_m -Wert der UDPGA betrug 2,56 mM. Eine optimale Glucuronidierung von Paracetamol konnte daher durch eine Inkubation für 4 Stunden bei 37,5 °C unter Verwendung des Puffers von pH 9,0 und einer UDPGA-Konzentration von 8 mM erreicht werden. Bei der Glucuronidierung von Paracetamol unter diesen Bedingungen wurden K_m -Werte zwischen 10,15 und 17,56 mM und V_{max} -Werte zwischen 2,36 und 4,38 nmol/min/mg ermittelt.

Nach Optimierung der Versuchsbedingungen wurden zehn verschiedene Alkohole mit einer Kettenlänge von bis zu 5 C-Atomen, nämlich Methanol, Ethanol, 2-Propanol, n-Propanol, R-2-Butanol, S-2-Butanol, Isobutanol, n-Butanol, Isopentanol und n-Pentanol, als Inhibitoren der Paracetamol-Glucuronidierung untersucht. Ferner wurden die Opiate Morphin, Codein und Dihydrocodein als Inhibitoren eingesetzt. Diese Inkubationen wurden allerdings mit Puffer pH 7,4 durchgeführt, da die Opiate in Puffer pH 9,0 nicht ausreichend löslich waren, um eine geeignete Stammlösung herstellen zu können. Neben Paracetamolglucuronid konnten auch Morphin-3-glucuronid und Codeinglucuronid gemessen und der Einfluss von Paracetamol auf deren Glucuronidierung bestimmt werden. Nach Umrechnung in die jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten erfolgte eine enzymkinetische Auswertung. Dazu wurden die Werte K_m , V_{max} , K_i und der Hemmtyp bestimmt.

Bei den Versuchen mit den Alkoholen hemmten alle Alkohole außer Methanol und Ethanol die Glucuronidierung von Paracetamol, und es wurde ein gemischter Hemmtyp als am wahrscheinlichsten ermittelt. Sicher ausgeschlossen werden konnte allerdings lediglich eine uncompetitive Hemmung. Das Ausmaß der Inhibition war sehr unterschiedlich und von der Struktur des Alkohols abhängig. So hatte n-Pentanol mit 5,73 mM den kleinsten K_i -Wert, 2-Propanol mit 340,54 mM den größten. Die Länge der Alkylkette hatte den größten Einfluss auf das Inhibitions Potenzial der untersuchten Alkohole. Primäre Alkohole hemmten stärker als sekundäre, unverzweigte stärker als verzweigte. n-Pentanol als langkettiger primärer unverzweigter Alkohol hemmte daher die Glucuronidierung von Paracetamol am meisten.

Auch bei den Versuchen mit den Opiaten konnten Interaktionen festgestellt werden. Die Opiate hemmten die Glucuronidierung von Paracetamol, und Paracetamol seinerseits die Glucuronidierung der Opiate. Für alle Substanzen wurde ein gemischter Hemmtyp als am wahrscheinlichsten ermittelt. Wie bei den Alkoholen konnte jedoch auch bei den Opiaten nur der uncompetitive Hemmtyp sicher ausgeschlossen werden. Die K_i -Werte lagen bei 9,07 bzw. 11,44 mM für Morphin, 8,52 bzw. 10,69 mM für Codein und bei 4,02 mM für Dihydrocodein. Von den untersuchten Opiaten war daher Dihydrocodein der stärkste Hemmstoff. Paracetamol inhibierte mit einem K_i -Wert von 14,19 mM die Bildung von Morphin-3-glucuronid und mit einem K_i -Wert von 17,28 mM die Bildung von Codeinglucuronid. Daher erwiesen sich die Opiate als stärkere Hemmstoffe als Paracetamol. Insgesamt waren die ermittelten K_i -Werte aus den Versuchen mit den Opiaten deutlich kleiner als die der Alkohole.

Bei den Versuchen zur Glucuronidierung von Paracetamol und den Opiaten ohne Inhibitor besaß Morphin mit einem K_m -Wert von 4,62 mM die größte Affinität zu den Enzymen, gefolgt von Codein mit einem K_m -Wert von 9,44 mM und Paracetamol mit K_m -Werten zwischen 19,50 und 25,22 mM. Paracetamol wurde mit V_{max} -Werten zwischen 1,78 und 2,36 nmol/min/mg am schnellsten glucuronidiert, am zweitschnellsten Morphin mit 0,75 nmol/min/mg und am langsamsten Codein mit 0,45 nmol/min/mg.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten In-vitro-Versuche mit menschlichen Lebermikrosomen belegen das große Interaktionspotenzial zwischen Paracetamol, Opiaten und Alkoholen. Überträgt man die Ergebnisse auf die Verhältnisse in vivo, so ist eine verstärkte Lebertoxizität durch Paracetamol möglich, wenn gleichzeitig hohe Mengen an begleitstoffhaltigen alkoholischen Getränken oder Opiaten eingenommen werden.

6 Literatur

Aderjan RE, Skopp G (1998) Formation and clearance of active and inactive metabolites of opiates in humans. *Ther Drug Monit* 20:561-569

Alkharfy KM, Frye RF (2001) High-Performance liquid chromatographic assay for acetaminophen glucuronide in human liver microsomes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 753:303-308

Aw TY, Jones DP (1983) Intracellular inhibition of UDP-glucose dehydrogenase during ethanol oxidation. *Chem Biol Interact* 43:283-288

Balikova M, Maresova V, Habrdova V (2001) Evaluation of urinary dihydrocodeine excretion in human by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 752:179-186

Bank A (2004) Zur Ausscheidung von Glucuroniden aliphatischer Alkohole im Urin nach Konsum alkoholischer Getränke. Inaugural-Dissertation, Med. Fakultät, Universität zu Köln

Bansal SK, Gessner T (1980) A unified method for the assays of uridine diphospho-glucuronyltransferase activities toward various aglycones using uridine diphospho-[U-¹⁴C]-glucuronic acid. *Anal Biochem* 109:321-329

Berghaus G, Graß H (2003) Fahrsicherheit unter Alkoholwirkung. In: Madea B, Brinkmann B *Handbuch gerichtliche Medizin*, Band 2, Springer Verlag, Berlin S.885-925

Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung - BtMVV Lesefassung Stand: 1. Mai 2005 §§ 2,5

Bisswanger H (1994) *Enzymkinetik*. 2.Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim a: S.67-70 b: S.172-177 c: S.98-121 d: S.169-172

Bock KW, Forster A, Gschaidmeier H, Brück M, Münzel P, Schareck W, Fournel-Gigleux S, Burchell B (1993) Paracetamol glucuronidation by recombinant rat and human phenol UDP-Glucuronosyltransferases. *Biochem Pharmacol* 45:1809-1814

Bodd E, Drevon CA, Kveseth N, Olsen H, Morland J (1986a) Ethanol inhibition of codeine and morphine metabolism in isolated rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 237:260-264

Bodd E, Gadeholt G, Christensson PI, Morland J (1986b) Mechanisms behind the inhibitory effect of ethanol on the conjugation of morphine in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 239: 887-890

Bodd E, Green MH, Drevon CA, Morland J (1986c) Interaction of ethanol with codeine metabolism in rat hepatocytes: a multicompartiment model. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 11:239-243

Bolanowska W, Gessner T (1978) Drug Interactions: Inhibition of acetaminophen glucuronidation by drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 206:233-238

- Bonte W, Busse J (1980) Möglichkeiten einer blut- und urinalytischen Getränkeartbestimmung. *Blutalkohol* 17:49-57
- Bonte W (1987) Begleitstoffe alkoholischer Getränke. Max Schmidt-Römhild Verlag, Lübeck a: S.43-46 b: S.54-62 c: S.142-144
- Brunner LJ, Bai S (1999) Simple and rapid assay for acetaminophen and conjugated metabolites in low-volume serum samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 732:323-329
- Burchell B, Nebert DW, Nelson DR, Bock KW, Iyanagi T, Jansen PL, Lancet D, Mulder GJ, Chowdhury JR, Siest G, Tephly TR, Mackenzie PI (1991) The UDP glucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA Cell Biol* 10:487-494
- CESAR - Central European Society for Anticancer Drug Research (2003) SOP 12: Validation of bioanalytical methods. *Onkologie* 26 (suppl 6):52-55
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-3108
- Coffman BL, Rios GR, King CD, Tephly TR (1997) Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 25:1-4
- Court MH, Duan SX, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Patten CJ, Miners JO, Mackenzie PI (2001) Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 299:998-1006
- Court MH, Krishnaswamy S, Hao Q, Duan SX, Patten CJ, von Moltke LL, Greenblatt DJ (2003) Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism. *Drug Metab Dispos* 31:1125-1133
- Draganov P, Durrence H, Cox C, Reuben A (2000) Alcohol-acetaminophen syndrome. Even moderate social drinkers are at risk. *Postgrad Med* 107:189-195
- Dybing E (1976) Inhibition of acetaminophen glucuronidation by oxazepam. *Biochem Pharmacol* 25:1421-1425
- Ebner T, Burchell B (1993) Substrate specificities of two stably expressed human liver UDP-glucuronosyltransferases of the UGT1 gene family. *Drug Metab Dispos* 21:50-55
- Fisher MB, Campanale K, Ackermann BL, VandenBranden M, Wrighton SA (2000a) In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin. *Drug Metab Dispos* 28:560-566
- Fisher MB, Vandenbranden M, Findlay K, Burchell B, Thummel KE, Hall SD, Wrighton SA (2000b) Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics* 10:727-739

- Fujisawa (2002) Fachinformation zu Dolomo[®] TN, München
- Gilg T (2005) Alkoholbedingte Fahruntüchtigkeit. Beurteilung und Begutachtung in der forensischen Praxis, Teil 2. Rechtsmedizin 15:97-112
- Hand CW, Moore RA, McQuay HJ, Allen MC, Sear JW (1987) Analysis of morphine and its major metabolites by differential radioimmunoassay. *Ann Clin Biochem* 24:153-160
- He H, Shay SD, Caraco Y, Wood M, Wood AJ (1998) Simultaneous determination of codeine and its seven metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 708:185-193
- Howie D, Adriaenssens PI, Prescott LF (1977) Paracetamol metabolism following overdose: application of high performance liquid chromatography. *J Pharm Pharmacol* 29:235-237
- Hufschmid E, Theurillat R, Martin U, Thormann W (1995) Exploration of the metabolism of dihydrocodeine via determination of its metabolites in human urine using micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 668:159-170
- Iffland R, Staak M, Rieger S (1982) Experimentelle Untersuchungen zur Überprüfung von Nachtrunkbehauptungen. *Blutalkohol* 19:235-251
- Iwersen S, Schmoldt A (1998) A specific hydroxysteroid UGT is responsible for the conjugation of aliphatic alcohols in rats: an estimation of the importance of glucuronidation versus oxidation. *Alcohol* 15:185-192
- Jurowich S (2002) Hydrolyse und In-vitro-Biosynthese von Glucuroniden aliphatischer Alkohole. Inaugural-Dissertation, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- Jurowich S, Sticht G, Käferstein H (2004) Glucuronidation of aliphatic alcohols in human liver microsomes in vitro. *Alcohol* 32:187-194
- King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR (2000a) UDP-glucuronyltransferases. *Curr Drug Metab* 1:143-161
- King C, Finley B, Franklin R (2000b) The glucuronidation of morphine by dog liver microsomes: identification of morphine-6-O-glucuronide. *Drug Metab Dispos* 28:661-663
- Kirkwood LC, Nation RL, Somogyi AA (1998) Glucuronidation of dihydrocodeine by human liver microsomes and the effect of inhibitors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:266-270
- Kromidas S (2000) Handbuch Validierung in der Analytik. 1.Auflage, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, S.187-195
- Lau GS, Critchley JA (1994) The estimation of paracetamol and its major metabolites in both plasma and urine by a single high-performance liquid chromatography assay. *J Pharm Biomed Anal* 12:1563-1572
- Lederman S, Fysh WJ, Tredger M, Gamsu HR (1983) Neonatal paracetamol poisoning: treatment by exchange perfusion. *Arch Dis Child* 58:631-633

- Leistner E, Breckle SW (1992) Pharmazeutische Biologie I. 4.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.125-131
- Lin JH, Wong BK (2002) Complexities of glucuronidation affecting in vitro - in vivo extrapolation. *Curr Drug Metab* 3:623-646
- Lucas D, Lamboeuf Y, de Saint Blanquat G, Menez JF (1990) Ethanol-inducible cytochrome P-450 activity and increase in acetaldehyde bound to microsomes after chronic administration of acetaldehyde or ethanol. *Alcohol Alcohol* 25:395-400
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Belanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW (1997) The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7:255-269
- Mallach HJ, Hartmann H, Schmidt V (1987) Alkoholwirkung beim Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.19-26
- Manautou JE, Carlson GP (1992) Comparison of pulmonary and hepatic glucuronidation and sulphation of ethanol in rat and rabbit in vitro. *Xenobiotica* 22:1309-1319
- McKarns SC, Hansch C, Caldwell WS, Morgan WT, Moore SK, Doolittle DJ (1997) Correlation between hydrophobicity of short-chain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity. *Fundam Appl Toxicol* 36:62-70
- Mignat C, Wille U, Ziegler A (1995) Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and their glucuronides at opioid receptor subtypes. *Life Sci* 56:793-799
- Miners JO, Lillywhite KJ, Birkett DJ (1988) In vitro evidence for the involvement of at least two forms of human liver UDP-glucuronosyltransferase in morphine 3-glucuronidation. *Biochem Pharmacol* 37:2839-2845
- Miners JO, Lillywhite KJ, Yoovathaworn K, Pongmarutai M, Birkett DJ (1990) Characterization of paracetamol UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 40:595-600
- Miners JO, Mackenzie PI (1991) Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther* 51:347-369
- Moldeus P (1978) Paracetamol metabolism and toxicity in isolated hepatocytes from rat and mouse. *Biochem Pharmacol* 27:2859-2863
- von Moltke LL, Manis M, Harmatz JS, Poorman R, Greenblatt DJ (1993) Inhibition of acetaminophen and lorazepam glucuronidation in vitro by probenecid. *Biopharm Drug Dispos* 14:119-130
- Motulsky HJ, Christopoulos A (2003) Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc., San Diego CA, www.graphpad.com

- Mulder GJ (1992) Glucuronidation and its role in regulation of biological activity of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32: 25-49
- Mundipharma (2003) Fachinformation zu DHC 60/90/120 mg Mundipharma[®], Limburg
- Mundipharma (2001) Fachinformation zu MST 10/30/60/100/200mg, Mundipharma[®], Limburg
- Mutschler E (2001) Arzneimittelwirkungen. 8.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart a: S.21-37 b: S.980-983
- Novartis (2002) Fachinformation zu Benuron[®] Tabletten, München
- Pabba SK, Bolla S, Kandhagatla R, Chaluvadi MR, Krishna DR (2002) Paracetamol metabolism in Indian population. *Arzneimittelforschung* 52:769-772
- Pacifici GM, Back DJ, Orme ML (1988) Sulphatation and glucuronidation of paracetamol in human liver: assay conditions. *Biochem Pharmacol* 37:4405-4407
- Puig JF, Tephly TR (1986) Isolation and purification of rat liver morphine UDP-glucuronosyltransferase. *Mol Pharmacol* 30:558-565
- Rane A, Säwe J, Lindberg B, Svensson JO, Garle M, Erwald R, Jorulf H (1984) Morphine glucuronidation in the rhesus monkey: a comparative in vivo and in vitro study. *J Pharmacol Exp Ther* 229:571-576
- Rumack BH (2004) Acetaminophen misconceptions. *Hepatology* 40:10-15
- Säwe J, Pacifici GM, Kager L, von Bahr C, Rane A (1982) Glucuronidation of morphine in human liver and interaction with oxazepam. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 74:47-51
- Schütz H (1983) Alkohol im Blut: Nachweis und Bestimmung, Umwandlung, Berechnung. Verlag Chemie, Weinheim, S.43-48
- Skopp G, Klinder K, Pötsch L, Zimmer G, Lutz R, Aderjan R, Mattern R (1998) Postmortem distribution of dihydrocodeine and metabolites in a fatal case of dihydrocodeine intoxication. *Forensic Sci Int* 95:99-107
- Soars MG, Ring BJ, Wrighton SA (2003) The effect of incubation conditions on the enzyme kinetics of UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 31:762-767
- Somogyi A, Bochner F, Chen ZR (1991) Lack of effect of paracetamol on the pharmacokinetics and metabolism of codeine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 41:379-382
- Sonne J, Poulsen HE, Loft S, Dossing M, Vollmer-Larsen A, Simonsen K, Thyssen H, Lundstrom K (1988) Therapeutic doses of codeine have no effect on acetaminophen clearance or metabolism. *Eur J Clin Pharmacol* 35:109-111
- SPSS Science Enzyme Kinetics Module 1.1/Sigma Plot (2001) Handbook

- Stone AN, Mackenzie PI, Galetin A, Houston JB, Miners JO (2003) Isoform selectivity and kinetics of morphine 3- and 6-glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferases: evidence for atypical glucuronidation kinetics by UGT2B7. *Drug Metab Dispos* 31:1086-1089
- Strubelt O, Deters M, Pentz R, Siegers CP, Younes M (1999) The toxic and metabolic effects of 23 aliphatic alcohols in the isolated perfused rat liver. *Toxicol Sci* 49:133-142
- Stryer L (1994) *Biochemie*. 3.Auflage, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, S. 17-44
- Svensson JO, Rane A, Säwe J, Sjoqvist F (1982) Determination of morphine, morphin-3-glucuronide and (tentatively) morphine-6-glucuronide in plasma and urine using ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 230:427-432
- Takeda S, Ishii Y, Iwanaga M, Mackenzie PI, Nagata K, Yamazoe Y, Oguri K, Yamada H (2005) Modulation of UDP-glucuronosyltransferase function by cytochrome P450: evidence for the alteration of UGT2B7-catalyzed glucuronidation of morphine by CYP3A4. *Mol Pharmacol* 67:665-672
- Tephly TR (1990) Isolation and purification of UDP-glucuronosyltransferases. *Chem Res Toxicol* 3:509-516
- Tredger JM, Smith HM, Read RB, Portman B, Williams R (1985) Effects of ethanol ingestion on the hepatotoxicity and metabolism of paracetamol in mice. *Toxicology* 36:341-352
- Tredger JM, Smith HM, Read RB, Williams R (1986) Effects of ethanol ingestion on the metabolism of a hepatotoxic dose of paracetamol in mice. *Xenobiotica* 16:661-670
- Uchaipichat V, Mackenzie PI, Guo XH, Gardner-Stephen D, Galetin A, Houston JB, Miners JO (2004) Human UDP-glucuronosyltransferases: isoform selectivity and kinetics of 4-methylumbelliferone and 1-naphthol glucuronidation, effects of organic solvents, and inhibition by diclofenac and probenecid. *Drug Metab Dispos* 32:413-423
- Vree TB, van Dongen RT, Koopman-Kimenai PM (2000) Codeine analgesia is due to codeine-6-glucuronide, not morphine. *Int J Clin Pract* 54:395-398
- Wikipedia-Enzyklopädie (2005) Aminosäuren. <http://de.wikipedia.org/wiki/L-Aminosäure>
- Wilson K, Goulding KH (1991) *Methoden der Biochemie*. 3.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S.107-123
- Xu BQ, Aasmundstad TA, Lillekjendlie B, Bjorneboe A, Christophersen AS, Morland J (1997) Effects of ethanol on ethylmorphine metabolism in isolated rat hepatocytes: characterization by means of a multicompartmental model. *Pharmacol Toxicol* 80:171-181
- Yue Q, von Bahr C, Odar-Cederlöf I, Säwe J (1990) Glucuronidation of codeine and morphine in human liver and kidney microsomes: effect of inhibitors. *Pharmacol Toxicol* 66:221-226

7 Anhang

7.1 Enzymkinetische Auswertung mit SPSS

Enzyme Kinetics Nonlinear Fit Results

Mixed

Number of Replicates: 4

Parameters

	<u>Value</u>	<u>±Std. Error</u>	<u>95% Conf. Interval</u>		
Vmax	4,0996	0,2677	3,5601	to	4,6391
Km	12,5088	1,6644	9,1544	to	15,8633
Ki	162,3127	33,6904	94,4128	to	230,2126

Goodness of Fit

Degrees of Freedom	45
AICc	-208,868
R ²	0,966
Sum of Squares	0,488
Sy.x	0,105
Runs Test p Value	0,284

Data

Number of x values	12
Number of replicates	4
Total number of values	48
Number of missing values	0

Enzyme Kinetics Data Summary

Mixed

Number of Replicates: 4

Paracetamol	R-2-Butanol	Velocity	±Std.Err	Predicted	Max Residual
5,00	0,00	1,1645	4,1264e-2	1,1707	-0,1017
10,00	0,00	1,8198	4,9525e-2	1,8213	0,1387
20,00	0,00	2,4965	3,9146e-2	2,5222	-0,1082
5,00	100,00	0,8198	7,1181e-2	0,7670	0,1770
10,00	100,00	1,2105	3,8283e-2	1,2336	-0,1156
20,00	100,00	1,8520	3,0433e-2	1,7727	0,1533
5,00	150,00	0,6523	5,6087e-2	0,6542	-0,1622
10,00	150,00	1,0710	3,3677e-2	1,0622	-8,4176e-2
20,00	150,00	1,6310	0,0429	1,5434	0,2026
5,00	200,00	0,5658	0,0402	0,5703	0,1107
10,00	200,00	0,8980	5,2050e-2	0,9326	-0,1366
20,00	200,00	1,2305	6,6630e-2	1,3666	-0,2976

Abb. 7.1: Enzymkinetische Auswertung der Inhibitionsversuche mit R-2-Butanol

Enzyme Kinetics Model Comparison

Study Type: Single Substrate - Single Inhibitor

Number of Replicates: 4

Rank by R²	Equation	R²	AICc	Sy.x	Runs Test	Convergence
1	Mixed	0,96644	-208,868	0,10527	pass	Yes
2	Noncompetitive	0,96485	-209,148	0,10773	pass	Yes
3	Competitive	0,95752	-200,063	0,11842	pass	Yes
4	Uncompetitive	0,93334	-178,432	0,14835	pass	Yes

Abb. 7.1 (Fortsetzung): Enzymkinetische Auswertung der Inhibitionsversuche mit R-2-Butanol

7.2 Chromatogramme

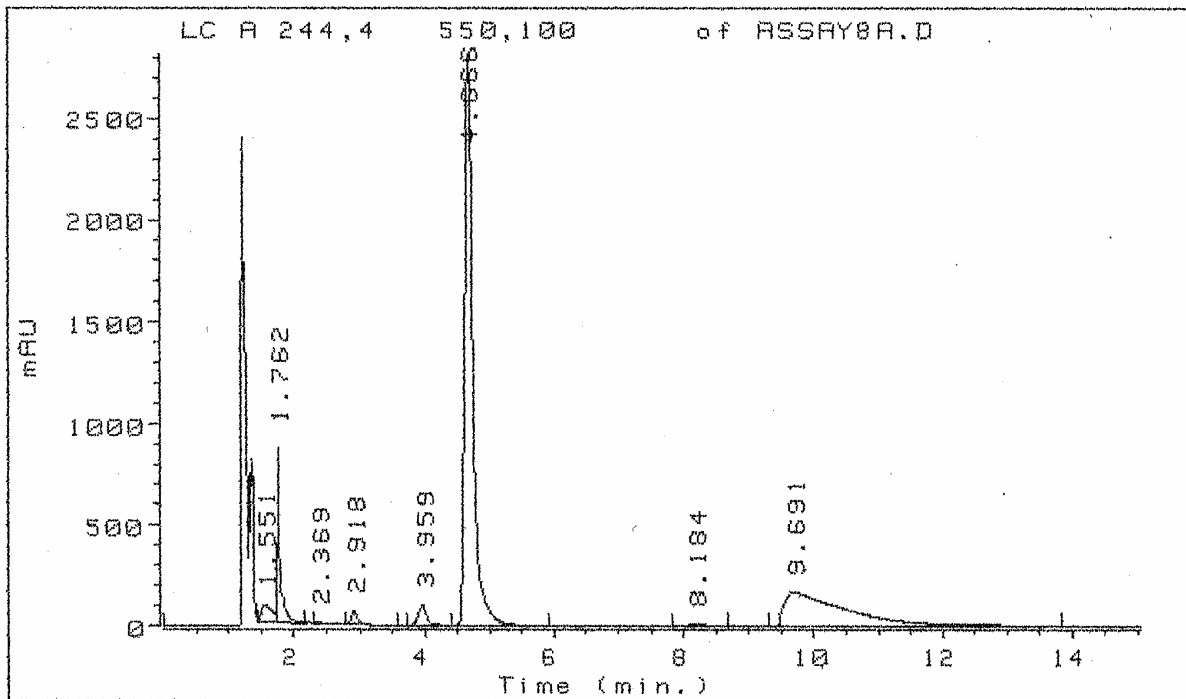


Abb. 7.2: Inkubation mit Paracetamol und Codein

PG: 2,918min; p-Nitrophenolglucuronid: 3,959min; Paracetamol: 4,666min; CG: 8,184min
Codein: 9,691min

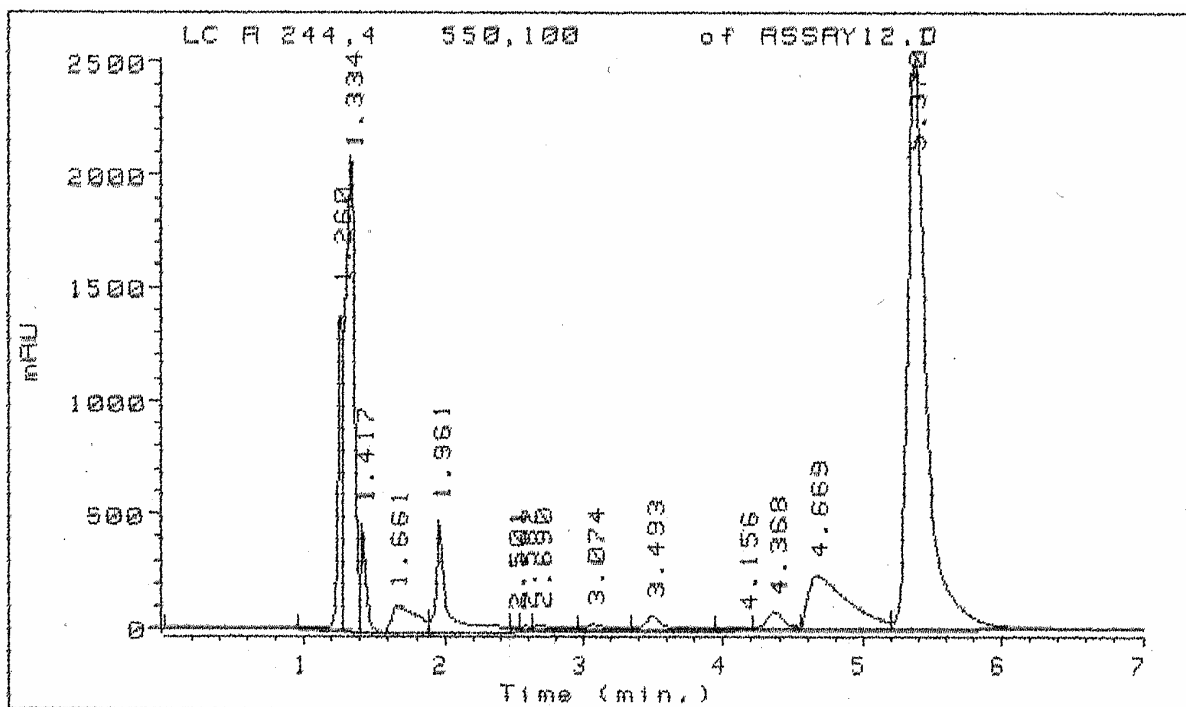


Abb. 7.3: Inkubation mit Paracetamol und Morphin

M3G: 3,074min; PG: 3,493min; p-Nitrophenolglucuronid: 4,368min; Morphin: 4,669min;
Paracetamol: 5,370min

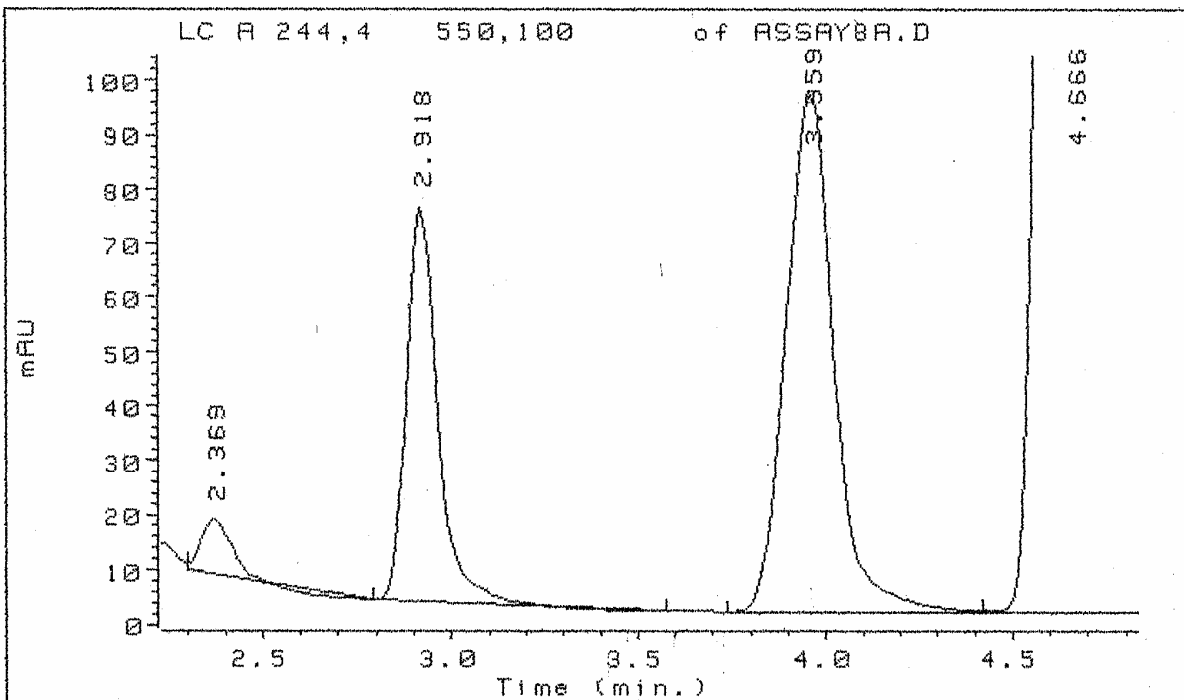


Abb. 7.4: Inkubation mit Paracetamol und Codein; Vergrößerung aus Abb. 7.2
 PG: 2,918min; p-Nitrophenolglucuronid: 3,959min; Paracetamol: 4,666min

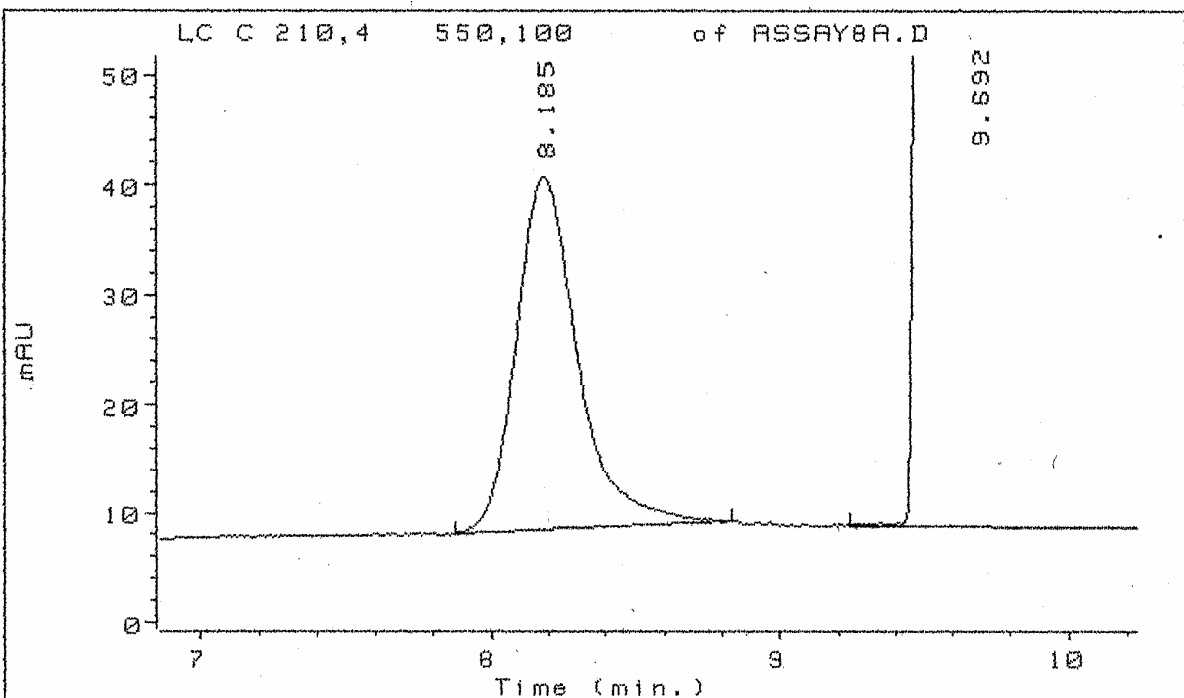


Abb. 7.5: Inkubation mit Paracetamol und Codein, Vergrößerung aus Abb. 7.2
 CG: 8,185min; Codein: 9,692min

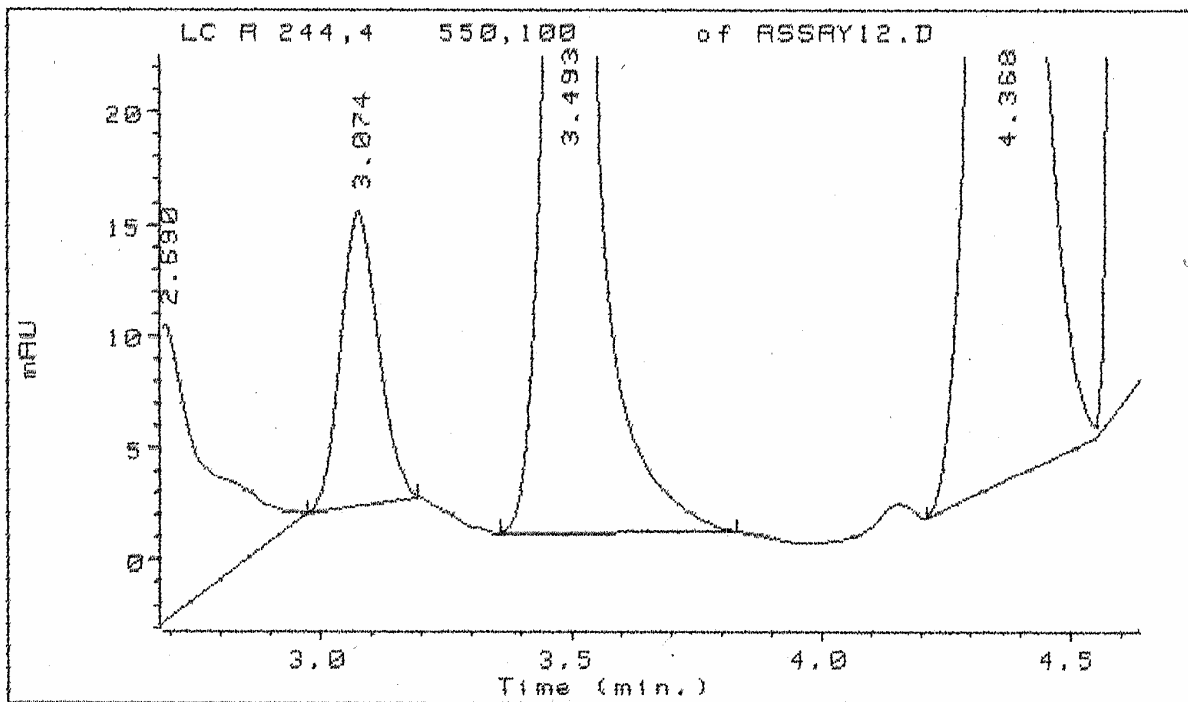


Abb. 7.6: Inkubation mit Paracetamol und Morphin, Vergrößerung von Abb. 7.3
M3G: 3,074min; PG: 3,493min; p-Nitrophenolglucuronid: 4,368min

Kongressmitteilungen / Abstracta zu dieser Arbeit

Boldt P, Käferstein H (2004) Glucuronidierung von Paracetamol, Morphin, Codein und Dihydrocodein in vitro. Vortrag auf der 13. Frühjahrstagung (Nord) der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Köln, Juni 2004

Boldt P, Käferstein H (2004) Glucuronidierung von Paracetamol unter Einwirkung aliphatischer Alkohole in vitro. Vortrag auf der 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Göttingen, September 2004; Abstract in Rechtsmedizin 14:315

Boldt P, Käferstein H (2005) Glucuronidation of paracetamol and the effect of aliphatic alcohols and opiates as inhibitors in vitro. Vortrag auf dem 6th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM), Hamburg, September 2005; Abstract in Rechtsmedizin 15:277