

**Synthese, Pharmakodynamik und Biotransformation
des Fomocain-Derivats Oe 9000**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Thomas Dahse
aus Jena

Jena 2007

Gutachter

1. Prof. Dr. Jochen Lehmann
2. Prof. Dr. Gerhard Scriba
3. Prof. Dr. Gottfried Blaschke

Tag der Doktorprüfung: 14.03.2007

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.05.2007

Danksagungen

Die praktischen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Januar 2003 bis August 2006 am Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie der FSU Jena durchgeführt.

Bei all denen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben, möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn **Prof. Dr. Dres. h.c. mult. H. Oelschläger** für die Überlassung des anspruchsvollen Themas und Herrn **Prof. Dr. J. Lehmann** für die Übernahme der „Doktorvaterschaft“ nach dem Ableben von Prof. Oelschläger. Ihre Unterstützung und Förderung waren wichtige Grundlage für den Erfolg dieser Arbeit.

Ferner gilt mein Dank den Arbeitsgruppen von Herrn **Prof. Dr. Hans-Georg Schaible** und Herrn **Prof. Dr. Axel A. Brakhage** für die Durchführung der elektrophysiologischen bzw. pharmakologisch-toxikologischen Untersuchungen, wobei ich besonders Herrn **Dr. rer. nat. Hans-Martin Dahse**, Frau **Dr. rer. nat. Ute Möllmann** und Herrn **Dr. rer. nat. Albert Härtl** und ihren Mitarbeitern für die umfangreiche Charakterisierung der neuen Substanzen in *In-vitro*-Versuchen danke.

Besonders möchte ich die gute wissenschaftliche Betreuung und technische Unterstützung des elektrophysiologischen Teils der Arbeit durch Herrn **Dr. rer. nat. Gabriel Natura** sowie Herrn **Holger Sack** und den unermüdlichen Einsatz von Herrn **Christian Feller** bei der Durchführung der *Patch-Clamp*-Experimente hervorheben, wofür ich besonders dankbar bin.

Weiterhin danke ich den Arbeitsgruppen von Herrn **Prof. Dr. Dieter Müller** und Herrn **Prof. Dr. Christian Fleck** für die Betreuung und Durchführung der Tierversuche und der Inkubationsversuche mit Präzisionsleberschnitten.

Den Herren **PD Dr. phil. nat. Andreas Seeling**, **Dr. rer. nat. Johannes Wange**, **Apotheker Uwe Conrad** und **Prof. Dr. Ingo Dahse** danke ich für die kritische inhaltliche und formelle Durchsicht des Manuskripts und für die damit verbundenen Anregungen.

Ferner danke ich Herrn **Dr. rer. nat. Wolfgang Günther** und seinen Mitarbeiterinnen für die Aufnahme der NMR-Spektren, Frau **Dr. rer. nat. Christine Oberthür**, Herrn **Apotheker Georg-Ulrich Rüster** und Frau **Dipl.-Biol. Yvonne Schröter** für die Hilfestellungen bei den LC-MS-Messungen und Frau **Dipl.-Apothekerin Kirsten Dahse** für die Charakterisierung der oberflächenaktiven Eigenschaften der Substanzen.

Darüber hinaus möchte ich meinen **Kollegen** am Lehrstuhl und den **studentischen Hilfskräften** danken, die mich bei vielen Details meiner Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gebührt nicht zuletzt meiner **Familie** für die immerwährende Hilfe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der synthetisierten Verbindungen	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Lokalanästhesie	1
1.1.1. Lokalanästhetika an ihrem Wirkort	1
1.1.2. Durchführung der Lokalanästhesie	2
1.2. Wirkmechanismus der Lokalanästhetika	3
1.2.1. Struktur spannungsabhängiger Na ⁺ -Kanäle	3
1.2.2. Konformative Zustände spannungsabhängiger Na ⁺ -Kanäle	4
1.2.3. Wechselwirkungen der Lokalanästhetika mit ihrem Bindungsareal	6
1.2.4. Aktivitätsabhängige Wirkung	7
1.2.5. Weitere Wirkmechanismen von Lokalanästhetika	8
1.3. Struktur-Wirkungs-Beziehungen	9
1.3.1. Bauprinzip der Lokalanästhetika nach Löfgren	9
1.3.2. Lokalanästhetika vom Typ I: Basisch substituierte Benzoesäureester	10
1.3.3. Lokalanästhetika vom Typ II: Basisch substituierte Aryl-carbonsäureamide	12
1.3.4. Lokalanästhetika vom Typ III: Basisch substituierte Anilide	12
1.3.5. Lokalanästhetika vom Typ IV: Basisch substituierte Aryl-alkyl-ketone	17
1.3.6. Lokalanästhetika vom Typ V: Basisch substituierte Aryl-alkyl-ether	17
1.3.7. Lokalanästhetika vom Typ VI: Basisch substituierte Alkylbenzyl-phenyl-ether (Fomocaine)	18
1.3.8. Lokalanästhetika vom Typ VII: Basisch substituierte Phenylcarbamate	18
1.3.9. Sonstige	19
1.4. Resorption und Metabolismus von Lokalanästhetika	20
1.5. Fomocain	23
1.5.1. Fomocain als Oberflächenanästhetikum	23
1.5.2. Biotransformation des Fomocain	25
2. ZIELSTELLUNG	27

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	29
3.1. Synthesen der Referenzsubstanzen	29
3.1.1. Syntheseplanung und -durchführung	29
3.1.2. Synthesen des Oe 9000 und der postulierten stickstoffhaltigen Metaboliten	30
3.1.3. Synthesen der stickstofffreien Metaboliten	32
3.1.4. Synthesen weiterer postulierter Metaboliten und neuartiger Oe 9000-Derivate	33
3.2. Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen hinsichtlich Identität, Reinheit und Lagerstabilität	35
3.2.1. Kernresonanzspektroskopie	35
3.2.2. UV-Spektroskopie	39
3.2.3. IR-Spektroskopie	40
3.2.4. Prüfungen der Substanzen auf Reinheit	42
3.2.5. Gaschromatographische Analyse der Syntheseprodukte	42
3.2.6. Untersuchung der Stabilität der Phase-I-Metaboliten	44
3.3. Biopharmazeutische Untersuchungen	45
3.3.1. Qualitative und quantitative Analyse der Metaboliten in den Biotransformationsmodellen	45
3.3.2. Wahl geeigneter Tierspezies für die Biotransformation	49
3.3.3. <i>In-vitro</i> -Biotransformation von Oe 9000 mit Schweineleberhomogenaten	51
3.3.4. <i>In-vitro</i> -Biotransformation von Oe 9000-Metaboliten mit Schweineleberhomogenaten	54
3.3.5. Inkubation von präzisionsgeschnittener Rattenleber mit Oe 9000	58
3.3.6. <i>In-vivo</i> -Biotransformation von Oe 9000 bei der Ratte	66
3.3.7. Oe 9000-Metabolisierung mit humanen Präzisionsleberschnitten	70
3.3.8. Fazit und Ausblick	77
3.4. Pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen	78
3.4.1. Zytotoxizität und antiproliferative Wirkungen von Oe 9000 seinen Derivaten	78
3.4.2. Antimikrobielle Eigenschaften von Oe 9000 und seinen Derivaten	81
3.4.3. Antioxidative Wirkungen von Oe 9000 und seinen Derivaten	85
3.5. Biophysikalische Untersuchungen	87
3.5.1. Untersuchung des Wirkmechanismus von Oe 9000	87
3.5.2. Bestimmung der Oberflächenaktivitäten von Oe 9000, Fomocain und OeDimer	96

4. MATERIAL UND METHODEN	99
4.1. Synthesen	99
4.1.1. Synthese von Oe 9000 und dessen Hydrochlorid	99
4.1.2. Synthesen der stickstoffhaltigen Metaboliten	100
4.1.3. Synthesen der stickstofffreien Referenzsubstanzen POMPBUOH, POMPBA, POMPBAld und POMPEs	104
4.1.4. Synthesen der postulierten Metaboliten POMPBAm und BHABBA	107
4.1.5. Synthesen von OeDimer und 2-Nitro-Oe 9000	110
4.2. Analytische Methoden	113
4.2.1. Chromatographische Methoden	113
4.2.2. Spektroskopische Methoden	119
4.2.3. Weitere analytische Methoden	120
4.3. Biopharmazeutische Untersuchungsverfahren	120
4.3.1. <i>In-vitro</i> -Metabolisierung von Oe 9000 und Oe 9000-Metaboliten mit Leberhomogenaten	120
4.3.2. <i>In-vitro</i> -Metabolisierung von Oe 9000 mit Präzisionsleberschnitten	126
4.3.3. <i>In-vivo</i> -Biotransformationsversuch von Oe 9000-HCl an der Ratte	128
4.3.4. Umsetzung von POMPBAld mit ALDH-1	129
4.4. Pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen	129
4.4.1. Test auf antiproliferative Wirkungen der Substanzen	129
4.4.2. Test auf Zytotoxizität	130
4.4.3. Test auf Radikalfängereigenschaften und antioxidative Wirkungen der Oe 9000-Derivate	130
4.4.4. Untersuchung der antibiotischen und antifungalen Wirkungen von Oe 9000 und seinen Derivaten	133
4.5. Biophysikalische Untersuchungsverfahren	134
4.5.1. <i>Patch-Clamp</i> -Untersuchungen	134
4.5.2. Charakterisierung der oberflächenaktiven Eigenschaften einiger Verbindungen mittels Wilhelmy-Platten-Methode	136
5. ZUSAMMENFASSUNG	138

ANHANG

Abkürzungsverzeichnis	A1
Literaturverzeichnis	A4
Abbildungsverzeichnis	A19
Tabellenverzeichnis	A22
Übersicht über die antimikrobiellen Effekte von Oe 9000 und seinen Derivaten	A23
Kalibrierung der Referenzsubstanzen im Rattenkot	A24
Patientenprofil der Leberspenderin	A25
Lebenslauf	
Ehrenwörtliche Erklärung	

Verzeichnis der synthetisierten Verbindungen

Code	IUPAC-Name
Oe 9000	2,2'-[4-(4-Phenoxyethylphenyl)butylimino]diethanol
Oe 9000-N-oxid	2,2'-[4-(4-Phenoxyethylphenyl)butylimino]diethanol-N-oxid
4-OH-Oe 9000	2,2'-{4-[4-(4-Hydroxy-phenoxyethyl)phenyl]butylimino}diethanol
2-OH-Oe 9000 ¹	2,2'-{4-[4-(2-Hydroxy-phenoxyethyl)phenyl]butylimino}diethanol
4-OH-Oe 9000-N-oxid	2,2'-{4-[4-(4-Hydroxyphenoxyethyl)phenyl]butylimino}diethanol-N-oxid
Oe 9000-Säure	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)- <i>N</i> -[4-(4-phenoxyethylphenyl)butyl]glycin
POMPBA _m Et	2-[4-(4-Phenoxyethylphenyl)butylamino]ethanol
POMPBA _n i	4-(4-Phenoxyethylphenyl)butyronitril
POMPBA _m	4-(4-Phenoxyethylphenyl)butylamin
POMPBA _{OH}	4-(4-Phenoxyethylphenyl)butan-1-ol
POMPBA _{ld}	4-(4-Phenoxyethylphenyl)butanal
POMPBA	4-(4-Phenoxyethylphenyl)buttersäure
POMPBA _{Es}	(4-Phenoxyethylphenyl)essigsäure
BHABBA	4-{4-[Bis(2-hydroxyethyl)amino]butyl}benzoesäure
Methyl-BHABBA	4-[4-Bis(2-hydroxyethyl)aminobutyl]benzoesäure-methylester
OeDimer	2,2'-(4-{4-[4-(4-{4-[Bis(2-hydroxyethyl)aminobutyl]-phenylmethoxy)phenoxyethyl]phenyl}butylimino)diethanol
2-Nitro-Oe 9000	2,2'-{4-[4-(2-Nitro-phenoxyethyl)phenyl]butylimino}diethanol
2-Amino-Oe 9000 ¹	2,2'-{4-[4-(2-Amino-phenoxyethyl)phenyl]butylimino}diethanol
Oe 7000	2,2'-[3-(4-Phenoxyethylphenyl)propylimino]diethanol

¹ nicht als Reinprodukt erhalten

Code	IUPAC-Name
Bis(POMPb)AmEt	2-{Bis[4-(4-phenoxyethylphenyl)butyl]amino}ethanol
1	(4-Chlorbutyl)benzen ²
2	1-(4-Chlorbutyl)-4-(chloromethyl)benzen ³
2a	1-(4-Chlorbutyl)-2-(chloromethyl)benzen ⁴
2b	1-(4-Chlorbutyl)-3-(chloromethyl)benzen ⁴
3	1-(4-Chlorbutyl)-4-(phenoxyethyl)benzen
4	4-{4-(4-Chlorbutyl)benzyloxy}phenyl-benzoat
5	4-(4-Phenoxyethylphenyl)butyl-formiat
6	1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxyethyl)benzen
7	(4-Brombutyl)benzen ²
8	1-[4-(4-Brombutyl)phenyl]ethanon
9	4-(4-Brombutyl)benzoesäure
10	1-(4-Brombutyl)-4-(phenoxyethyl)benzen
11	1,4-Bis[4-(4-chlorbutyl)benzyloxy]benzen
12	1-[4-(4-Chlorbutyl)benzyloxy]-2-nitrobenzen

² kommerziell erhältliches Synthese-Edukt³ nicht als Reinprodukt erhalten⁴ Synthese-Nebenprodukt

1. Einleitung

1.1. Lokalanästhesie

1.1.1. Lokalanästhetika an ihrem Wirkort

Lokalanästhetika (LA) heben örtlich begrenzt und reversibel die Erregbarkeit der schmerzvermittelnden Endorgane und das Leitungsvermögen der sensiblen Nervenfasern auf. In der Folge wird die Schmerzempfindung ohne Beeinträchtigung des Bewusstseins vorübergehend ausgeschaltet. Die Fähigkeit der LA, die Auslösung und Weiterleitung von Aktionspotentialen (AP) zu inhibieren, ist dabei nicht auf sensible Nerven beschränkt. In ausreichend hohen Konzentrationen können sie ihre Wirkung an jedem Nervenfasertyp entfalten, doch reagieren sensible, sensorische, motorische und autonome Nervenfasern je nach Durchmesser und Komplexität im Aufbau (mit/ohne Myelinisierung) mit unterschiedlicher Sensitivität auf LA (Tab. 1), [Begaud und Montastruc 1998, Mutschler et al. 2001, Seeling 1996]. Die Leitung von AP wird in den dünnen A_δ-, B- und C-Fasern in der Regel bei geringeren Konzentrationen geblockt als in den dickeren A_α-, A_β- oder A_γ-Fasern. Die Reizleitung wird daher im Allgemeinen in der Abfolge der Reize Schmerz, Geschmack, Wärme/Kälte, Berührung, Druck – und zuletzt – motorische Funktion inhibiert [Catterall und Mackie 2006].

Typ	Markscheide	Durchmesser [μM]	Leitungsgeschwindigkeit [m/s]	Leitungsfunktion	klinische Empfindlichkeit für Blockade
A-Fasern					
A _α	ja	6 – 22	10 – 85	efferent: motorisch afferent: Propriozeption	+
A _β	ja	5 – 12	10 – 85	afferent: von Hautrezeptoren (Druck- und Berührungsempfindung)	++
A _γ	ja	3 – 6	15 – 35	efferent: motorisch zu Muskelspindeln	++
A _δ	ja	1 – 4	5 – 25	afferent: Temperatur, Schmerz, mechanische Reize	+++
B-Fasern	ja	< 3	3 – 15	präganglionär sympathisch	++++
C-Fasern					
Hinterwurzelfasern	nein	0,4 – 1,2	0,7 – 1,3	afferent: Schmerz, Temperatur, mechanische Reize	++++
sympathische Fasern	nein	0,3 – 1,3	0,1 – 2,0	postganglionär sympathisch	++++

Tab. 1: Ansprechbarkeit der Nervenfasern auf Lokalanästhetika (modifiziert nach Catterall und Mackie 2006)

Dieses als differenzielle Blockade benannte Phänomen tritt bei Bupivacain beispielsweise wesentlich stärker auf als bei dem strukturverwandten Etidocain, obwohl beide nahezu identische physikochemische Eigenschaften aufweisen [Atanassoff et al. 1996, Axelsson 1989]. Dies ist ein Indiz für die hohe Spezifität der zugrunde liegenden Wechselwirkungen der LA mit ihren Bindungsstellen, insbesondere mit verschiedenen Isoformen spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle (Na_v -Kanäle, siehe Kapitel 1.2.). Da sich die einzelnen Nervenfasertypen erheblich in ihrer Ausstattung mit Na_v -Kanälen unterscheiden, sind sie verschieden empfänglich für einen Angriff des LA. Als weitere Ursachen für die differenzielle Blockade werden Unterschiede der verschiedenen Nervenfasertypen in ihrem Myelinisierungsgrad, ihrer Dimension und ihren internodialen Abständen diskutiert. Da für eine Impulsauslöschung eine Mindestanzahl an Internodien inhibiert werden müssen, könnten dünne Fasern mit kleinen internodialen Abständen, die über kurze Diffusionsstrecken zu erreichen sind, schneller inhibiert werden als dicke Fasern mit ihren größeren internodialen Abständen [Catterall und Mackie 2006, Raymond und Gissen 1987].

1.1.2. Durchführung der Lokalanästhesie

Je nach Applikationsart unterscheidet man die im Folgenden erläuterten vier Formen der Lokalanästhesie.

Bei der **Oberflächenanästhesie** wird das LA auf die Haut, Schleimhaut oder Wunde aufgebracht. Der Wirkstoff diffundiert zu den sensiblen Endorganen und den terminalen Nervenverzweigungen und erzielt eine Linderung von Juckreiz und Schmerzen. Soll das LA die intakte Haut penetrieren, sind Okklusivverbände, Pflaster oder penetrationsfördernde Zusätze erforderlich.

Bei der **Infiltrationsanästhesie**, die beispielsweise bei kleineren Eingriffen in der Dentologie durchgeführt wird, injiziert man das LA flächig in das Operationsgebiet, wodurch sensible Nozizeptoren und Endigungen der kleinen Nervenstämmen erreicht werden. Größere Gebiete können hingegen in der **Leitungsanästhesie** durch gezieltes Umspritzen bestimmter Nerven schmerzfrei gestellt werden, wodurch die Weiterleitung der im Operationsgebiet ausgelösten AP unterbunden wird. Typische Anwendungen sind chirurgische Eingriffe an den Extremitäten oder in der Dentologie. Sonderformen der Leitungsanästhesie sind die Spinalanästhesie, bei der durch Injektion in den Subarachnoidalraum Spinalnerven erreicht werden, ferner die Epiduralanästhesie und die Paravertebralanästhesie. Im Gegensatz zur Spinalanästhesie wird bei der Epiduralanästhesie die harte Hirnhaut (Dura) nicht durchstoßen und das LA in den Epiduralraum appliziert. Spinalnerven, die diesen Bereich durchziehen, können somit geblockt werden. Spinal- und Epiduralanästhesie werden vor allem zur Geburtshilfe eingesetzt und kommen bei urologischen, gynäkologischen und chirurgischen Eingriffen zur Anwendung. Die Blockade einzelner Spinalnervenwurzeln kann auch durch eine Lokalanästhetika-Applikation außerhalb der Wirbelsäule (paravertebral) erfolgen.

Bei der **intravenösen Regionalanästhesie** wird das LA nach Anlegen einer Blutdruckmanschette in eine Extremität injiziert. Die Substanz verteilt sich im Gewebe und bewirkt Schmerzfreiheit nach 10 – 15 min. Die Blutleere muss noch weitere 20 – 30 min aufrecht erhalten werden, um eine hinreichende Verteilung des LA in das Gewebe der Extremität zu gewährleisten, sodass nach Wiederherstellung der Blutzirkulation nur mit einem flachen Anstieg der Konzentration des LA im zentralen Kompartiment gerechnet werden muss [Büch und Rummel 1996, Loy et al. 2003, Mutschler 2001].

1.2. Wirkmechanismus der Lokalanästhetika

1.2.1. Struktur spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle

Seit dem ausgehenden 19. Jh. wurde die Wirkung der LA an den Membranen von Neuronen vermutet [Meyer 1899, Overton 1901]. Heute ist allgemein akzeptiert, dass der Hauptwirkmechanismus der LA die Interaktion an einer oder mehreren Bindungsstellen an spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen einschließt [Catterall und Mackie 2006]. Na_v-Kanäle sind integrale Membranproteine, die mit hoher Selektivität Na⁺-Ströme, die an der Auslösung und Weiterleitung von AP in Nerven- und Muskelzellen beteiligt sind, leiten [z.B. Review Yarov-Yarovoy 2002]. Ihre Struktur und ihre biophysikalischen Eigenschaften seien daher im Folgenden beleuchtet.

Na_v-Kanäle bestehen aus einer etwa 1950 Aminosäuren zählenden α -Untereinheit (Molekulargewicht ca. 260 kDa), die mit einer oder mehreren kleineren β -Untereinheiten (33 – 38 kDa) über Disulfidbrücken und/oder Nebervalenzkräfte assoziiert ist [Catterall 2000, Nau et al. 2004]. Die α -Untereinheit formt mit ihren 4 homologen Domänen die Porenregion für den Ionendurchtritt. Jede Domäne ist aus jeweils 6 helikalen Segmenten (S1-S6) aufgebaut. Die Segmente S5 und S6 jeder Domäne bilden zusammen mit den kurzen Schleifen zwischen ihnen, den P-Schleifen, die Wände der Pore, wobei die P-Schleifen als Selektivitätsfilter für Natrium-Ionen dienen [Catterall und Mackie 2006, Yarov-Yarovoy et al. 2002]. Im äußeren Bereich der Pore gelegen, tragen sie als gemeinsames Strukturmerkmal die selektivitätsbestimmende Aminosäuresequenz DEKA. Wird DEKA in den Domänen I-IV durch eine EEEE-Struktur ersetzt, wird der Na_v-Kanal Ca²⁺-selektiv [Catterall 2000].

Die Spannungsempfindlichkeit des Kanals ist durch die hohe Dichte an positiven Ladungen der S4-Segmente gegeben, die durch das Vorkommen repetitiver Motive protonierter Lysin- und Argininreste in der Aminosäuresequenz begründet ist. Eine Änderung des Membranpotentials zu weniger negativen Werten führt zu einer Relativbewegung der S4-Segmente gegenüber den übrigen Segmenten in Richtung des Zelläußeren, was die Kanalöffnung auslöst, während eine Hyperpolarisation eine Einwärtsbewegung der S4-Segmente bewirkt und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit reduziert [Scholz 2002].

Mittlerweile wurden neun verschiedene α -Untereinheiten von Na_v -Kanälen kloniert und exprimiert sowie vier β -Untereinheiten identifiziert [Catterall und Mackie 2006, Ogata et al. 2002]. Letztere modulieren die Aktivierungs- und Deaktivierungs-Charakteristik der verschiedenen Na_v -Kanäle und beeinflussen wahrscheinlich über Zell-Zell-Interaktionen durch Bindung an die extrazellulären Matrixproteine Tenascin C und R die Na_v -Kanal-Verteilung innerhalb der Membran [Catterall 2000, Scholz 2002].

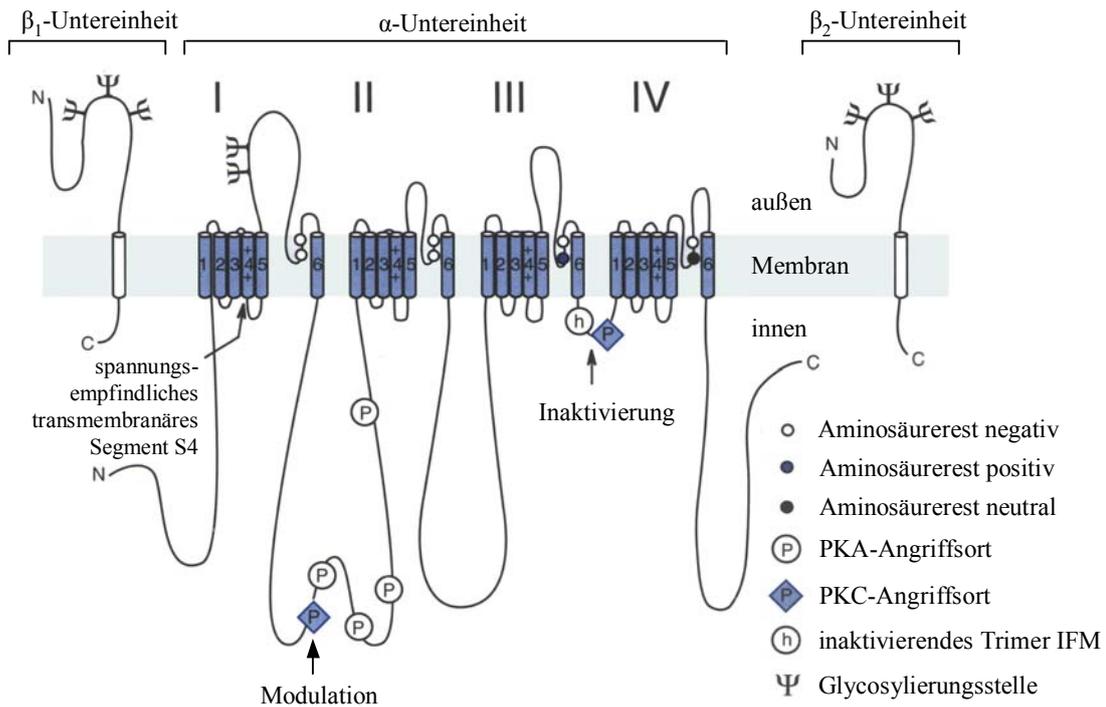


Abb. 1: Struktur und Funktion von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen am Bsp. des $\text{Na}_v1.2$ -Kanals aus Rattenhirn. Zylinder stellen transmembranäre α -Helices dar. Die α -Untereinheit besteht aus vier homologen Domänen (I-IV), die jeweils aus den sechs transmembranären Segmenten (1-6) aufgebaut sind. Die S5-S6-Segmente und die sie verbindenden P-Schleifen jeder Domäne formen die Wand der Pore. Über Proteinphosphorylierung durch die Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) werden Aktivierbarkeit und Geschwindigkeit der Inaktivierung moduliert [nach Catterall und Mackie 2006; modifiziert].

1.2.2. Konformative Zustände spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle

Na_v -Kanäle ändern ihre Konformation in Abhängigkeit vom Membranpotential. Dabei unterscheidet man zwischen dem leitenden (offenen) Zustand und nichtleitenden Zuständen (geschlossen bzw. inaktiviert).

Bei einem Ruhepotential von -70 mV ist die innere Pore des Kanals geschlossen. Die Überschreitung des Schwellenpotentials bewirkt die Öffnung des Kanals und damit den Einstrom von Natrium-Ionen

entsprechend ihrem elektrochemischen Gradienten ins Zellinnere, wodurch die Membran depolarisiert wird. Die Auswärtsbewegung der S4-Segmente bei der Kanalöffnung soll bereits die Überführung in den inaktiven Zustand einleiten [Catterall 2000], wobei zwischen schneller und langsamer Inaktivierung differenziert wird.

Die schnelle Inaktivierung erfolgt eine bis wenige Millisekunden nach dem Öffnen des Kanals. Wie ein Deckel legt sich dabei die P-Schleife (vgl. Abb. 1) zwischen den Domänen DIII und DIV auf die intrazelluläre Porenöffnung. Diese Konformation wird durch die Bindung eines hydrophoben Isoleucin-Phenylalanin-Methionin-Sequenzabschnitts („IFM-Partikel“) an den Inaktivierungstor-Rezeptor (*inactivation gate receptor*) des Kanals stabilisiert. Schnell inaktivierte Kanäle bleiben für einige Millisekunden refraktär. Langsame Inaktivierung, die bei anhaltender Depolarisation auftritt, führt hingegen zu verlängerten Refraktärzeiten von mehreren Millisekunden bis Minuten [Scholz 2002].

Der Übergang vom inaktivierten in den geschlossenen Zustand ist spannungs- und kanaltypabhängig. Zwischen den einzelnen Na_v-Kanal-Isoformen bestehen außerdem beträchtliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Expression, ihrer Schwellenpotentiale, ihrer Öffnungskinetik und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren (vgl. Tab. 2).

Zur Differenzierung einzelner Na⁺-Ströme ist die Empfindlichkeit gegenüber Tetrodotoxin (TTX) von herausragender Bedeutung. Während die Kanäle Na_v1.1 – 1.4 sowie Na_v1.6 und Na_v1.7 im unteren nanomolaren Bereich durch TTX blockiert werden (Tab. 2), ist dessen Affinität zu Na_v1.5, Na_v1.8 und Na_v1.9 aufgrund eines Austauschs einer einzelnen Aminosäure in Domäne I um mindestens zwei Zehnerpotenzen verringert [Catterall 2000].

Die Schwellenpotentiale für TTX-resistente (TTX-r) Kanäle liegen bei deutlich positiveren Werten als für TTX-sensitive (TTX-s) Kanäle. Außerdem sind sowohl die Kanalöffnung als auch die -inaktivierung langsamer als bei den TTX-s Kanälen (Gold 1999, Ogata 1993). Diese biophysikalischen Eigenschaften der Na_v-Kanäle und auch deren Dichte, Verteilung und Modulation bestimmen maßgeblich die Erregbarkeit der Neuronen.

Tab. 2: Biophysikalische Eigenschaften von klonierten und heterolog exprimierten TTX-sensitiven α -Untereinheiten in Säugetier-Zelllinien (nach Clare et al. 2000).

Kanal	Na _v 1.1	Na _v 1.2	Na _v 1.3	Na _v 1.6
Schwellenpotential V _{1/2} in mV	-33 ± 1	-24 ± 2	-23 ± 3	-29 ± 2
Geschwindigkeit der Inaktivierung in ms	0,67 ± 0,03	0,78 ± 0,04	0,81 ± 0,06	1,08 ± 0,06
K ₁ (TTX) in nmol/l	5,9 (5,0 – 7,0)	13,3 (11,2 – 15,9)	4,3 (3,5 – 5,2)	2,5 (1,9 – 3,4)

offizieller Name	traditioneller Name	Name des Gens	TTX-Empfindlichkeit	hauptsächliches Vorkommen	Expression in DRG
Na _v 1.1	type I, rat I, Scn 1a, HBSCI, GPBI	SCN1A	S	ZNS, PNS	+++
Na _v 1.2	type II, rat II, HBSCII, HBA	SCN2A	S	ZNS	+
Na _v 1.3	type III, rat III	SCN3A	S	ZNS (Embryo)	hochreguliert nach Axotomie
Na _v 1.4	SkM1, μ 1	SCN4A	S	Skelettmuskel	–
Na _v 1.5	SkM2, rH1, H1	SCN5A	R	Herzmuskel	–
Na _v 1.6	type IV, NaCh6, Na6, PN4, Scn8a, CerIII	SCN8A	S	ZNS, PNS, Ranviersche Gliaknoten	+++
Na _v 1.7	PN1, hNE, Nas	SCN9A	S	Schwann-Zellen (PNS)	+++
Na _v 1.8	SNS, PN3, NaNG	SCN10A	R	sensorische Neurone (PNS)	+++
Na _v 1.9	SNS2, NaN, NaT, SCN12A	SCN11A	R	PNS	+++
Na _x	Na _v 2.1, Na _v 2.2, Na _v 2.3, SCL11, NaG	SCN6A (SCN7A)	R	Herz, Uterus, Glia, PNS, Skelettmuskel	+

Tab. 3: Eigenschaften der α -Untereinheiten der spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle (Na_v) und des konzentrationsabhängigen Na_x-Kanals, modifiziert nach Ogata et al. [2002]. PNS = peripheres Nervensystem

1.2.3. Wechselwirkungen der Lokalanästhetika mit ihrem Bindungsareal

LA gelangen im Regelfall von intrazellulärer oder membranärer Seite aus zu ihrer Bindungsstelle ins Innere der Ionenpore [Hille 1977]. Die Lokalisation des Bindungsareals ist Ragsdale et al. [1994] in Mutageneseversuchen an in *Xenopus*-Oozyten exprimierten Ratten-Na_v1.2-Kanälen gelungen. Er erkannte die Wechselwirkung von Etidocain mit den Aminosäuren Phenylalanin F1764 und Tyrosin Y1771 des Segments 6 der Domäne IV. Inzwischen wurden auch für weitere LA vom Anilidtyp und einige Antiarrhythmika wie Phenytoin Interaktionen mit dieser Bindungsstelle festgestellt, sodass eine Verallgemeinerung dieser Ergebnisse auf andere Lokalanästhetikagruppen zulässig erscheint [Catterall 1999 und 2000].

Yarov-Yarovoy et al. [2002] erweiterten die Vorstellung vom Lokalanästhetika-Bindungsareal mit einem computergestützten 3D-Modell (siehe Abb. 2). Diesem wurden neuere, ebenfalls aus Mutageneseuntersuchungen gewonnene Erkenntnisse um die Beteiligung von Aminosäuren aus den Abschnitten IS6 und IIS6 neben den benannten in IVS6 an der Bindung von LA zugrunde gelegt. Die Lokalanästhetika-Bindungsstelle soll demnach im Zentrum dieser drei S6-Segmente liegen. Die Kontaktpunkte zwischen Aminosäuren und LA werden als beweglich angenommen und differieren sowohl phasen- als auch kanaltypabhängig. Hierin liegen nach aktuellem Kenntnisstand die

Unterschiede in den Selektivitäten und Affinitäten der LA für die verschiedenen Kanaltypen begründet [Nau et al. 2004]. Die LA-vermittelte Blockade der Na_v-Kanäle resultiert aus der Immobilisation des Spannungssensors in Domäne III während der Inaktivierungsphase [Fozzard et al. 2005]. Dadurch wird die Überführung der Kanäle vom inaktivierten in den geschlossenen Zustand verzögert.

Aufgrund der relativ geringen Bindungsaffinitäten der LA zu den Na_v-Kanälen mit K_I-Werten $\geq 10^{-6}$ M und wegen der unterschiedlichen Beteiligung der in Nachbarschaft von F1764 und Y1771 liegenden Aminosäuren des Na_v1.2-Kanals an der Bindung der Arzneistoffe spricht man bevorzugt von einem Bindungsareal anstatt von einem Lokalanästhetika-Rezeptor [Lee-Son et al. 1992].

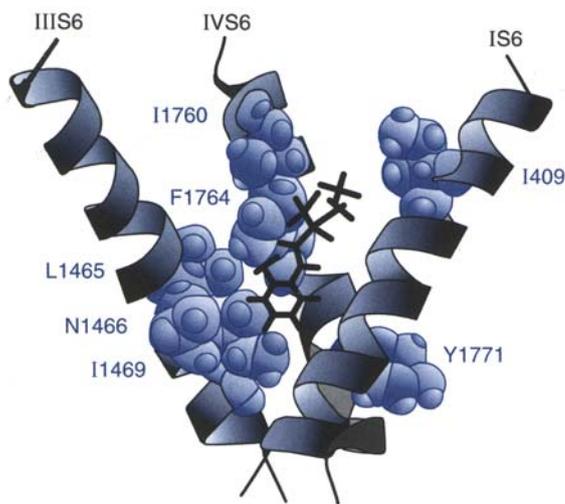


Abb. 2: 3D-Modell der Interaktion eines LA mit den S6-Segmenten der Domänen I, III und IV des Na_v1.2-Kanals der Ratte. Die an der Bindung des LA vermuteten Aminosäuren sind nummeriert und hervorgehoben (nach Yarov-Yarovoy et al. 2002).

1.2.4. Aktivitätsabhängige Wirkung

Das Ausmaß der Blockade der Reizweiterleitung in einem Nerven ist bei gegebener Konzentration des LA von der Spannungspulsfrequenz und der Höhe des Ruhepotentials abhängig [Catterall und Mackie 2006]. So wird die inhibitorische Wirkung der meisten LA auf Na⁺-Ströme durch die repetitive Auslösung von AP verstärkt. Dieses Phänomen tritt bei LA mit tertiären und quartären Aminogruppen auf, außerdem auch bei Antiarrhythmika und Antiepileptika und wird *use dependence* bzw. *frequency dependence* genannt.

Use dependence ist für das klinische Wirkungsbild der Arzneistoffe von höchster Bedeutung. Während niederfrequente nervale Impulse in niedrigen Arzneistoffkonzentrationen ungeblockt bleiben, setzt die Wirkung besonders bei pathologisch bedingten hochfrequenten Pulsfolgen ein, wie sie für epileptische Anfälle, Schmerzen oder Tachykardien typisch sind.

Zwei konkurrierende Hypothesen wurden für die Erklärung des Effekts etabliert. Der *Modulated-Receptor*-Hypothese liegen unterschiedliche Affinitäten des LA zu den einzelnen Rezeptorzuständen als Annahme zugrunde. Substanzen, die mit deutlich höherer Affinität an den inaktiven und/oder offenen Zustand als an den geschlossenen Zustand binden, zeigen eine ausgeprägte

Frequenzabhängigkeit, da die Dissoziationsgeschwindigkeit des dann gebildeten Lokalanästhetikum-Kanal-Komplexes verringert ist, das LA also lange gebunden bleibt. Der Anteil der inhibierten Na_v -Kanäle der Zelle nimmt entsprechend zu [Hille 1977].

Die *Guarded-Receptor*-Hypothese besagt, dass die Bindungskonstanten eines LA zu den einzelnen Kanalzuständen konstant bleiben, der Zugang zur Bindungsstelle wie auch der Austritt des LA aus der Pore seien aber phasenabhängig [Starmer et al. 1984]. Das Eintreten neutraler und lipophiler LA in das Innere der Pore ist über den schnellen „hydrophoben Weg“ von membranärer Seite aus möglich. Protonierte und quarternisierte LA erreichen und verlassen den Bindungsort allerdings von intrazellulärer Seite aus über den „hydrophilen Weg“. Dafür und auch für die entgegengesetzte Richtung muss der Kanal aber in seinem offenen Zustand vorliegen. Hydrophile, geladene und große Moleküle, die überwiegend den phasenabhängigen hydrophilen Weg nutzen, zeigen eine starke Frequenzabhängigkeit [Hille 1977, Strichartz und Richie 1987], während Neutralstoffe wie Benzocain phasenunabhängig wirken. Optische Isomere können Unterschiede in ihrer Frequenzabhängigkeit aufweisen, was die Spezifität der Wechselwirkung mit der Bindungsstelle unterstreicht.

Beide Hypothesen waren bisher für die Interpretation zahlreicher Experimente nützlich. Neuere Modelle versuchen die Kernaspekte beider Hypothesen zu kombinieren [Fozzard et al. 2005].

1.2.5. Weitere Wirkmechanismen von Lokalanästhetika

LA wechselwirken mit weiteren Membranproteinen, z.B. mit spannungsabhängigen und -unabhängigen K^+ -Kanälen [Komai 2001, Longobardo et al. 1998, Olschewski et al. 1998]. Da die Affinitäten zu den spannungsabhängigen K^+ -Kanälen aber kleiner als zu Na^+ -Kanälen sind, wird das Ruhepotential während der Leitungsblockade nicht anhaltend verändert [Catterall und Mackie 2006]. Die klinische Relevanz des Angriffs von LA an K^+ -Kanäle ist umstritten. Es wird diskutiert, dass der Angriff an ATP-sensitiven K^+ -Kanälen des Herzens für die kardialen Nebenwirkungen oder toxische Wirkungen verantwortlich ist [Scholz 2002]. Für Fomocain-Derivate gibt es bisher noch keine Erkenntnisse über ihre Affinitäten zu K^+ -Kanälen.

In klinisch relevanten Konzentrationen wurden für LA weitere Angriffe an transmembranären und intrazellulären Proteinen festgestellt [Nau et al. 2004]. Hier sind der nicotinerge Acetylcholinrezeptor und G-Proteine zu nennen [Arias und Bhumireddy 2005, Arias und Blanton 2002]. Für zahlreiche Verbindungen wurden Veränderungen der physikochemischen Membraneigenschaften nachgewiesen, die Permeabilitätsänderungen der Membran für Na^+ bedingten.

1.3. Struktur-Wirkungs-Beziehungen

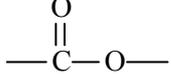
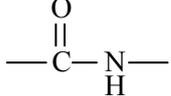
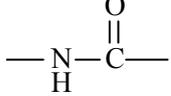
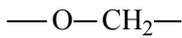
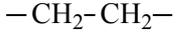
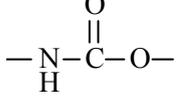
1.3.1. Bauprinzip der Lokalanästhetika nach Löfgren

Verschiedene Arten von Arzneimitteln können die Weiterleitung von AP inhibieren. So weisen einige Alkohole wie Polidocanol und verschiedene Antidepressiva, Antiepileptika, Antihistaminika, Sekretolytika und Betablocker lokalanästhetische Eigenschaften auf [Courtney und Strichartz 1987]. Zahlreiche Vertreter aus diesen Stoffklassen und die meisten klinisch eingesetzten LA (inklusive Fomocain) entsprechen in ihrer Struktur dem 1948 von Löfgren postulierten Bauprinzip. Demnach bestehen LA aus einem lipophilen, meist aromatischen Molekülteil, der über eine Ester-, Amid-, Keto-, Carbamat- oder Etherfunktion und eine kurze Zwischenkette aus üblicherweise 1 – 4 Kohlenstoffeinheiten mit einem basischen Amin verknüpft ist (vgl. Tab. 4).

Wirkstärke und Wirkdauer der LA sind neben der Affinität zum Ionenkanal vor allem davon abhängig, wie die Substanz Zugang zu ihrer Bindungsstelle gewinnt, was vor allem durch den pK_s -Wert, die Lipophilie, die Größe und Form des Moleküls beeinflusst wird [Strichartz und Ritchie 1987]. Der pK_s -Wert des sekundären oder tertiären Amins liegt zumeist zwischen 7,5 – 9,4 (nur selten bis 10,0), sodass beim zytosolischen pH-Wert von 7,4 die protonierte und die deprotonierte Form nebeneinander vorliegen. LA, die einen hohen Anteil der Basenform und eine mittlere Lipophilie ($\log P$ der Base ca. 2 – 3) aufweisen, permeieren rasch durch die Zellmembran. Die in die Zellen eingedrungenen Moleküle greifen wie unter 1.2.3. beschrieben an Na_v -Kanälen an, und blockieren, vor allem wenn sie in protonierter Form vorliegen, die Reizleitung. Die Größe des Moleküls ist in erster Linie durch die Art des Aromaten, die Länge der Zwischenkette und die Substitution des Amins determiniert und entscheidet über die Dissoziationsgeschwindigkeit des LA von seiner Bindungsstelle am Ionenkanal. Große Moleküle verweilen länger am Bindungsareal als kleinere und bewirken eine erhöhte Blockadedauer [Courtney und Kenneth 1980].

In Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde die Bedeutung der Zwischenkette für die lokalanästhetische Wirkung geklärt. Ein geringer Verzweigungsgrad, eine hohe Lipophilie und eine Esterfunktion als Brückenglied wirken sich begünstigend für eine potente lokalanästhetische Wirksamkeit aus. Der Austausch der Esterfunktion (-CO-O-) durch eine Ethylengruppe (-CH₂-CH₂-) oder eine Ketogruppe (-CO-CH₂-) führt im Allgemeinen zu einer leichten Verminderung der (infiltrations)anästhetischen Potenz [Büchi et al. 1968, Rudinger-Adler und Büchi 1979].

Eine Verlängerung der Zwischenkette vergrößert die leitungs- und oberflächenanästhetische Wirkung, geht allerdings auch mit einer Erhöhung der Stickstoffbasizität und des Verteilungskoeffizienten sowie einer Verminderung der Wasserlöslichkeit einher und bedingt häufig eine Zunahme der Toxizität [Bokesch et al. 1983, Courtney und Strichartz 1987]. Das Wirkungsoptimum innerhalb homologer Lokalanästhetika-Reihen liegt für die Fomocain-Reihe bei einer Kettenlänge von 3 C-Atomen [Oelschläger et al. 1968] und bei basischen Aniliden bei 2 C-Atomen [Bokesch et al. 1986]. Im Falle

lipophile Komponente	Brückenglied	Zwischenkette	hydrophile Aminkomponente	Vertreter
	X—Y	(CHR) _n		
Typ I		basisch substituierte Benzoesäureester		Kokain, Procain, Chlorprocain, Tetracain, Oxybuprocain, Proxymetacain
Typ II		basisch substituierte Aryl-carbonsäureamide		Cinchocain
Typ III		basisch substituierte Anilide		Lidocain, Etidocain, Prilocain, Mepivacain, Ropivacain, Bupivacain, (Articain)
Typ IV		basisch substituierte Aryl-alkyl-ketone		Propipocain, Dyclocain
Typ V		basisch substituierte Aryl-alkyl-ether		Dimethisoquin, Ketocain, Pramoxin
Typ VI		basisch substituierte Alkylbenzyl-phenyl-ether		Fomocain, Oe 9000, Oe 7000
Typ VII		basisch substituierte Phenylcarbamate		Diperodon

Tab. 4: Strukturelle Klassifizierung der Lokalanästhetika

der Benzocain-Reihe wurde ab einer Kettenlänge von 6 C-Atomen eine drastische Abnahme der oberflächenanästhetischen Wirksamkeit (so genannter *Cut-off-Effekt*) festgestellt [Büchi et al. 1968].

1.3.2. Lokalanästhetika vom Typ I: Basisch substituierte Benzoesäureester

Das durch Koller 1884 in die Therapie eingeführte Kokain wird noch heute topisch für das Anästhesieren von Schleimhäuten verwendet. Bereits kurze Zeit nach Applikation einer 4-5%igen Lösung wird eine tiefe Lokalanästhesie erzielt [Tetzlaff 2000]. Kokain (vgl. Abb. 3) gehört zu den wenigen LA, die außerdem vasokonstriktorisch wirken und damit einen raschen Abtransport des Arzneistoffs über die Blutbahn verhindern. Wegen seiner geringen therapeutischen Breite, seiner gewebeirritierenden Wirkung und seines erheblichen Suchtpotentials ist die Anwendung auf kleinflächige Areale im Kopfbereich beschränkt.

Die klinisch bedeutsamen Weiterentwicklungen in dieser Gruppe sind Abkömmlinge der 3- bzw. 4-Aminobenzoesäure. Hierzu zählen das ausgesprochen gewebefreundliche Procain, das lipophilere Chlorprocain, das deutlich potentere, aber auch toxischere Tetracain und die in der Ophthalmologie eingesetzten Derivate Oxybuprocain und Proxymetacain. Im Gegensatz zum Kokain beeinflussen sie nicht die Wiederaufnahme von Dopamin, Adrenalin und Serotonin aus dem synaptischen Spalt und weisen daher kein Suchtpotential auf.

Procain wird wegen seiner guten Gewebeverträglichkeit und seiner geringen systemischen Toxizität vor allem als Infiltrations- und für diagnostische Zwecke als Leitungsanästhetikum eingesetzt [Catterall und Mackie 2006]. Seine Wirkung ist nur von kurzer Dauer, sodass es besonders bei kleinen operativen Eingriffen verwendet wird. Dem hohen pK_s -Wert von 8,9 und der geringen Lipophilie geschuldet, überwindet Procain lipophile Barrieren nur schlecht, was seinen verzögerten Wirkeintritt beim peripheren Nervenblock und die sehr schwache oberflächenanästhetische Wirkung nach Applikation auf die Haut oder Schleimhaut erklärt [Tetzlaff 2000]. Die Einführung eines Chloratoms in 2-Stellung geht mit einer Steigerung der Lipophilie und einer Beschleunigung des Wirkeintritts einher. Die geringe Toxizität des Chlorprocain ermöglicht dessen Einsatz als Infiltrations- und Leitungsanästhetikum. Nachdem allerdings in den 1980er Jahren neurologische Defizite mit dem Einsatz der Substanz beim Epiduralblock in Zusammenhang gebracht wurden [Moore 1982, Ravindran 1980, Reisner 1980], wurde die Verbindung durch LA vom Typ III ersetzt. Heute schreibt man die neurologischen Nebenwirkungen der einst verwendeten ungeeigneten Darreichungsform zu, was erwarten lässt, dass Chlorprocain in die Regionalanästhesie zurückkehren wird [Drasner 2005].

Noch deutlich lipophiler und etwas weniger basisch ist Tetracain. Es ist signifikant stärker wirksam als Procain, hat eine lange Latenz bis zum Wirkeintritt und vor allem eine lange Wirkdauer. Daher werden 0,03–1,0%igen Tetracain-Lösungen häufig bei größeren operativen Eingriffen in der Spinalanästhesie eingesetzt. Zudem begünstigt seine gute Penetrationsfähigkeit durch lipophile Barrieren den Einsatz als Oberflächenanästhetikum auf Haut und Schleimhaut. Gewisse Bedeutung hat Tetracain auch in der Ophthalmologie erlangt [Amiel und Koch 2007, Irle et al. 2005].

Nach Applikation hoher Tetracain-Dosen auf gut absorbierende Schleimhäute des Rachenraumes oder der Lunge werden hohe Plasmaspiegel erhalten, die die Gefahren einer Verminderung der

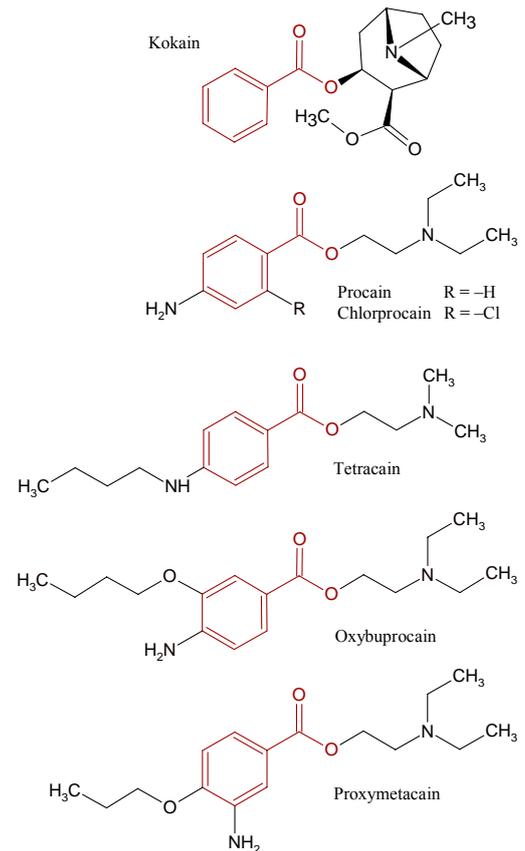


Abb. 3: Lokalanästhetika vom Typ I: Basisch substituierte Benzoesäureester

Kontraktilität des Herzens und – je nach Konzentration im Liquor – einer exzitatorischen oder zentraldämpfenden ZNS-Störung bergen [Patel et al. 1989]. Symptome einer akuten ZNS-Intoxikation mit LA treten im Allgemeinen vor dem Auftreten von Störungen im kardiovaskulären System auf und reichen von leichter Benommenheit, Angst, Tremor und Orientierungslosigkeit bis hin zum tonisch-klonischen Anfall, respiratorischen Block und zu Bewusstlosigkeit [Liu et al. 1983]. Ein objektives Maß für die ZNS-Toxizität ist die minimale Dosis, die erforderlich ist, um (im Tierversuch) Konvulsionen auszulösen [Casati und Putzu 2005].

Ausgehend von Procain wurde durch Einführung einer Butyloxygruppe in 3-Position am Aromaten das Oberflächenanästhetikum Oxybuprocain erhalten, das mit Proxymetacain strukturverwandt ist (vgl. Abb. 3). Ihre Hydrochloride werden wegen guter Wasserlöslichkeit und Gewebeverträglichkeit topisch am Auge, z.B. zur Operation des grauen Stars, appliziert [Sauder und Jonas 2003]. Im Gegensatz zu Kokain lösen sie keine Mydriasis aus. Vorteilhaft gegenüber Tetracain soll das verringerte Verletzungsrisiko für die cornealen Zellschichten sein, das bei jenem bereits bei der ersten Applikation besteht [Boljka et al. 1994, Brewitt et al. 1980]. Außerdem lösen beide Derivate beim Einträufeln der Tropfen in das Auge vergleichsweise weniger Schmerzen aus [Bartfield 1994]. Als Derivat der 3-Aminobenzoessäure ist Proxymetacain eventuell weniger immunogen als die anderen Esterlokalanästhetika [Tetzlaff 2000].

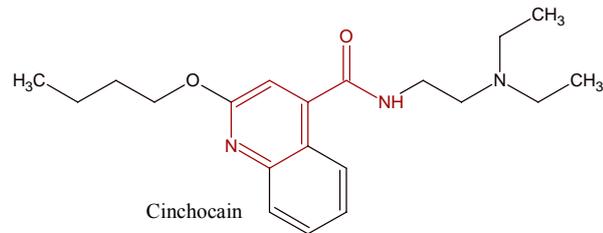
1.3.3. Lokalanästhetika vom Typ II: Basisch substituierte Aryl-carbonsäureamide

Das derzeit einzige als LA zugelassene Derivat dieser Gruppe ist **Cinchocain** (Dibucain, vgl. Abb. 4). Die sehr lipophile Verbindung ist beim anorektalen Symptomkomplex und bei entzündlichen Erkrankungen des Ohrs indiziert und kommt vereinzelt in der Spinalanästhesie zum Einsatz [Rote Liste 2006, Concepcion 1989].

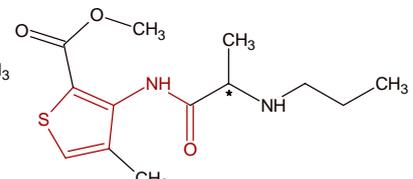
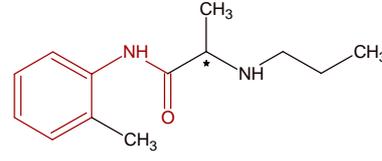
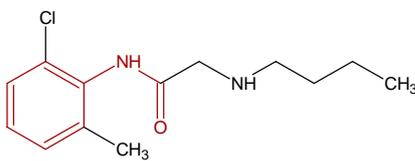
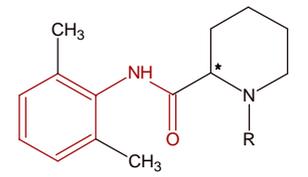
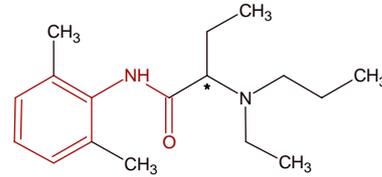
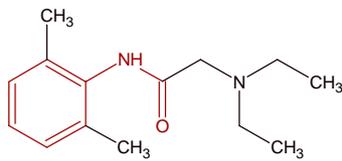
1.3.4. Lokalanästhetika vom Typ III: Basisch substituierte Anilide

Sie stellen derzeit die am häufigsten verwendete Gruppe dar [Steinhilber et al. 2005]. Die wichtigsten Vertreter sind in Abb. 4 gezeigt. Charakteristisch für alle heute gebräuchlichen Derivate ist die Aromatensubstitution in den Positionen 2 und 6 durch Methyl- und Methoxycarbonylgruppen oder Chlor, die durch eine sterische Abschirmung die enzymatische Hydrolyse der Amidfunktion erschweren.

Typ II



Typ III



¹⁾ Therapeutisch genutzt wird nur das S-Enantiomer.

²⁾ Therapeutisch genutzt werden das Razemat und das S-Enantiomer

Abb. 4 Lokalanästhetika vom Typ II und vom Typ III: Basisch substituierte Aryl-carbonsäureamide und basisch substituierte Anilide

Strukturelle Unterschiede innerhalb der Klasse bestehen hauptsächlich in der Substitution des Amins und der Zwischenkette. Ausgehend vom achiralen Lidocain erhält man durch Einführung eines Ethylrests am α -C-Atom (und durch Austausch des N-Ethyl- durch einen N-Propylsubstituenten) das chirale, lokalanästhetisch potentere Etidocain. Razemisches Ropivacain ist ein zyklisches Etidocain-Analogon, Mepivacain und Bupivacain unterscheiden sich davon lediglich in der Kettenlänge des Alkylsubstituenten am Stickstoff. Das Thiophenderivat Articain kann als methoxycarbonyl-substituiertes Prilocain-Analogon betrachtet werden. Bis auf Ropivacain, das als S-Enantiomer zur Verfügung steht, werden die chiralen Verbindungen als Razemate eingesetzt. Seit September 2004 ist zusätzlich Levobupivacain, das linksdrehende S-Enantiomer des Bupivacain, im Handel. Aus Studien mit Tieren und Probanden ist bekannt, dass die S-Enantiomere der drei N-substituierten Pipercolylxylylide¹ jeweils ein besseres ZNS- und kardiotoxisches Profil als die Razemate aufweisen [Casati und Putzu 2005].

Die Verbindung mit dem größten Einsatzspektrum aller LA ist das von Löfgren 1948 entwickelte **Lidocain**. Seine Basizität ($pK_s = 7,8$) und Lipophilie rangieren im Vergleich zu den

¹ exakte Bezeichnung nach IUPAC: N-(2,6-Dimethylphenyl)piperidin-2-carboxamid-Derivate

Benzoessäureestern im Mittelfeld. Das vasorelaxierende Lidocain-Hydrochlorid findet häufig therapeutische Anwendung unter Zusatz von Adrenalin. Während die oberflächenanästhetische Wirkung auf intakter Haut nur wenig ausgeprägt ist, erzielt es auf Schleimhäute aufgebracht eine kurze, aber intensive Schleimhautanästhesie [Schonemann et al. 1992], die beispielsweise bei endoskopischen Eingriffen ausgenutzt wird. Obwohl ein bedeutsamer Anteil zur Resorption gelangen kann, sind kardiale Nebenwirkungen wie Bradykardie und Arrhythmien unter therapeutischen Dosen selten [Tetzlaff 2000].

Lidocain gilt in der Infiltrations-, Spinal- und Epiduralanästhesie als Mittel der Wahl für operative Eingriffe, die eine mittellange Wirkdauer erfordern. Außerdem soll auch die Verwendung der Substanz in der intravenösen Regionalanästhesie nicht unerwähnt bleiben. Im Gegensatz zum ebenfalls für diese Indikation eingesetzten Prilocain ist die Gefahr der Auslösung einer Methämoglobinämie deutlich geringer, sodass dem Lidocain in der Regel der Vorzug für längere Eingriffe gegeben wird. Seine gute Verteilung ins Gewebe der Extremität und die Bindung an Plasma- und Gewebeproteine führen nach hinreichender Verteilungszeit auch nach Wiederherstellung des Blutflusses zu Plasmaspiegeln von $< 5 \mu\text{g/ml}$, bei denen toxische Effekte selten sind [Bader et al. 1988, Simon et al. 1997]. Systemisch wird Lidocain bei akuten und chronischen Schmerzen eingesetzt [Challapalli et al. 2005, Ebell 2006, Petersen und Rowbotham 2000]. Als Wirkmechanismus wird eine Verminderung der nozizeptiven Transmission durch direkten Angriff an Fasern im Rückenmark diskutiert [Dohi et al. 1979, Tetzlaff 2000]. Ferner ist Lidocain bei ventrikulären Arrhythmien und intranasal zur Therapie der Migräne indiziert [Maizels et al. 1996, Rapoport et al. 2004]. Die letztgenannte Indikation beruht möglicherweise auf einer Unterdrückung der Reizleitung im Ganglion sphenopalatinum, das mit dem Nervus trigeminus verbunden ist [Kudrow et al. 1995].

Die Modifizierung der Lidocainstruktur zum lipophileren **Etidocain** bewirkte zwar die anvisierte Steigerung der leitungs- und oberflächenanästhetischen Potenz und der Wirkdauer [Åkerman 1975], sie ging aber zugleich mit einer deutlichen Erhöhung der ZNS- und Kardiotoxizität einher [Bacsik et al. 1995, Heavner 2002]. Die größte Bedeutung hat Etidocain in der Epiduralanästhesie erlangt. Hier wird neben der Blockade nozizeptiver Nervenimpulse die bei chirurgischen Eingriffen angestrebte Inhibierung motorischer Efferenzen ausgenutzt. Etidocain ist das einzige LA, das epidural appliziert einen potenteren motorischen als sensorischen Block auslöst [Atanassoff et al. 1996, Gissen et al. 1982]. Seine geringe therapeutische Breite verhindert jedoch den routinemäßigen Einsatz als Oberflächenanästhetikum.

Beim etwa äquipotenten **Bupivacain** [Åkerman 1975] ist der basische Stickstoff in einen Heterozyklus eingebunden. Wegen der rigideren Molekülstruktur des zyklischen Etidocain-Derivats wird der basische Stickstoff sterisch weniger abgeschirmt. Der pK_s -Wert des Bupivacain ist daher mit 8,1 im Vergleich zum Etidocain ($\text{pK}_s = 7,9$) leicht erhöht. In der Leitungsanästhesie ist die Latenz des Wirkeintritts mit 30 min die höchste aller verfügbaren LA. Die hohe Lipophilie bedingt eine lange Wirkdauer, die bei hohen Dosen über 24 h anhalten kann, ohne dass nervale Schäden auftreten.

Bupivacain wird daher als Infiltrations- und Leitungsanästhetikum eingesetzt, wenn eine lang andauernde und potente Wirkung benötigt wird [Concepcion 1989, Gazzotti et al. 2001].

Im Gegensatz zu Etidocain wird die Weiterleitung der AP in motorischen Fasern (A_α - und A_γ -Fasern) wesentlich schwächer unterdrückt als in nozizeptiven Nervenfasern (A_δ und C-Fasern). So kann in der Leitungsanästhesie eine Auftrennung von sensorischen und motorischen Wirkqualitäten erzielt werden, indem Lösungen mit Konzentrationen kleiner 0,25 % verabreicht werden, die eine Schmerzkupierung bereits erlauben, aber nur minimale motorische Einschränkungen beim Patienten bewirken. Bupivacain wird daher auch postoperativ im Schmerzmanagement eingesetzt [Colwell 2004, McLeod et al. 2001]. Nachteilig wirkt sich die geringe motorische Wirkkomponente bei Operationen im abdominalen Bereich oder an den Extremitäten aus [Moore et al. 1978]. Unerwünschte Muskelkontraktionen während einer Epiduralanästhesie lassen sich durch eine Dosissteigerung oder durch Zugaben von Etidocain oder Mepivacain unterdrücken.

Die geringe Plazentagängigkeit, die hohe leitungsanästhetische Potenz und der Erhalt der motorischen Funktionen haben zu einer standardmäßigen Verwendung von Bupivacain in der Geburtshilfe, z.B. bei der Durchführung des Kaiserschnitts (*sectio caesarea*), geführt. Als nachteilig stellte sich aber eine gegenüber Lidocain und Mepivacain unproportional erhöhte Kardiotoxizität heraus, die auf eine hohe Affinität des Bupivacain zu kardialen Na^+ - und K^+ -Kanälen zurückzuführen ist [Gristwood 2002, Santos et al. 1989, Valenzuela et al. 1995 a und b]. Durch die Inhibierung dieser myokardialen Ionenkanäle kommt es zu Verzögerungen und Störungen der Erregungsüberleitung. Bei einigen Fällen einer versehentlichen intravasalen Injektion von Bupivacain im Dosisbereich von 50 – 60 mg führte die Substanz zu Verlängerungen des PR- und QRS-Intervalls im Elektrokardiogramm und zu malignen, z.T. tödlich verlaufenden ventrikulären Arrhythmien [Albright et al. 1979]. Diese Bupivacain-induzierte Kardiotoxizität erwies sich zudem als ausgesprochen reanimationsrefraktär, sodass die Anwendung 0,75%iger Bupivacain-Lösungen in der Geburtshilfe in Deutschland verboten wurde [Groban und Butterworth 2003, Kuschel 2005]. Auch das Auftreten von ZNS-toxischen Effekten wurde in der Therapie beobachtet [Casati und Putzu 2005, Kozody et al. 1982].

Nichtsdestotrotz ist razemisches Bupivacain eines der am meisten verwendeten LA in der Spinalanästhesie, denn wegen des kleinen Volumens des Subarachnoidalraums und der damit verbundenen kurzen Diffusionsstrecken zu den Neuronen werden wesentlich geringere Dosen als in der Epiduralanästhesie benötigt. Damit ist das Risiko einer systemischen Toxizität in der Spinalanästhesie gering [Casati und Putzu 2005].

Anstrengungen, eine Trennung der lokalanästhetischen von der kardiotoxischen Wirkqualität vorzunehmen, führten zu dem S-Enantiomer **Levobupivacain** und dem um eine Methylengruppe verkürzten **S-Ropivacain**. Für beide Derivate gibt es aus *Patch-Clamp*- und tierexperimentellen Untersuchungen sowie Studien an Probanden gute Evidenzen für eine tatsächlich reduzierte Kardiotoxizität gegenüber Bupivacain. So blockieren Levobupivacain und S-Ropivacain den myokardialen Na_v -Kanal [Valenzuela et al. 1995 b] und den Kaliumkanal $hK_v1.5$ erst bei höheren

Konzentrationen als die Razemate [Valenzuela et al. 1995 a]. Ferner beeinträchtigen Levobupivacain und Ropivacain die atrioventrikuläre Überleitungszeit und die QRS-Dauer bei Ratten bzw. Meerschweinchen vergleichsweise schwach [Dony et al. 2000, Graf et al. 1997]. Schließlich setzten bei Probanden kardiotoxische Effekte mit den Neuentwicklungen bei höheren Konzentrationen als mit Bupivacain und racemischem Ropivacain ein [Bardsley et al. 1998, Knudsen et al. 1997, Scott et al. 1989].

Während Bupivacain und sein S-Enantiomer in der Leitungsanästhesie als etwa äquipotent angesehen werden [Lyons et al. 1998; Vladimirov et al. 2000], wird die Frage, ob höhere Dosen Ropivacain benötigt werden, um eine gleiche Anästhesietiefe wie mit Bupivacain zu erreichen, noch kontrovers diskutiert [Casati und Putzu 2005]. Auf molekularer Ebene wurde eine etwas geringere inhibitorische Aktivität des Ropivacain gegenüber der homologen Verbindung an Na_v-Kanälen festgestellt. So ergaben *Patch-Clamp*-Untersuchungen an TTX-r Na_v-Kanälen an Hinterhornanglienzellen der Ratte, aus denen nozizeptive C-Fasern herauslaufen, für Ropivacain eine um ca. 50 % kleinere Potenz als für Levobupivacain oder Bupivacain, an TTX-s Na_v-Kanälen war der Unterschied sogar noch stärker ausgeprägt [Bräu et al. 2000].

Ropivacain und Levobupivacain weisen eine noch stärker ausgeprägte Selektivität zu sensorischen als zu motorischen Nervenfasern auf als Bupivacain [Oda et al. 2000, Scott et al. 1997, Van de Velde 2006]. Dadurch eignen sich beide S-Enantiomere epidural appliziert hervorragend zur Kontrolle postoperativer Schmerzen. Unterschiede finden sich in ihrer Gefäßwirkung: Während die N-Butyl-Derivate in klinischen Dosen vasodilatierend wirken [Newton 2005], sind für Ropivacain schwach vasokonstriktorische Eigenschaften an verschiedenen Gefäßen beschrieben worden [Burmester et al. 2005, Cederholm et al. 1994, Iida et al. 2001].

Zusammenfassend betrachtet, können Levobupivacain und Ropivacain als Schritttinnovationen angesehen werden, die trotz höherer Kosten immer dann zu empfehlen sind, wenn aufgrund von hohen Lokalanästhetika-Dosen mit erhöhten Plasmaspiegeln zu rechnen ist.

Das 1957 synthetisierte und als Razemat in die Therapie eingeführte Pipecolylxylylid **Mepivacain** unterscheidet sich strukturell nur durch seinen Substituenten am Stickstoff von racemischem Ropivacain und Bupivacain. Wegen der niedrigeren Lipophilie und der durch den geringeren +I-Effekt der Methylgruppe bedingten verminderten Basizität ähneln die pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften des Mepivacain eher denen des Lidocain als denen der anderen Pipecolylxylylide: In der Leitungsanästhesie zeigt es aufgrund seines hervorragenden Penetrationsvermögens bereits nach 10 – 15 min einen vollständigen Wirkungseintritt. Seine leitungsanästhetische Potenz ist mit der des Lidocain vergleichbar [Simon et al. 2002]. In der Infiltrationsanästhesie ist die Wirkdauer auch wegen seiner leichten vasokonstriktorischen Eigenschaften etwas erhöht. In der Epiduralanästhesie wird mit 1-2%igen Lösungen sowohl ein vollständiger motorischer als auch sensorischer Block erzielt. Die ausgeprägte Inhibierung motorischer Nervenimpulse wird beispielsweise bei chirurgischen Operationen an der Schulter und an

den Extremitäten ausgenutzt [Vester-Andersen et al. 1981]. Wegen seiner guten Plazentagängigkeit und einer Kumulationsgefahr der Substanz im Fötus, die zu einer Absenkung des fötalen Muskeltonus über 24 h führen kann, wird auf den perinatalen Einsatz von Mepivacain verzichtet [Tetzlaff et al. 2000].

Das 1973 in die Zahnheilkunde eingeführte **Articain** weist einige strukturelle Besonderheiten auf. Es ist ein Thiophen-analoges Anilid und zugleich ein Ester. Die Esterstruktur unterliegt in Plasma und Gewebe einer raschen Spaltung, sodass die Gefahr des Auftretens systemischer Nebenwirkungen auch nach versehentlicher intravasaler Injektion (von bis zu 80 mg) gering ist [Oertel et al. 1997]. Ferner gehört Articain zu den wenigen LA, die eine sekundäre Aminstruktur aufweisen. Obwohl der pK_s -Wert gegenüber Lidocain leicht erhöht ist, penetriert Articain gut durch weiches Gewebe und Knochen. Wegen seiner kurzen Latenz bis zum Wirkeintritt, seiner kurzen Wirkdauer, der guten lokalanästhetischen Potenz und der geringen Toxizität gilt es in der Zahnheilkunde zur Infiltrations- und Leitungsanästhesie als Mittel der Wahl für kleinere Eingriffe. Weit verbreitet sind 4%ige Lösungen mit Zusätzen von Adrenalin [Vree und Gielen 2005]. Typische Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen (4%), faziale Ödeme, Gingivitis, Infektionen und Parästhesien (je 1%) treten nicht häufiger auf als mit Lidocain. Zahlreiche Studien über die Wirksamkeit und Sicherheit von Articain in der Epidural-, Spinal- und intravenösen Regionalanästhesie stammen aus den Bereichen der Geburtshilfe und der Chirurgie, insbesondere für Eingriffe an den Extremitäten und im Urogenitalbereich [Kaukinen et al. 1978 und 1986]. Bislang erlaubt die Datenlage für diese Anwendungsbereiche jedoch noch keine gesicherten Aussagen über eine Überlegenheit des Articain gegenüber den kurzwirksamen LA Lidocain, Prilocain oder Mepivacain [Vree und Gielen 2005].

1.3.5. Lokalanästhetika vom Typ IV: Basisch substituierte Aryl-alkyl-ketone

Seit der Einstellung der Produktion des zum Katheterisieren eingesetzten Gleitmittels Urocomb[®], das als wirksamen Inhaltsstoff **Propipocain** (Falicain, vgl. Abb. 5) enthielt, ist das ehemals in der USP als Hydrochlorid monographierte Oberflächenanästhetikum **Dyclocain** der einzige und auch nur selten therapeutisch genutzte Vertreter dieses Strukturtyps [Moll und Rathert 2001]. Seit dem Auftreten von Fällen allergischer Kontaktdermatitis nach topischer Applikation des 1%igen Gels bei *Herpes simplex labialis* gilt seine therapeutische Verwendung als obsolet [Purcell und Dixon 1985].

1.3.6. Lokalanästhetika vom Typ V: Basisch substituierte Aryl-alkyl-ether

Auch **Dimethisoquin** (Quinisocain), **Ketocain** und **Pramoxin** haben im Wettbewerb mit Vertretern der Klassen I und III ihre Bedeutung als Oberflächenanästhetika verloren.

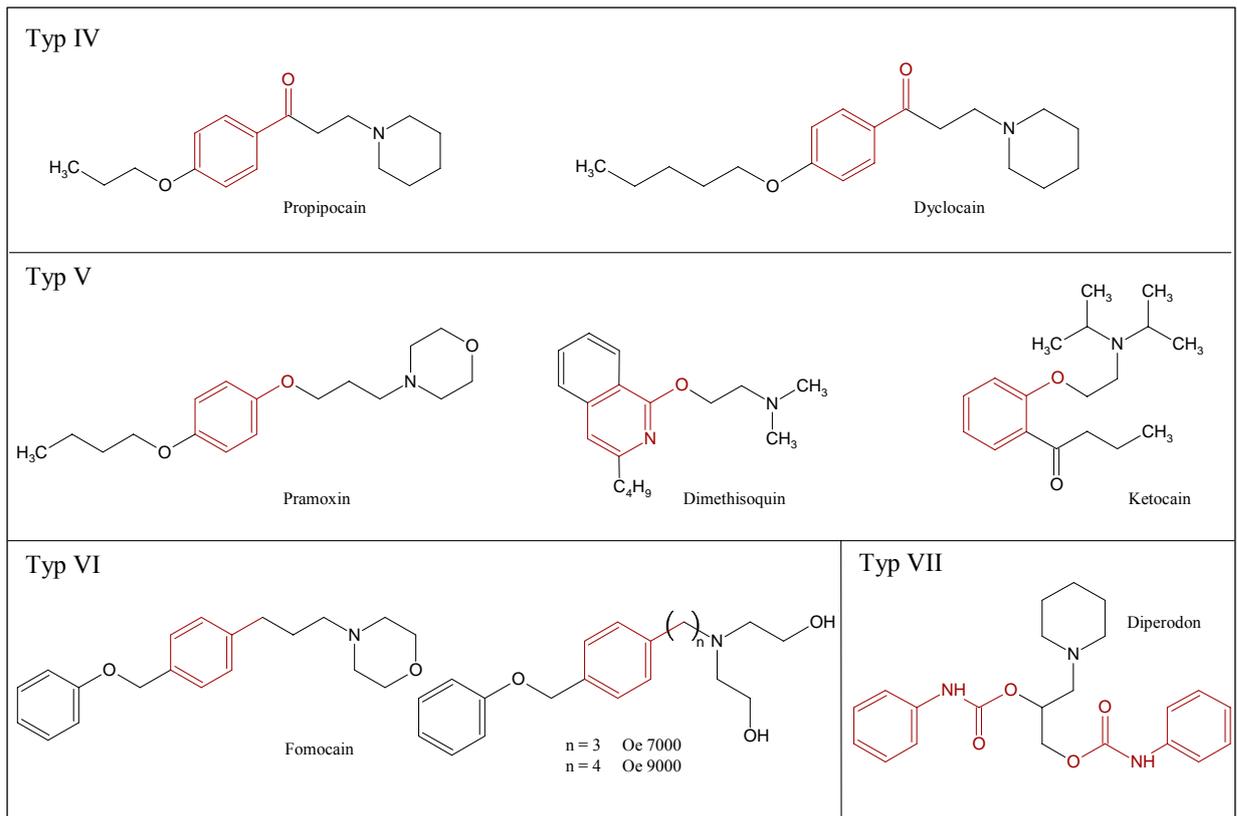


Abb. 5: Lokalanästhetika der Typen IV-VII: Basisch substituierte Aryl-alkyl-ketone (IV), basisch substituierte Aryl-alkyl-ether (V), basisch substituierte Alkylbenzyl-phenyl-ether (VI), basisch substituierte Phenylcarbamate (VII)

1.3.7. Lokalanästhetika vom Typ VI: Basisch substituierte Alkylbenzyl-phenyl-ether (Fomocaine)

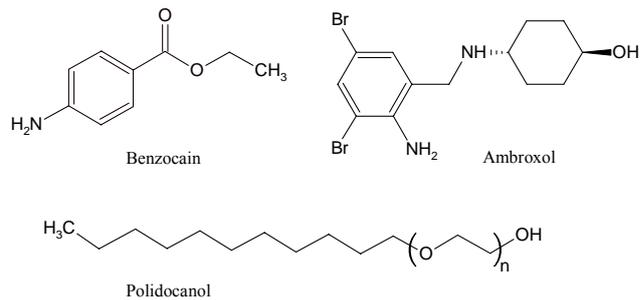
Fomocain und die in dieser Arbeit untersuchten Derivate Oe 9000 und Oe 7000, die statt des Morpholinrings eine Aminodiethanol-Struktur als Basenkomponente haben, gehören dieser Klasse an und werden in den Kapiteln 1.5. und 2. behandelt. Fomocain wurde bereits 1957 durch Oelschläger synthetisiert. Zur Charakterisierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden weit mehr als 100 Fomocain-Derivate entwickelt und untersucht.

1.3.8. Lokalanästhetika vom Typ VII: Basisch substituierte Phenylcarbamate

Das einzige LA, das eine solche Zwischenkette enthält, ist das chirale Dipiperodon. Die Substanz ist nur wenig untersucht und wird auch wegen sensibilisierender Eigenschaften heute nicht mehr in der Therapie verwendet [Calcnan et al. 1980].

1.3.9. Sonstige

Drei als Oberflächenanästhetika gebrauchte Substanzen, die nicht dem allgemein gültigen Strukturprinzip folgen, sind **Ambroxol**, das neben seiner Anwendung als Sekretolytikum auch zur Schmerzlinderung im Rachenraum eingesetzt wird [Schutz et al. 2002, Wunderer und Weiser 2004], und die Neutralstoffe



Benzocain und **Polidocanol**. Bei letzterem handelt es sich um eine Polyethylenglykol-

Abb. 6: Lokalanästhetika, die nicht dem allgemeinen Strukturprinzip entsprechen

Dodecylether-Mischung mit durchschnittlich 9 Ethylenoxid-Einheiten. Während für Ambroxol und Benzocain die Inhibierung von Na_v-Kanälen in nozizeptiven Nervenfasern für die schmerzkupierende Wirkung in Betracht zu ziehen ist [DeLuca et al. 1991, Weiser 2006], gibt es keine gesicherten Erkenntnisse über die Pharmakodynamik des Polidocanol.

Nach topischer Applikation auf Schleimhäute erzielt Benzocain innerhalb von 30 s seinen Wirkeintritt und ist daher zur Vorbereitung einer Endoskopie oder Bronchoskopie wie auch zur Schmerzlinderung bei rektalen Verletzungen indiziert. Großflächige Anwendungen des primären aromatischen Amins oder Applikation von Dosen > 200 mg auf gut resorbierende Schleimhäute sind zu vermeiden, um der Gefahr einer Auslösung einer Methämoglobinämie vorzubeugen [Byrne et al. 2004, Dahshan und Donovan 2006].

Die Einsatzgebiete wichtiger LA sind in Tab. 5 zusammenfassend dargestellt.

Lokalanästhetikum	Typ	Oberflächenanästhesie		IA ¹⁾	LA ²⁾	Epidural-Block	Spinal-block	i.v. RA ³⁾
		Auge	Gesamt					
Chlorprocain	I			+	+	+		+
Kokain	I	+	+					
Oxybuprocain	I	+	+					
Procain	I			+	+		+	
Proxymetacain	I	+						
Tetracain	I	+	+				+	
Cinchocain	II		+				+ ⁴⁾	

Lokalanästhetikum	Typ	Oberflächenanästhesie		IA ¹⁾	LA ²⁾	Epidural-Block	Spinal-block	i.v. RA ³⁾
		Auge	Gesamt					
Articain	III			+	+	+	+ ⁴⁾	
Bupivacain	III			+	+	+	+	
Etidocain	III			+	+	+		
Levobupivacain	III			+	+	+		
Lidocain	III	+	+	+	+	+	+	+
Mepivacain	III			+	+	+	+	
Prilocain	III		+	+	+	+		+
Ropivacain	III			+	+	+		
Dyclocaïn	IV		+ ⁴⁾					
Propipocain	IV		+ ⁴⁾					
Dimethisoquin	V		+ ⁴⁾					
Ketocain	V		+ ⁴⁾					
Pramoxin	V		+ ⁴⁾					
Fomocain	VI		+ ⁴⁾					
Diperodon	VII		+ ⁴⁾					
Ambroxol	-		+					
Benzocain	-		+					
Polidocanol	-		+					

Tab. 5: Applikationsformen von Lokalanästhetika (nach Seeling 1996, modifiziert und aktualisiert)
¹⁾ IA = Infiltrationsanästhesie; ²⁾ LA = Leitungsanästhesie (peripher); ³⁾ i.v. RA = intravenöse Regionalanästhesie; ⁴⁾ kein Handelspräparat zugelassen bzw. Einsatz obsolet

1.4. Resorption und Metabolismus von Lokalanästhetika

Der Metabolismus von LA ist von großer praktischer Bedeutung, da deren systemische Toxizität maßgeblich durch das Gleichgewicht zwischen Resorption und Eliminierung bestimmt wird [Catterall und Mackie 2005]. Die Resorption ist in erster Linie von den physikochemischen Eigenschaften des LA und den physiologischen Gegebenheiten am Applikationsort abhängig. Letztere können durch Zugabe von Vasokonstriktoren, z.B. Adrenalin, Noradrenalin, Phenylephrin oder Clonidin [Burm et al. 1986, Dobrydnjov und Samarutel 1999, Jage et al. 1993] oder von pH-modifizierenden

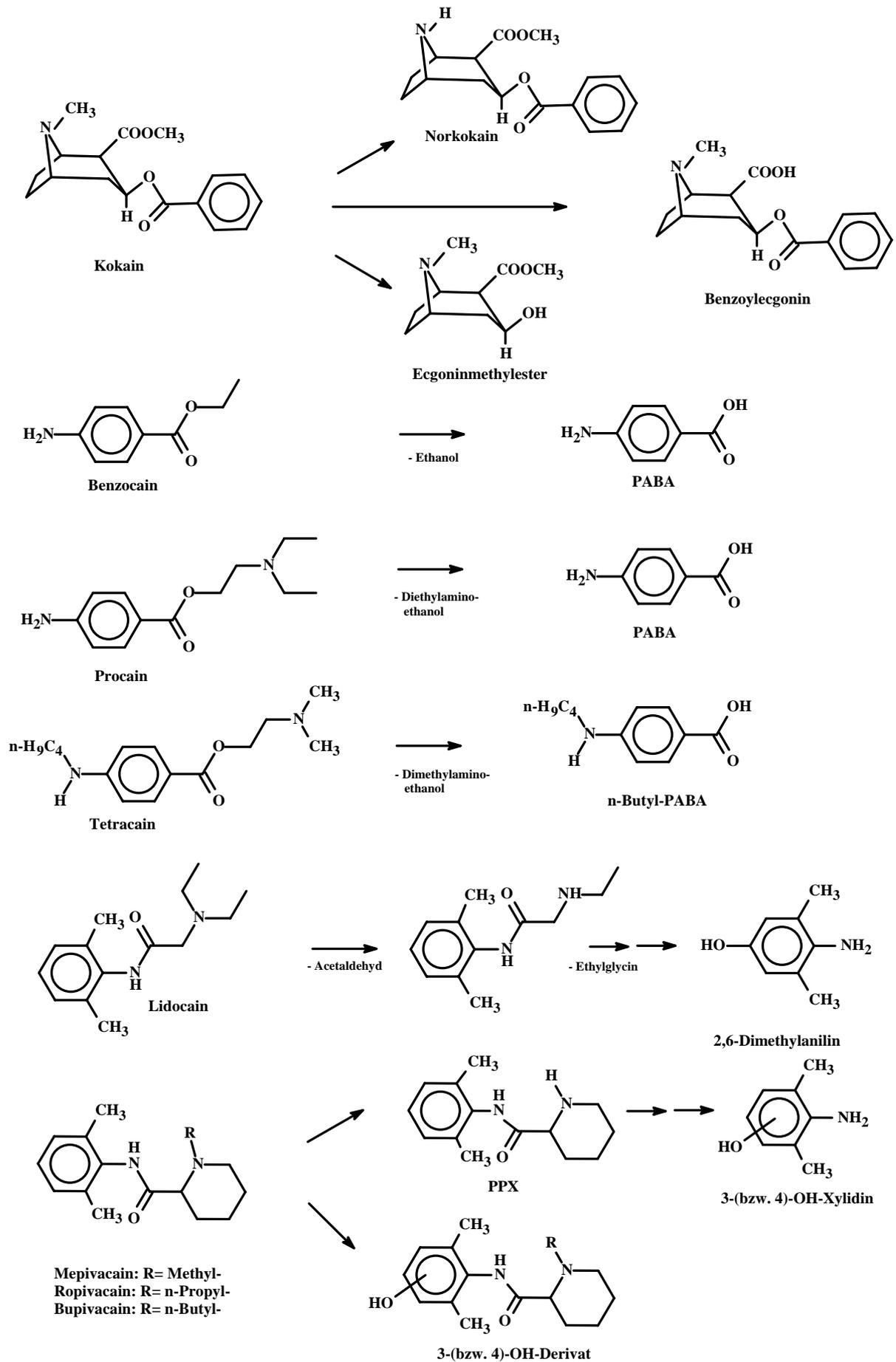


Abb. 7: Hauptmetabolisierungswege wichtiger Lokalanästhetika beim Menschen. PPX = Pipecolylxylidid

Substanzen wie Natriumhydrogencarbonat [Arakawa et al. 2003, Davies 2003] moduliert werden.

Die Eliminierung von Arzneistoffen erfolgt durch deren Exkretion und/oder Metabolisierung [Buxton 2005]. Die lipophilen Eigenschaften von LA, die ihre Passage durch biologische Membranen ermöglichen, erschweren zugleich ihre Ausscheidung aus dem Körper. So spielt die renale Exkretion der unveränderten LA im Allgemeinen nur eine geringe Rolle, weil der Hauptteil der glomerulär filtrierte basischen Verbindungen tubulär rückresorbiert wird. Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts und ihrer raschen intestinalen Resorption sind auch die biliäre und fäkale Exkretion des unveränderten LA von untergeordneter Bedeutung. Die Eliminierung des Arzneistoffs wird daher maßgeblich durch die Geschwindigkeit seiner Biotransformation determiniert. Da die Toxizität von der Konzentration des freien Anteils einer Substanz im Plasma bestimmt wird, wird das Sicherheitsprofil eines LA zusätzlich von seiner Bindung an Plasmaeiproteine und Gewebeproteine beeinflusst [Catterall und Mackie 2005].

Einen Überblick über den Metabolismus der LA vom Typ I beim Menschen gibt Abb. 7.

Als doppelter Ester unterliegt Kokain einer intensiven Metabolisierung. So ist nach intravenöser Gabe von 25 mg Kokain nur etwa 1 % der Substanz intakt im Urin wieder zu finden [Cone et al. 1998]. Der übrige Teil wird hydrolytisch an einer der zwei Esterfunktionen zu Benzoylecgonin bzw. Ecgoninmethylester gespalten oder wird über oxidative Biotransformationswege, vor allem durch oxidativen N-Desalkylierung und Oxygenierungen am Aromaten, umgesetzt. Die oxidative Metabolisierung findet vorwiegend in der Leber statt. Jedoch wurden einzelne Reaktionen der Kokain-Biotransformation auch für Gehirn, Lunge und Niere beschrieben [Tönnies et al. 2003].

Sobald Benzocain, Procain oder Chlorprocain ins Plasma gelangen, werden sie durch die Plasmacholinesterase rasch zu 4-Aminobenzoessäure (PABA) bzw. 4-Amino-2-chlor-benzoessäure (2-Chlor-PABA) und dem entsprechenden Alkohol metabolisiert [Coleman und Taylor 1997, O'Brien et al. 1979]. Ihre Plasmahalbwertszeiten liegen im Sekundenbereich (jeweils ca. 30 – 45 s). Aus der etwas langsamer verlaufenden Esterspaltung des Tetracain ($t_{1/2} = 3$ min) gehen die Metaboliten 4-(Butylamino)benzoessäure und Dimethylaminoethanol hervor [Kudo et al. 2001]. Da die Plasmacholinesterase in der Nervenzelle und im Subarachnoidalraum fehlt, erfolgt die Metabolisierung der Substanzen erst nach Diffusion ins umliegende Gewebe. PABA und 2-Chlor-PABA werden weitgehend mit dem Urin ausgeschieden. Die Aminoethanole unterliegen unterdessen weiteren Metabolisierungsreaktionen [Tetzlaff 2000].

Bei fachgerechter Anwendung ist die Gefahr des Auftretens systemischer Intoxikationen bei LA vom Typ I wegen ihrer raschen Metabolisierung und entsprechend kurzen Halbwertszeiten im Allgemeinen als gering einzustufen. Mit Intoxikationserscheinungen ist hingegen zu rechnen, wenn eine atypische Form der Cholinesterase vorliegt oder die Esteraseaktivität im Plasma reduziert ist, wie es nach Leberschädigungen, Fehlernährung, akuten Verbrennungen oder Herzerkrankungen beschrieben wurde [Davis et al. 1997].

Anaphylaktische Reaktionen nach Gabe von LA vom Typ I werden auf die Entstehung von PABA und

seine Derivate zurückgeführt. Innerhalb der Substanzklasse ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von allergischen Kreuzreaktionen hoch [Eggleston und Lush 1996]. Beim klinischen Einsatz der LA vom Typ I ist außerdem zu berücksichtigen, dass PABA die Wirkung von Sulfonamiden auf die Dihydropteroinsäure-Synthetase antagonisiert [Martindale 1996].

Die Biotransformation von Substanzen der Typen II und III verläuft hauptsächlich hepatisch über Cytochrom P450-Isoenzyme (CYP) und Amidasen. Substituenten am Aromaten in den Positionen 2 und 6 und sperrige Substituenten am Aminstickstoff schützen die Amidbindung vor enzymatischer Spaltung [Arthur 1987].

Die Amidhydrolyse beim Lidocain erfolgt daher nicht direkt, sondern erst nach oxidativer Deethylierung zum sekundären Amin. Als Hauptmetabolit in humanem Urin tritt konjugiertes 4-Amino-3,5-dimethylphenol (4-OH-Xylidin) auf, das 70 – 80 % der applizierten Dosis ausmacht. Die zweifache Deethylierung führt zu dem primären Amin N¹-(2,6-Dimethylphenyl)glycinamid (Glycinoxylidid, GX). Nach peroraler Applikation erfährt Lidocain eine intensive First-pass-Metabolisierung [Tetzlaff 2000]. Wegen Kanzerogenität des ebenfalls auftretenden 2,6-Dimethylanilin ist von einem dauerhaften Einsatz der Substanz in der Therapie ventrikulärer Arrhythmien oder der Migräne abzusehen [Bryant et al. 1994, Puente und Josephy 2001].

Mepivacain, Ropivacain und Bupivacain werden oxidativ N-desalkyliert und haben damit den jeweiligen Hauptmetaboliten N-(2,6-Dimethylphenyl)piperidin-2-carboxamid (Pipecolylxylidid, PPX) gemeinsam. PPX und dessen meta- bzw. para-oxygenierte Derivate haben noch eine gewisse lokalanästhetische Wirksamkeit und leisten einen Beitrag zur ZNS-Toxizität [Halldin et al. 1996].

Ähnliche Daten liegen zum Metabolismus des Etidocain vor. Beim Menschen wurden nach peroraler Applikation para- und meta-oxygenierte und N-desalkylierte Derivate identifiziert. Die Amidspaltung führte zu 2,6-Dimethylanilin [Thomas et al. 1976, Vine et al. 1978].

Mit Halbwertszeiten von 0,6 bzw. 2,5 h wird (razemisches) Articain nach epiduraler Applikation schneller metabolisiert als alle übrigen LA seines Strukturtyps. Im Urin finden sich nur 2,1 % des unveränderten LA. Als Hauptmetaboliten wurden die inaktive (±)-Articainsäure (72,3 %) und das (±)-Acylglucuronid (14,6 %) identifiziert. Die große therapeutische Breite des Articain ist also der raschen Spaltung seiner Estergruppe zuzuschreiben [Vree und Gielen 2005].

1.5. Fomocain

1.5.1. Fomocain als Oberflächenanästhetikum

Fomocain ist ein basisch substituierter Alkylbenzyl-phenyl-ether. Es wurde 1957 von Oelschläger entwickelt und bereits 1967 als Oberflächenanästhetikum in die Therapie eingeführt [Oelschläger 2000]. Als typische Darreichungsformen kamen bisher Salben und Gele (z.B. Pellit Dermal Wund- und Heilsalbe[®]) in der Dermatologie sowie Suppositorien zur Behandlung des hämorrhoidalen

Symptomkomplexes (z.B. Fomocain-Zaepfchen Kade®) zum Einsatz. Wegen freiwilligen Verzichts der Hersteller auf eine Verlängerung der fiktiven Zulassungen [BfArM 2003], finden sich keine Fomocain-haltigen Präparate mehr im Handel. Sowohl Fomocain als auch sein Hydrochlorid sind jedoch noch im Deutschen Arzneimittel-Codex monographiert.

Die praktisch wasserunlösliche Base bildet farb- und geruchlose Kristalle, die bei 54 – 56 °C schmelzen. Der pK_s -Wert beträgt 7,1. Das Hydrochlorid löst sich leicht in Wasser, neigt allerdings bei der Injektion therapeutischer Dosen in das Gewebe zur Präzipitation [Oelschläger et al. 1978 und 2000, Wennek-Klose 2005].

Die lokalanästhetischen und toxikologischen Eigenschaften von Fomocain wurden durch Nieschulz et al. [1958] und Fleck et al. [2001] charakterisiert. Als Leitungsanästhetikum (Rattenschwanz, s.c.) übertrifft es deutlich die Wirkpotenz des Procain. An der Cornea des Kaninchen-, Ratten- und Mäuseauges zeigt Fomocain etwa die gleiche oberflächenanästhetische Wirkung wie Tetracain. Vorteilhaft ist die geringe systemische Toxizität des Fomocain, die an Maus und Ratte bestimmt wurde (Fomocain: LD_{50} (Maus, i.v.) = 175 mg/kg KM gegenüber Tetracain: LD_{50} (Maus, i.v.) = 10,5 mg/kg KM) [Oelschläger 2000].

Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption nach epicutaner Applikation sind auch infolge der hohen Gewebeweißbindung gering [Nachev 1982, Oelschläger und Rothley 1979]. Die Konzentration an freiem Fomocain im Plasma ist zusätzlich durch die hohe Plasmaeweißbindung (PEB) von 95 % gemindert. Auch gestützt durch Tierversuche an Ratten und Beagle-Hunden, die Dosen bis zu 1000 mg/kg KM (appliziert auf intakte Schleimhaut im Rektal- und Rachenraum) vertragen hatten, ist das Risiko einer systemischen Nebenwirkung selbst nach großflächiger Anwendung auf der Haut als gering eingestuft worden [Nieschulz et al. 1958, Seeling 1996].

Die Gewebeverträglichkeit des Fomocain wurde an geschorener Flankenhaut am Meerschweinchen und im *repeated patch test* an 10 freiwilligen Probanden getestet. Es ergab sich kein Anhalt für eine sensibilisierende Wirkung [Oelschläger et al. 1982]. Desweiteren sind trotz jahrelangem Einsatz in der Dermatologie keine Fälle bekannt, in denen es zu allergischen Reaktionen durch Fomocain gekommen ist.

Am Ganztier (Katze) und am isolierten Organ (Meerschweinchen) wurde über eine dosisabhängige Verlängerung der EKG-Zeiten eine antiarrhythmische Aktivität des Fomocain festgestellt. Gemäß Reuter et al. [1975] wirkt Fomocain positiv inotrop und steigert den peripheren Blutdruck. Bräunig et al. [1989] bestätigten die antiarrhythmischen Eigenschaften am isolierten Meerschweinchenherzen, stellten aber eine verminderte Kontraktilität des Herzens fest. Ferner wurde von antiphlogistischen und spasmolytischen Effekten berichtet [Oelschläger et al. 1982]. Außerdem war für das Hydrochlorid eine schwache Bakteriostase gegenüber *Staphylococcus aureus* (Konzentrationen > 128 µg/ml) und eine schwache Fungistase gegenüber *Candida albicans* (Konzentrationen > 512 µg/ml) beobachtet worden [Knothe et al. 1980].

1.5.2. Biotransformation des Fomocain

Erste Hinweise auf eine intensive Fomocain-Metabolisierung lieferte Koch [1970], der nach peroraler Applikation des LA bei Wistar-Ratten vier phenolische und einen nicht-phenolischen Phase-I-Metaboliten im 24-h-Sammelharn fand. Seither wurden zahlreiche Untersuchungen an Ratten, Meerschweinchen, Beagle und Kaninchen am Ganztier und in verschiedenen *In-vitro*-Biotransformationsmodellen unternommen. Die Tierversuche zeigten, dass Fomocain hauptsächlich in der Leber oxidativ biotransformiert wird und die Metaboliten nach Konjugationsreaktionen mit aktivierter Glucuronsäure oder aktiviertem Sulfat ausgeschieden werden [Seeling 1996].

Bei der **Ratte** traten in den 24-h-Sammelexkrementen nach 4-Oxygenierung am *exo*-Zyklus und nach N-Oxidation die teilweise konjugierten Metaboliten Fomocain-N-oxid, 4-OH-Fomocain und 4-OH-Fomocain-N-oxid auf (vgl. Abb. 8) [Jindra et al. 1973, Oelschläger et al. 1975]. Desweiteren fanden sie im Rattenurin die aus der oxidativen Etherspaltung resultierenden Metaboliten Phenol und 4-[3-(Morpholin-4-yl)propyl]benzoesäure in bedeutenden Anteilen. Der dabei als Intermediat auftretende Aldehyd (4-[3-(Morpholin-4-yl)propyl]benzaldehyd) war *in vivo* nicht nachzuweisen; im *In-vitro*-Versuch mit Mikrosomen gelang jedoch dessen Identifizierung [Sgoff 1975]. Die Analyse der Sammelexkreme nach peroraler Applikation von ¹⁴C-markiertem Fomocain gab Aufschluss über Metabolismusnebenwege. Hierzu zählen die oxidative Desaminierung, die α -Oxidation der Morpholinkomponente und die 2-Oxygenierung des *exo*-Zyklus [Ewald 1985]. Nur 0,7 % des applizierten Fomocain waren unverändert ausgeschieden worden. Die Metabolisierungsreaktionen in der Haut nach intrakutaner Applikation zum N-Oxid und zu 4-OH-Fomocain [Jindrova 1976] und in Rattenlebermitochondrien (N-Oxidation und N-Oxid-Reduktionen) erwiesen sich quantitativ gesehen als wenig bedeutsam [Blume und Oelschläger 1978 und 1981].

Die perorale Gabe von ¹⁴C-Fomocain beim **Beagle** führte hauptsächlich zu konjugiertem 4-OH-Fomocain. 42 % der Gesamtradioaktivität wurden im Urin und 52 % in den Faeces gefunden [Ewald 1985]. Die oxidative Desalkylierung trat im Vergleich zur Ratte in den Hintergrund, 2-Oxygenierung wurde nicht beobachtet. Stattdessen traten Metaboliten auf, die aus dem Abbau der Propylkette bis zum Benzoesäurederivat resultierten.

Die Biotransformationswege beim **Kaninchen** [Jindra et al. 1973 und 1977] und beim **Meerschweinchen** [Jindra 1971] wurden nur teilweise geklärt. In Mikrosomenversuchen traten bei beiden Spezies die Produkte der 4-Oxygenierung und der N-Oxidation auf. Der Metabolit Fomocain-N-oxid wurde außerdem in der Leber partiell zum Fomocain zurückreduziert. Ferner wurde beim Kaninchen Phenol als Metabolit gefunden.

Nach großflächiger Auftragung von Dermatika auf die menschliche Rückenhaut bei zwei **Probanden** konnte das Glucuronid des 4-OH-Fomocain identifiziert werden, was Oelschläger zu der etwas gewagten Annahme führte, Beagle spiegelten besser als Ratten den humanen Fomocain-Metabolismus

wieder [Oelschlager 2000]. Weiterführende Humanversuche zur Fomocain-Metabolisierung stehen allerdings noch aus.

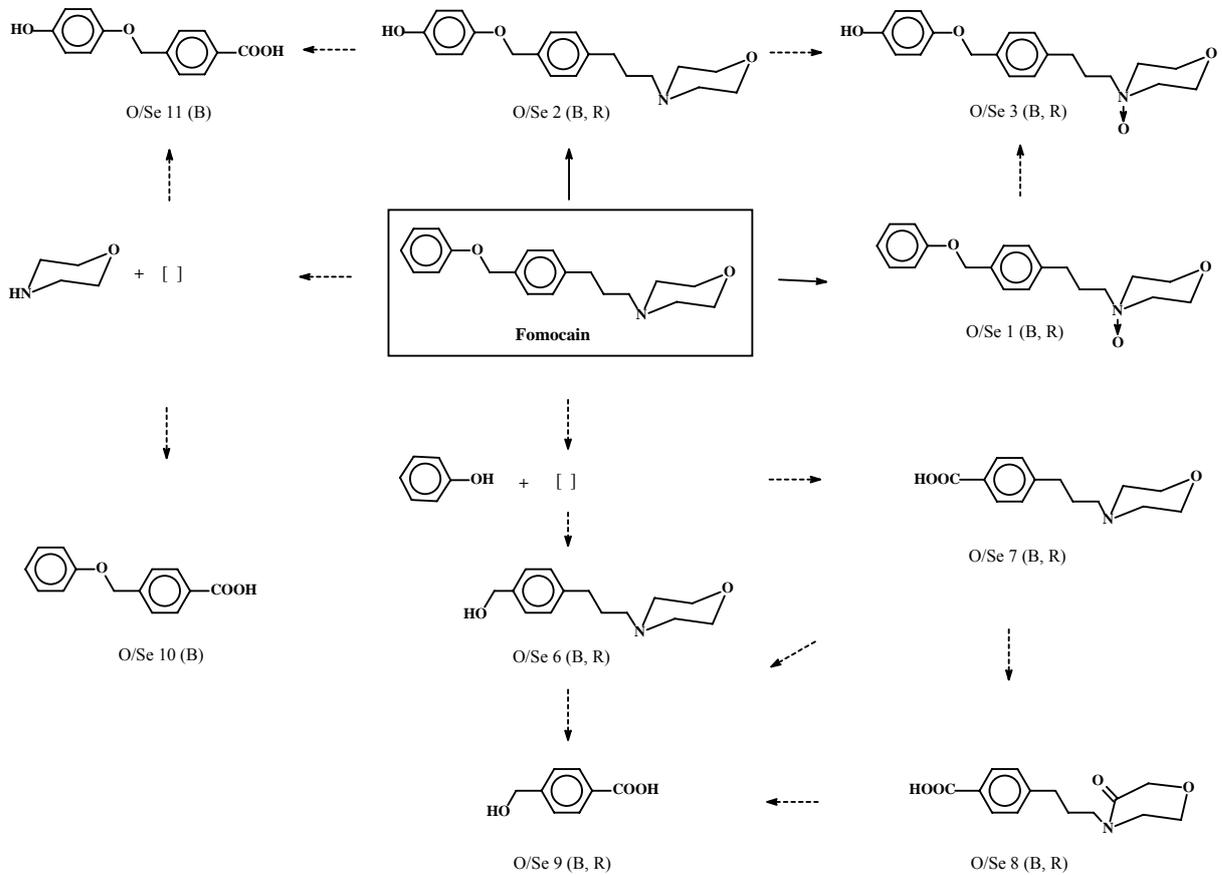


Abb. 8: In den Exkreten von Ratte (R) und Beagle (B) identifizierte Metaboliten des Fomocain. Gesicherte Reaktionen sind mit durchgehenden Pfeilen gekennzeichnet, wahrscheinliche Biotransformationswege sind mit gestrichelten Pfeilen dargestellt (modifiziert nach Seeling 1996 und Seeling et al. 2001).

2. Zielstellung

Die Substanz Oe 9000 (2,2'-[4-(4-Phenoxymethylphenyl)butylimino]diethanol) ist ein neu entwickeltes Oberflächen- und Leitungsanästhetikum aus der Gruppe der basisch substituierten Alkylbenzyl-phenyl-ether. Gegenüber seiner Leitsubstanz Fomocain, das als Oberflächenanästhetikum seit 1979 im Deutschen Arzneimittel-Codex monographiert ist, zeichnet es sich bei erstaunlich geringer Toxizität (LD_{50} , i.p. Ratte = 284 mg/kg KM) durch eine gesteigerte Wirkpotenz aus. Bei längerer Aufrechterhaltung der Anästhesie (über 40 min) erweist es sich mit einer EC_{50} von 9 mmol/l dem Tetracain (EC_{50} = 160 mmol/l) als Oberflächenanästhetikum überlegen. In der Leitungsanästhesie übertrifft es die Wirkstärke des Procain [Fleck et al. 2003]. Damit zählt Oe 9000 zu den hochwirksamen Oberflächenanästhetika und zu den potentesten aller bisher synthetisierten Fomocaine. Unter Berücksichtigung der günstigen physikochemischen Eigenschaften seines Hydrochlorids (vgl. Tab. 6), insbesondere der guten Wasserlöslichkeit, gilt Oe 9000 als ein beachtenswerter Kandidat zur Erschließung neuer Indikationsgebiete als Lokalanästhetikum, als Antiarrhythmikum, zur Kupierung neuropathischer Schmerzen oder – analog zu nasal appliziertem Lidocain – als Migränetherapeutikum [Fleck et al. 2003, Rapoport et al. 2004].

Im Hinblick auf eine eventuell systemische Applikation rückten das toxische Spektrum des Oe 9000 und die Beiträge seiner Metaboliten zur Toxizität in den Vordergrund.

Der Hauptteil dieser Arbeit sollte daher der Identifizierung und Quantifizierung der Phase-I-Metaboliten in verschiedenen *In-vitro*-Biotransformationsmodellen gewidmet werden. Ausgehend von einem Fundus an Metabolismusdaten zu zahlreichen Fomocain-Derivaten wurde das Auftreten verschiedener Oe 9000-Metaboliten postuliert. Die erwarteten Metaboliten sollten einerseits synthetisiert werden, um als Referenzen zur Entwicklung und Validierung der analytischen Methoden zur Verfügung zu stehen und andererseits, um pharmakologisch-toxikologischen Prüfungen

Tab. 6: Physikochemische Eigenschaften von Oe 9000 und Fomocain [Wennek-Klose 2005]

	Oe 9000	Fomocain
Löslichkeit ¹⁾ der Hydrochloride, EuAB	leicht löslich	unlöslich
pK _a -Wert	8,37	7,24
Ionisationsgrad pH 7,4 [%] ²⁾	90,3	40,9
Wasserlöslichkeit ³⁾ der Basenform [μ mol/l]	117	28
lgP-Wert	3,0	3,9
lgD-Wert pH 7,4	2,0	3,6
Trübungs-pH-Wert ⁴⁾	7,49	5,70

¹⁾ in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4, EuAB

²⁾ Berechnet mit Henderson-Hasselbalch-Gleichung

³⁾ Berechnet (vgl. Wennek-Klose)

⁴⁾ einer millimolaren Lösung

unterzogen werden zu können.

Der Metabolismus eines Xenobiotikums ist vom Biotransformationsmodell und der Tierspezies abhängig. Um eine Aussage über ein breites Spektrum an möglichen Metaboliten treffen zu können, sollten daher neben Leberhomogenaten vom Schwein auch Präzisionsleberschnitte der Ratte und des Menschen als Biotransformationsmodelle herangezogen werden. Diese Modelle waren im Prinzip etabliert und charakterisiert, sodass sie lediglich bezüglich der eingesetzten Oe 9000-Konzentration und der Probenaufarbeitung zu optimieren waren. Zusätzlich sollte durch

i.p. Verabreichung von Oe 9000-Einzeldosen bei der Ratte ein qualitativer Vergleich zwischen der *In-vitro*- und der *In-vivo*-Biotransformation gezogen werden, um eventuell auftretende extrahepatische Metabolisierungsreaktionen zu erfassen. Durch die Analyse der Phase-II-Metaboliten in den Versuchen mit Leberschnitten und am Ganztier sollte das Metabolitenspektrum vervollständigt werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit war das Augenmerk auf pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften des Oe 9000 und dessen Metaboliten gerichtet. Hier sollte zunächst in einfachen *In-vitro*-Versuchen geklärt werden, inwieweit die Metabolisierung mit einer Toxifizierung der Substanzen auf zellulärer Ebene einhergeht. Außerdem war zu prüfen, ob Oe 9000 antioxidative oder antimikrobielle Eigenschaften aufweist, was für eine Applikation auf verletzte Haut unter Umständen von therapeutischem Interesse wäre.

Um eventuelle Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten zu können, waren neben den identifizierten und postulierten Metaboliten auch einige neu entwickelte Oe 9000-Derivate in die vorstehenden Untersuchungen einzubeziehen.

Obwohl die Gruppe der Fomocaine mit ihren mehr als 100 Vertretern bereits seit einem halben Jahrhundert Gegenstand zahlreicher Dissertationen und Publikationen ist [z.B. Dünges 1969, Glassl 1995, Matheus 1977, Nieschulz 1958, Oelschläger 1957, Seeling 2001, Sgoff 1975, Vogel 1980, Wange 2006, Zimmer 1991], fehlte zu Beginn meiner Tätigkeit eine biophysikalische Charakterisierung der Inhibitionen der spannungsabhängigen Na⁺-Kanäle durch diese Lokalanästhetika. Die exemplarisch für Oe 9000 durchgeführten *Patch-Clamp*-Untersuchungen im letzten Teil der vorliegenden Arbeit sollten daher einen ersten Beitrag zur Klärung des Hauptwirkmechanismus und zur Evaluierung der Wirkstärke der Fomocaine auf molekularbiologischer Ebene leisten.

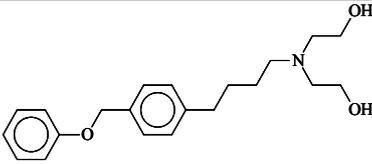
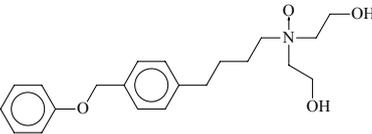
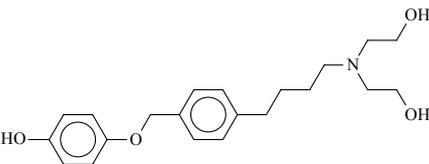
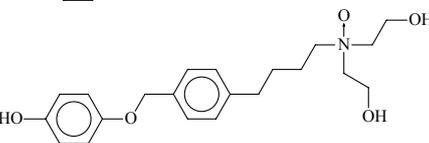
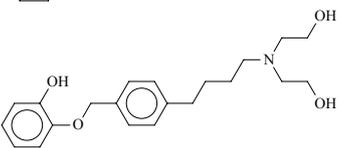
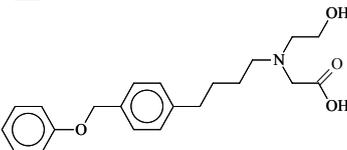
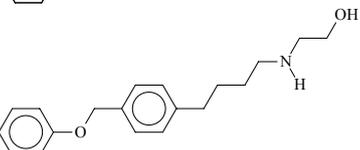
3. Ergebnisse und Diskussion

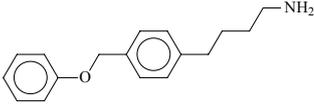
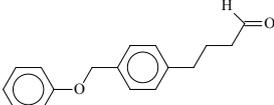
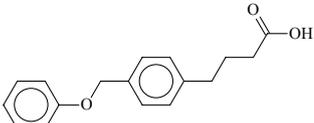
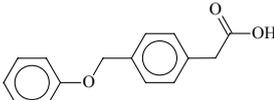
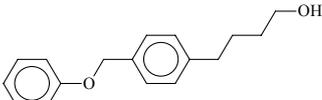
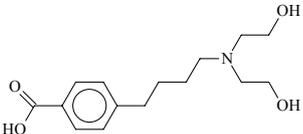
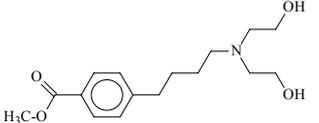
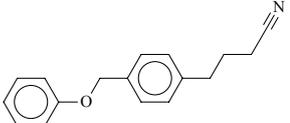
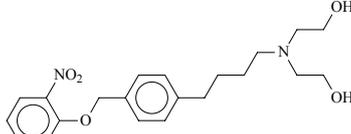
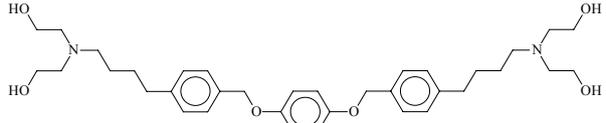
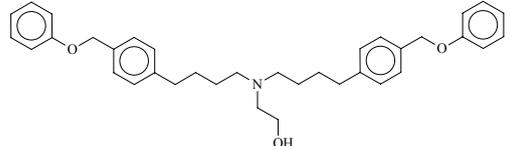
3.1. Synthesen der Referenzsubstanzen

3.1.1. Syntheseplanung und -durchführung

Die Synthese des Oe 9000 war erstmals durch Listing durchgeführt worden [Listing 2001], war also zu Beginn dieser Arbeit bekannt. Die postulierten Metaboliten und neuartigen Oe 9000-Derivate (vgl. Tab. 7) konnten daher in Anlehnung an diese und anderen Vorschriften für Fomocaine des Arbeitskreises um Prof. Oelschläger hergestellt werden [Oelschläger 2001, Seeling 1996]. Sie bedurften zur Anpassung an die substanzspezifischen Verhältnisse und zur Optimierung der Ausbeute allerdings einiger Modifikationen.

Tab. 7: Strukturformeln und relative Molekulargewichte (M_r) von Oe 9000, postulierten Oe 9000-Metaboliten und weiteren Oe 9000-Derivaten

Oe 9000 und postulierte Metaboliten	Strukturformeln	M_r
Oe 9000		343,5
Oe 9000-N-oxid		359,5
4-OH-Oe 9000		359,5
4-OH-Oe 9000-N-oxid		375,5
2-OH-Oe 9000		359,5
Oe 9000-Säure		357,4
POMPBAmEt		299,4

POMPBA _m		255,4
POMPBA _{ld}		254,3
POMPBA		270,3
POMPE _s		242,3
POMPBU _{OH}		256,3
BHABBA		281,4
Methyl-BHABBA		295,4
weitere Oe 9000-Derivate		
POMPBU _{Ni}		251,3
2-Nitro-Oe 9000		388,5
OeDimer		608,8
Bis(POMPBA) _m Et		537,7

3.1.2. Synthesen des Oe 9000 und der postulierten stickstoffhaltigen Metaboliten

Die Synthesen von Oe 9000, POMPBAmEt und 4-OH-Oe 9000, die sowohl Zielverbindungen als auch Zwischenverbindungen für die Synthesen von Oe 9000-N-oxid, Oe 9000-Säure und 4-OH-Oe 9000-N-oxid darstellten, verliefen in ihrer einfachsten Ausführung jeweils dreistufig und entsprachen prinzipiell der klassischen Fomocainsynthese, bestehend aus einer Blanc-Chlormethylierung, einer anschließenden Williamson-ähnlichen Ethersynthese und einer Aminalkylierung (Abb. 9).

Ausgehend von (4-Chlorbutyl)benzen (**1**) ergab die von Oelschlager et al. [1991] modifizierte Blanc-Chlormethylierung 1-(4-Chlorbutyl)-4-(chloromethyl)benzen (**2**), ein Schlüsselprodukt in der Synthese der stickstoffhaltigen Oe 9000-Metaboliten. Aus dem elektrophilen Aromatenangriff resultierten desweiteren die in 2- und 3-Stellung chlormethylierten Stellungsisomere von **2** (**2a**, **2b**) (Verhältnisse im Rohprodukt: o/m/p = 38/7/55, GC-MS) und mehrfach chlormethylierte Verbindungen. Die Reaktionstemperatur von 50 °C stellte dabei einen Kompromiss dar; schon bei geringfügiger Unterschreitung trat vermehrt die 2-Substitution auf, während durch Temperaturerhöhung die Bildung zweifach chlormethylierter Produkte begünstigt wurde. Der Erfolg der Abtrennung der Nebenprodukte durch fraktionierte Destillation und SC auf dieser frühen Synthesestufe entschied über die Qualität der Zielverbindungen.

Die anschließende Ethersynthese mit *in situ* gebildetem Kaliumphenolat in Aceton ergab ein öliges Stoffgemisch aus 1-(4-Chlorbutyl)-4-(phenoxyethyl)benzen (**3**) und den analogen ortho- und meta-Isomeren, das durch SC von einem weiteren Nebenprodukt, dem Diether 1-(4-Phenoxybutyl)-4-(phenoxyethyl)benzen, separiert wurde.

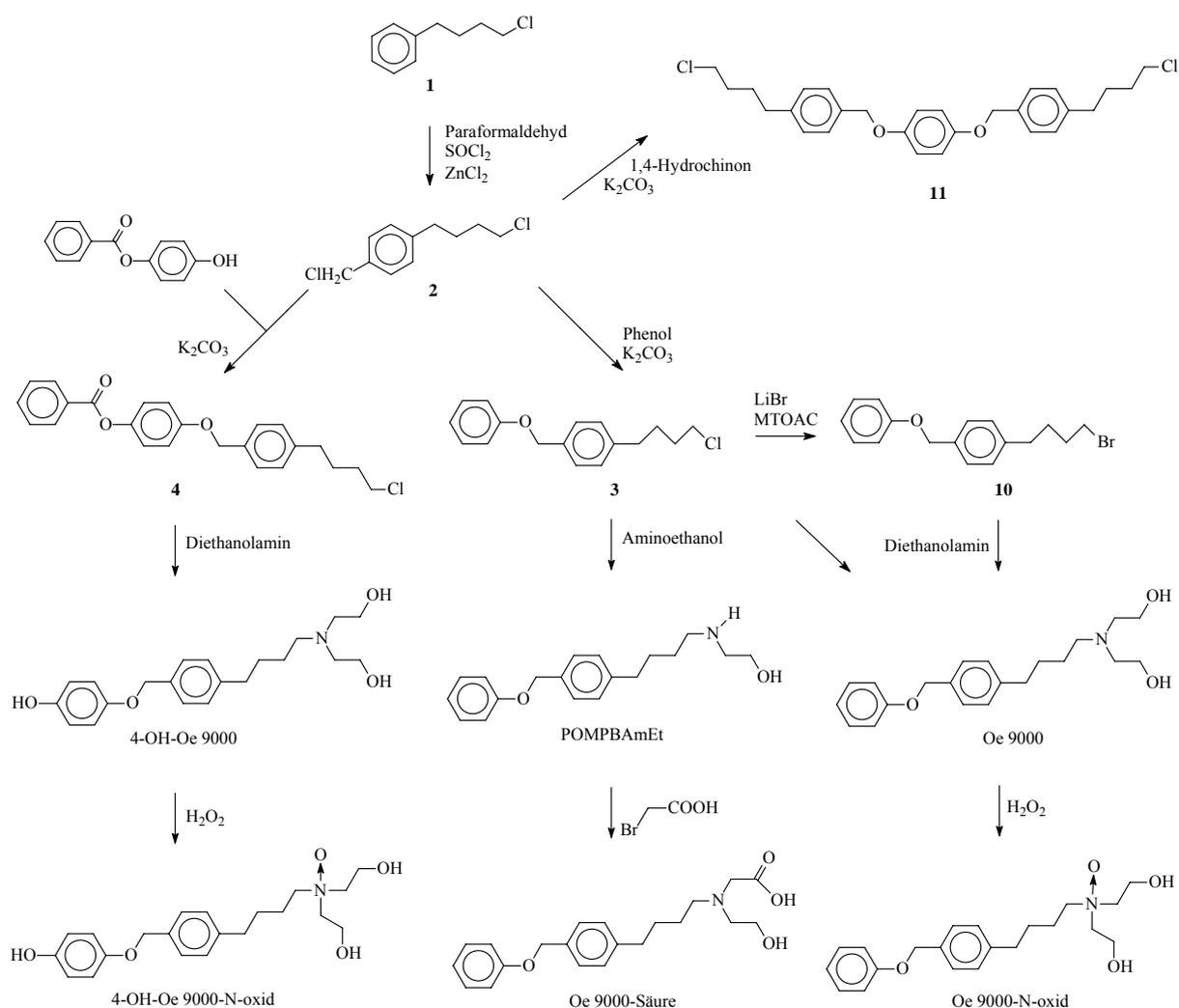


Abb. 9: Syntheschema zur Darstellung der Metaboliten 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, Oe 9000 und POMPBAmEt. MTOAC = Methyltrioctylammoniumchlorid

Die analoge Umsetzung des nach der Fraktionierung im Hochvakuum erhaltenen Isomerengemisches (**2**, **2a**, **2b**) mit 1,4-Hydrochinon und Kaliumcarbonat führte statt zum 4-[4-(4-Chlorbutyl)benzyloxy]phenol durch zweifache Veretherung zum 1,4-Bis[4-(4-chlorbutyl)benzyloxy]benzen (**11**) als Hauptprodukt. Durch Einsatz des 1,4-Hydrochinonmonobenzoats wurde die Nebenreaktion unterbunden. Die Estergruppe konnte während der sich anschließenden nukleophilen Substitution leicht abgespalten werden.

Die Umsetzung der Alkylhalogenide **3** und **4** mit dem 3-4fachen Überschuss Diethanolamin bzw. dem zehnfachen Überschuss 2-Aminoethanol führte damit direkt zu Oe 9000, 4-OH-Oe 9000 bzw. POMPBA_mEt. Im späteren Verlauf der Versuche wurde erkannt, dass sich eine bemerkenswerte Ausbeutesteigerung erzielen lässt, wenn vor der Aminzugabe mit Lithiumbromid und dem Phasentransferkatalysator Methyltrioctylammoniumchlorid das Alkylchlorid **3** nach Kobayashi et al. [1998] in der Schmelze zum Alkylbromid **10** umhalogeniert wird. Dieses Verfahren wurde durch Wange [2006] erfolgreich bei der Synthese von Fomocain-Derivaten mit Diethanolamin-Basenkomponekte angewendet.

Die nukleophile Substitutionsreaktion (S_N-Reaktion) des sekundärenamins POMPBA_mEt mit Bromessigsäure bei 60 °C in Anwesenheit von K₂CO₃ ergab das tertiäre Amin Oe 9000-Säure.

Die N-Oxide der Diethanolamin-Derivate Oe 9000 und 4-OH-Oe 9000 ließen sich analog den Fomocain-N-oxiden durch Oxidation der Amine mit Wasserstoffperoxid in Methanol gewinnen [Schatton 1977, Seeling 1996]. 4-OH-Oe 9000-N-oxid fiel zudem als Nebenprodukt bei der Synthese des 4-OH-Oe 9000 an.

3.1.3. Synthesen der stickstofffreien Metaboliten

3.1.3.1. POMPBA_mOH

Die Eintopf-Synthese nach Zahalka [Zahalka und Sasson 1986] ausgehend von **3** (Abb. 10) erwies sich als einfach, schnell und ertragreich (Gesamtausbeute über beide Teilschritte > 90 % d. Th.). Bei der Reaktion wurden die einfache Überführbarkeit des Alkylhalogenids zum Formiat **5** mit dem Phasentransferkatalysator Tetrabutylammoniumbromid in der Schmelze [Lele et al. 1983] und die hohe Hydrolysegeschwindigkeit des Esters ausgenutzt.

3.1.3.2. POMPBA und POMPBA_{ld}

Durch Umsetzung von 1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxy)methylbenzen (**6**) (Abb. 11) – einem Zwischenprodukt aus der Synthese

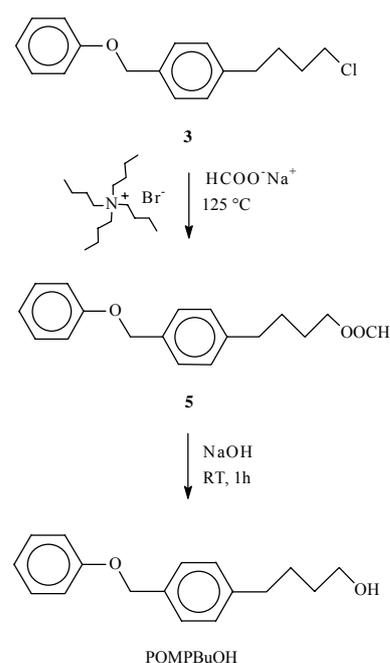


Abb. 10: Synthese des Metaboliten POMPBA_mOH

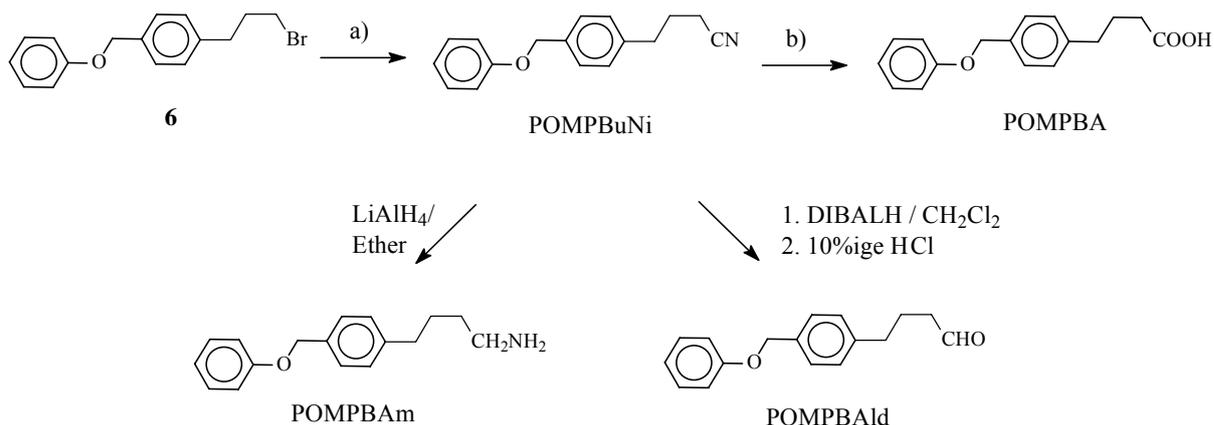


Abb. 11: Synthesen des als IS verwendeten POMPBuNi und der Metaboliten POMPBA, POMPBAlD sowie des postulierten Metaboliten POMPBAm. a) KCN; Triethylenglycol, 130 °C, 1 h. b) NaOH, Triethylenglycol, 130 °C, 13 h

von Fomocain-Derivaten mit Propylenkette, das nach einer Vorschrift von Wange [2006] erhalten wurde – mit KCN in einer Kolbe-Nitrilsynthese und anschließender alkalischer Nitrilhydrolyse ließ sich POMPBA in hoher Ausbeute (80 % d. Th.) gewinnen.

Auch die Synthese des Aldehyds POMPBAlD verlief über die Zwischenstufe des Nitrils POMPBuNi, das hierfür unter Verwendung von Diisobutylaluminiumhydrid (DIBALH) selektiv zum Imin reduziert wurde, welches in Anwesenheit von verdünnter Salzsäure einer hydrolytischen Spaltung zum Aldehyd unterlag.

3.1.3.3. POMPEs

Da aus verschiedenen Literaturquellen [Fang et al. 1998, Song et al. 2001] bekannt ist, dass bei Williamson-ähnlichen Ethersynthesen durch den Zusatz von Phasentransferkatalysatoren eine drastische Ausbeutesteigerung erzielt werden kann, wurde bei der Darstellung von POMPEs aus 4-(Brommethyl)phenyllessigsäure und Kaliumphenolat Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) in einem Anteil von 5 mol%, berechnet auf 4-(Brommethyl)phenyllessigsäure, zugesetzt und das Produkt nahezu quantitativ gewonnen.

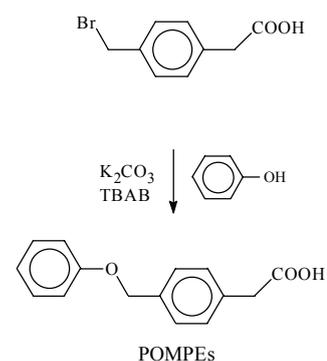


Abb. 12: Synthese von POMPEs

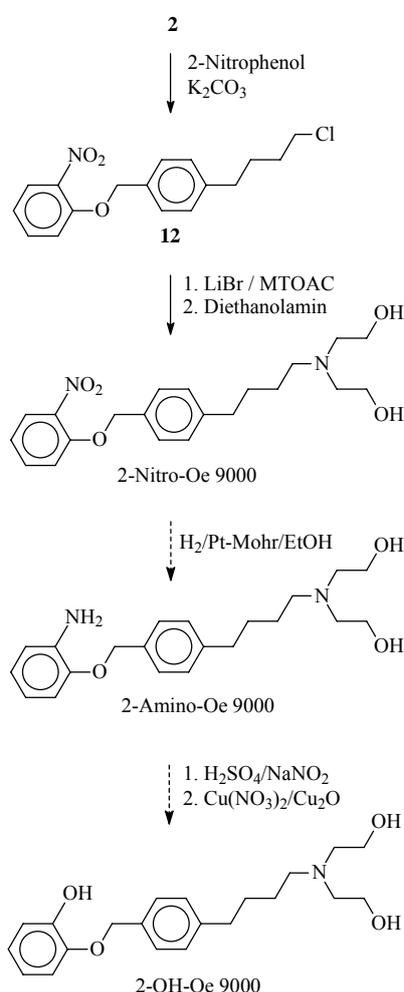
3.1.4. Synthesen weiterer postulierter Metaboliten und neuartiger Oe 9000-Derivate

Bei der Reduktion von POMPBuNi mit LiAlH₄ (vgl. Abb. 11) entstand der postulierte Metabolit POMPBAm in hoher Ausbeute (78 % d. Th.).

Die Synthese der Verbindung BHABBA (Abb. 13), die als Metabolit vermutet wurde, ging vom kommerziell erhältlichen (4-Brombutyl)benzen (**7**) aus, das in einer Friedel-Crafts-Acylierung in

Schwefelkohlenstoff und nachgeschalteter Haloformreaktion mit Natriumhypobromit-Lösung zum Benzoesäurederivat **9** in Ausbeuten von 86 % d. Th. umgesetzt wurde. In einer S_N -Reaktion entstand im Diethanolamin-Überschuss die Zielverbindung BHABBA, die sich mit Methanol und Schwefelsäure zu Methyl-BHABBA verestern ließ.

Die Bildung von 2-Nitro-Oe 9000 als Vorstufe des projektierten 2-OH-Oe 9000 (Abb. 14) gelang in Analogie zur Synthese des Oe 9000 durch selektiven Angriff von 2-Nitrophenol an **2**, gefolgt Umhalogenierung des nitrosubstituierten Etherchlorids **12** und anschließender S_N -Reaktion im Überschuss Diethanolamin. Die sich anschließende katalytische Hydrierung der Nitrofunktion führte sowohl unter Verwendung von Raney-Nickel als auch von Pt-Mohr zu einem Vielstoffgemisch, welches das angestrebte 2-Amino-Oe 9000 enthielt. Die Aufreinigung des Produkts bereitete allerdings erhebliche Schwierigkeiten, sodass der Syntheseweg nicht weiter verfolgt wurde.



2-Nitro-Oe 9000 sollte gemeinsam mit den weiteren Oe 9000-Derivaten den pharmakologisch-toxikologischen Prüfungen unterzogen werden.

Wegen des starken $-I$ - und $-M$ -Effekts der Nitrogruppe, repräsentiert es ein Oe 9000-Derivat mit elektronenarmem *exo*-Zyklus. Zusammen mit den Dimer-ähnlichen Verbindungen des Oe 9000 (OeDimer und Bis(POMPb)AmEt), mit denen in *Patch-Clamp*-Untersuchungen möglicherweise Erkenntnisse über den Zugang des Oe 9000 zu seiner Bindungsstelle gewonnen werden könnten (vgl. Kapitel 3.5.1.), erweiterte 2-Nitro-Oe 9000 die Substanzpalette zur Aufstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Oe 9000-Derivaten.

Abb. 14: Syntheschema zur Darstellung von 2-Nitro-Oe 9000. Auf dem weiteren Syntheseweg zum 2-OH-Oe 9000 ließen sich keine reinen Syntheseprodukte gewinnen.

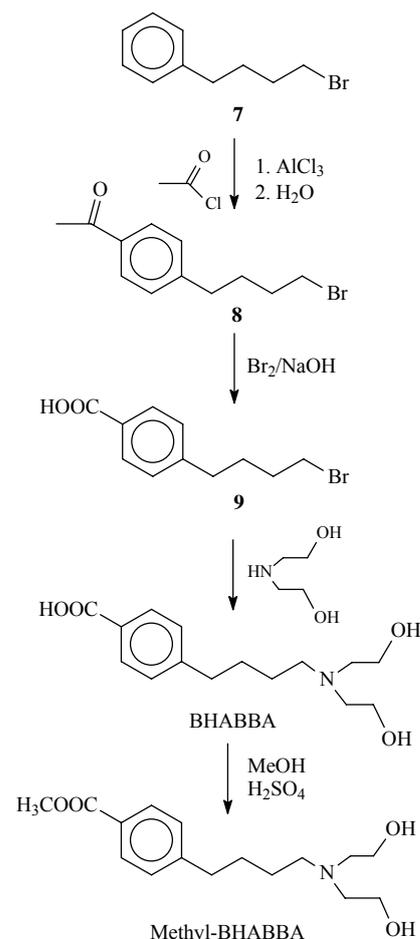


Abb. 13: Synthese der postulierten Metaboliten BHABBA und Methyl-BHABBA

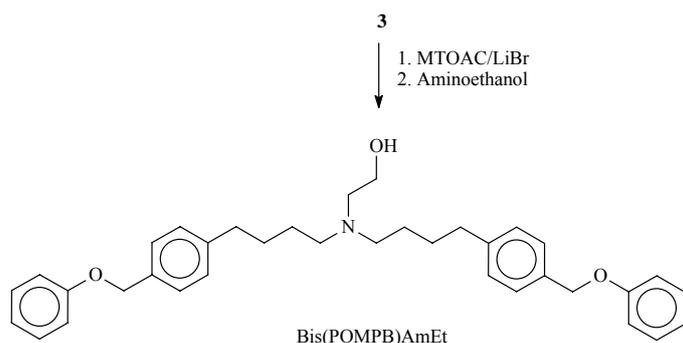
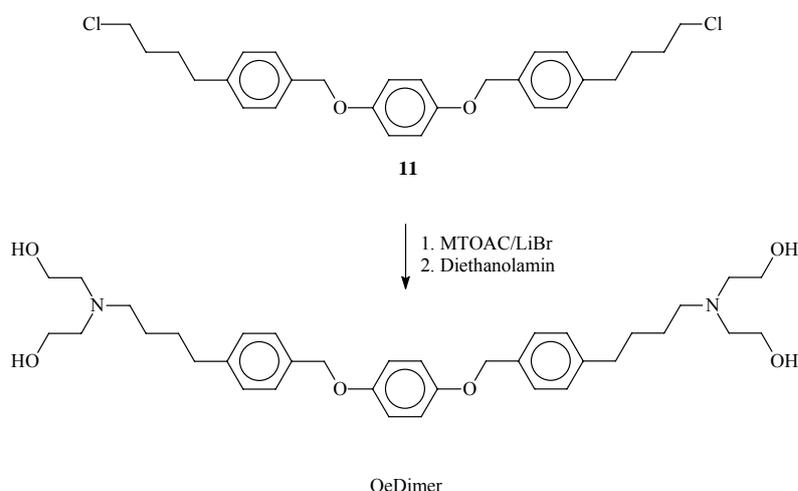


Abb. 15:

Oben: Entstehung von Bis(POMPb)AmEt als Nebenprodukt bei der Synthese von POMPbAmEt. Die Nebenreaktion findet auch statt, wenn auf die Umhalogenierung verzichtet wird. MTOAC = Methyltrioctylammoniumchlorid



Unten: Synthese von OeDimer durch Umhalogenierung des Alkylchlorids und nukleophile Substitutionsreaktion

OeDimer wurde ausgehend von **11** unter Anwendung der bereits beschriebenen Reaktionsprinzipien synthetisiert (Abb. 15). Bis(POMPb)AmEt entstand als Nebenprodukt bei der Synthese von POMPbAmEt durch zweifachen Angriff des Alkylhalogenids an Aminoethanol.

3.2. Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen hinsichtlich Identität, Reinheit und Lagerstabilität

3.2.1. Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie diente der Identitätssicherung der synthetisierten Referenzsubstanzen und aller übrigen isolierten und reinen Syntheseprodukte. Standardmäßig wurden die ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen, in kom-

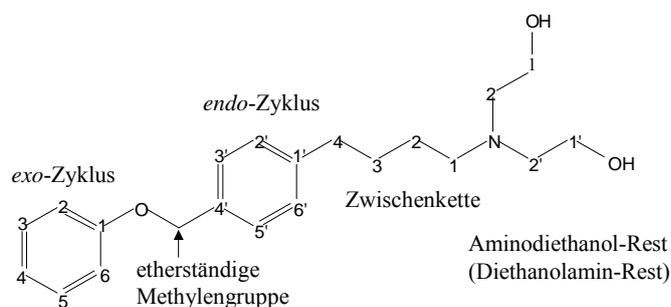


Abb. 16: Zählweise der Atome zur NMR-Auswertung für Oe 9000

plexeren Fällen zusätzlich C,H-COSY-NMR-Spektren, um den Strukturbeweis zu erbringen.

3.2.1.1. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die Mehrzahl der synthetisierten Referenzsubstanzen (Oe 9000, dessen N-Oxid, POMPBA_mEt, Oe 9000-Säure, POMPBA, POMPBuOH und POMPEs) wies mit der Phenoxyethylphenyl-Gruppe das typische Strukturmerkmal der Fomocaine auf, das im ^{13}C -NMR-Spektrum leicht durch das Signal der Methylengruppe bei 71 ppm und 8 charakteristische Signale im Aromatenbereich zu erkennen war (vgl. Abb. 17). Hierbei lagen die 3 Linien der drei quartären Kohlenstoffe im Tieffeld zwischen 135 und 161 ppm, 3 Linien für je zwei gleichartig magnetisierte Kohlenstoffe (C-2'/C-6', C-3'/C-5', C-3/C-5) zwischen 128 und 131 ppm und schließlich 2 Linien der *exo*-zyklischen Kohlenstoffe C-2/C-6 und C-4 zwischen 115 – 122 ppm, die aufgrund des +M-Effekts des Ethersauerstoffs ins Hochfeld verschoben waren. Die Einführung einer Hydroxylfunktion am *exo*-zyklischen C-4 bewirkte dessen Verschiebung von 122 auf 150 ppm ins Tieffeld.

Da strukturelle Unterschiede zwischen den Oe 9000-Metaboliten vornehmlich im heteroaliphatischen Molekülteil auftraten, seien die Signale im Hochfeld zwischen 25 und 65 ppm exemplarisch für Oe 9000 detailliert beschrieben:

Entsprechend den Elektronegativitäten der Heteroatome im Molekül war die chemische Verschiebung für das Signal der zwei alkoholischen Kohlenstoffe bei 61 ppm um ca. 3 – 5 ppm größer als für die aminständigen Kohlenstoffe. Für die drei verbleibenden Kohlenstoffatome der Zwischenkette trat Kernresonanz im Hochfeld auf. Hierbei war der entschirmende Effekt des substituierten Phenylrests auf den Kohlenstoff C-4 anhand der stärkeren chemischen Verschiebung gegenüber den benachbarten Kohlenstoffen C-2 und C-3 zu beobachten.

Ausgehend vom Oe 9000 führte der Verlust der ersten Hydroxyethylgruppe zum sekundären Amin POMPBA_mEt, dessen N-ständige C-Atome gegenüber der Muttersubstanz um 4 – 5 ppm ins Hochfeld

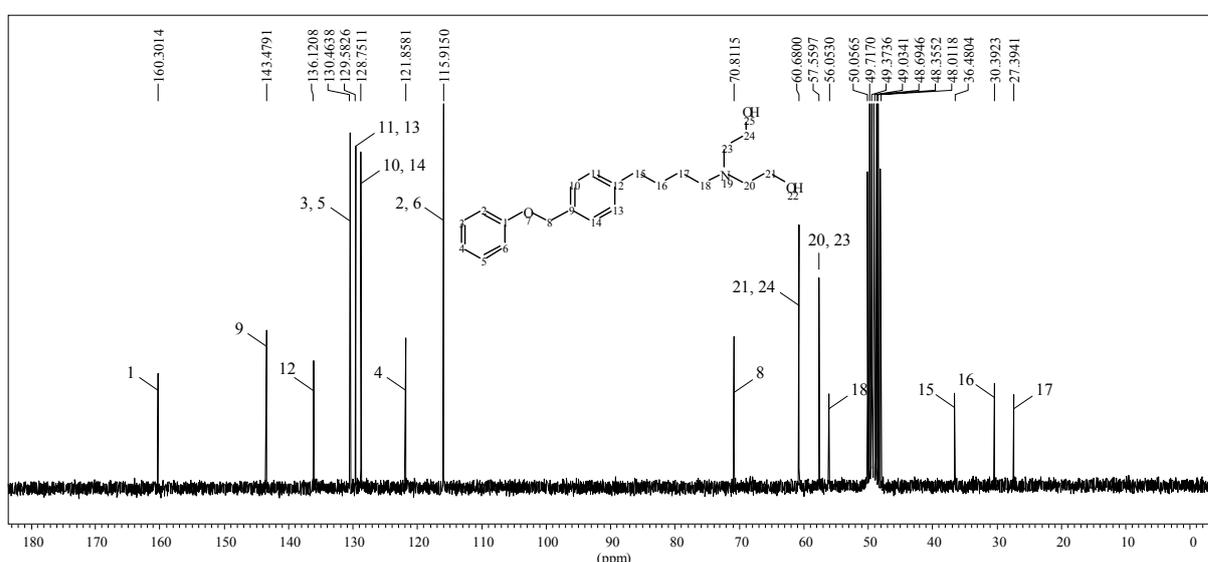


Abb. 17: ^{13}C -NMR-Spektrum (250 MHz) von Oe 9000 in CDCl_3

verschoben waren. Beim primären Amin POMPBA, wurde das verbleibende C-1 sogar um weitere 7 ppm auf 42 ppm hochfeldverschoben.

N-Oxidation bewirkte eine Tieffeldverschiebung der N-ständigen C-Atome um ca. 11 – 12 ppm.

Die Carboxylgruppen der Metaboliten POMPEs und POMPBA ließen sich durch Signale bei 173 ppm (DMSO-D₆) bzw. 179 ppm (POMPBA, CDCl₃) nachweisen. Der Aldehyd POMPBAld konnte leicht anhand des Signals seiner Carbonylfunktion bei 202 ppm (CDCl₃) identifiziert werden.

3.2.1.2. ¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektren der Oe 9000-Metaboliten unterschieden sich nur in Teilbereichen vom Oe 9000-Spektrum, weshalb letzteres im Folgenden exemplarisch für die gesamte Stoffklasse erläutert sei. Die Nummerierung der Protonen geht aus Abb. 16 hervor. Die Protonen am *endo*-Zyklus werden jeweils mit einem Strich dargestellt.

Die Integration der Signale im Oe 9000-Spektrum ließ 18 aliphatische neben 9 aromatischen Protonen erkennen (vgl. Abb. 18 oben). Von letzteren waren die 3 Signale *exo*-zyklischer Protonen aufgrund des starken +M-Effekts des Ethersauerstoffs gegenüber den restlichen Aromatenprotonen hochfeldverschoben und bildeten zwischen 6,9 und 7,0 ppm eine eigene Signalgruppe. Es handelte sich dabei um die Protonen an C-2, C-4 und C-6. Je zwei Protonen (H_A, H_A' und H_B, H_B') am *endo*-Zyklus unterschieden sich nur wenig in ihrer chemischen Verschiebung. Sie ließ sich am besten durch ein AB-System beschreiben. Es traten vier Linien auf (7,37, 7,34, 7,23, 7,20 ppm), von denen die äußeren weniger intensiv als die inneren waren (Dacheffekt). Zwischen diesen vier Linien lag ein Pseudotriplett [Breitmeier 2005], wie sich aus den ungleichen, aber ähnlichen Kopplungskonstanten von 8,4 Hz und 7,6 Hz ablesen ließ, dessen eine Linie (bei 7,24 ppm) mit einer inneren Linie des AB-Systems zusammenfiel. Dem Pseudotriplett konnten die Protonen 3 und 5 des *exo*-Zyklus zugeordnet werden, die mit ihren jeweiligen Nachbarprotonen koppelten. Charakteristisch für alle dargestellten Oe 9000-Derivate war die etherständige Methylengruppe, die durch den Aromaten und den –I-Effekt des Ethersauerstoffs stark entschirmt wurde und so als Singulett bei 5,0 ppm zu finden war. Die Verbindungen mit intaktem Diethanolamin- bzw. Ethanolamin-Rest wiesen ein Triplett bei 3,6 ppm auf, welches den carbonständigen Wasserstoffen der –CH₂OH-Gruppe zuzuordnen war. Mit Hilfe von dessen Kopplungskonstante (J = 5,9 Hz) erschloss sich das Signal zwischen 2,50-2,75 ppm, das aus drei Triplets hervorging und 8 Protonen darstellte. Die gleiche Kopplungskonstante zeigte nur das mittlere der drei Triplets mit den Linien bei 2,66, 2,64 und 2,61 ppm. Damit stand fest, dass es sich hierbei um die 4 Protonen handelte, die vicinal zu den je zwei am Kohlenstoff gebundenen Protonen der –CH₂OH-Gruppen stehen. Die verbleibenden Triplets der Signalgruppe hatten ähnliche chemische Verschiebungen und fielen daher mit dem ersten Triplett teilweise zusammen. Hierbei wurden die Protonen am C-1 der Butylkette (Linie bei 2,69 ppm) durch den –I-Effekt des Stickstoffs stärker entschirmt als die unter dem Einfluss des benachbarten Aromaten stehenden Protonen am C-4 (Linien

bei 2,54 und 2,57 ppm). Noch deutlicher fiel die Entschirmung beim N-Oxid aus. Dort wurden die Linien der Protonen in Stickstoffnachbarschaft aufgrund ihrer Tieffeldverschiebung um 0,8 ppm sogar von dem Triplet der C-4-ständigen Protonen getrennt.

Schließlich erschienen im Spektrum die 4 Protonen an C-2 und C-3 der Butylenkette als Multipllett im Hochfeld.

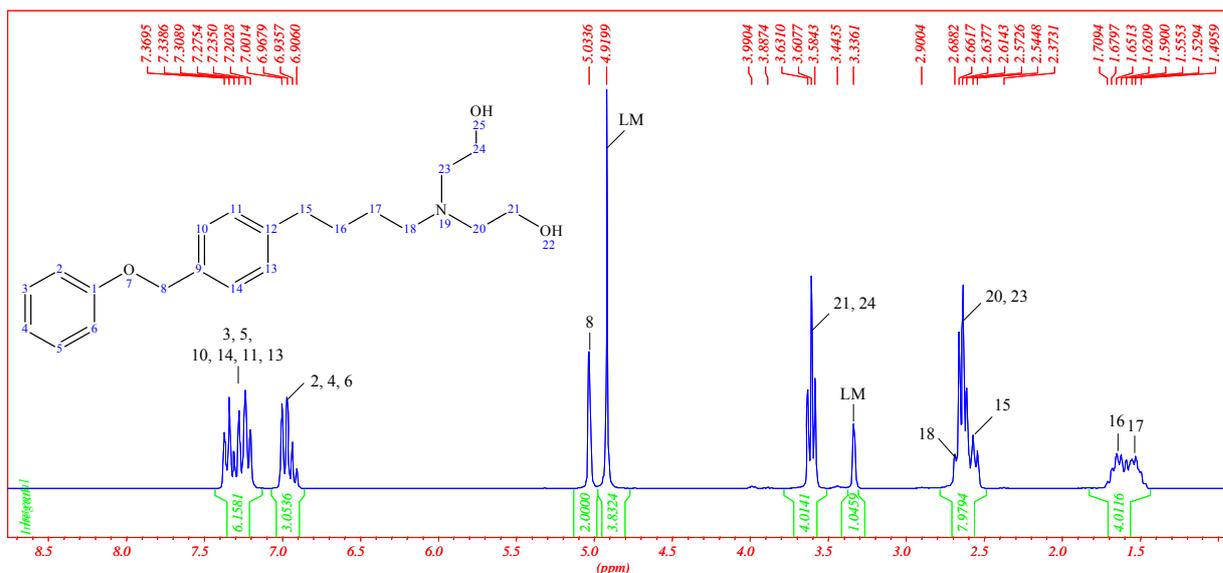
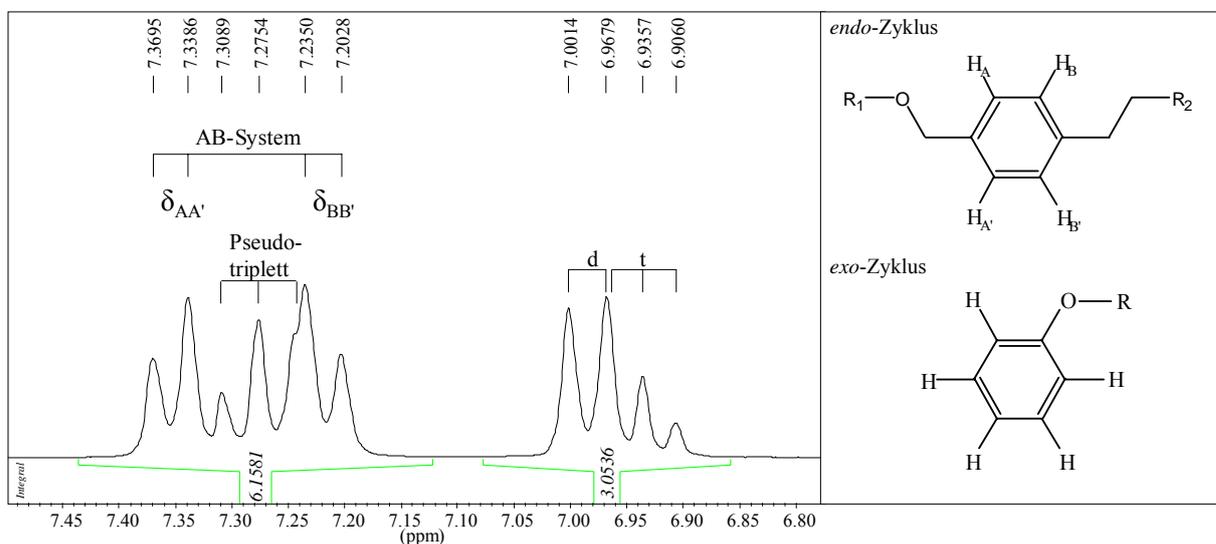


Abb. 18: Bild oben: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Oe 9000 in CD_3OD , 250 MHz.

δ [ppm] = 7,15-7,41 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,87-7,07 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,03 [2H, s, benzy], 3,54-3,70 [4H, t, $J = 5,9$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$], 2,50-2,75 [8H, m, $\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-} + \text{N}(\text{CH}_2\text{-})_3$], 1,44-1,77 [4H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$]. LM = Lösungsmittel

Bild unten: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Oe 9000 (Aromatenbereich). Der *endo*-Zyklus (oberer Formelausschnitt) bildet ein AB-System. Die Protonen in ortho- und para-Position des *exo*-Zyklus (unterer Formelausschnitt) sind gegenüber den meta-ständigen hochfeldverschoben. Aus den C,H-NOSY -Spektren von chiralen Fomocainen [Wange 2006] ist bekannt, dass die Protonen der etherständigen Methylengruppe in räumlicher Nähe zu den Protonen des 7,34-7,37 ppm-Signals stehen, woraus hervorgeht, dass es sich um die *endo*-zyklischen Protonen H_A und H_A' handelt.



3.2.2. UV-Spektroskopie

Die Absorptionsspektren der Oe 9000-Derivate waren bei der Suche nach einer geeigneten Wellenlänge für die HPLC hilfreich. Die UV-Spektren wurden daher alle im FM des HPLC-Systems 5 aufgenommen.

Ein für unsubstituierte Oe 9000-Derivate typisches Spektrum ist in Abb. 19 dargestellt. Die beiden Maxima bei 222 und 271 nm gehen auf zwei chromophore Gruppen des Oe 9000-Moleküls zurück. Da der Ether-Sauerstoff auxochrom mit seinen nichtbindenden Elektronenpaaren mit dem π -System des *exo*-zyklischen Aromaten wechselwirkte und es damit unter Ausbildung neuer π - und π^* -Orbitale zur energetischen Anhebung des HOMO kam, war das langwelligste Maximum des *exo*-Zyklus mit 271 nm gegenüber dem des *endo*-Zyklus bathochrom verschoben. Das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten in den Maxima $\epsilon_{222}/\epsilon_{271}$ war 16/1.

Dass beide Chromophore durch die Methylengruppe nicht gänzlich voneinander getrennt sind, ließ sich anhand des Vergleichs von Oe 9000-Derivaten mit den am *exo*-Zyklus substituierten Derivaten erkennen, denn letztere wiesen eine bathochrome Verschiebung des ersten Maximums von 222 auf 223 nm (4-OH-Oe 9000 und 4-OH-Oe 9000-N-Oxid) bzw. 224 nm (OeDimer) auf. Dieses Phänomen war aber für die praktische Arbeit ohne Belang. Das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten in den Maxima $\epsilon_{223}/\epsilon_{292}$ betrug etwa 8/1.

Von größerem analytischen Wert für die Metabolitenidentifizierung war hingegen die Lage des bei höheren Wellenlängen auftretenden lokalen Maximums. Während die am Aromaten unsubstituierten Verbindungen durchgehend bei 271 nm (lokal) maximal absorbierten und bei 277 nm eine Schulter ausbildeten, zeigten die 4-OH-Oe 9000-Derivate eine bathochrome Verschiebung auf 292 nm und die Abwesenheit der Schulter. Von den in 2- und 3-Stellung oxygenierten Fomocainin ist bekannt, dass diese jeweils Maxima bei 276 sowie bei 280 und 273 nm aufweisen [Oelschläger et al. 1975]. Diese

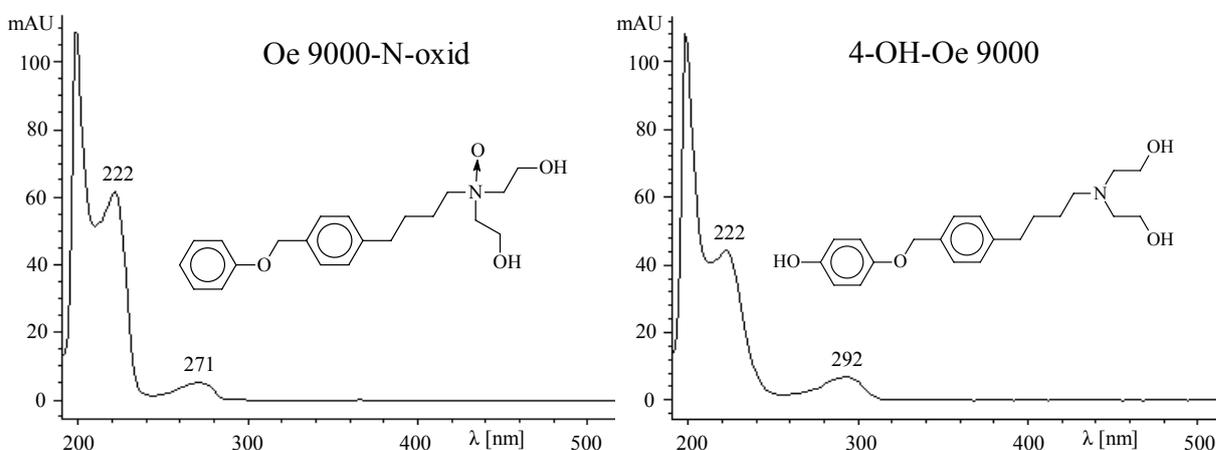


Abb. 19: Online-UV-Spektren von Oe 9000-N-oxid und 4-OH-Oe 9000. Die Einführung der Hydroxylfunktion in 4-Position des *exo*-Zyklus bewirkt eine bathochrome Verschiebung des lokalen Maximums von 271 auf 292 nm.

Charakteristika gestatteten die eindeutige Zuordnung der phenolischen OH-Gruppe von 4-OH-Oe 9000 und dessen N-Oxid zur Position 4 des *exo*-zyklischen Aromaten.

Die Oxidation des Benzylkohlenstoffs zur entsprechenden Carbonsäure wie bei BHABBA ging mit einer bathochomen Verschiebung des globalen Maximums von 222 nm auf 239 nm einher.

Referenzsubstanz	globales Maximum (nm)	lokales Maximum (nm)	Schulter (nm)
Oe 9000	222	271	277
Oe 9000-N-oxid	222	271	277
Oe 9000-Säure	222	271	277
POMPBA_mEt	222	271	277
POMPBA_m	222	271	277
POMPBA	222	271	277
POMPBAld	222	271	277
POMPBuOH	222	271	277
POMPBuNi	222	271	277
POMPEs	222	271	277
Phenol	214	271	277
4-OH-Oe 9000	223	292	-
4-OH-Oe 9000-N-oxid	223	292	-
OeDimer	224	290	-
2-Nitro-Oe 9000	215	263, 331	-
BHABBA	239	-	-
Methyl-BHABBA	240	-	-

Tab. 8: UV-Maxima der synthetisierten Referenzsubstanzen

Die UV-Spektroskopie leistete folglich nützliche Dienste, um Anwesenheit, Art und Stellung von Substituenten an den chromophoren Zentren des Oe 9000-Moleküls zu erkennen. Außerdem sollte so auch der Verlust des *exo*-Zyklus, wie er nach oxidativer Dearylierung zu erwarten gewesen wäre, anhand des Verschwindens des Maximums bei 271 nm im (Online)-UV-Spektrum leicht nachzuweisen sein. Strukturelle Veränderungen gegenüber der Muttersubstanz in der aliphatischen Seitenkette ließen sich UV-spektroskopisch hingegen nicht erkennen.

3.2.3. IR-Spektroskopie

Die IR-Spektroskopie wurde als weitere identitätssichernde Methode für alle Zielverbindungen herangezogen. Erwartungsgemäß ähnelten die IR-Spektren der Oe 9000-Derivate dem des Fomocain (Abb. 20).

War die Phenoxyethylphenyl-Struktur ohne weitere Substitution erhalten geblieben, traten typische Banden des *exo*-Zyklus bei 1596 cm^{-1} und 1496 cm^{-1} sowie die aus der C-O-Deformationsschwingung des Ethers resultierende Bande bei 1250 cm^{-1} auf. 4-Hydroxylierung des *exo*-Zyklus bewirkte eine Verschiebung der letzteren Bande auf 1234 cm^{-1} , bei schwereren Substituenten wie beim OeDimer (1228 cm^{-1}) sogar zu noch kleineren Wellenzahlen.

Wichtigstes Unterscheidungsmerkmal zum Fomocain bestand in der mittelstarken, aber sehr breiten Bande bei 3382 cm^{-1} , der OH-Valenzschwingung, die durch Lage und Form Hinweis auf die Präsenz mindestens einer Wasserstoffbrückenbindung gab. Die Öffnung des Morpholinrings zum

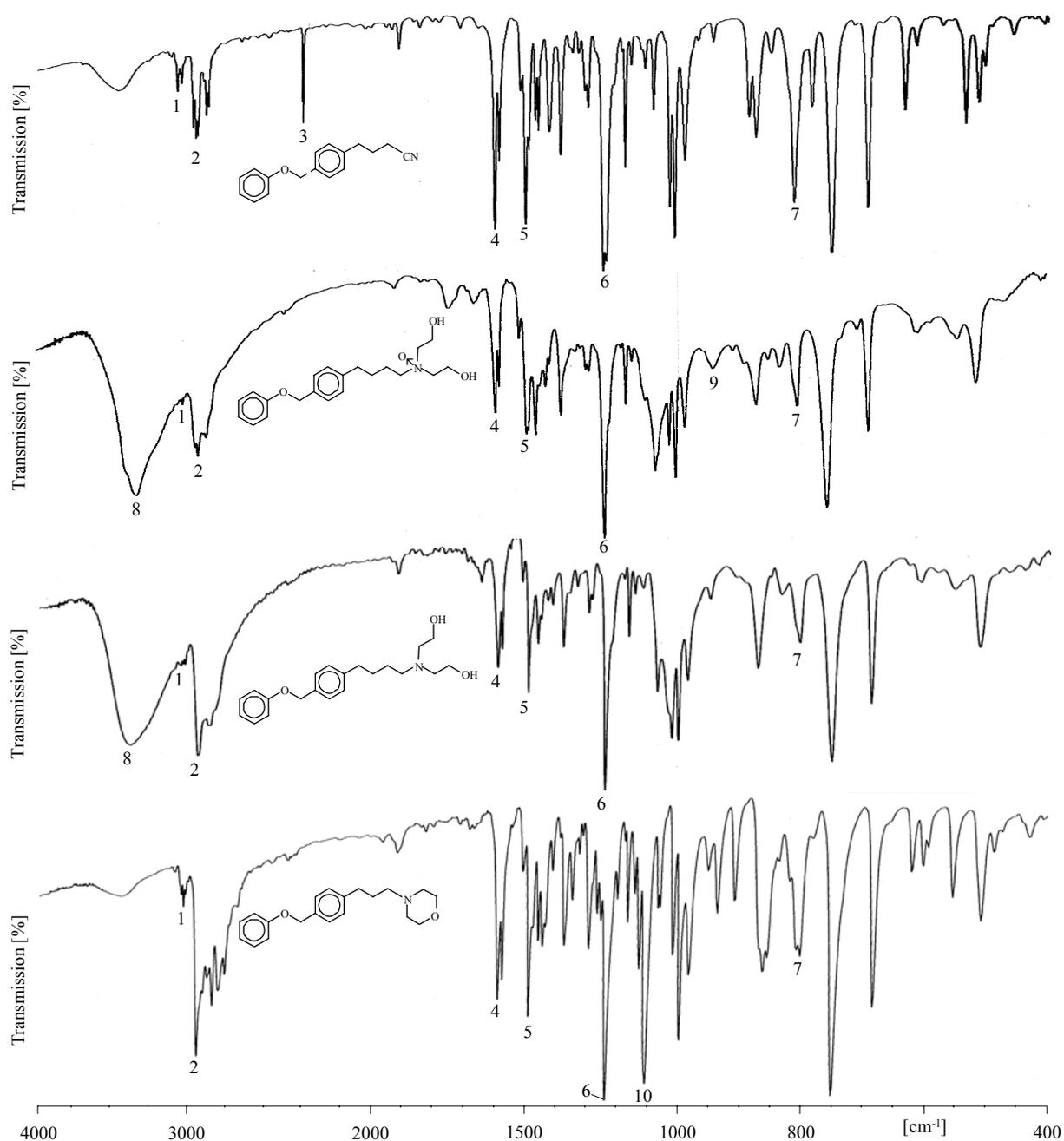


Abb. 20: IR-Spektren von POMPuNi, Oe 9000-N-oxid, Oe 9000 im Vergleich zur Leitsubstanz Fomocain. 1 = CH-Val., arom., 2 = CH-Val., aliph., 3 = C≡N-Val. des Nitrils; 4 u. 5 = C=C-Val., *exo*-Zyklus; 6 = C-O-Def., Ether; 7 = CH-Def. des di-*para*-substituierten *endo*-Zyklus; 8 = OH-Val. Alkohol; 9 = N-O-Def. des N-Oxids; 10 = C-O-Def. (Morpholin)

Aminodiethanol führte zum Verlust der morpholintypischen C-O-Deformationsschwingung bei 1110 cm^{-1} . Die N-O-Deformationsschwingungen der N-oxidischen Oe 9000-Derivate lagen mit $880 - 950\text{ cm}^{-1}$ bei etwas kleineren Wellenzahlen als die N-Oxide der morpholinhaltigen Fomocaine mit $950 - 975\text{ cm}^{-1}$ [Seeling 1996].

Da die wichtigsten Substituenteneinflüsse für Fomocaine bereits aus den Literaturspektren abzuleiten sind [Matheus 1977, Schatton 1977, Seeling 1996], sei hier lediglich auf Kapitel 4.1. verwiesen, in dem die IR-Banden der synthetisierten Verbindungen aufgeführt sind.

3.2.4. Prüfungen der Substanzen auf Reinheit

Substanzen, die zur quantitativen Analyse bei der Erstellung von Kalibriergeraden genutzt oder auf oberflächenaktive Eigenschaften geprüft wurden, wiesen eine HPLC-Reinheit von mind. 99 % auf. Bei allen anderen Zielverbindungen wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet, wenn die HPLC-Reinheit mind. 94 % betrug. Die Prüfungen erfolgten mit den unter 4.2.1.3. beschriebenen HPLC-Methoden 1, 2 oder 5. Flüchtige Verunreinigungen wurden zusätzlich mit Hilfe der Gaschromatographie erfasst.

3.2.5. Gaschromatographische Analyse der Syntheseprodukte

Die Zwischenstufen und Zielverbindungen wurden gaschromatographisch mit FI-Detektion oder mit EI-MS-Detektion auf ihre Identität und Reinheit überprüft (Abb. 21). Da die Amino- und Amino-di-

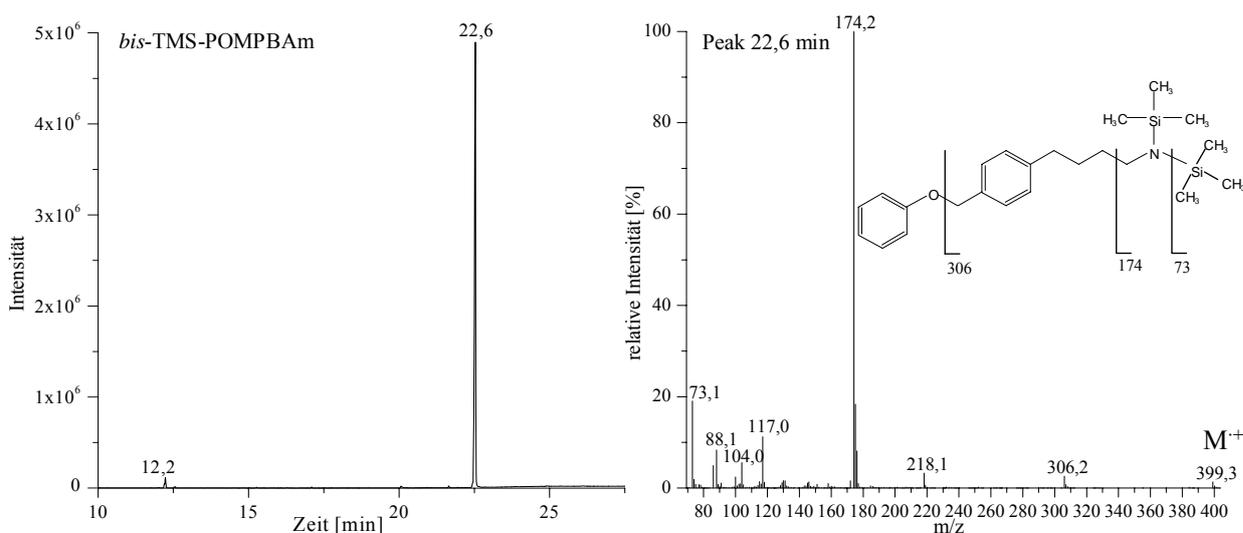


Abb. 21: GC-MS des zweifach trimethylsilylierten POMPBA zu dessen Identitätssicherung und Reinheitsprüfung. **Links:** Ausschnitt aus Gaschromatogramm. **Rechts:** EI-Massenspektrum des Hauptpeaks. Charakteristisch für trimethylsilylierte primäre Amine ist das Auftreten des aus der Oniumspaltung resultierenden Fragments mit m/z 174.

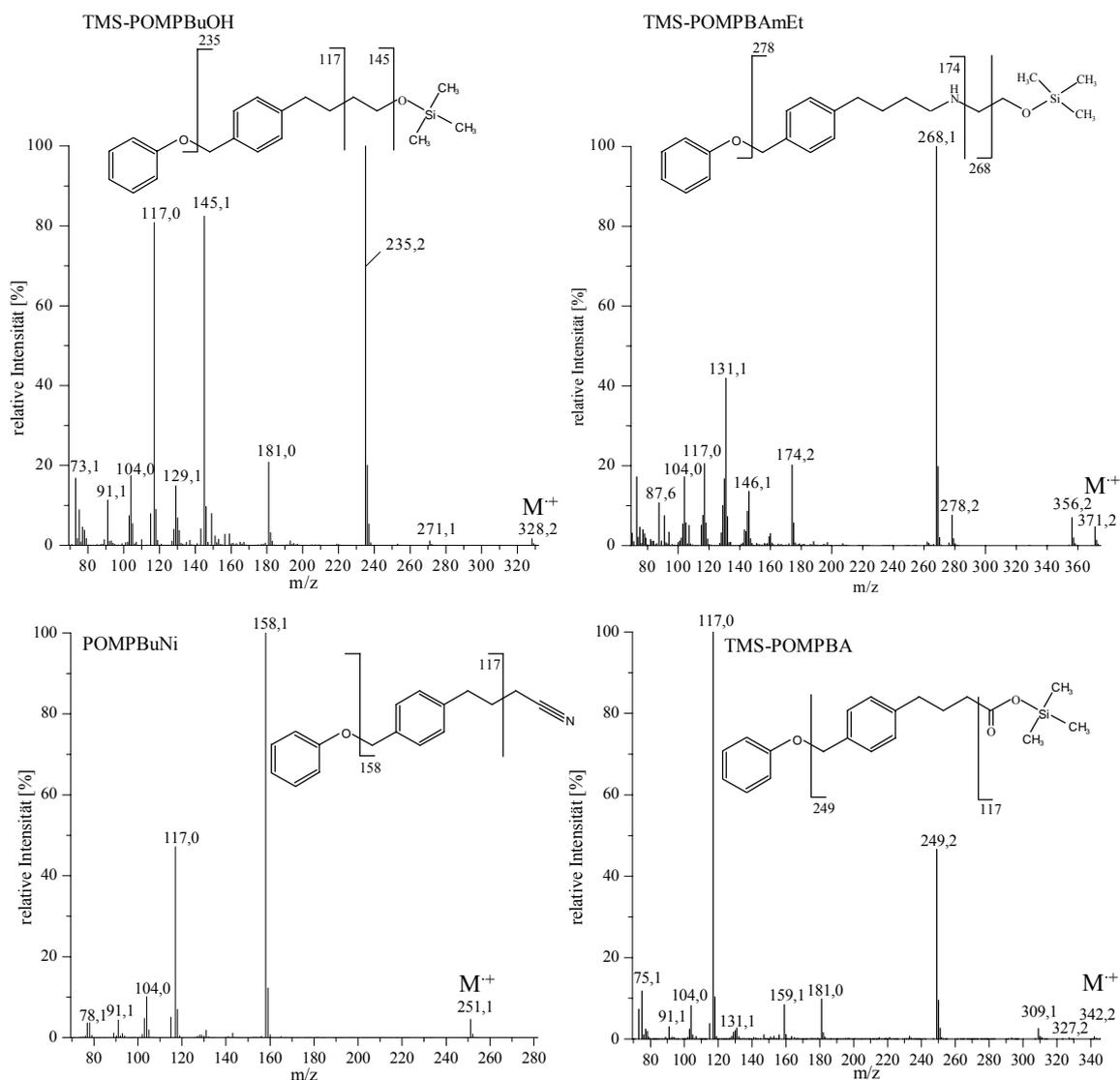


Abb. 22: Online-EI-Massenspektren von POMPBuOH, POMPBAmEt, POMPBuNi und POMPBA nach Derivatisierung mit BSTFA und gc Trennung. Der Molekülpeak ist jeweils mit M⁺ gekennzeichnet.

ethanole sowie Carbonsäuren aufgrund hoher intermolekularer Wechselwirkungen eine geringe Flüchtigkeit zeigten, war deren Derivatisierung vonnöten. Dabei stellte sich N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) als ideales Silylierungsmittel für alle synthetisierten Zielverbindungen heraus, weil es diese schnell, (nahezu) quantitativ und reproduzierbar zu definierten Produkten umsetzte, die alle bis auf OeDimer und Bis(POMPBA)AmEt eine hinreichende Flüchtigkeit und eine hervorragende Peakschärfe in der GC zeigten. Hierbei wurden alkoholische Hydroxylfunktionen sowie Carbonsäurefunktionen einfach trimethylsilyliert, während primäre Amine wie POMPBAm doppelt umgesetzt wurden. Sekundäre und tertiäre Aminfunktionen oder auch Nitrile blieben hingegen unangetastet (Abb. 22). Die Trimethylsilylierung der N-Oxide führte gegenüber den entsprechenden Aminen zu einer deutlichen Verkürzung der Retentionszeiten in der GC.

Aus den Massenspektren der Oe 9000-Derivate ließen sich einige Fragmentierungsregeln ableiten. Die trimethylsilylierten Derivate (TMS-Derivate) zerfielen während der Ionisierung rasch, meist unter

Verlust eines Methylradikals, sodass neben dem Molekülpeak M^+ häufig $[M-15]^+$ zu beobachten war. Außerdem unterlag die Phenoxymethylphenyl-Struktur einer Benzylspaltung. Das resultierende Fragment $[M-93]^+$ wies bei Abwesenheit labiler funktioneller Gruppen durch die Möglichkeit zur Stabilisierung zum substituierten Tropylium-Kation die höchste Intensität auf [vgl. Seeling 1996] und war zusammen mit dem aus der Folgespaltung resultierenden Schlüsselfragment m/z 117 indikativ für alle Fomocain-Derivate mit Butylen-Zwischenkette. TMS-Aminoethanol- und TMS-Amino-diethanolgruppen zerfielen in einer Oniumspaltung (auch β -Spaltung genannt) zu den mesomeriestabilisierten Kationen $RNH-CH_2^+$ bzw. $R(R')N-CH_2^+$ und dem Radikal $\cdot CH_2-O-Si(CH_3)_3$ (vgl. POMPBAmEt, Abb. 22). TMS-Carbonsäuren gaben ihre Identität hingegen durch Fragmentierung zu $[O\equiv CO-Si(CH_3)_3]^+$ preis, das ein intensives Signal bei m/z 117 gab. Charakteristisch für viele TMS-Derivate war auch das Auftreten des TMS-Kations als Schlüssel-fragment mit m/z 73.

3.2.6. Untersuchung der Stabilität der Phase-I-Metaboliten

Die physikalische und chemische Stabilität von Fomocainen wurde bereits eingehend untersucht [Schatton 1977]. Derivate mit Diethanolamin-Basenkomponente zeigten sich als Festsubstanzen im Tageslicht über drei Monate gegenüber Temperaturen von bis zu 50 °C stabil. In neutraler, schwach saurer (pH 5) und stark alkalischer Lösung (3 M-NaOH) traten bei 50 °C keine Zersetzungsprodukte im Untersuchungszeitraum von 24 h auf. In stark sauren wässrigen Lösungen (3 M-HCl) ist schon innerhalb von 24 h die Bildung von aus der Etherspaltung resultierenden Zersetzungsprodukten sowohl für Fomocain als auch für die Oe 9000-homologe Verbindung Oe 7000 beschrieben [Wennek-Klose 2005].

In Langzeitstabilitätstests erwies sich Fomocain in Phosphatpuffer pH 7,4 über 100 d als chemisch stabil. Auch Oe 9000-HCl blieb unter diesen Bedingungen intakt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren Oe 9000 und seine Metaboliten in den verschiedenen Biotransformationsmodellen bis zu drei Tage lang dem Einfluss von Sauerstoff, Tageslicht und körperwarmen wässrigen Lösungen (z.B. Blut, Urin, Inkubationsmedien) ausgesetzt, bevor die Analysen durchgeführt werden konnten. Um entscheiden zu können, ob Substanzen, die während dieser Experimente entstehen, durch enzymatische Reaktionen generiert werden oder ob es sich lediglich um Metabolite oder gar Artefakte handelt, musste auf chemische Stabilität der Phase-I-Metaboliten geprüft werden. Zusätzlich sollte ausgeschlossen werden, dass Fehler bei der quantitativen Erfassung der Metaboliten aufgrund von Instabilitäten auftreten könnten.

3.2.6.1. Ergebnisse der Stabilitätstests

Oe 9000-N-oxid, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, 4-OH-Oe 9000, POMPBA, POMPBUOH, POMPBAmeT sowie Oe 9000-Säure wurden im Konzentrationsbereich zwischen $8 \cdot 10^{-5}$ bis $1,6 \cdot 10^{-4}$ M nach einer 4-tägigen Lagerung bei 37 °C in Phosphatpuffer pH 7,4 zu 99 – 101 % wiedergefunden und erwiesen sich damit als chemisch stabil. Es wurden auch keine Abbauprodukte beobachtet. Damit war sichergestellt, dass die untersuchten Phase-I-Metaboliten auch bei Versuchszeiten über mehrere Tage noch nachweisbar und quantifizierbar waren und aus ihnen keine Zersetzungsprodukte hervorgehen sollten.

3.3. Biopharmazeutische Untersuchungen

3.3.1. Qualitative und quantitative Analyse der Metaboliten in den Biotransformationsmodellen

3.3.1.1. Entwicklung der analytischen Methoden

Zur Erfassung aller wesentlichen Phase-I-Metaboliten mussten die analytischen Methoden den nachfolgend umrissenen Anforderungen und Zielkriterien gerecht werden.

Aufgrund des hohen Probendurchsatzes sollte die Identifizierung von Säuren, Basen und Neutralstoffen nebeneinander bei möglichst kurzen Analysenlaufzeiten erfolgen. Hierbei war zu gewährleisten, dass die Detektion der gebildeten Metaboliten von den aus den biologischen Proben stammenden Matrixbestandteilen getrennt stattfindet. Da die Biotransformationsreaktionen des Oe 9000 sowohl zu einem Zuwachs als auch zu einer Abnahme der Lipophilie führen konnten, musste für die chromatographischen Methoden teilweise mit sehr hohen Selektivitätsunterschieden der Analyten gerechnet werden. Die Methoden sollten außerdem eine hohe Orthogonalität und Robustheit aufweisen.

In dieser Arbeit wurden für die Analyse von Oe 9000 und seinen Phase-I-Metaboliten verschiedene HPLC-Methoden und HPLC-MS-Methoden entwickelt. Mit den HPLC-Methoden 1 und 2 [vgl. 4.2.1.3. und 4.2.1.4.] gelang es jeweils, die Mehrzahl der Metaboliten zu analysieren, allerdings war keine Methode geeignet, alle Metaboliten zu trennen. Obwohl beide HPLC-Methoden mit RP-18-Säulen und AN-Wasser-Gemischen durchgeführt wurden, wiesen sie einen hohen Grad an Orthogonalität auf und ergänzten sich damit komplementär. Die markanten Unterschiede in den Retentionsreihenfolgen der Analyten ergaben sich aus der Tatsache, dass wegen unterschiedlicher Fließmittelzusammensetzungen und pH-Werte der Elutionsmittel alle Substanzen – mit Ausnahme der Neutralstoffe – mit Methode 1 in einer anderen Protonierungsform vorlagen als mit Methode 2. Für alle Phase-I-Metaboliten wurde mit wenigstens einer Methode Basislinientrennung erreicht, was deren Identifizierung und Quantifizierung ermöglichte.

3.3.1.2. Qualitative Analysen

3.3.1.2.1. HPLC-Chromatogramme

Die Identitätssicherung der Metaboliten erfolgte entweder durch Vergleich der Retentionszeiten zweier aufeinanderfolgender Chromatographieläufe von Probe und Referenz oder durch Spiken von Referenzsubstanz zur bereits analysierten Probe und erneuter chromatographischer Analyse (Abb. 23). Auf diese Weise konnten die Identitäten aller Phase-I-Metaboliten ermittelt werden, aber auch die Anwesenheit von postulierten Metaboliten wie BHABBA im jeweiligen Inkubationsüberstand ausgeschlossen werden.

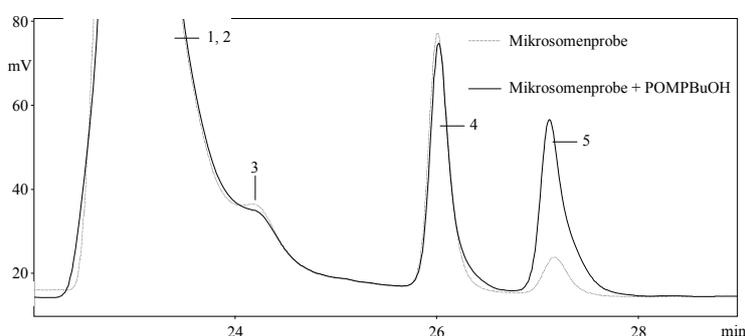


Abb. 23: Identitätsbeweis von POMPBuOH nach Inkubation von Schweinelebermikrosomen mit Oe 9000-HCl, (HPLC-System 1).

1 = Oe 9000, 2 = Oe 9000-N-oxid,
3 = POMPBAmEt, 4 = POMPBA,
5 = POMPBuOH

3.3.1.2.2. Online-ESI-Massenspektren

Unter den in Kapitel 4.2.1.4. bezeichneten ESI-MS-Bedingungen fragmentierten Oe 9000 und die stickstoffhaltigen Metaboliten kaum, sodass POMPBAmEt, Oe 9000, Oe 9000-Säure, Oe 9000-N-oxid, 4-OH-Oe 9000 und 4-OH-Oe 9000-N-oxid im positiven Modus anhand ihrer $[M+H]^+$ -Linien bei m/z 300, 344, 358, 360 und 376 erkannt werden konnten. In zahlreichen Fällen trat jeweils ein um 94 (Phenol) bzw. bei den 4-oxygenierten Derivaten ein um 110 m/z -Einheiten (1,4-Hydrochinon) verringertes Fragment auf, das aus der Etherspaltung resultierte (Abb. 24). Die Basispeaks $[M+H]^+$ waren in der Regel von den um 22 bzw. 38 m/z -Einheiten höherliegenden $[M+Na]^+$ - und $[M+K]^+$ -Signalen begleitet.

Der Einsatz eines alkalischen Elutionsmittels mit HPLC-System 2 ermöglichte die Identifizierung von Phase-I-Metaboliten auch im negativen Modus. Phenole und Säuren wurden derart anhand ihrer $[M-H]^-$ -Signale identifiziert. Nachteilig an den Messungen im negativen Modus war die vergleichsweise geringe Empfindlichkeit der Methode. Der Neutralstoff POMPBuOH konnte weder im positiven noch im negativen Modus ionisiert werden.

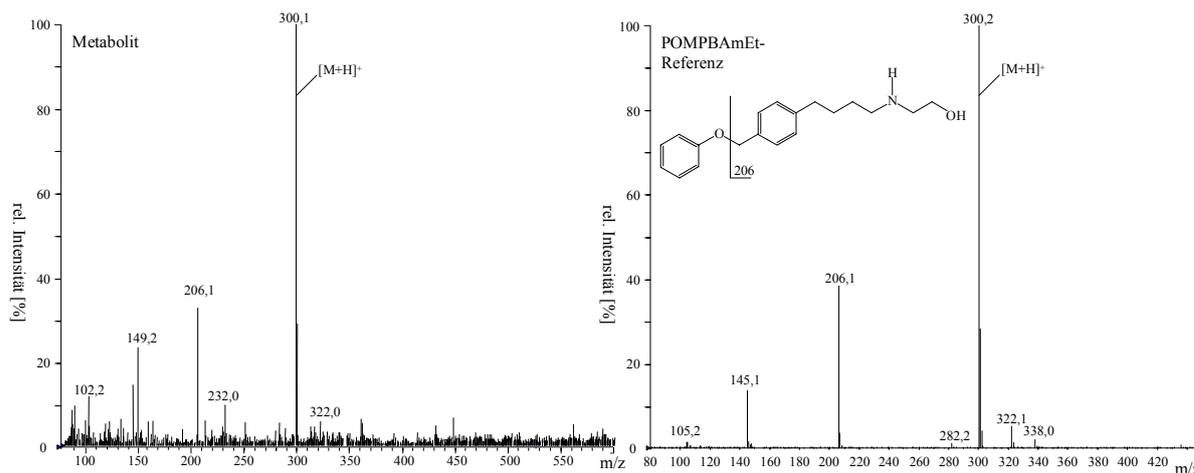


Abb. 24: Identifizierung von POMPBAmEt durch Online-ESI-MS nach Inkubation von Oe 9000-HCl mit Schweinelebermikrosomen (links). Rechts: synthetisiertes POMPBAmEt

3.3.1.2.3. Online-UV-Spektren

Die Kenntnisse über Molmasse und Retentionszeiten der Analyten erlaubten nicht in jedem Fall, einen sicheren Schluss über den Ort der metabolischen Veränderung im Molekül zu ziehen. Mit zufälligen Koelutionen und Übereinstimmungen der Masse-Ladungs-Verhältnisse isomerer Verbindungen musste prinzipiell gerechnet werden. Daher leisteten die mit den HPLC-Systemen 5 und 6 aufgenommenen Online-UV-Spektren außerordentlich nützliche Dienste, um die Position der Oxygenierung an den chromophoren Zentren des Oe 9000-Moleküls zu charakterisieren oder eine solche auszuschließen (siehe Kapitel 3.2.2).

3.3.1.2.4. Nachweis von N-Oxiden durch Reduktion

N-Oxide lassen sich selektiv durch TiCl_3 , Natriumdithionit oder andere starke Reduktionsmittel reduzieren, was für ihre Identifizierung genutzt werden konnte [Schmidt 1994].

Die Reduktion mit Natriumdithionit erwies sich in der Frühphase dieser Arbeit als hilfreich beim Nachweis von Oe 9000-N-oxid. Die entsprechende Abnahme der N-Oxid-Konzentration und/oder die Zunahme der Aminkonzentration ließen sich durch LC-MS (LC-MS-System 1) aufzeigen. Die geringe Empfindlichkeit der Methode gab später Anlass zur Entwicklung der HPLC-Methode 2, mit der Basislinientrennungen von Oe 9000 und dessen N-Oxid erreicht wurden und damit eine direkte Identifizierung des Oe 9000-N-oxid gelang.

3.3.1.3. Quantitative Analysen

3.3.1.3.1. Kalibrierung der Referenzsubstanzen

Die HPLC-Methoden zur Quantifizierung von Oe 9000 und den Metaboliten Phenol, 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, POMPBA_mEt, Oe 9000-N-Oxid, POMPBA und POMPBA_uOH wurden hinsichtlich der Linearität validiert. Kalibrierkurven wurden mit 7 verschiedenen Konzentrationsstufen der Substanzen im Bereich von 0,5 – 40 µmol/l aufgenommen. Jede Verdünnung wurde dreifach hergestellt und unter identischen Bedingungen vermessen. Für alle Verbindungen wurde eine gute Linearität mit Regressionskoeffizienten $r^2 > 0,996$ beobachtet. Da alle Substanzen mit unsubstituierter Phenoxyethylphenyl-Struktur den gleichen Chromophor tragen, sind die Anstiege der entsprechenden Geradengleichungen praktisch identisch.

Die Bestimmungsgrenzen der Oe 9000-Metaboliten im reinen Lösungsmittel lagen im Bereich zwischen 300 und 600 nmol/l, die Detektionsgrenzen zwischen 100 – 200 nmol/l. Die Wiederfindungsraten lagen mit inaktivierten Mikrosomen zwischen 78 – 90 % [vgl. 4.3.1.6. und 4.3.1.7.]. Die Analyse der Kotproben erforderte eine erneute Kalibrierung der Referenzsubstanzen (siehe Anhang).

Verbindung	Anstieg der Geradengleichung ¹⁾	Regressionskoeffizient r^2
Oe 9000	40056	0,998
Oe 9000-N-oxid	40489	0,996
POMPBA	40169	0,999
POMPBA _u OH	40233	0,997
POMPBA _m Et	39569	0,998
POMPBA _u Ni	40337	0,999
4-OH-Oe 9000	36068	0,996
4-OH-Oe 9000-N-oxid	36463	0,998
Phenol	9647	0,999

Tab. 9: Kalibrierung der Referenzsubstanzen mit dem HPLC-System 1. ¹⁾ Beim Auftragen der auf den IS korrigierten Peakflächeneinheiten gegen die Konzentrationen (in µmol/l) bei einem Injektionsvolumen von 100 µl. Da der Metabolit Oe 9000-Säure nicht in ausreichend hohem Reinheitsgrad zur Verfügung stand, wurde der Anstieg der Geradengleichung des Oe 9000 für dessen Quantifizierung zugrunde gelegt.

3.3.1.3.2. Präzision

Die Quantifizierung der Metaboliten im AN-Wasser-Gemisch 40/60 (V/V) wurde hinsichtlich ihrer Präzision validiert. Drei Konzentrationsstufen der Metaboliten wurden jeweils im Triplikate hergestellt und injiziert. Die minimalen und maximalen relativen Standardabweichungen der Peakflächen sind für alle Metaboliten in Tab. 10 zusammengefasst. Mit dem HPLC-System 2 lag die größte relative Standardabweichung bei 9,87 %, im System 1 dagegen deutlich höher bei 31,1 %. Ursache hierfür war die verhältnismäßig große Peakbreite der phenolischen Verbindungen auf der nachsilanierten RP-18-

Säule, was Fehler bei der Integration bedingte.

HPLC-System	Präzision		
	Konzentrationsstufe μmol/l	minimale rel. Standardabweichung [%]	maximale rel. Standardabweichung [%]
1	0,5	6,31	31,1
	10	2,71	8,47
	40	1,43	5,63
2	0,5	8,70	9,87
	10	0,38	3,36
	40	1,49	3,81

Tab. 10: Präzision der Peakflächen der HPLC-Systeme 1 (für POMPBA, POMPBuOH, 4-OH-Derivate, Phenol) und 2 (Oe 9000, Oe 9000-N-oxid und POMPBAmEt)

3.3.2. Wahl geeigneter Tierspezies für die Biotransformation

Die Entwicklung von Arzneistoffen erfolgt unter ethischen Gesichtspunkten im Spannungsfeld zwischen dem Anspruch des Patienten auf eine risikoarme Therapie, die derzeit erst nach ausgiebiger, auch Tiermodelle einschließender Substanztestung sichergestellt werden kann, und dem Recht des (Versuchs-)Tieres auf ein artgerechtes Leben. In unserem abendländischen Kulturkreis, in dem ein anthropozentrisches Weltbild vorherrscht, gilt eine Einschränkung des Schutzanliegens des Tieres bei Vorliegen eines triftigen Grundes als ethisch vertretbar. Als triftige Gründe nennt das deutsche Tierschutzgesetz die Erzeugung von Nahrungsmitteln oder tierischen Produkten sowie „das Vorbeugen, Erkennen, Behandeln von Krankheiten, Leiden, körperlichen Beschwerden [...] und die Grundlagenforschung“ [TierSchG § 7; Fassung v. 18.05.2006].

Da eine *In-vivo*-Biotransformationsstudie mit Oe 9000 am Menschen aufgrund des unzureichenden Datenmaterials zur Substanz und des damit verbundenen gesundheitlichen Risikos im Widerspruch mit humanistischen Werten (z.B. dem Recht auf körperliche Unversehrtheit) gestanden hätte, ergab sich die Erfordernis, die Untersuchungen zunächst am Tiermodell durchzuführen, um die wichtigsten Metaboliten zu identifizieren, darauf abgestimmt anschließend die analytischen Methoden zu entwickeln und zu optimieren und die erhaltenen Ergebnisse im Arten-Vergleich auf den Menschen zu extrapolieren [Anzenbacher und Anzenbacherova 2003]. Erst im zweiten Schritt sollten *In-vitro*-Untersuchungen mit den in ihrer Verfügbarkeit eingeschränkten menschlichen Primärzellen erfolgen. Der Wahl des Versuchstieres kommt eine essentielle Bedeutung zu, da erhebliche Differenzen in den Metabolisierungsreaktionen zwischen den Spezies bestehen, die vorrangig auf unterschiedliche Organdurchblutung, Enzymausstattung und -expression sowie auf Unterschiede in den

Substrataffinitäten und im Stofftransport zurückzuführen sind. Als Modelltiere für Metabolismusuntersuchungen finden vor allem Ratten, Affen, Hunde oder Schweine Anwendung.

Für diese Arbeit geschah die Auswahl der Tierart unter Berücksichtigung der an Ratte, Beagle und Mensch gesammelten *In-vivo*-Daten zur Biotransformation des Fomocain, deren Übertragung durch Analogieschlüsse auf Oe 9000 praktikable Arbeitshypothesen hervorbringen sollte. Da die Fomocain-Metabolisierung im Gegensatz zu Lokalanästhetika vom Estertyp hauptsächlich hepatisch und CYP-abhängig verläuft, was bei Ratte, Beagle und Mensch zu am Aromaten oxygenierten Metaboliten führt, die anschließend teilweise in Phase-II-Reaktionen umgesetzt werden, war es für Oe 9000 zulässig und folgerichtig, die Wahl der Tierart direkt aus den Ergebnissen der durch Lupp erbrachten CYP-Oe 9000-Interaktionsstudie abzuleiten [Lupp et al. 2003]. In dieser *In-vitro*-Studie mit Rattenlebermikrosomen wurde festgestellt, dass Oe 9000 in 10 und 100 μ M-Lösungen in erster Linie die CYP1A-selektive EROD und die CYP2B-selektive PROD hemmt, wodurch es als wahrscheinlich gilt, dass es durch Enzyme aus diesen Unterfamilien metabolisiert wird.

Aus dem umfangreichen Datenmaterial über die Substrataffinitäten und Enzymaktivitäten orthologer CYPs [Lewis 2001] ist bekannt, dass Schweine und Ratten geeignete Modelltiere für CYP1A- und 2E1-vermittelte Substratumsätze sind (vgl. Tab. 11) und damit für die Oe 9000-Metabolisierung in Frage kommen, während sich Hunde für eine Ergebnisübertragung auf den Menschen beispielsweise besser als Modelltiere für CYP2D-Substrate eignen [Anzenbacher 2003].

CYP	relativer Anteil in humaner Leber [%]	Anteil der Arzneistoffe ¹⁾ [%]	Charakteristische Markersubstrate	Tiermodell
1A2	12	4	Coffein	Ratte, Kaninchen, Schwein, Minischwein
2C9/10/19	20	11	Diclofenac (2C9) S-Mephenytoin (2C19)	Affe (<i>Maccacus mulatta</i>)
2D6	4	30	Sparteïn, Debrisoquin, Dextromethorphan	Hund, (Schwein)
2E1	6	2	Chlorzoxazon	Ratte, Kaninchen, Schwein, Minischwein
3A4	30	52	Nifedipin, Erythromycin, Alprazolam, Dextromethorphan	Schwein, Minischwein

Tab. 11: Die für den Arzneistoffmetabolismus wichtigsten CYP-Enzyme in Menschenleber und ihre möglichen Tiermodelle. Modifiziert nach Zuber et al. 2002

¹⁾ der durch das individuelle CYP-Isoenzym metabolisiert wird (geschätzt)

Da kein ideales Modelltier existiert, ist man in der Regel auf mehrere Spezies angewiesen, um ein umfassendes Metabolitenprofil, das möglichst alle humanen Metabolisierungswege für einen Arzneistoff aufzeigt, zu erstellen. In der vorliegenden Arbeit wurden *In-vitro*-Modelle von Schwein und Ratte genutzt.

3.3.3. *In-vitro*-Biotransformation von Oe 9000 mit Schweineleberhomogenaten

Erste Inkubationen von Schweine- und Rinderleberhomogenaten mit Oe 9000 und anschließender HPLC-MS-Analyse der enteweißten Überstände hatten Wennek-Klose anhand des jeweiligen Auftretens eines Peaks im Chromatogramm mit m/z 360 postulieren lassen, 4-OH-Oe 9000 oder Oe 9000-N-oxid könnte gebildet worden sein [Wennek-Klose 2005]. Außerdem beschrieb sie die Kinetik der Bildung dieses noch nicht näher charakterisierten Metaboliten über 2 Stunden und stellte fest, dass im Zeitintervall von 40 – 60 min der Inkubation dessen Konzentrationszuwachs zum Erliegen kam.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Identität des beobachteten Metaboliten sowie aller weiteren hepatisch gebildeten Phase-I-Metaboliten zu klären. In Vorversuchen galt es daher, Inkubationsbedingungen und Probenaufarbeitung zu optimieren.

Die Funktionsfähigkeit der Homogenate wurde durch eine photometrische Gehaltsbestimmung der Gesamt-CYP-Enzyme und des Cytochrom b5 sichergestellt. Der über die Folin-Ciocalteu-Lowry-Methode bestimmte Gesamtproteingehalt diente dafür als Bezugspunkt [Lowry et al. 1951, Wennek-Klose 2005].

3.3.3.1. Optimierte Durchführung der Homogenatversuche

Die Biotransformation von Oe 9000 wurde an aus vier Schweinelebern gewonnenen Homogenaten geprüft. Für die Inkubationen der $10000 \times g$ -Überstände und Mikrosomen vom Schwein wurden die Oe 9000-Konzentrationen mit 150 – 335 $\mu\text{mol/l}$ so gewählt, dass während des Versuchs jederzeit ein Substratüberschuss zur Umsetzung zur Verfügung stand. Da die Nachweisgrenzen für die Metaboliten im oberen nanomolaren Bereich lagen, durfte die Ausgangskonzentration an Oe 9000 zur Aufklärung von Biotransformationsnebenwegen nicht wesentlich niedriger gewählt werden. Die Substratkonzentration wurde damit bewusst oberhalb des Bereichs therapeutischer Plasmakonzentrationen (max. 20 μM für Lidocain in Spinalanästhesie; vgl. Lupp et al. 2003) vergleichbarer Lokalanästhetika angesetzt.

Lange Inkubationszeiten (40 min) sollten die Bildung von Sekundärmetaboliten ermöglichen. Die Probenaufarbeitung wurde wie unter 4.3.1.7. beschrieben durchgeführt. Die Analyse der Proben erfolgte mit den HPLC-Systemen 1, 2, 5 und 6 und mit dem ESI-MS-System 1 [vgl. 4.2.1.3. und 4.2.1.4.].

3.3.3.2. Ergebnisse und Diskussion

3.3.3.2.1. Identifizierung der Metaboliten

Mit Hilfe der Referenzsubstanzen wurde die Identität von sieben Phase-I-Metaboliten nach Inkubationen von Oe 9000 mit Schweineleberhomogenaten geklärt. Darunter fand sich auch der durch Wennek-Klose beschriebene Metabolit mit m/z 360, der anhand seiner Retentionszeiten in den

verschiedenen HPLC-Systemen und anhand seines Online-UV-Spektrums als 4-OH-Oe 9000 identifiziert wurde. Außerdem wurde nicht umgesetztes Oe 9000 wiedergefunden. Das Metabolitenmuster nach Mikrosomeninkubation unterschied sich qualitativ nicht von dem, welches aus den Inkubationen mit den $10000 \times g$ -Überständen resultierte, was den Schluss nahe legt, dass die metabolisierenden Enzyme überwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind.

In beiden *In-vitro*-Modellen trat in erster Linie oxidative Desaminierung auf, was nach Oxidation des als Intermediat anzunehmenden Aldehyds POMPBAld zu dem Hauptmetaboliten POMPBA und nach Reduktion zu POMPBUOH führte. Der Aldehyd selbst entzog sich dem Nachweis.

Daneben wurde Oxygenierung in 4-Stellung des *exo*-Rings sowie N-Oxidbildung anhand des Auftretens der Verbindungen 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid und Oe 9000-N-oxid in den Chromatogrammen und Massenspektren beobachtet. Durch einfache oxidative N-Desalkylierung entstand POMPBA_mEt. Oe 9000-Säure trat in einigen wenigen Proben in Spuren auf.

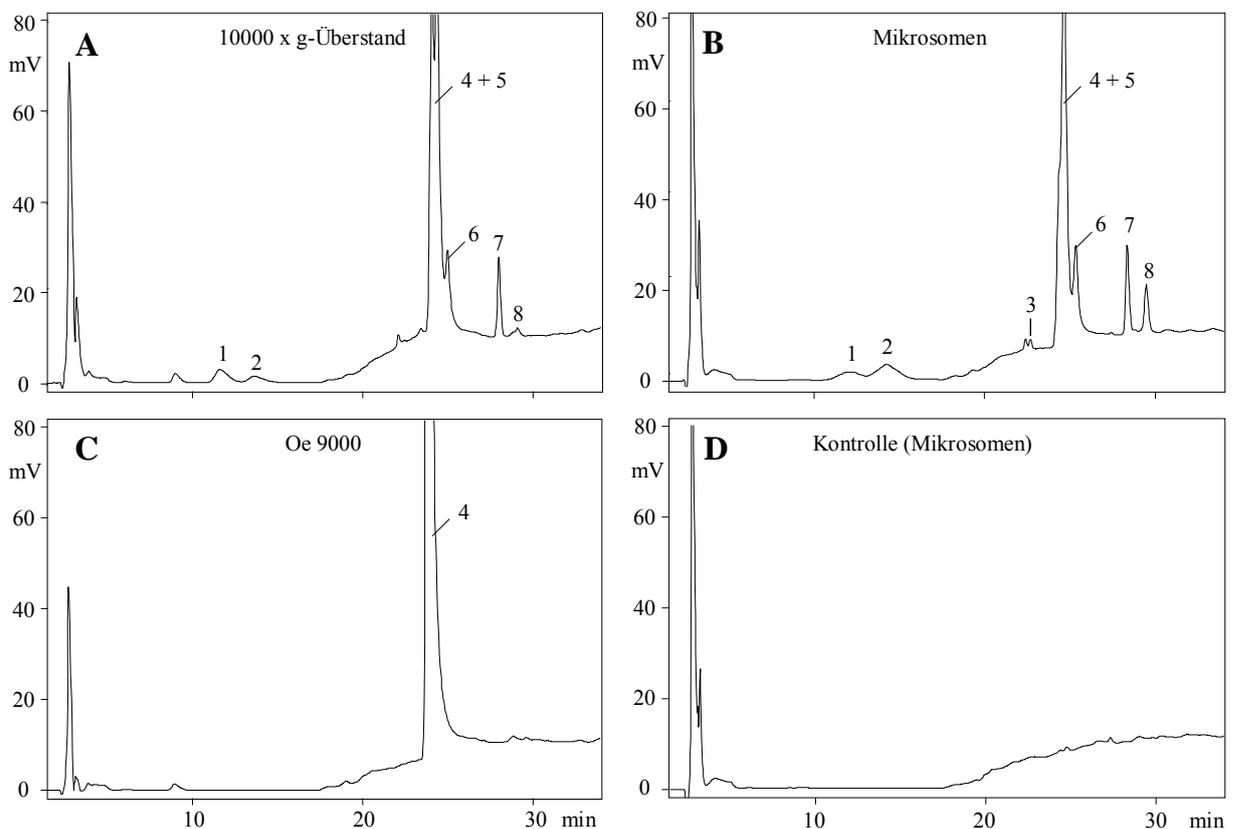


Abb. 25: HPLC-Analyse von Oe 9000-Metaboliten nach 40 min Inkubation von $10000 \times g$ -Überständen (**A**) bzw. Mikrosomen (**B**) mit Oe 9000 (4). In beiden Modellen entstehen bei der Metabolisierung 4-OH-Oe 9000 (1), 4-OH-Oe 9000-N-oxid (2), Oe 9000-N-oxid (5), POMPBA_mEt (6), POMPBA (7) und POMPBUOH (8). Oe 9000-Säure (3) trat nur gelegentlich in einigen Proben auf. **C:** inaktivierter $10000 \times g$ -Überstand mit Oe 9000-Zusatz. **D:** Mikrosomen ohne Zusatz von Oe 9000.

3.3.3.2.2. Quantifizierung der Metaboliten

Während mit $10000 \times g$ -Überständen etwa die Hälfte des eingesetzten Oe 9000-HCl (2×10^{-4} M) metabolisiert wurde (Abb. 26), waren die Aktivitäten bzw. Umsetzungsgeschwindigkeiten in den Mikrosomen signifikant geringer. Dies war auf das längere Herstellungsverfahren für die Mikrosomen

zurückzuführen, währenddessen trotz sachgerechter Kühlung stets ein kontinuierlicher Enzymaktivitätsverlust eintrat. Die relativen Verhältnisse der Metaboliten zueinander waren hingegen in beiden Modellen recht ähnlich.

Aus beiden Biotransformationsmodellen ging POMPBA als Hauptmetabolit hervor. In deutlich geringerem Ausmaß wurde POMPBUOH gebildet. Das Auftreten beider Metaboliten in beiden Modellen ist ein Indiz dafür, dass die oxidative Desaminierung CYP-abhängig verläuft und nicht auf unvollständig abgetrennte mitochondriale MAO zurückzuführen ist, die allenfalls rudimentär im $10000 \times g$ -Überstand anzutreffen gewesen wäre. In $10000 \times g$ -Überständen liefen 4-Oxygenierung, N-Oxidation und oxidative Desaminierung zu etwa gleichen Teilen ab. In Mikrosomen überwog 4-Oxygenierung gegenüber den letztgenannten Reaktionen schwach.

Auch unter Verwendung verschiedener Schweinelebern waren die Ergebnisse aus beiden *In-vitro*-Modellen gut reproduzierbar.

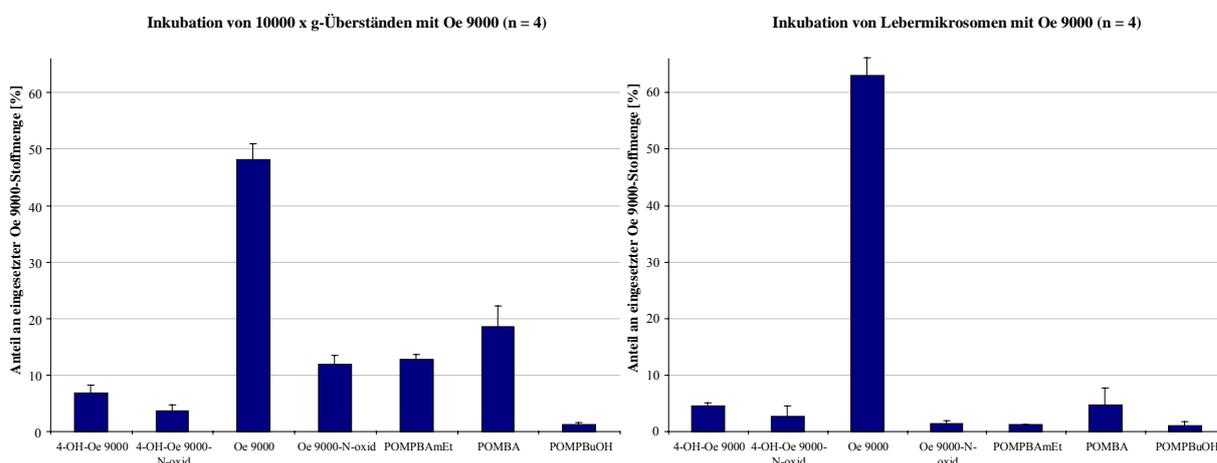


Abb. 26: Quantifizierung von Oe 9000 und seinen Metaboliten nach Inkubation von $10000 \times g$ -Überständen (links) bzw. Mikrosomen (rechts) vom Schwein mit Oe 9000-HCl ($2 \cdot 10^{-4}$ M) über 40 min. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Werte auf 100 % normiert.

3.3.3.2.3. Vergleich mit Fomocain-Derivaten

Als biotransformatorisches Gruppenmerkmal aller untersuchten schwefelfreien Fomocaine in *In-vitro*-Untersuchungen mit Leberhomogenaten von Ratte, Kaninchen und Meerschweinchen ist deren 4-Oxygenierung und N-Oxidation zu nennen [Ewald 1985]. Oe 9000 reihte sich in dieser Hinsicht gut in die Fomocaingruppe ein. Die an Ratte und Meerschweinchen für zahlreiche Verbindungen beschriebene oxidative Dearylierung fand für Oe 9000 hingegen nicht statt. Auch für die Fomocain-typische 2-Oxygenierung des *exo*-Rings gab es keine vergleichbare Umsetzung beim Oe 9000. Diese Unterschiede sind wohl auf Differenzen der Substrate in ihren Affinitäten zu den einzelnen CYPs zurückzuführen.

3.3.3.2.4. Ergebnisextrapolation auf den Menschen

Biotransformationsreaktionen des Schweins laufen häufig mit denen des Menschen konform, da die wichtigsten für den humanen Metabolismus verantwortlichen Enzyme – CYPs, Epoxidhydrolase, Aldehyddehydrogenase, Glutathion-S-Transferase-ähnliches Protein und zahlreiche andere – auch beim Schwein exprimiert werden [Desille et al. 1999]. Große strukturelle Übereinstimmung zu den orthologen Schweine-CYPs bestehen beispielsweise für die im Arzneistoffmetabolismus bedeutenden Cytochrome CYP1A2, CYP2D6 und CYP3A4, wie anhand der Kreuzreaktivitäten humaner CYPs mit Antikörpern vom Schwein ermittelt wurde [Jurima-Romet et al. 2000]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Soucek et al. [2001], der zusätzlich Vergleichbarkeit in den Enzymaktivitäten für CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 festgestellt hat.

Besonders unter Berücksichtigung der EROD- und PROD-Hemmung in der Oe 9000-Interaktionsstudie von Lupp [vgl. Kapitel 3.3.2.] ist es äußerst wahrscheinlich, dass zumindest ein Teil der aus den CYP-abhängigen Reaktionen hervorgehenden Metaboliten auch beim Menschen gebildet werden.

Für die Abbildung humaner FMO-abhängiger Prozesse wie N-Oxidationen basischer tertiärer Amine ist Schweineleber hingegen ungeeignet, da in ihr – gemäß heutigem Kenntnisstand – aus der FMO-Familie lediglich FMO-1 exprimiert wird, während FMO-1 beim Menschen nur in untergeordnetem Ausmaß und überwiegend extrahepatisch gebildet wird [Cashman 2002, Dolphin 1996, Gasser et al. 1990]. Aus der Entstehung von Oe 9000-N-oxid und 4-OH-Oe 9000-N-oxid beim Schwein ist daher nicht zu schlussfolgern, dass beide Metaboliten beim Menschen auftreten müssen.

3.3.4. *In-vitro*-Biotransformation von Oe 9000-Metaboliten mit Schweineleberhomogenaten

Wie unter 3.3.3. beschrieben, brachten die Inkubationen von Schweineleberhomogenaten mit Oe 9000 die Metaboliten 4-OH-Oe 9000, dessen N-Oxid, Oe 9000-N-oxid, POMPBAmEt, POMPBuOH und POMPBA hervor. Um zu klären, auf welchen Biotransformationswegen diese entstehen, wurden die wichtigsten Vertreter erneut im *In-vitro*-Modell umgesetzt. Um ein möglichst großes Enzymspektrum zur Verfügung zu haben, wurden 10000 × g-Überstände zweier Schweine verwendet. Die Durchführung der Versuche erfolgte wie unter 4.3.1. beschrieben. Mit einer Reduzierung der Inkubationszeiten auf 10 min sollten sekundäre Biotransformationsreaktionen minimiert werden. Referenzproben (nur Substrat) und Kontrollproben (nur 10000 × g-Überstände) wurden mitgeführt.

Die Proben wurden mittels HPLC-System 1 und HPLC-ESI-MS-System 1 analysiert.

Da die Substrate zu Inkubationsbeginn in deutlich höheren Konzentrationen vorlagen (jeweils $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l) als sie bei den Oe 9000-Inkubationen gebildet werden konnten, kam es vereinzelt vor, dass

zusätzliche Metaboliten auftraten, deren Charakterisierung allerdings nicht Ziel dieser Untersuchung sein sollte.

3.3.4.1. Inkubation von 10000 × g-Überständen mit POMPBA_mEt-HCl, POMPBA_m und POMPBA

Zunächst war für POMPBA zu klären, über welche Reaktionswege dieser Hauptmetabolit entsteht. Die Vermutung, POMPBA würde aus POMPBAld hervorgehen, lag nahe, bedurfte allerdings einer experimentellen Überprüfung, da POMPBAld in keinem Metabolisierungsversuch direkt nachzuweisen war. Es sollte daher untersucht werden, ob das synthetisierte POMPBAld als Substrat der Aldehyddehydrogenase-1 (ALDH-1) zu POMPBA umgesetzt werden kann. Im zweiten Schritt sollte geklärt werden, über welchen Weg POMPBAld gebildet wird. Neben Oe 9000 kamen prinzipiell auch POMPBA_mEt, POMPBA_m und Oe 9000-N-oxid als Ausgangsprodukte für dessen Bildung in Betracht.

3.3.4.1.1. Ergebnisse

Nach 40minütiger Inkubation von POMPBAld und NAD⁺ mit Aldehyddehydrogenase in Anwesenheit von Mercaptoethanol war der Aldehyd nahezu vollständig in POMPBA umgesetzt, während in Abwesenheit des Enzyms POMPBAld über die Versuchsdauer stabil geblieben war. Damit war gezeigt, dass POMPBA als Substrat der ALDH-1 aus POMPBAld entstehen kann. In den Inkubationsversuchen von POMPBA_mEt-HCl mit 10000 × g-Überständen entstanden hauptsächlich die Metaboliten POMPBA und POMPBA_uOH. Zusätzlich wurde ein neuer Metabolit gefunden, dessen Absorptionsmaxima im Online-UV-Spektrum bei 222 und 292 nm sowie dessen massenspektrometrisches Signal von $m/z = 316$ die Bildung des am *exo*-Zyklus in 4-Stellung oxygenierten POMPBA_mEt suggerierten (Abb. 27). Die oxidative Desaminierung zu POMPBA_m war hingegen nicht zu beobachten. Die Inkubation von 10000 × g-Überständen mit POMPBA_m führte ebenfalls zu den Metaboliten POMPBA und POMPBA_uOH. Die Umsetzung von POMPBA brachte hingegen weder POMPBA_uOH noch POMPBAld hervor, sondern stattdessen nur einen unbekanntem Metaboliten, dessen Online-UV-Maxima von 228 und 274 nm die Oxygenierung des *endo*-Rings vermuten lassen [vgl. Kapitel 3.2.2].

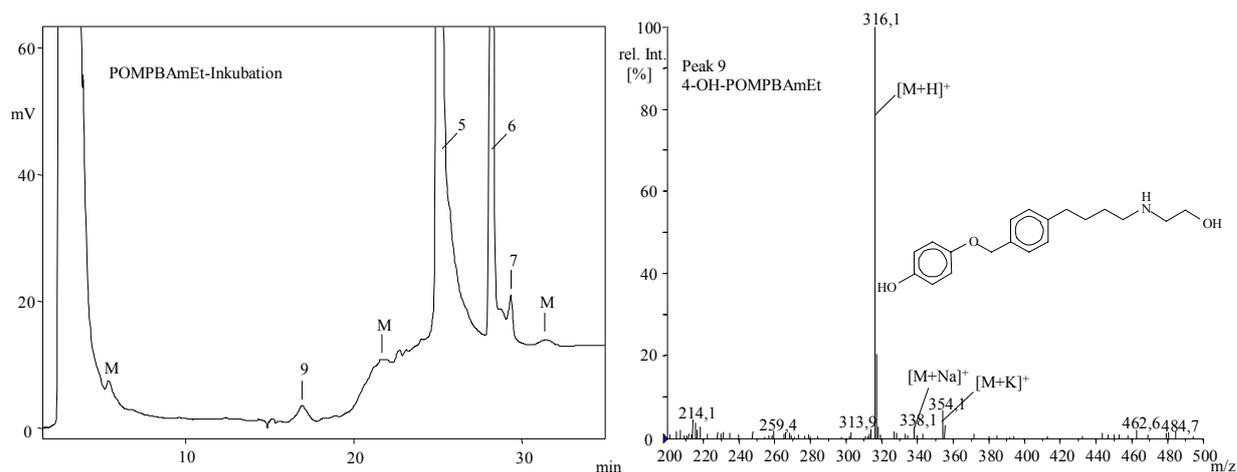


Abb. 27: HPLC-Chromatogramm (links) und Online-ESI-Massenspektrum von Peak 9 (rechts) nach Inkubation von 10000 x g-Überständen mit POMPBAmEt-HCl.

5 = POMPBAmEt; 6 = POMPBA; 7 = POMPBuOH; 9 = 4-OH-POMPBAmEt (?); M = Matrix.

3.3.4.1.2. Diskussion

Die Tatsache, dass POMPBAld Substrat der ALDH-1 ist, stärkt die Annahme, dass der Hauptmetabolit POMPBA auch im Homogenatversuch aus POMPBAld entsteht.

Da POMPBA und POMPBuOH bei den Inkubationen des tertiären, des sekundären und des primären Amins als Metaboliten auftraten, konnte ohne aufwendige Erfassung der Reaktionskinetik oder den Einsatz spezifischer Inhibitoren nicht festgestellt werden, ob die oxidativen Desaminierungen jeweils direkt vom tertiären oder sekundären Amin aus oder erst nach oxidativer Desalkylierung über die Zwischenstufen des sekundären oder primären Amins erfolgten.

Wenngleich gezeigt werden konnte, dass die POMPBAld-Bildung nicht zwangsweise vom tertiären Amin aus verlaufen muss, sprechen einige Indizien für eine zumindest partielle direkte Desaminierung des Oe 9000: Erstens scheint es sich bei den Desalkylierungsreaktionen um Metabolismusnebenwege zu handeln, da weder POMPBAmEt, noch POMPBAm als Intermediate in bedeutenden Konzentrationen gefunden wurden. Zweitens entsteht bei der POMPBAmEt-Inkubation dessen oxygenierter Metabolit (Peak 9 in Abb. 27) in höheren Konzentrationen als POMPBuOH. Würde Oe 9000 erst nach Bildung von POMPBAmEt oxidativ desaminiert werden, sollte auch dieser Metabolit in den Oe 9000-Inkubaten erscheinen. Dieser war darin aber nicht zu finden.

3.3.4.2. Inkubation von 10000 x g-Überständen mit Oe 9000-N-oxid und 4-OH-Oe 9000-N-oxid

Für Oe 9000-N-oxid und 4-OH-Oe 9000-N-oxid galt es zu klären, ob sie im Homogenatversuch nicht wieder zu den Aminen reduziert werden können, was im ersten Fall mit einer Bioaktivierung gleichzusetzen wäre.

3.3.4.2.1. Ergebnisse

Die Analyse der N-Oxid-Inkubate brachte das überraschende Ergebnis, dass nach nur 10minütiger Inkubation sogar unter aeroben Bedingungen jeweils etwa ein Drittel des eingesetzten N-Oxids zum Amin reduziert worden war. Desweiteren wurde für Oe 9000-N-oxid das Auftreten der gleichen Metaboliten wie bei der Umsetzung von Oe 9000 beobachtet. Damit war bewiesen, dass Amin und N-Oxid hepatisch rasch ineinander überführt werden (vgl. Abb. 28).

Die Metabolisierungswege für Oe 9000 und Oe 9000-N-oxid sind in Abb. 29 zusammengefasst.

3.3.4.2.2. Diskussion

Klinisch bedeutsame N-Oxide, wie das als Migränetherapeutikum und Antidepressivum eingesetzte Amitriptylinoxid oder auch zahlreiche Metaboliten mit N-Oxid-Struktur (z.B. Morphin-N-oxid, Tramadol-N-oxid, Escitalopram-N-oxid), werden vornehmlich in der Leber, aber auch teilweise im Gehirn, zu ihren Aminen reduziert und damit bioaktiviert.

Geschwindigkeit und Ausmaß der Reduktion hängen vom Redoxpotential des Substrats ab [Schmidt 1994]. N-Oxid-Reduktionen wurden bisher in der Mikrosomenfraktion, in Mitochondrien, im Zytosol und im Blut [Kitamura 1998] beobachtet. Sowohl Cytochrom-P-450-abhängige [Skalova 1998] als auch -unabhängige Mechanismen [Kitamura 1999] sind bekannt. Der eigentliche Reduktionsschritt kann in Anwesenheit starker Reduktionsmittel auch nicht-enzymatisch erfolgen.

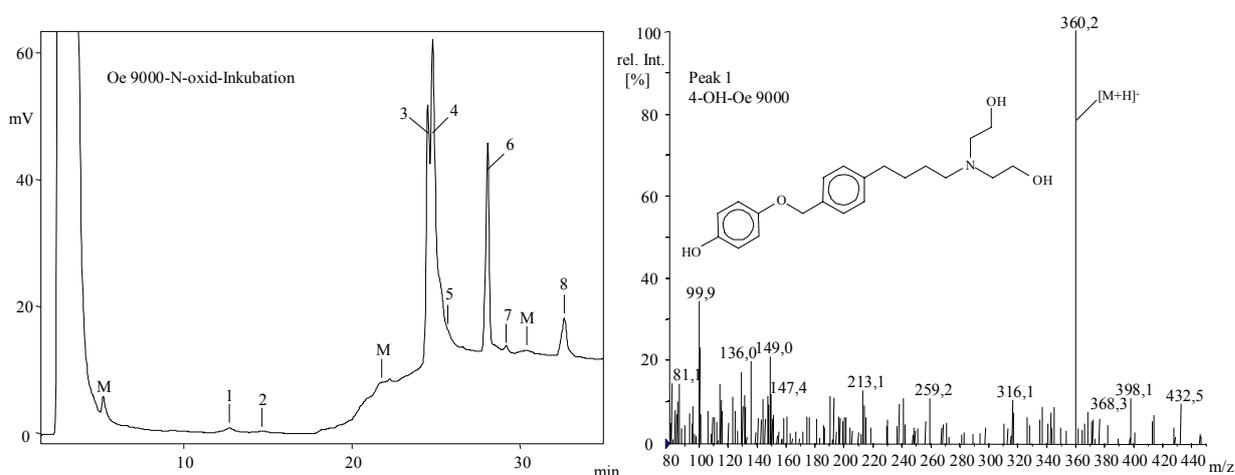


Abb. 28: HPLC-Chromatogramm (links) und Online-ESI-Massenspektrum von Peak 1 (rechts) nach Inkubation von $10000 \times g$ -Überständen mit Oe 9000-N-oxid. 1 = 4-OH-Oe 9000; 2 = 4-OH-Oe 9000-N-oxid; 3 = Oe 9000; 4 = Oe 9000-N-oxid; 5 = POMPBA_mEt; 6 = POMPBA; 7 = POMPBuOH; 8 = IS (POMPBuNi); M = Matrix

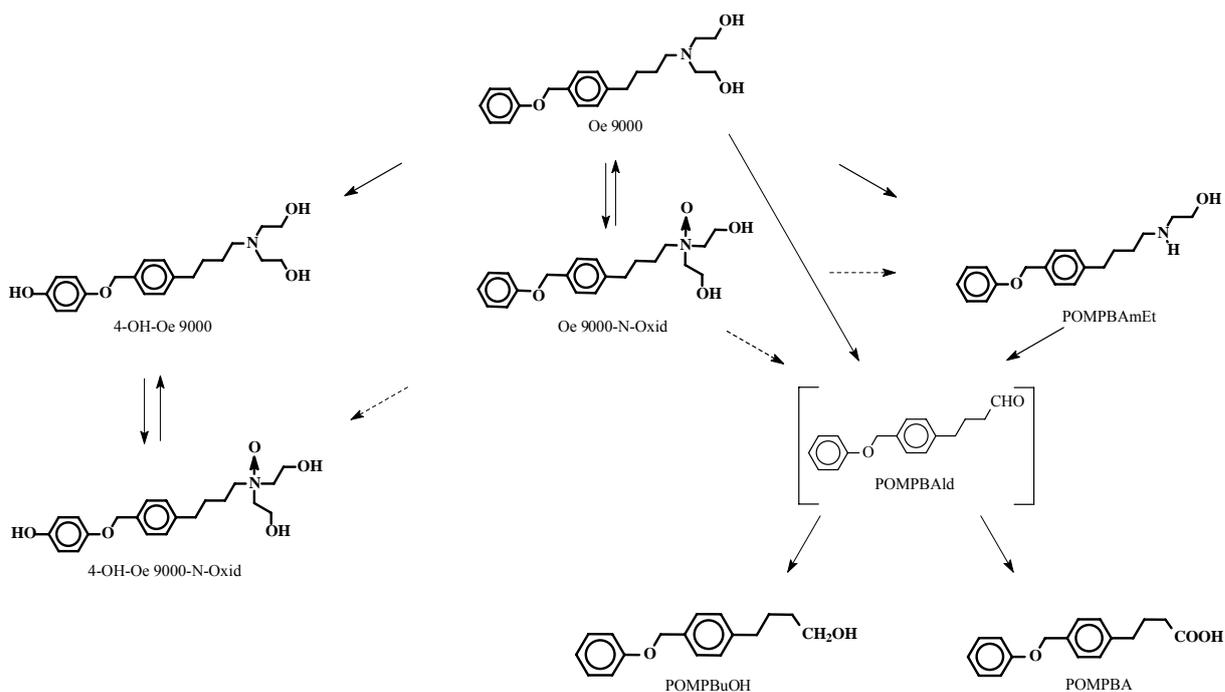


Abb. 29: Biotransformationswege des Oe 9000 und Oe 9000-N-oxid beim Schwein. Durchgezogene Pfeile markieren gesicherte Reaktionen, gestrichelte Pfeile geben theoretisch mögliche Reaktionen wieder.

Für einen Einsatz als Lokalanästhetikum wäre eine Reaktivierung des Metaboliten zum Arzneistoff therapeutisch nicht erwünscht, da in diesem Fall mit einer erhöhten systemischen Belastung des Patienten zu rechnen wäre. Anders stellt sich die Situation für Indikationen dar, in denen die Substanz zur Resorption gelangen soll, um den pharmakodynamischen Effekt auszulösen, z.B. beim Einsatz als Antiarrhythmikum. Hier könnte das Oe 9000-N-oxid durch seine Reaktivierung zu einer Verlängerung der Plasmahalbwertszeit des Amins beitragen.

3.3.5. Inkubation von präzisionsgeschnittener Rattenleber mit Oe 9000

3.3.5.1. Biotransformationsmodell

Präzisionsleberschnitte zeichnen sich durch ihre zuverlässige Repräsentation der *In-vivo*-Situation aus [Ekins 1996 a]. Ihre metabolische Kapazität bleibt im Nährmedium über Stunden gut erhalten, wodurch sie auch zu Untersuchungen des Sekundär- bzw. Phase-II-Metabolismus herangezogen werden können. Im Gegensatz zum Mikrosomenmodell steht das gesamte Spektrum hepatischer Enzyme zur Verfügung. Außerdem entspricht das Enzym-Expressionsmuster in präzisionsgeschnittener Leber sehr gut den *In-vivo*-Verhältnissen, was einen wesentlichen Vorteil gegenüber den häufig eingesetzten Biotransformationsmodellen mit isolierten Hepatozyten darstellt [Ekins 1996 a].

Um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, müssen Leberschnitte definierter Größe erhalten werden. Die Schnitte sollten eine Dicke von 250 µm nicht überschreiten, um Diffusionswege für Sauerstoff, Arzneistoff und gebildete Metaboliten kurz zu halten. Eine optimale Versorgung der Mono- und Dioxygenasen mit Sauerstoff wird durch Begasung mit Carbogen, einem Gasgemisch aus 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid, erreicht. Um die Vitalität der Zellen aufrecht zu erhalten, ist besonderes Augenmerk auf die sachgerechte Gewinnung der Schnitte zu legen, welches unter Vermeidung größerer Traumata zu erfolgen hat. Besonders schonend werden Schnitte in physiologischem Puffer mit einem Krumdieck-Slicer® erhalten.

Vitalität der Zellen, hormonelle Ansprechbarkeit, CYP-Enzymaktivitäten und deren Induzierbarkeit sowie die Fähigkeit zur Durchführung von Phase-II-Reaktionen verringern sich im Laufe von 48 h, im Gegensatz zu Leberhomogenaten bleiben jedoch Vitalitäts- und Aktivitätsverlust innerhalb der ersten 4 h der Inkubation gering, wie in funktionellen und histomorphologischen Untersuchungen gezeigt wurde. [Ekins 1996 b, Lupp 2001]. In diesem Zeitfenster höchster Funktionalität wurden die Oe 9000-Inkubationen durchgeführt.

Wie auch bei den Leberhomogenatversuchen sollten die Hauptwege der Biotransformation von Oe 9000 durch Identifizierung und Quantifizierung der Phase-I-Metaboliten erkannt werden. Außerdem sollte ermittelt werden, ob und in welchem Ausmaß Phase-II-Metaboliten auftreten. Anhand von verschiedenen Inkubationszeiten sollte der Verlauf der Bildung der Metaboliten in groben Zügen verfolgt werden.

3.3.5.2. Ergebnisse der Untersuchung des Phase-I-Metabolismus

Nach Inkubation der Leberschnitte mit 10^{-4} M-Oe 9000-HCl-Lösung erfolgte die Analyse der Proben mit den HPLC-Systemen 1 und 2 sowie mit HPLC-MS-System 1. Die Chromatogramme sind in den Abb. 30 und 31 dargestellt. Oe 9000-HCl wurde in allen Inkubationsversuchen ($n = 7$) extensiv unter Bildung von 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, Oe 9000-N-oxid, Oe 9000-Säure und Phenol metabolisiert. Die Sicherung der Identitäten der Metaboliten erfolgte dabei unter Zuhilfenahme der speziell synthetisierten Referenzsubstanzen. Die wichtigsten analytischen Charakteristika waren wie im Kapitel 3.3.1.2. ausgeführt die Retentionszeiten mit den verschiedenen HPLC-Methoden und die ESI-Massenspektren. Zudem konnten von 4-OH-Oe 9000, Oe 9000-Säure und Oe 9000-N-oxid aussagekräftige Online-UV-Spektren erhalten werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Biotransformationsuntersuchungen mit Schweineleberhomogenaten wurde bei der Ratte keine oxidative Desaminierung festgestellt. So waren weder POMPBAld, noch dessen reduzierte Form POMPBUOH oder die oxidierte Form POMPBA zu finden. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Frage gewidmet, ob eine oxidative Dearylierung wie bei Fomocain auftreten würde. Als Spaltprodukt wäre in diesem Fall neben Phenol auch BHABBA zu erwarten gewesen.

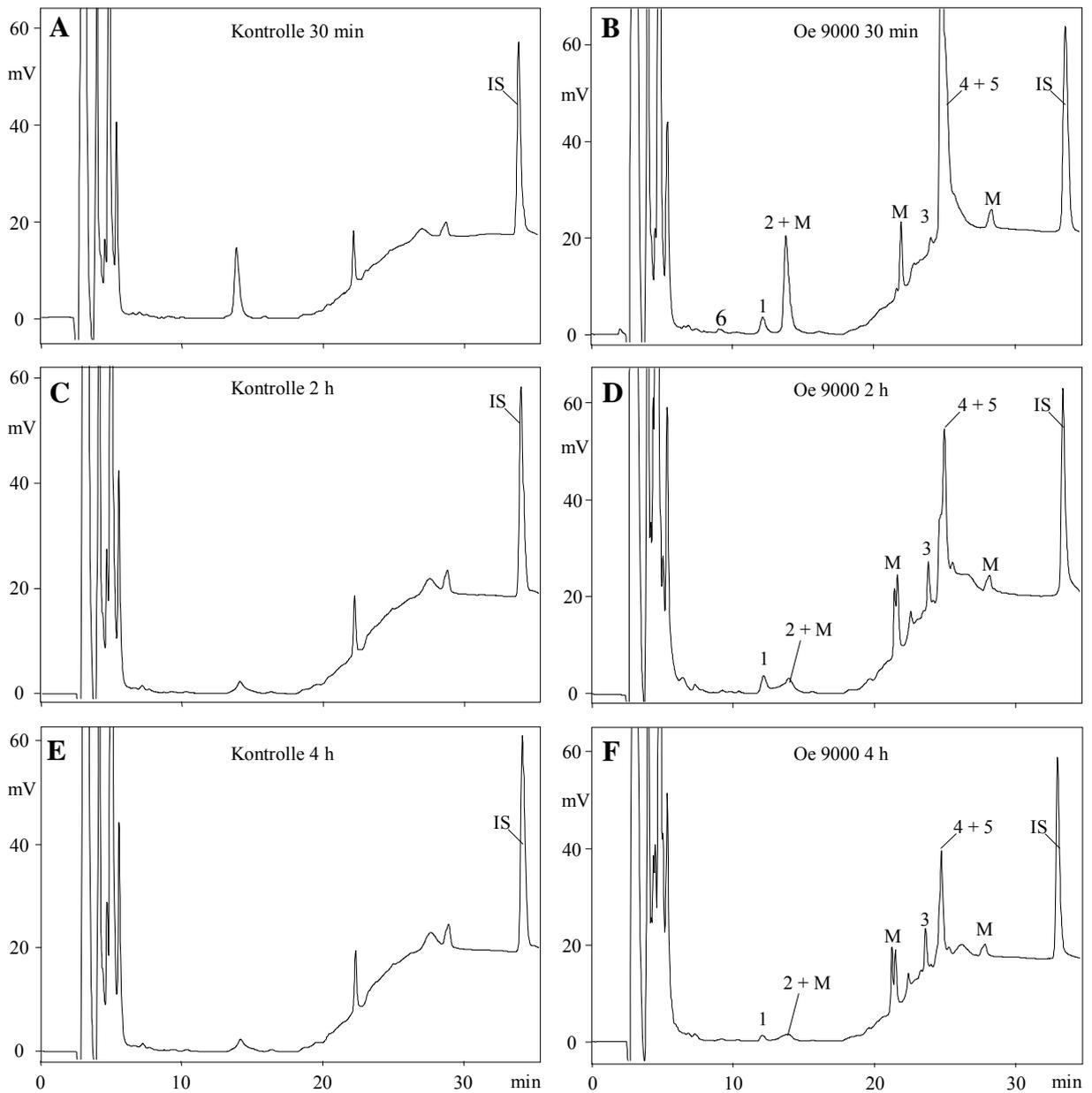


Abb. 30: Metabolismus von Oe 9000-HCl an Rattenleberschnitten. Dargestellt sind die Chromatogramme für die Leberschnitt-Inkubationen mit Oe 9000-HCl (B, D, F) und die Kontrollen (ohne Oe 9000-HCl, A, C, E) für verschiedene Inkubationszeiten (30 min, 2 h, 4 h). 1 = 4-OH-Oe 9000; 2 = 4-OH-Oe 9000-N-oxid; 3 = Oe 9000-Säure; 4 = Oe 9000; 5 = Oe 9000-N-oxid; 6 = Phenol; IS = POMPBUi (interner Standard); M = Matrix, HPLC-System 1.

Da Phenol aufgrund seines relativ hohen Dampfdrucks (0,2 h Pa bei 20 °C) bei der Lyophilisation aus den Proben entfernt worden wäre, wurde vor diesem Aufkonzentrierungsschritt ein Aliquot für die Untersuchung entnommen. Die Phenolkonzentration lag nur bei 30-Minuten-Werten oberhalb der Nachweisgrenze. Es blieb die Frage offen, ob Phenol ein Primär- oder Sekundärmetabolit des Oe 9000 ist, da kein weiteres aus der Spaltung resultierendes Produkt nachzuweisen war.

Danach stellt die hepatische oxidative Dearylierung von Oe 9000 bzw. Oe 9000-Primärmetaboliten bestenfalls einen unbedeutenden Biotransformationsnebenweg dar. Im Gegensatz zu Experimenten mit Schweinelebermikrosomen trat an der Rattenleber auch keine oxidative Desalkylierung zum

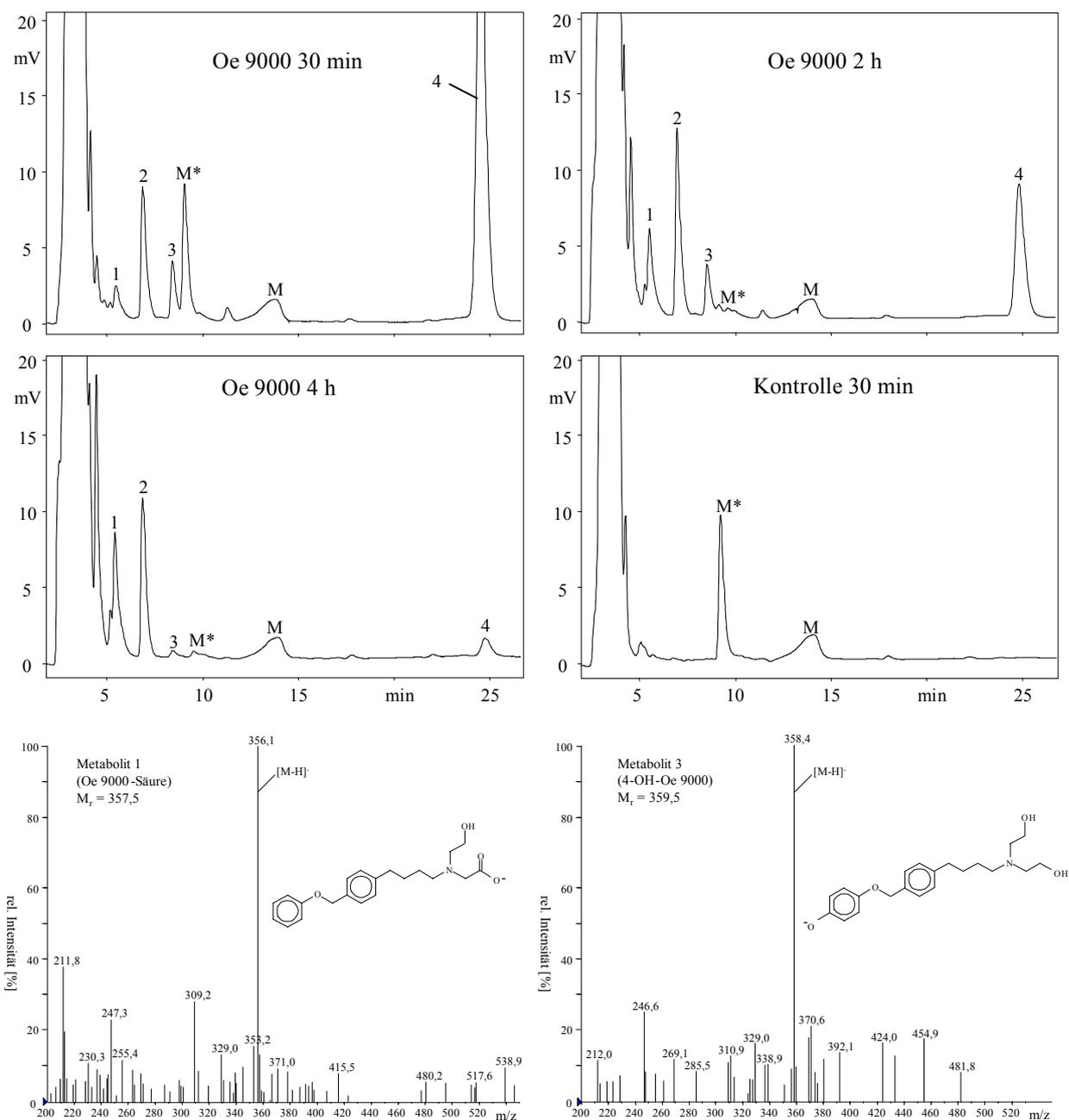


Abb. 31: HPLC-Chromatogramme nach Inkubation von Rattenleberschnitten mit Oe 9000-HCl. Auf der alkalistabilen RP-18-Säule lassen sich Oe 9000 (4) und Oe 9000-N-oxid (2) problemlos trennen und quantifizieren. Nach 30 min nimmt die Konzentration des intermediär auftretenden 4-OH-Oe 9000 (3) wieder ab. 1 = Oe 9000-Säure; M = Matrix. M* = Matrixpeak, dessen Konzentration im Laufe der Inkubation aufgrund von Phase-II-Metabolisierungsreaktionen abnimmt.

sekundären Amin POMPBA_mEt auf. Die Quantifizierung der Metaboliten erfolgte wie unter 3.3.1.3. ausgeführt unter Zusatz von POMPBA_ni als IS mit den HPLC-Systemen 1 und 2.

Während nach 30-minütiger Leberschnittinkubation von Oe 9000 noch 54 % der eingesetzten Ausgangsmenge unverändert vorlag, war die Substanz nach 4 h nahezu vollständig abgebaut.

Die Abnahme der Konzentrationen bereits gebildeter Metaboliten, wie sie vor allem aus den Differenzen von 30 min- zu 4 h-Werten zu beobachten war, gab Hinweise auf das Auftreten sekundärer Biotransformationsreaktionen. Besonders eindrücklich traten diese bei den 4-OH-

Derivaten zu Tage, bei denen schon innerhalb der ersten zwei Stunden die Zerfallsgeschwindigkeit gegenüber der Bildungsgeschwindigkeit Überhand gewann.

3.3.5.3. Ergebnisse der Glucuronidspaltungsversuche

Während der Inkubation von Rattenleberschnitten mit Oe 9000 entstanden analog zur *In-vivo*-Biotransformation des Fomocain die Glucuronide der 4-OH-Derivate und zusätzlich auch etwas Oe 9000-Glucuronid. Bei allen benannten Glucuroniden ist davon auszugehen, dass es sich um Etherglucuronide handelt, da N- und C-Glucuronide nicht durch β -D-Glucuronidase spaltbar sind [Mandel 1971]. In den Spaltversuchen kamen die aus *Helix pomatia* stammende β -D-Glucuronidase, die zugleich eine Sulfatase-Restaktivität aufwies, und die gentechnisch in *E. coli* hergestellte β -D-Glucuronidase zum Einsatz.

Die Kinetik der Glucuronidbildung wurde in groben Schritten verfolgt. Bereits nach 30 min hatte die Glucuronidierung eingesetzt. 9,6 % der initialen Oe 9000-Stoffmenge lagen am Versuchsende glucuronidiert vor, wobei das Oe 9000-Glucuronid, das sich auch in den Massenspektren der ungespaltenen Proben mit m/z 520 als $[M+H]^+$ zu erkennen gab, dominierte. Da auch in den

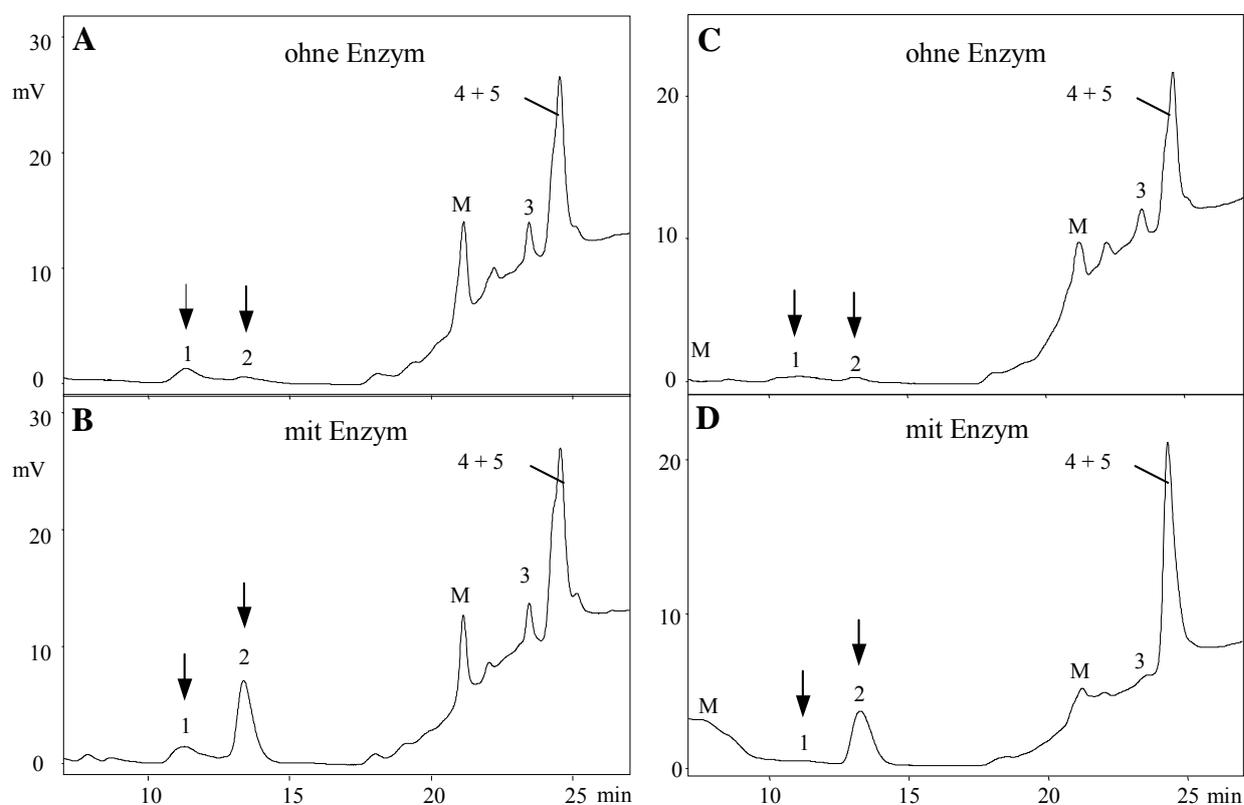


Abb. 32: HPLC-Chromatogramme der indirekten Bestimmung von Glucuroniden und Arylsulfaten nach zweistündiger Inkubation von Rattenleberschnitten mit Oe 9000 und anschließendem Phase-II-Metaboliten-Spaltungsversuch mit β -D-Glucuronidase aus *Escherichia coli* (A = Kontrolle, B = mit Enzym) bzw. *Helix pomatia* (C = Kontrolle, D = mit Enzym). 1 = 4-OH-Oe 9000; 2 = 4-OH-Oe 9000-N-oxid + Matrix; 3 = Oe 9000-Säure; 4 = Oe 9000; 5 = Oe 9000-N-Oxid; M = Matrix.

Leberschnittkontrollen die Glucuronidierung einer Substanz erfolgte, die mit 4-OH-Oe 9000-N-oxid koeluierte, eignete sich HPLC-Methode 1 nur bedingt für die Quantifizierung des aus der Spaltung hervorgehenden 4-OH-Oe 9000-N-oxid. Abhilfe schuf hier eine massenspektrometrische Quantifizierungsmethode mit 4-OH-Oe 9000-N-oxid als externem Standard.

3.3.5.4. Ergebnisse der Sulfatspaltungsversuche

Das Sulfat des 4-OH-Oe 9000-N-oxid ließ sich bei allen Ratten als Biotransformationsprodukt in Spaltungsversuchen mit Sulfatase aus Seeohr-Innereien (*Haliotis sp.*) nachweisen. Während der Oe 9000-Inkubation nahm seine Konzentration bis auf 3 % ($\pm 0,45$ %) der eingesetzten Oe 9000-Stoffmenge zu. Der Unterschied zur ungespaltenen Probe wurde allerdings erst für den 4-h-Wert signifikant. Als weiterer Schwefelsäurehalbestoff wurde Phenolsulfat nachgewiesen (Abb. 33). Für das Sulfat des 4-OH-Oe 9000 waren die Konzentrationsunterschiede zwischen Proben, die mit Sulfatase gespalten wurden und den ungespaltenen Proben allerdings nicht signifikant.

In Abb. 34 a sind alle Ergebnisse der Rattenleberschnitt-Inkubationen mit Oe 9000 zusammengefasst.

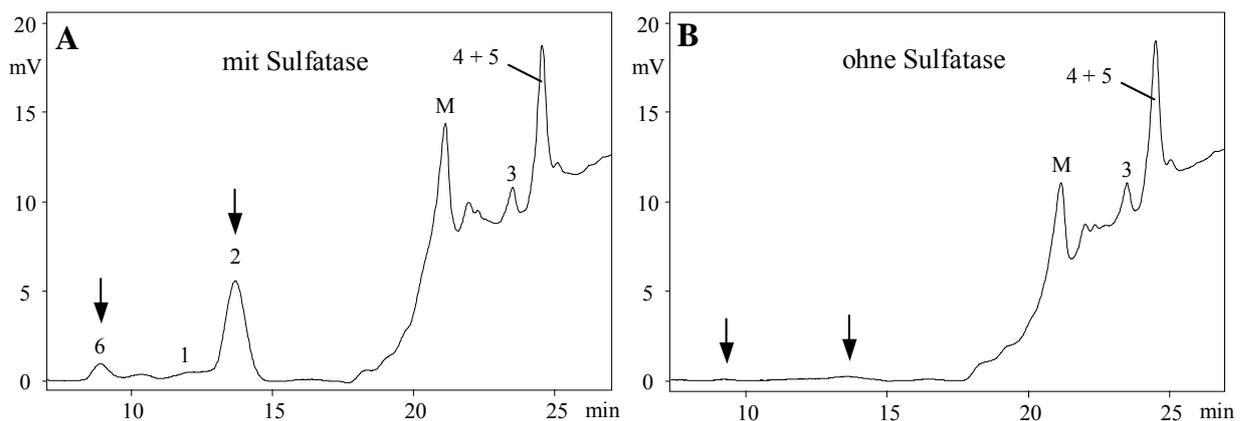


Abb. 33: HPLC-Chromatogramme (System 1) der indirekten Bestimmung von Arylsulfaten nach 4 h Inkubation von Rattenleberschnitten mit Oe 9000 und anschließender Arylsulfatspaltung mit Sulfatase aus Seeohr-Innereien über 24 h (**A** = mit Enzym, **B** = Referenz, ohne Enzym).

1 = 4-OH-Oe 9000; 2 = 4-OH-Oe 9000-N-oxid + Matrix; 3 = Oe 9000-Säure; 4 = Oe 9000; 5 = Oe 9000-N-oxid; 6 = Phenol; M = Matrix.

3.3.5.5. Diskussion der Ergebnisse

Im Gegensatz zu Fomocain, bei dem die Bildung des N-Oxids in *In-vitro*-Untersuchungen mit Rattenlebermikrosomen nur eine untergeordnete Rolle spielt [Sgoff 1975], führt die N-Oxidation des Oe 9000 (im Rattenleberschnittmodell) zu dessen Hauptmetabolit Oe 9000-N-oxid. Dieser Befund steht im Einklang mit den Rattenleber-Mikrosomenversuchen von Schatton [1977], der zeigte, dass das Ausmaß der N-Oxidationen bei Fomocain-Derivaten sehr stark von der Aminkomponente abhängt

und jene für Diethanolamine besonders favorisiert sind.

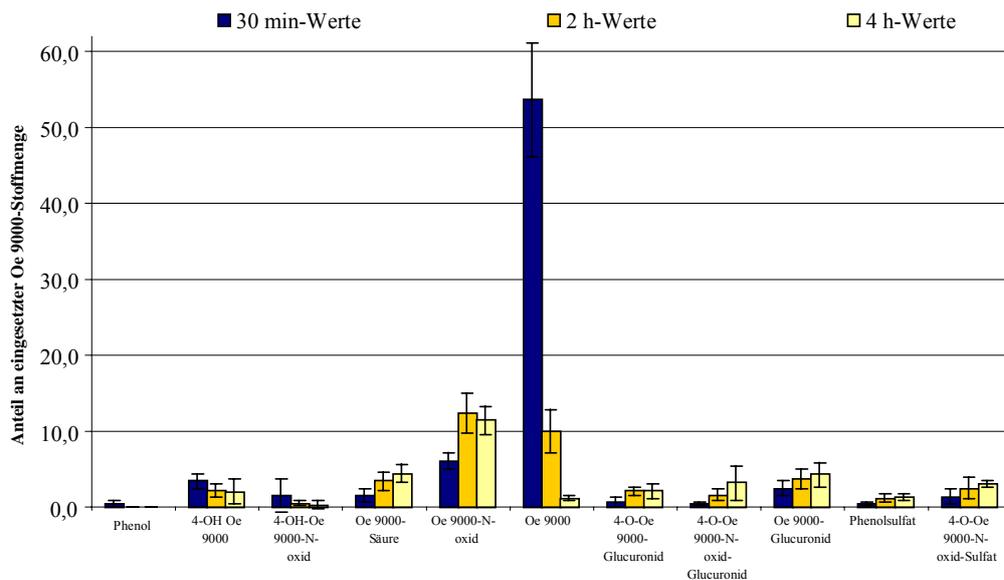


Abb. 34 a:
Quantifizierung der Phase-I- und Phase-II-Metaboliten nach Inkubation von Rattenleberschnitten mit Oe 9000-HCl (n = 7).

Als Ursache für die erleichterte N-Oxidbildung kommt dabei nicht die gegenüber Fomocain erhöhte Basizität der Diethanolamin-Komponente in Betracht – die stärker basischen Fomocaine mit Pyrrolidin-, Piperidin oder Diethylamin-Basenkompente (pK_s -Werte 10,4, 9,8 und 10,4) werden im gleichen Modell nämlich kaum oder gar nicht N-oxidiert [Schatton 1977]. Vielmehr ist eine erhöhte Affinität zur Flavinmonooxygenase (FMO) oder das veränderte Redoxpotential für die gesteigerte Umsetzungsrate anzunehmen.

N-Oxidationen von basischen Aminen mit pK_s -Werten zwischen 8 und 11 [Beedham 1997] werden in Rattenleber vorrangig durch FMO-1 vorgenommen, in humaner Leber hingegen überwiegend durch FMO-3 [Cashman und Zhang 2002]. Der Kenntnisstand zu den Substratspezifitäten beider Enzyme ist bis dato recht lückenhaft, allerdings zeichnet sich anhand vorliegender Daten bereits ab, dass jene recht verschieden voneinander sind [Cashman 2000]. Die Extrapolation der aus Rattenleberinkubationen stammenden Ergebnisse zu N-Oxidationsreaktionen auf den Menschen ist daher nur sehr beschränkt durchführbar.

Auf die Reduktionen von Oe 9000-N-oxid und 4-OH-Oe 9000-N-oxid durch (Schweine)leberhomogenate wurde bereits hingewiesen (Kapitel 3.3.4.2). Auch in Rattenlebermodellen wurden N-Oxidreduktionen von Fomocain-Derivaten vielfach experimentell bestätigt, sodass auch hier das Vorliegen eines Gleichgewichts zwischen Amin und N-Oxid anzunehmen ist (Abb. 34b).

Eine terminale Seitenkettenoxidation der offenkettigen Aminkomponente wie sie zur Bildung von Oe 9000-Säure stattfand ist nun erstmals für eine Verbindung aus der Fomocaingruppe nachgewiesen worden. Strukturanaloge Metaboliten entstehen beim Linezolid [Slatter 2002] und Gefitinib [McKillop 2005] aus der CYP-abhängigen oxidativen Morpholinöffnung. Auch dort unterliegt das N-Hydroxyethylglycin-Derivat keiner Phase-II-Metabolisierung. Der Mechanismus der Bildung der

Oe 9000-Säure sollte im Falle des Oe 9000 allerdings CYP-unabhängig über die Alkoholdehydrogenase, Aldehyddehydrogenase und/oder andere Enzyme erfolgen.

Aus der Summation der Stoffmengen der Muttersubstanz und der den *endo*-Zyklus tragenden Metaboliten wird ersichtlich, dass nach 4stündiger Inkubation nur etwa 1/3 des applizierten Oe 9000 unverändert oder in Form seiner Metaboliten wiederzufinden war. Wo sind also die verbliebenen 2/3 zu suchen? Oe 9000 hat wie die überwiegende Zahl von Fomocainen eine PEB von über 90 % [Wennek-Klose 2005]. Für Fomocaine ist auch die sehr hohe Affinität zu Gewebeproteinen bekannt [Nachev 1982]. Die Wiederfindungsraten für Oe 9000 und seine Metaboliten sind bereits mit inaktivierten (!) Mikrosomen auf nur 78 – 90 % gemindert. Wesentlich schwieriger gestalten sich Quantifizierungen aus Leberschnittinkubaten, da die Kompartimentierung der Zellen wesentlich komplexer und die Stofftransportvorgänge vielfältiger gestaltet sind. Phase-II-Metaboliten werden beispielsweise überwiegend über aktive Transportvorgänge in das Inkubationsmedium sezerniert. Stofftransporte sind daher entsprechend vom ATP-Gehalt sowie dem Funktionserhalt von ABC-Transportern und damit von der Vitalität der Hepatozyten abhängig. Es wird daher erwartet, dass ein wesentlicher Anteil an Oe 9000 und seinen Metaboliten überwiegend proteingebunden in den Leberschnitten verblieben ist.

Ein Vergleich der aus sieben Rattenleberpräparationen stammenden Ergebnisse zeigte insgesamt eine gute Reproduzierbarkeit der Methode. Gegenüber den Mikrosomenversuchen war vor allem der geringere Proteinanteil im Inkubationsüberstand vorteilhaft, der das Risiko der Metabolitenkoelutionen mit Matrix minderte und die Probenaufarbeitung erleichterte. Die Hauptmetabolisierungswege des Oe 9000 bei der Ratte führten zu Oe 9000-N-oxid, Oe 9000-Säure und den Phase-II-Metaboliten der 4-OH-Oe 9000-Derivate (Abb. 34 b).

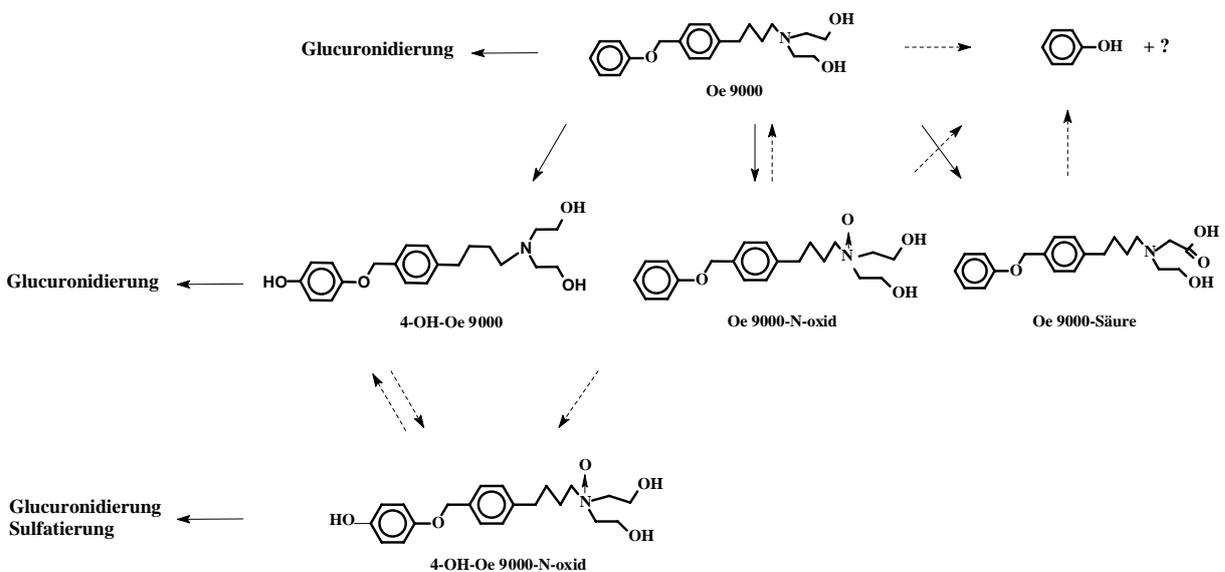


Abb. 34 b: Schema zur Biotransformation des Oe 9000 nach Inkubation von Rattenleberschnitten. Die Sulfatierung von Phenol ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

3.3.6. *In-vivo*-Biotransformation von Oe 9000 bei der Ratte

Auch wenn aus den *In-vitro*-Biotransformationsexperimenten bereits wesentliche Informationen überwiegend qualitativer Art zum Metabolismus des Oe 9000 zu ziehen waren, blieben zahlreiche Fragen offen, z.B., ob das gesamte *in vitro* gefundene Metabolitenspektrum auch *in vivo* auftritt, ob die Muttersubstanz vollständig metabolisiert wird oder auch über welche Wege die Metaboliten ausgeschieden werden. Ein einmaliger Biotransformationsversuch an vier weiblichen, gesunden HAN:Wistar-Ratten im Alter von fast 12 Wochen sollte zur Klärung dieser Fragen beitragen.

Die Ratten erhielten zu diesem Zweck eine einmalige i.p. Bolusinjektion von 40 mg Oe 9000-HCl/kg KM. Die Wahl der Dosis war unter Berücksichtigung der Oe 9000-DL₅₀ (Ratte, i.p.) von 284 mg/kg getroffen worden und knüpfte an Erfahrungen mit Fomocain in gleichartigen Untersuchungen an [Ewald 1985].

Durch den Einsatz von Stoffwechselläufigen war es möglich, die getrennte Sammlung von Urin und Fäzes in zeitlich gestaffelten Fraktionen (0 – 6 h, 6 – 24 h, 24 – 48 h, 48 – 72 h) über eine Gesamtversuchsdauer von 72 h vorzunehmen. Die Analyse der Proben erfolgte mit den HPLC-Systemen 1 und 2 sowie dem LC-MS-System 1. Auf Glucuronide wurde in Spaltungsversuchen mit β -D-Glucuronidasen von *Helix pomatia* und *Escherichia coli* geprüft.

3.3.6.1. Analyse der Urinfraktionen

Der zeitliche Verlauf des Erscheinens von Oe 9000-Metaboliten im Urin ist in den Chromatogrammen der Abb. 35 zu erkennen. Die höchsten Konzentrationen an unverändertem Oe 9000 und an Metaboliten traten innerhalb der ersten 6 h auf und fielen innerhalb der folgenden 18 h deutlich ab. Bereits ab der dritten Fraktion (24 – 48 h) waren bei drei von vier Ratten im Urin weder Muttersubstanz noch Metaboliten nachzuweisen.

Während im Harn der Ratten 2 – 4 nur drei Phase-I-Metaboliten identifiziert wurden – 4-OH-Oe 9000, Oe 9000-N-oxid, Oe 9000-Säure – eliminierte Ratte 1 zusätzlich 4-OH-Oe 9000-N-oxid über die Niere. Da sich dieses Tier in seinem gesamten Exkretionsverhalten von seinen Geschwistern unterschied, sind dessen Daten gesondert gezeigt. Im Harn aller Ratten war das Glucuronid des 4-OH-Oe 9000-N-oxid in Spaltungsexperimenten mit beiden β -D-Glucuronidasen nachweisbar. Weitere Phase-II-Metaboliten traten nicht auf. In Analogie zu den Untersuchungen mit Rattenleberschnitten waren weder POMPBA, POMPBUOH noch POMPBA_{MEt} nachzuweisen.

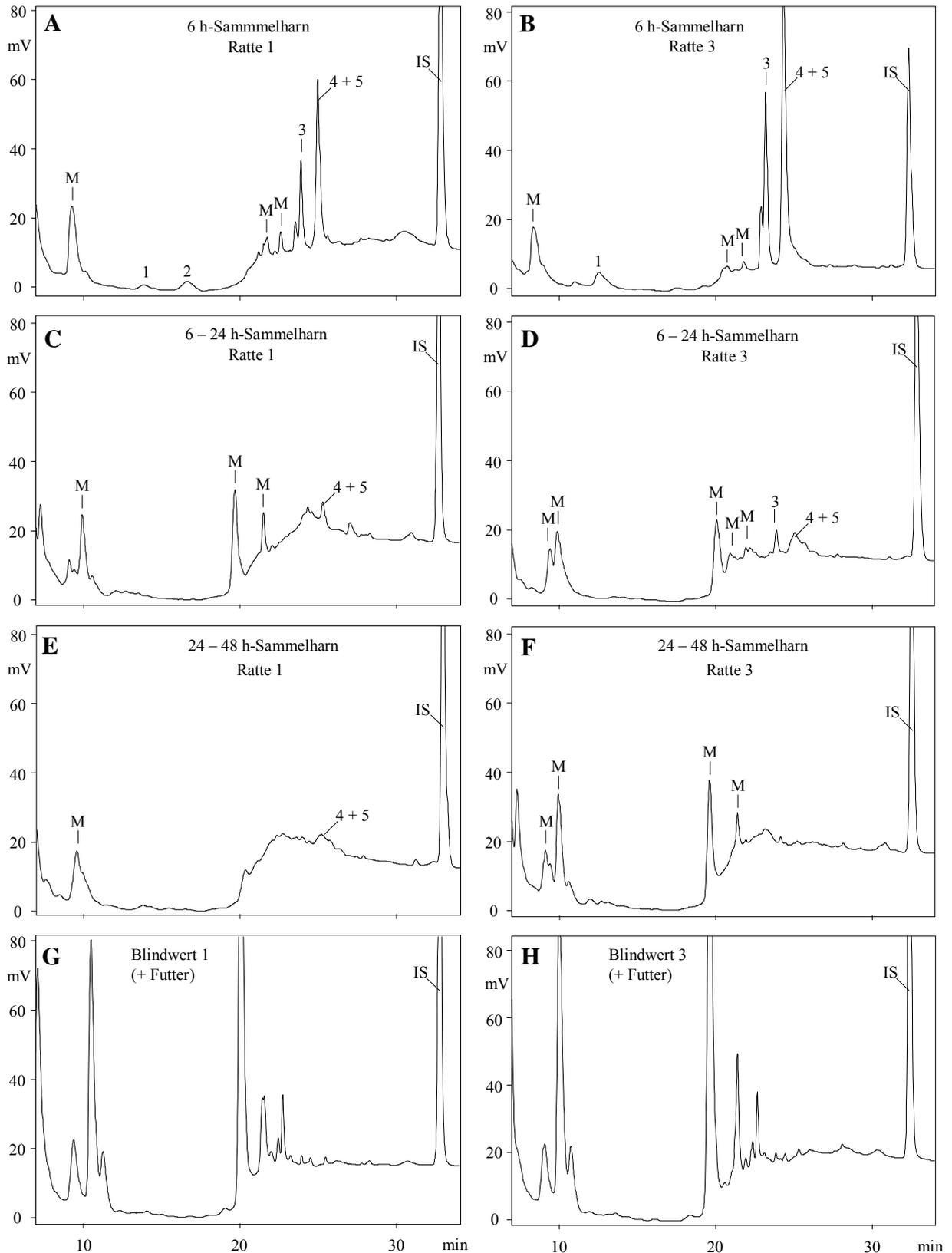


Abb. 35: Ausschnitte aus den HPLC-Chromatogrammen der Harnproben der Ratten 1 (A, C, E, G) und 3 (B, D, F, H). Da zahlreiche Proben mit Rattenfutter kontaminiert waren, wurde den Kontrollproben Futter zugesetzt. Die erhebliche Größe der Matrixpeaks in den Blindwerten ist auf den hohen Futteranteil zurückzuführen. 1 = 4-OH-Oe 9000; 2 = 4-OH-Oe 9000-N-oxid; 3 = Oe 9000-Säure; 4 = Oe 9000; 5 = Oe 9000-N-oxid; M = Matrix

3.3.6.2. Analyse der Kotfraktionen

In Vorversuchen erwies sich Methanol als Auszugsmittel für Kotproben gegenüber Acetonitril- und Methanol-Wasser-Gemischen als überlegen, da es einerseits die zu erwartenden Metaboliten hinreichend zu lösen vermochte, andererseits unerwünschte Matrixbestandteile lediglich in verhältnismäßig geringen Anteilen löste. Von einer weiteren Aufkonzentrierung der Proben musste dennoch abgesehen werden, um die Matrixbestandteile, die ohnedies bereits teilweise mit breiten Peaks die Metabolitenidentifizierung erschwerten, nicht weiter anzureichern.

Im Kot aller vier Ratten fanden sich die oxygenierten Derivate 4-OH-Oe 9000 und 4-OH-Oe 9000-N-oxid sowie Oe 9000-N-oxid. Oe 9000 selbst trat nur bei den Ratten 2 – 4 auf. Zwar im Urin reichlich vorhanden, fehlte Oe 9000-Säure im Kot gänzlich. Im Gegensatz zu den Harnproben, bei denen innerhalb der ersten 6 Stunden nach Applikation die höchsten Konzentrationen an Oe 9000 und Metaboliten nachweisbar waren, fielen die Konzentrationsmaxima in den Fäzes in die 6 – 24 h-Fractionen, was auf den längeren Zeitbedarf für die Darmpassage zurückzuführen ist. Im Zeitraum von 24 – 48 h nach Applikation war die biliär bzw. gastral ausgeschiedene Metabolitenmenge deutlich verringert, in den 48 – 72 h-Kotfraktionen waren keine Metaboliten mehr zu identifizieren.

Zwar lassen sich aufgrund der unbekanntenen Extraktionsausbeute aus dem Rattenkot nur semiquantitative Aussagen zum Metabolitenvorkommen in selbigem treffen, doch war ersichtlich, dass sich Ratte 1 markant in ihrer fäkalen Metabolitenexkretion von den übrigen Ratten abhob.

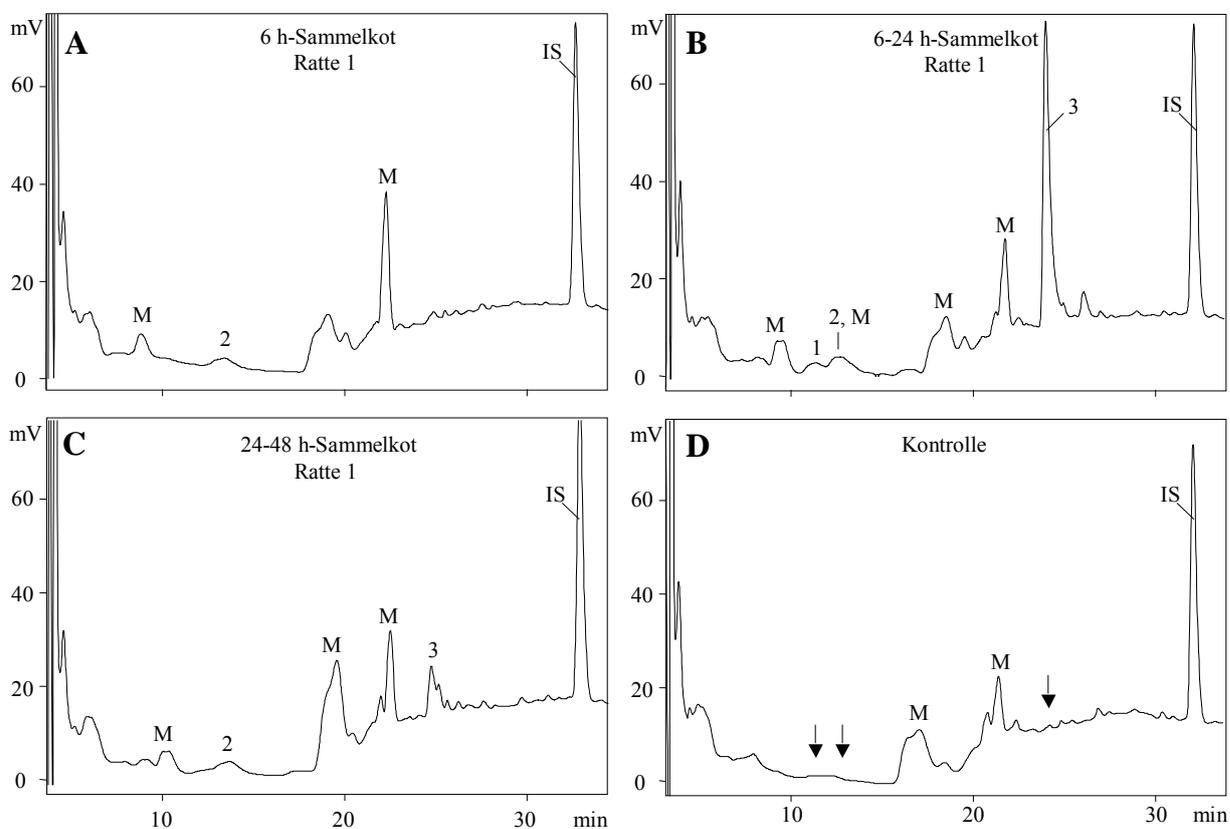


Abb. 36: HPLC-Untersuchungen der Rattenkotfraktionen nach einmaliger i.p. Applikation eines Oe 9000-HCl-Bolus. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf des Auftretens der Metaboliten in den verschiedenen Fraktionen. 1 = 4-OH-Oe 9000, 2 = 4-OH-Oe 9000-N-oxid, 3 = Oe 9000-N-oxid

Besonders deutlich trat der Unterschied für das Oe 9000-N-oxid zu Tage, das bei Ratte 1 als Hauptmetabolit gebildet wurde, bei den anderen Ratten aber nur in geringen Mengen zu finden war.

3.3.6.3. Quantitative bzw. semiquantitative Analyse der Metaboliten in den Exkrementen

Die quantitativen Verhältnisse der Metaboliten in den Exkrementen sind in Abb. 37 dargestellt. Die Quantifizierungen im Urin wurden wie unter 3.3.1.3. ausgeführt vorgenommen. Für die Quantifizierung der Metaboliten im Kot wurden die Referenzsubstanzen mit jeweils 6 verschiedenen Konzentrationen neu kalibriert [vgl. Anhang].

Im Fall der Ratte 1 konnten insgesamt 18,5 % des i.p. applizierten Oe 9000 unverändert oder in Form seiner Metaboliten wiedergefunden werden, für die übrigen Tiere lag der Wert bei durchschnittlich 9,5 %. Die Wiederfindungsraten an Oe 9000 lagen bei 1,4 % (Ratte 1) und 3,6 % (Ratten 2 – 4).

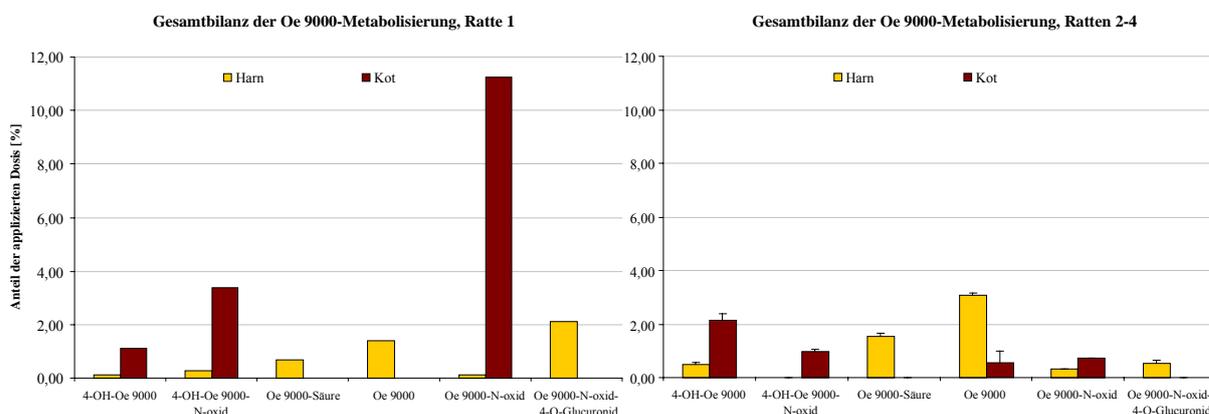


Abb. 37: Identifizierung von Oe 9000-Metaboliten nach i.p. Applikation von Oe 9000-HCl bei Ratte 1 (links) und den Ratten 2 – 4 (rechts). Dargestellt sind die molaren prozentualen Anteile der Metaboliten relativ zur applizierten Dosis in den einzelnen Sammelkotfraktionen. Ratte 1 metabolisierte Oe 9000 in höherem Ausmaß als die Ratten 2 – 4 und schied die Metaboliten überwiegend über die Fäzes aus.

3.3.6.4. Diskussion

Das auffällige Exkretionsverhalten der Ratte 1 ist möglicherweise auf eine versehentliche Punction der Darmwand – mit Folge einer intestinalen Resorption des Oe 9000 – zurückzuführen. Das Vorliegen relativ hoher Konzentrationen an N-Oxiden ist dabei nicht Ausdruck einer intestinalen N-Oxidation, sondern weist auf eine Leberpassage hin, da N-Oxidierungsreaktionen im Darm nach Prüfung der Datenlage zwar für N,N-Diethylnicotinamid (CYP-abhängig) [Chambon-Mougenot 1970], aber bisher nicht für basische tertiäre Amine gefunden wurden, deren N-Oxidation ausschließlich FMO-abhängig verläuft [Beedham 1997].

Als Ursache für die geringe Wiederfindung von Oe 9000 (als Muttersubstanz oder in Form seiner Metaboliten) muss die partielle Präzipitation des Lokalanästhetikums an der Einstichstelle und eine

damit verbundene Verringerung bzw. extreme Verzögerung der Resorption, wie sie für Fomocain-Derivate gelegentlich beobachtet worden war [Wange 2006], in Betracht gezogen werden. Eine Sektion war allerdings nicht durchführbar. Außerdem ist für Fomocain-Derivate die hohe Gewebeweißbindung charakteristisch [Nachev 1982]. Für verschiedene Lokalanästhetika ist bekannt, dass ihre Bioverfügbarkeiten (z.B. nach i.m. oder s.c. Applikationen) durch eine hohe Gewebeweißbindung reduziert werden [Tetzlaff 2000].

Die biliäre Exkretion von Metaboliten ist gegenüber der renalen Ausscheidung für Substanzen mit relativen Molmassen > 500 begünstigt [Mutschler 2001]. Bei Ratten liegt der Schwellenwert sogar noch tiefer. Da bereits für Oe 7000 die biliäre Elimination des 4-O-Glucuronids nachgewiesen wurde [Schatton 1977] und anhand des Fomocain sogar der enterohepatische Kreislauf über Glucuronidierung und enteraler Hydrolyse des Glucuronids gesichert worden war [Schatton 1977], ist für das O-Glucuronid des 4-OH-Oe 9000-N-oxid, das eine relative Molmasse von 535,6 aufweist, das selbe Schicksal wie für seine Leitsubstanz wahrscheinlich. Dieser Befund wird durch die Abwesenheit der Glucuronide in den Fäzes gestärkt.

Erschwerend für die Metabolitenidentifizierung war der Umstand, dass die Ratten ihre Exkremente mit dem zur Verfügung gestellten Futtergranulat kontaminierten, was für manche Proben einen erheblichen Matrixeintrag bedeutete. Kleinere Anteile an Metaboliten wie Phenol, die eventuell mit dieser Matrix koeluierten, wären daher dem Nachweis entgangen. Aus technischen Gründen war der Versuch allerdings nicht wiederholbar. Für eine tiefgehende Analyse des Verbleibs des Oe 9000 und für eine Aufstellung einer Gesamtbilanz sind eine andere Applikationsart und der Einsatz der radioaktiv markierten Substanz unumgänglich.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nach i.p. Applikation von Oe 9000-HCl bei der Ratte das Lokalanästhetikum zu einem geringen Anteil in unveränderter Form in Harn und Fäzes auftrat. Der quantitativ bedeutendere Teil lag allerdings in Form von Oe 9000-Metaboliten vor. Die Ausscheidung von Oe 9000 und Metaboliten war innerhalb von 48 h abgeschlossen. Bis auf Phenol konnten alle im *In-vitro*-Biotransformationsversuch aufgetretenen Phase-I-Metaboliten auch *in vivo* gefunden werden. Wie auch in den Rattenleberschnitten konnte als Phase-II-Metabolit das O-Glucuronid des 4-OH-Oe 9000-N-oxid identifiziert werden. Im *In-vitro*-Versuch waren keine neuen Metaboliten zu finden, die nicht bereits im *In-vivo*-Versuch aufgetreten waren.

3.3.7. Oe 9000-Metabolisierung mit humanen Präzisionsleberschnitten

3.3.7.1. Modell

Humane Leberschnitte gewinnen in Untersuchungen zum Arzneistoffmetabolismus zunehmend an Bedeutung [Glöckner et al. 2003]. Die Gewebeteile werden über eine Leberbiopsie oder in operativen

Eingriffen bei hepatischen Erkrankungen, z.B. Lebertumoren, erhalten. Dabei fällt neben pathologisch verändertem Gewebe auch gesundes Material an. Nur letzteres wird zur Präparation der Schnitte verwendet.

Das Einsatzgebiet der humanen Präzisionsleberschnitte umfasst die Aufklärung eines breiten Spektrums der Arzneistoffbiotransformation, inklusive Phase-II-Reaktionen, außerdem werden sie für Enzyminduktions- und -inhibitionstests sowie zur Untersuchung auf hepatotoxische Xenobiotikawirkungen herangezogen. Allerdings ist die Verwendung der Schnitte durch die Qualität und Verfügbarkeit des menschlichen Gewebes eingeschränkt [Ekins 1996 a]. Zahlreiche Faktoren wie Alter, Ernährung, Geschlecht, Rauchverhalten, sportliche Ertüchtigung und präoperative oder chronische Einnahme von Arzneistoffen sowie Erkrankung des Patienten sorgen für eine hohe interindividuelle Variabilität in den funktionellen Eigenschaften des *In-vitro*-Modells. Im Gegensatz zu Rattenlebermodellen, bei denen im Regelfall miteinander verwandte Tiere zum Einsatz kommen, ist zusätzlich das Auftreten von genetischen Polymorphismen zu berücksichtigen. Da frisches humanes Material immer nur sehr kurzzeitig zur Verfügung steht, wurden zahlreiche Versuche unternommen, den Funktionserhalt der Enzyme durch Kryokonservierungsmethoden zu gewährleisten [Ekins 1996 a]. Bisher gelang dies allerdings nur partiell. Daher wurde die Qualität der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Schnitte sowohl vor als auch nach der Kryokonservierung durch Untersuchung der Gesamtaktivität der CYPs durch die ECOD-Reaktion geprüft.

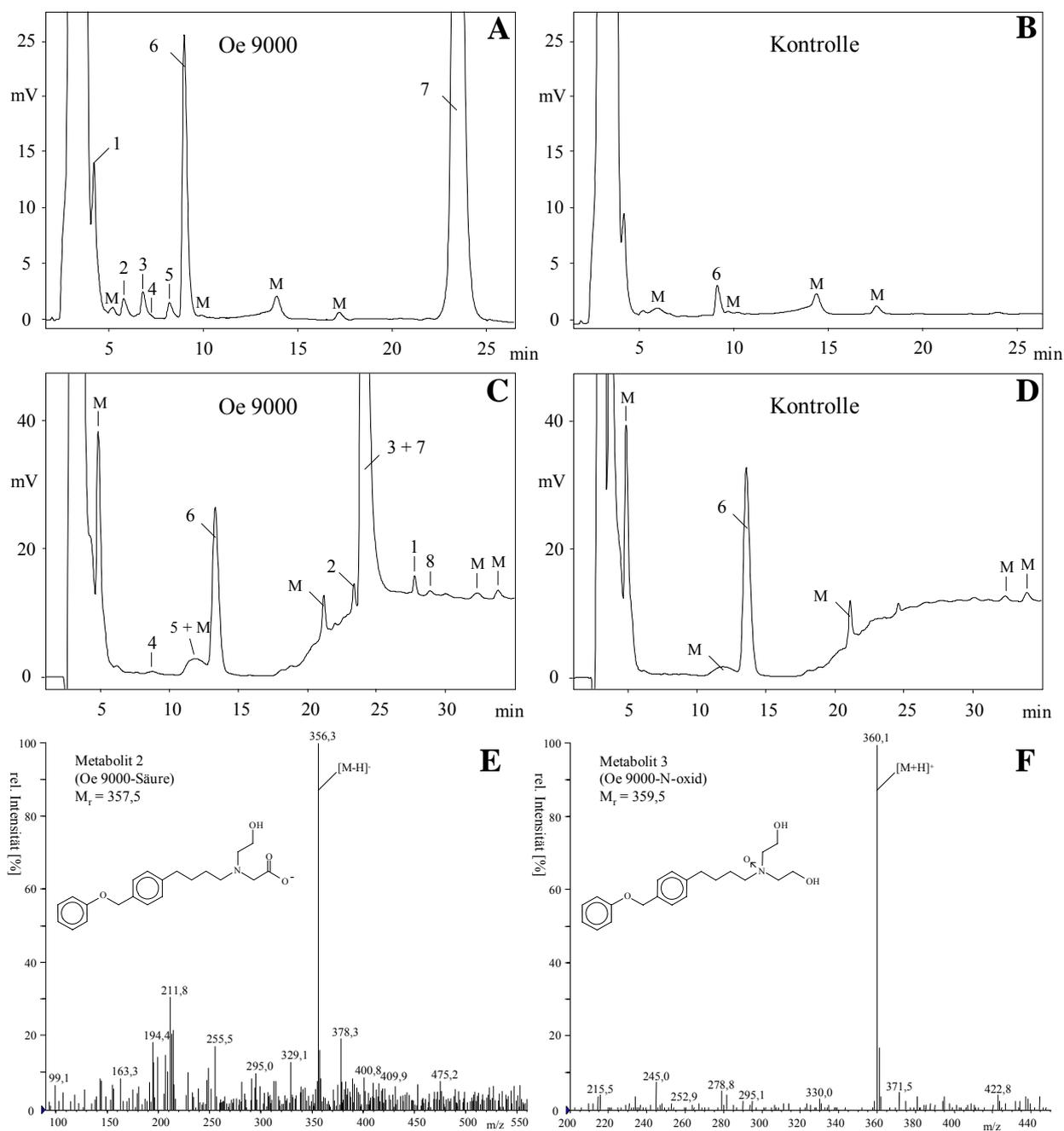
All diese Nachteile werden durch den Umstand überkompensiert, dass durch die Verwendung humanen Gewebes die größte Unsicherheit, nämlich die Übertragung von tierexperimentellen Daten auf den Menschen, entfällt.

3.3.7.2. Ergebnisse der Inkubationen der humanen Präzisionsleberschnitte

Die Inkubationen wurden an 2 Leberschnitten einer 50jährigen Patientin (siehe Anhang) in gleicher Weise durchgeführt wie für die Rattenleberschnitte beschrieben (vgl. 4.3.2.). Lediglich die initiale Oe 9000-Konzentration lag mit $3 \cdot 10^{-4}$ M etwas höher, die pro Inkubationsansatz eingesetzte Leberschnittmasse mit 37 – 60 mg etwas tiefer. Die Analyse der Proben erfolgte, wie unter 4.2.1.3. und 4.2.1.4. beschrieben mit den HPLC-Systemen 1 und 2 und dem LC-MS-System 2 (Abb. 38).

Oe 9000-HCl wurde mit humanen kryokonservierten Leberschnitten in deutlich geringerem Ausmaß als mit Rattenleberschnitten metabolisiert. So wurden nach einer Inkubationszeit von 4 h noch 69,2 % der Ausgangsstoffmenge an Oe 9000 wiedergefunden.

Abb. 38: Inkubation von Menschenleberschnitten über 4 h mit (**A, C, E, F**) und ohne (**B, D**) Oe 9000. **A** und **B:** HPLC-Chromatogramme (System 1); **C** und **D:** HPLC-Chromatogramme (System 2). 1 = POMPBA + Matrix; 2 = Oe 9000-Säure; 3 = Oe 9000-N-oxid; 4 = Phenol; 5 = 4-OH-Oe 9000; 7 = Oe 9000; M = Matrix. Die aus dem Inkubationsmedium stammende Substanz 6, die sich im ESI-MS nicht ionisieren ließ, wird während der Inkubation sulfatiert und glucuronidiert (Zeitverlauf nicht gezeigt). Ihre Phase-II-Metabolisierung wird durch Oe 9000 gehemmt. **E** und **F:** Online-ESI-Massenspektren der Peaks 2 (Oe 9000-Säure; MS-System 1 im negativen Modus) und 3 (Oe 9000-N-oxid; MS-System 2 im positiven Modus).



Oe 9000-N-oxid wurde als wichtigster Phase-I-Metabolit identifiziert, außerdem wurden 4-OH-Oe 9000, Oe 9000-Säure, POMPBA, POMPBUOH anhand ihrer Retentionszeiten nachgewiesen. Für Oe 9000, dessen N-oxid, Oe 9000-Säure und 4-OH-Oe 9000 wurden die Online-ESI-Massenspektren aufgenommen. Aus dem Fehlen des Signals von m/z 376 im positiven Modus war abzuleiten, dass kein 4-OH-Oe 9000-N-oxid mit dem Peak 6 (Abb. 38, C und D) koeluierte. Zudem konnten von

4-OH-Oe 9000, Oe 9000-Säure, Oe 9000-N-oxid und POMPBA charakteristische Online-UV-Spektren erhalten werden.

Lediglich bei Peak 4 (Phenol ?) und POMPBuOH, deren Konzentrationen nahe der Bestimmungsgrenze lagen, schied die Möglichkeit der UV-spektroskopischen Metabolitencharakterisierung aus. Im Einklang mit Ergebnissen aus den Biotransformationsuntersuchungen mit Schweineleberhomogenaten und im Gegensatz zu denen aus Rattenleberschnitten wurde beim Menschen oxidative Desaminierung mit nachgeschalteten Redoxreaktionen zu POMPBA und POMPBuOH festgestellt.

Das Zumischen („Spiken“) von Phenol zu den analysierten Proben zur Identitätssicherung des Peaks 4 verstärkte das Indiz, es könne sich um das Produkt der oxidativen Dearylierung handeln. Mit dem HPLC-System 2 trat bei der unbehandelten Probe an entsprechender Stelle im Chromatogramm eine Schulter auf, die den Sachverhalt nochmals erhärtete. Massenspektrometrisch konnte Phenol im negativen Modus in der Probe zwar nicht nachgewiesen werden, dies ist allerdings auf die bereits beobachtete geringe Ionenausbeute und eine entsprechend geringe Empfindlichkeit der Methode zurückzuführen. Wie auch bei Rattenleberschnitten war kein weiteres aus der Spaltung resultierendes Produkt nachzuweisen. Damit stellt die hepatische oxidative Dearylierung von Oe 9000 oder einem Oe 9000-Primärmetaboliten im Gegensatz zum Fomocain (an Ratte und Beagle) einen nur unbedeutenden Biotransformationsnebenweg dar.

Im Gegensatz zu Experimenten mit Schweinelebermikrosomen wurde beim Menschen keine oxidative Desalkylierung zum sekundären Amin POMPBA_{met} beobachtet.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Inkubationsüberstände sind in Abb. 39 zusammengefasst.

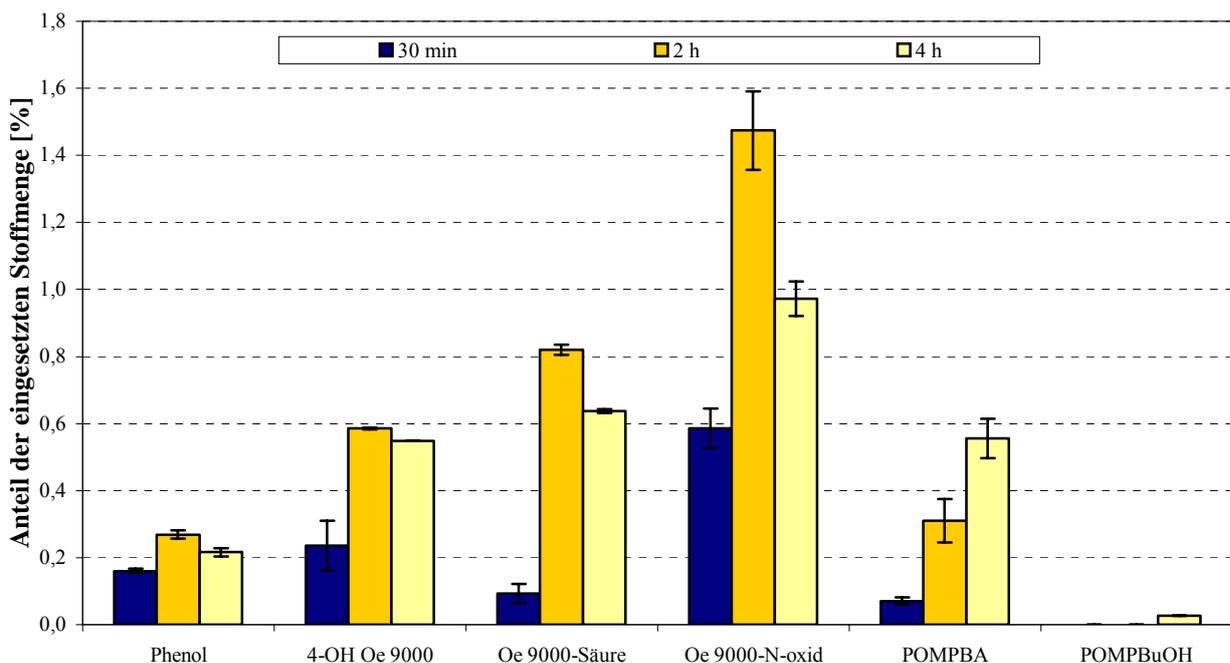


Abb. 39: Verlauf der Phase-I-Metabolisierung von Oe 9000-HCl mit humanen Präzisionsleberschnitten (n = 2) eines Patienten. Die Inkubationen wurden jeweils nach 30 min, 2 h oder 4 h gestoppt.

3.3.7.2.1. Ergebnisse der Glucuronidspaltung

Die Spaltung der Glucuronide mit β -D-Glucuronidase von *E. coli* bewirkte bei zwei Leberschnittproben eine Erhöhung der 4-OH-Oe 9000-Konzentration um durchschnittlich 10 % (von 0,87 % auf 0,96 % der applizierten Oe 9000-Stoffmenge), diese war allerdings nicht signifikant ($n = 8$). Auch die um $4,1 \pm 3,5$ % erhöhte Oe 9000-Konzentration nach angeschlossener salzsaurer Glucuronidspaltung, die Hinweis auf eine mögliche Bildung eines Oe 9000-N-Glucuronids gab, war nicht signifikant.

Bei der LC-MS-Analyse der ungespaltenen Proben traten zwar im negativen wie auch im positiven Modus entsprechende Masse/Ladungsverhältnisse (m/z 518 bzw. 520) der Molekülpeaks der Glucuronide auf, allerdings fanden sie sich nach gleicher Retentionszeit auch in den Oe 9000-freien Kontrollproben, sodass sie als Matrix-Signale angesehen werden mussten. Weiterhin fehlten m/z 534 bzw. 536, die für das Glucuronid des 4-OH-Oe 9000 erwartet wurden. Eventuell aufgetretenes Glucuronid war also zu wenig gebildet worden, um sicher identifiziert und quantifiziert zu werden.

Als gesichert kann jedoch festgehalten werden, dass Glucuronidierung bei diesem Patienten keine bedeutende Rolle bei der hepatischen *In-vitro*-Metabolisierung des Oe 9000 spielte.

Oe 9000 inhibiert eventuell die Glucuronidierung anderer Xenobiotika. Die Konzentration der aus dem Inkubationsmedium stammenden, nicht identifizierten Substanz 6 (Abb. 38) erhöhte sich in den Kontrollproben durch Glucuronidspaltung mit β -D-Glucuronidase von *E. coli* um 1606 %, was eine intensive vorgeschaltete Glucuronidierung nahe legt. In Anwesenheit von Oe 9000 hingegen wurde diese Substanz kaum metabolisiert und ihre Konzentration durch Glucuronidspaltung um 1,6 %, und damit nicht signifikant, erhöht.

3.3.7.2.2. Ergebnisse der Sulfatspaltung

Nach Spaltung mit Arylsulfatase aus Seeohr-Innereien waren die Peakflächen des Oe 9000 in der HPLC gegenüber denen der Kontrollproben zwar um durchschnittlich 6 % erhöht, dieser Unterschied war aber nicht signifikant ($n = 8$). Das zur Sicherstellung der Enzymaktivität der Sulfatase eingesetzte 4-Nitrobrenzcatechinsulfat wurde unter den gleichen Spaltungsbedingungen hingegen rasch umgesetzt, wie anhand der Entstehung von 4-Nitrobrenzcatechin (Retentionszeit 7,4 min, System 1) zu beobachten war. Damit war die Eignung der Methode zur Identifizierung von Sulfaten prinzipiell sichergestellt.

Da ferner die postulierten Schwefelsäure(halb)ester in den ungespaltenen Proben geladen aufgetreten wären und von deren Stabilität ausgegangen werden konnte [Mandel 1971], wurde aus dem Fehlen der Signale in den Online-Massenspektren die Abwesenheit der Schwefelsäure(halb)ester in den Leberschnittinkubaten geschlossen. Die Sulfatierung von Oe 9000 oder dessen Metaboliten spielte damit keine Rolle im hepatischen Oe 9000-Metabolismus der Patientin.

Interessanterweise ließ sich in den Kontrollproben (ohne Oe 9000) durch Sulfatspaltung ein erheblicher Zuwachs (Faktor 5) der Verbindung 6 (vgl. Abb. 38) verzeichnen; in Anwesenheit von Oe 9000 hingegen wurde deren Sulfatierung vollständig unterbunden. Über welchen Mechanismus die Inhibition der Sulfatierung der Substanz 6 erfolgte, wurde nicht näher untersucht und sollte nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

Die Ergebnisse der Biotransformation des Oe 9000 beim Menschen sind in Abb. 40 zusammengefasst.

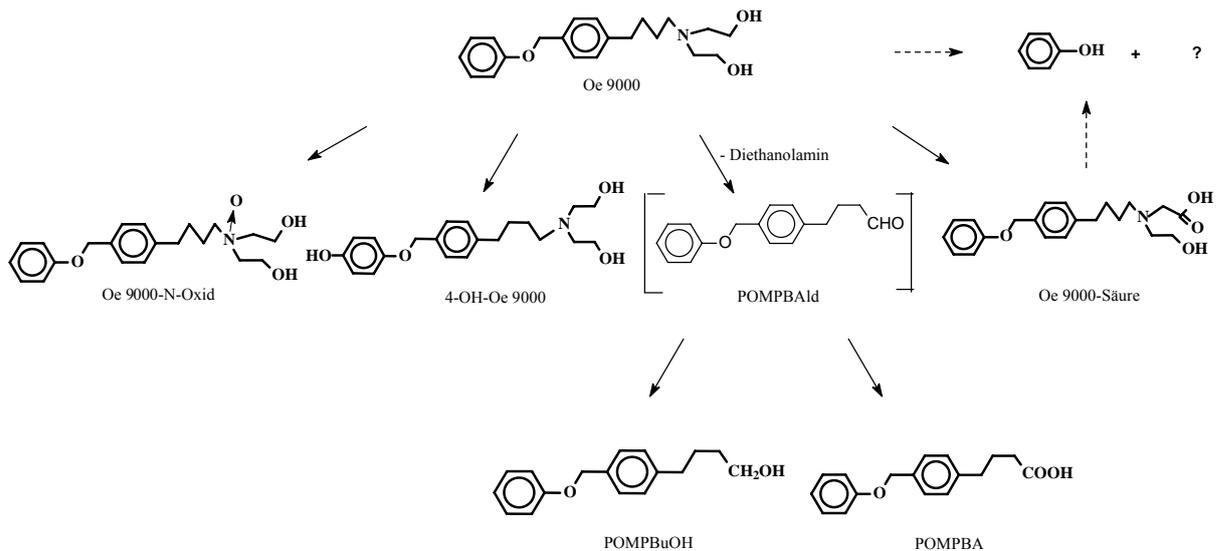


Abb. 40: Übersicht über die Phase-I-Biotransformationswege nach Inkubation von humanen Leberschnitten mit Oe 9000. Phase-II-Metabolisierung spielte allenfalls eine untergeordnete Rolle.

3.3.7.3. Diskussion der Ergebnisse

Oe 9000-HCl wurde mit kryokonservierten Leberschnitten in deutlich geringerem Ausmaß als mit Rattenleberschnitten metabolisiert. Die verwendeten Präzisionsschnitte wiesen technisch bedingt ein geringeres Schnittgewicht auf und variierten aufgrund der mechanischen Gewebeeigenschaften stärker in Größe und Masse als die Rattenleberschnitte.

Als Ursachen für den geringen Stoffumsatz kommen in Betracht:

- Die Aktivität der an der Metabolisierung beteiligten Enzyme wurde durch Art, Gewinnung und Vorbehandlung des Primärmaterials oder durch die Kryokonservierung gemindert.
- Die CYP-abhängige Metabolisierung verläuft beim Menschen im Allgemeinen langsamer und/oder weniger ausgeprägt als bei der Ratte.

Beide Faktoren seien im Folgenden diskutiert.

3.3.7.3.1. Qualität der präzisionsgeschnittenen Leberschnitte nach Kryokonservierung

Nach dem Auftauen weisen kryokonservierte Leberschnitte gegenüber frischen Leberschnitten veränderte Eigenschaften in ihrer Viabilität und Funktion auf. Die Ursache liegt in erster Linie in der partiellen Zerstörung von zellulären Strukturen während des Gefrier- und Auftauvorgangs [Ekins 1996 a]. Der Einfluss der Kryokonservierung auf die Funktionalität humaner Schnitte kann bisher nur durch Übertragung der überwiegend aus Rattenleber gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen abgeschätzt werden, da eine umfangreiche Charakterisierung humaner aufgetauter Schnitte bisher fehlt.

Bei der durch die Arbeitsgruppe von Prof. Müller verwendeten standardisierten Konservierungsmethode [Glöckner et al. 1998], bei der nach DMSO-Zusatz die Schnitte rasch in flüssigen Stickstoff getaucht werden, ist das histologische Erscheinungsbild direkt nach dem Auftauen noch normal. Allerdings lassen sich bereits nach 2stündiger Inkubationszeit Bereiche mit Zellschäden und toten Zellen in ca. 30 – 70 % des Schnittes ausmachen. Diese liegen vor allem in den mittig gelegenen Schnittbereichen (perizentral), wo Diffusionswege für Nährstoffe und Sauerstoff am längsten sind [Lupp 2002]. Nach 24-stündigen Inkubationen sind lebende Zellen ausschließlich in den Randbereichen des Schnitts und in der näheren Umgebung großer Blutgefäße zu finden. CYP-Funktionen und Lebensfähigkeit-beschreibende Faktoren wie Albuminsekretion, Glykogengehalt und Kaliumspiegel sind dann drastisch abgefallen, sodass auf die Durchführung von Langzeitinkubationen (> 24 h), wie sie für frische Leberschnitte üblich sind, verzichtet werden musste.

Für Kurzzeitinkubationen (2 – 6 h) hingegen haben zahlreiche Studien einen akzeptablen bis guten Funktionserhalt der aufgetauten Schnitte belegt [Glöckner et al. 1998 und 2001, Lupp 2002].

Beispielsweise wurde an kryokonservierten Leberschnitten die Charakterisierung der CYP-Aktivitäten nach 2stündigen Inkubationen mittels ECOD, EROD und Testosteronhydroxylierung vorgenommen und der Erhalt der Phase-I-Enzymsysteme für Ratte und teilweise auch für den Menschen gezeigt.

Auch das Ansprechen der entsprechenden CYPs auf die Enzyminduktoren Phenobarbital, Dexamethason und Pregnenolon-16- α -carbonitril, das durch immunhistochemische Detektion mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen wurde, unterstreicht diese Tatsache [Lupp 2002]. Im Falle der ECOD-Reaktion (spezifisch für CYP1A, 2A, 2B, 2C, 2E) stellten Glöckner und Ekins sogar höhere Umsetzungsraten als bei frischen Schnitten fest, was auf veränderte Transportvorgänge für Substrat und/oder Metaboliten in Kryoschnitten hinweist. Das Expressionsmuster der CYPs in den lebenden Zellen scheint innerhalb der ersten 24 h nach dem Auftauen etwa dem von frischen Leberschnitten zu entsprechen [Lupp 2002], sodass qualitative (und mit einiger Vorsicht auch quantitative) Aussagen zur Oe 9000-Metabolisierung wie für frische Schnitte getroffen werden können.

Der Einfluss der Kryokonservierung auf Phase-II-Biotransformationsreaktionen wurde von Martignoni et al. [2004] untersucht. Er zeigte den Erhalt der Phase-II-Funktionen sowohl für Ratten- als auch für Menschenleberschnitte. Limitierend für die Substratumsetzung ist jedoch häufig das Angebot an Kofaktoren [vgl. Ekins 1996 a].

3.3.7.3.2. Vergleich der Modelle Rattenleberschnitte/Menschenleberschnitte

Die Biotransformationsaktivität humaner Leberschnitte ist im Allgemeinen geringer als bei Rattenleberschnitten, wie bei zahlreichen Modellreaktionen für verschiedene Substrate beobachtet wurde [Glöckner 2003]. Auch wenn Kontroversen über die absoluten Werte bestehen [Ekins 1996 a, Glöckner et al. 2001, Olinga et al. 1998], sind sich die Autoren über die geringeren ECOD-Raten in den humanen Leberschnitten einig. Die geringere Umsatzgeschwindigkeit bei der Oe 9000-Metabolisierung steht mit diesen Befunden im Einklang.

Auch bei der Glucuronidierung der Standardsubstrate 4-Methylumbelliferon, 4-Hydroxybiphenyl und 4-Nitrophenol liegen die auf den Proteingehalt normierten humanen Umsatzraten nach 2 h-Inkubation ca. 20 – 50 % unterhalb der bei der Ratte ermittelten Werte [Glöckner et al. 2003], dabei ist der Gesamtproteingehalt in beiden Modellen etwa gleich. Für die Sulfatierung von 4-Nitrophenol fanden Kuhn et al. [2001] in humanen Schnitten sogar nur ca. ein Drittel der für die Rattenleberschnitte bestimmten Umsatzraten. Als Besonderheit ist die CYP3A-abhängige 6 β -Testosteronhydroxylierung zu nennen, die in beiden Spezies mit etwa gleicher Geschwindigkeit abläuft.

Die Speziesunterschiede in den Aktivitäten der flavinhaltigen Monooxygenase (FMO), die für die N-Oxidation von Oe 9000 verantwortlich zeichnen dürften, sind für Leberschnitte bisher wenig untersucht. Lediglich Rodrigues [Rodrigues et al. 1995] stellte anhand der N-Oxidation von ABT-418 (3-Methyl-5-(1-methylpyrrolidin-2-yl)-isoxazol) eine stärker ausgeprägte Umsetzung des Substrats in Rattenleberschnitten gegenüber dem humanen Material fest. Da neben der FMO-3 bei der Ratte zusätzlich FMO-1 in größerem Umfang exprimiert wird, lässt dieser Befund ähnlich wie beim Schwein keine Verallgemeinerung für den Menschen zu.

3.3.8. Fazit und Ausblick

Der an zwei Menschenleberpräparaten durchgeführte Biotransformationsversuch der vorliegenden Arbeit (12 Inkubationen) war nur ein erster Schritt zur Aufklärung des humanen Metabolismus des Oe 9000. Das Metabolitenspektrum des Oe 9000 der Patientin ähnelte dabei dem von Ratte und Schwein. So traten keine Metaboliten auf, die nicht in einem der vorgestellten *In-vitro*-Biotransformationsmodelle identifiziert wurden waren. Phase-II-Metabolisierung spielte nur eine untergeordnete Bedeutung. Für zukünftige Studien bleibt zu klären, wie groß interindividuelle Unterschiede sind, ob Polymorphismen zu berücksichtigen sind und wie die Oe 9000-Metabolisierung von Alter, Ernährungs- und Rauchverhalten oder der Einnahme von Arzneistoffen abhängig ist. Dabei wäre auch interessant zu erfahren, welche hepatischen und extrahepatischen Enzyme an der Biotransformation beteiligt sind.

3.4. Pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen

3.4.1. Zytotoxizität und antiproliferative Wirkungen von Oe 9000 seinen Derivaten

LA zeigen dosisabhängig neben kardialen und ZNS-toxischen Effekten auch lokale gewebetoxische Nebenwirkungen [Covino 1987]. Hierzu gehören muskuläre Schäden, wie sie nach i.m. Applikation von Lidocain [Zener et al. 1974] oder Bupivacain [Zink et al. 2002] beschrieben wurden, sowie wahrscheinlich auch nervale Verletzungen, die sich nach anhaltender hochdosierter Spinalanästhesie mit Lidocain bei einigen Patienten als *Cauda-Equina*-Syndrom äußerten [Rigler et al. 1991]. Mit Dibucain, Tetracain und Procain stehen auch andere LA im Verdacht, wegen ihrer hohen Oberflächenaktivität Membranstörungen zu verursachen, die zu neurologischen Schäden führen könnten [Kitagawa et al. 2004].

Da für Oe 9000-Derivate bisher keine Daten zu toxischen Wirkungen auf Zellen und Zellverbände vorlagen, wurde deren substanzspezifische Zytotoxizität im Rahmen einer Kooperation mit Dr. H.-M. Dahse vom Hans-Knöll-Institut Jena (HKI), *in vitro* untersucht. Zusätzlich wurden die Verbindungen hinsichtlich antiproliferativer und zytostatischer Eigenschaften charakterisiert.

Ausgehend von einer subkonfluenten Zell-Monolayer, die durch 48-stündige Inkubation von eingesäten Zellen zu erhalten war (vgl. 4.4.2.), wurde die **Zytotoxizität** nach Substanzexposition relativ zu unbehandelten Zellen ermittelt. Als Maß für die zytotoxische Wirksamkeit der Testsubstanzen wurden die halbmaximale und die zehntelmaximale *Cytotoxic Concentration* (CC_{50} und CC_{10}) bestimmt.

Im **Antiproliferationstest** wurde gleichermaßen die Proliferationshemmung der mit Substanz inkubierten Zellen relativ zu unbehandelten Zellen verglichen. Im Gegensatz zum Zytotoxizitätstest erfolgte die Substanzzugabe allerdings direkt nach Aussaat der Zellen (vgl. 4.4.1.).

Die Zytotoxizität der Verbindungen wurde in quantitativen Inhibitionstests an HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinomzellen), die antiproliferative Wirkung an L-929 (Mäusefibroblasten) und K-562-Zelllinien (humane chronisch-myeloische Leukämie-Zellen) ermittelt. Aufgrund ihrer leichten Kulturhaltung und reproduzierbarer Wachstumsraten sind die genannten Zelllinien für diese Untersuchungen besonders geeignet. Die Zellzahl wurde nach dreitägiger Inkubation entweder direkt über einen Zellcounter erfasst oder über zwei schnell durchzuführende indirekte Verfahren ermittelt. Beim ersten wurde die direkte Korrelation zwischen Lactatdehydrogenase-Aktivität und der Zahl lebender Zellen ausgenutzt. Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms wurde über eine Umsetzung des blauen Resazurin zum violetten Resorufin, die photometrisch zu verfolgen war, vorgenommen. Dem zweiten Verfahren lag die Bindung von Methylenblau an Ribonukleinsäuren für deren Gehaltsbestimmung zugrunde. Ein Anstieg der Zellzahl in einer Kavität ging mit einer Erhöhung des Gesamtgehalts an Ribonukleinsäure-gebundenem Methylenblau einher, die photometrisch erfasst wurde.

3.4.1.1. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. 12 zusammengefasst. Oe 9000 und Oe 7000 unterschieden sich in ihrer Zytotoxizität und ihrer antiproliferativen Wirkung praktisch nicht von Fomocain, zeigten aber im Vergleich zu Tetracain eine um den Faktor 4 – 6 größere Zytotoxizität und einen ebenso verstärkten antiproliferativen Effekt. Der potente Na_v-Kanalblocker Lidocain wies bei Konzentrationen unterhalb 50 µg/ml keine Zytotoxizität und keine antiproliferative Wirkung auf. Damit lässt sich die Zytotoxizität von Oe 9000 und seinen Derivaten wahrscheinlich nicht auf die Blockade von Na_v-Kanälen an den untersuchten Zellen zurückführen.

Die Metaboliten von Oe 9000 waren im Vergleich zur Muttersubstanz genauso oder weniger zytotoxisch und antiproliferativ wirksam. Die Verbindungen mit Phenoxyethylphenylalkyl-Grundstruktur und basischem Stickstoff bewirkten Zelllyse im gleichen Konzentrationsbereich wie Oe 9000, doch ging die Senkung der Basizität des Stickstoffs wie auch die Dearylierung mit einer Detoxifizierung einher. So wurde die Zytotoxizität durch N-Oxidation um den Faktor 3 – 4 gesenkt; auch die stickstofffreien Derivate POMPBA und POMPBUOH und die dearylierten Verbindungen BHABBA und Methyl-BHABBA wiesen eine deutlich verringerte Zytotoxizität auf. Im Gegensatz dazu hatte die Einführung hydrophiler Substituenten am *exo*-Zyklus keinen nennenswerten Einfluss

Zelllinie	Zytotoxische Wirkung		Antiproliferative Wirkung	
	HeLa CC ₅₀ [µmol/l]	HeLa CC ₁₀ [µmol/l]	L-929 GI ₅₀ [µmol/l]	K-562 GI ₅₀ [µmol/l]
Lidocain-HCl	> 184,6	> 184,6	> 184,6	> 184,6
Tetracain-HCl	107,0	42,9	62,5	24,3
Fomocain-HCl	30,3	7,3	30,7	27,0
Oe 9000-HCl	20,3	10,5	9,2	6,6
Oe 7000-HCl	26,4	11,6	26,1	18,0
2-Nitro-Oe 9000	19,0	9,8	10,3	10,0
POMPBU _{Ni}	31,4	14,7	15,1	17,9
OeDimer	1,3	0,7	1,3	0,2
Oe 9000-N-Oxid	74,8	38,9	32,0	14,5
4-OH-Oe 9000-N-Oxid	69,5	16,0	62,9	46,6
4-OH-Oe 9000	32,3	3,3	5,3	5,0
POMPBA _{AmEt} -HCl	19,4	10,7	11,9	11,6
POMPBA _{Am} -HCl	14,7	5,1	21,6	11,7
POMPBUOH	31,6	7,0	26,1	19,5
POMPBA	55,5	23,7	42,5	159,1
POMPES	> 206,4	40,9	139,9	> 206,4
BHABBA	> 177,7	160,7	> 177,7	> 177,7
Methyl-BHABBA	> 169,3	103,6	> 169,3	> 169,3

Tab. 12: Übersicht über Proliferationsinhibitionen bei verschiedenen Zelllinien durch postulierte und tatsächliche Oe 9000-Metaboliten und Oe 9000-Derivate sowie Anilid- und Ester-Lokalanästhetika im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die mit „>“ gekennzeichneten Werte zeigen keine Wirksamkeit im Konzentrationsbereich zwischen 0,4 und 50 µg/ml.

auf die Zytotoxizität. OeDimer fiel durch seine außerordentlich hohe, gegenüber Oe 9000 15fach stärkere Zytotoxizität auf. Ein Vergleich der CC_{50} -Werte für antiproliferative und zytotoxische Proliferationsinhibitionen lässt erkennen, dass die antiproliferativen Wirkungen der Verbindungen auf deren Zytotoxizitäten zurückzuführen sind (vgl. Abb. 41).

Die Zellkulturtests erlaubten auch, Aussagen über zytostatische Eigenschaften der untersuchten Verbindungen zu treffen. Charakteristischerweise treten bei zytostatischen Substanzen über einen großen Konzentrationsbereich starke antiproliferative Effekte auf, die nicht mit der Zytotoxizität einhergehen. Im Falle der Oe 9000-Derivate ließen aber die Dosis-Wirkungs-Kurven für keine der Substanzen zytostatisches Verhalten erkennen. Auch die Zellgrößen und Zellformen gaben keinen Hinweis auf zytostatische Effekte der Substanzen.

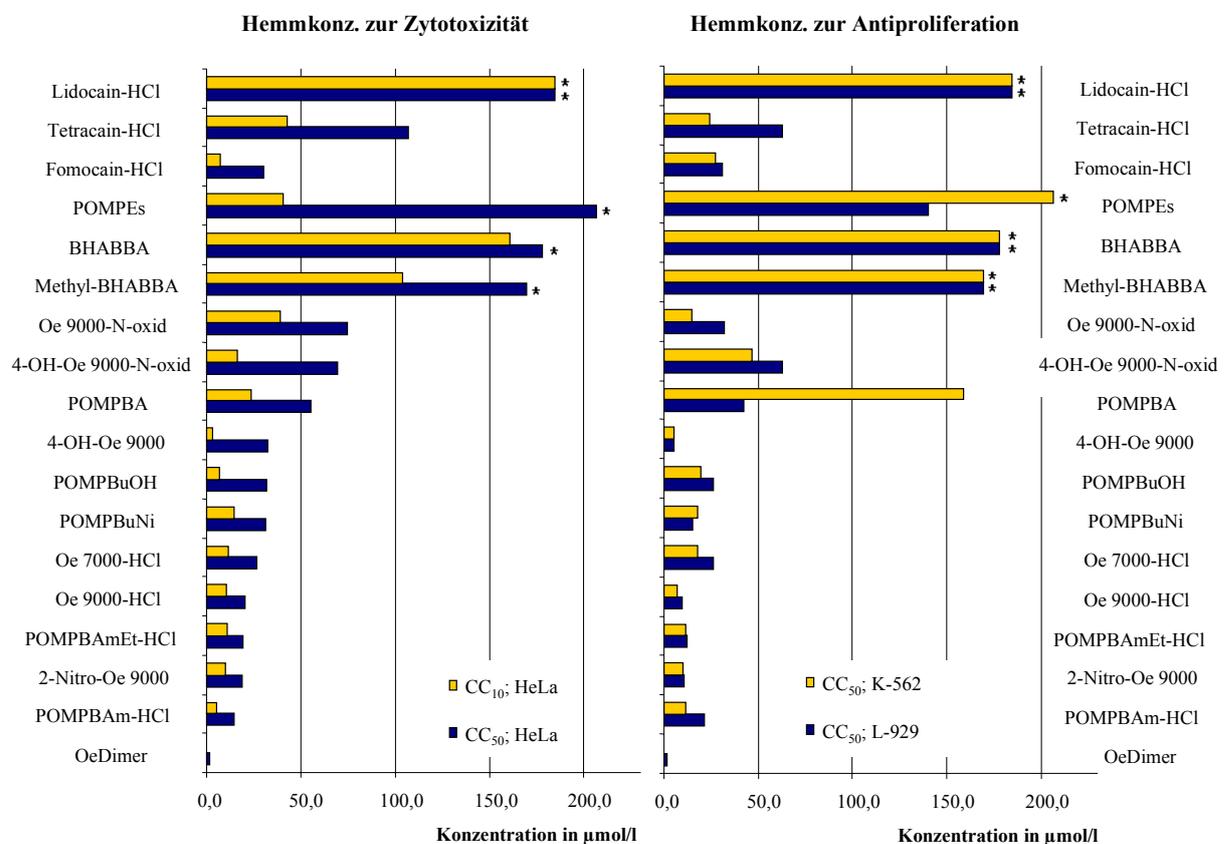


Abb. 41: Zytotoxische und antiproliferative Wirkungen von Oe 9000-Derivaten im Vergleich zu Lidocain und Tetracain. Die Substanzen sind nach steigender Zytotoxizität an HeLa-Zellen (CC_{50}) geordnet. Die mit „*“ gekennzeichneten Werte zeigten keine Wirksamkeit im Konzentrationsbereich zwischen 0,4 und 50 µg/ml.

3.4.1.2. Diskussion

Die hohe Zytotoxizität des Fomocain und der Diethanolamin-Derivate Oe 7000 und Oe 9000 steht in scheinbarem Widerspruch zur Gesamttoxizität der Verbindungen. Die Daten zur LD_{50} von 180 – 300 mg/kg KM (Ratte i.p.) [Fleck et al. 2004] belegen, dass sowohl Fomocain als auch die Diethanolamin-Derivate *in vivo* deutlich besser vertragen werden als Tetracain (LD_{50} = 50 mg/kg KM, i.p. Ratte) und als die geringen CC_{50} -Werte aus den Zellkulturtests suggerieren.

Der Widerspruch lässt sich unter Einbeziehung der hohen PEB von 87,1 – 91,6 % (Diethanolamin-Derivate) bzw. > 99,0 % (Fomocain) [Wennek-Klose 2005] auflösen, aus denen hervorgeht, dass die Konzentration des freien Arzneistoffs etwa 1 – 2 Zehnerpotenzen unterhalb seiner Gesamtkonzentration im Blut liegt. Die PEB von Lidocain und Tetracain liegen mit 64 % bzw. 76 % deutlich darunter [Nachev 1982, Steinhilber et al. 2005].

Wegen der hohen Zytotoxizität des Oe 9000 muss vor rascher i.v. Injektion, die kurzzeitig zu einem hohen Anteil der ungebundenen Substanz im Blut führen würde, gewarnt werden. Außerdem ist bei gleichzeitigem Einsatz von Arzneistoffen, die Oe 9000 aus der PEB verdrängen, Vorsicht geboten.

3.4.2. Antimikrobielle Eigenschaften von Oe 9000 und seinen Derivaten

3.4.2.1. Wirkungen von Lokalanästhetika auf Bakterien und Pilze

Dass LA antibakterielle Eigenschaften aufweisen sollen, wurde bereits 1909 postuliert [Aydin 2001]. Seitdem haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen dem Thema gewidmet [z.B. Bazaz et al. 1983]. Murphy beschrieb 1945 die toxische Wirkung von 0,5 % (18,9 mM) Tetracain auf Pseudomonaden. Schmidt et al. [1970] und Wimberley et al. [1979] untersuchten die antimikrobiellen Effekte von Procain an *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas*- und *Mycobacterium*-Arten und von Lidocainlösungen (1%ig, 42,7 mM) an zahlreichen weiteren grampositiven und gramnegativen Keimen. Aydin [Aydin et al. 2001] schloss zusätzlich Ropivacain und Bupivacain in Konzentrationen von 0,0625 – 0,5 % (ca. 2,3 – 18 mM) sowie Prilocain 0,25 – 2 % (11,3 – 90,8 mM) in seine Studien mit *E. coli*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* ein. Die Studien kamen einheitlich zu dem ernüchternden Ergebnis, dass die LA allenfalls nur schwach antibakteriell und dann auch nur in hohen Konzentrationen gegen spezielle Bakterienarten wirksam waren, sodass die Frage der klinischen Relevanz zu stellen war. Im Meerschweinchenmodell ergab zwar die Inokkulation von mit 2%igen (85,3 mM) Lidocainlösungen vorbehandelten chirurgischen Wunden mit *Staphylococcus aureus* im Vergleich zu Kontrolltieren einen Abfall der Bakterienzahl um 70 % [Stratford 2002], allerdings steht bis heute ein *in vivo* am Menschen erbrachter Beweis für eine effektive Keimreduktion in Wunden oder eine Reduktion des Infektionsrisikos nach LA-Applikationen aus.

Für mittel- bis hochprozentige Lösungen von Tetracain, Procain, Nupercain und Chlorpromazin existieren allerdings *In-vitro*-Daten über den Mechanismus der Zellzerstörung bei grampositiven Bakterien [Silva et al. 1979]. Typische mikromorphologische Membranveränderungen bei *Bacillus*-Arten und *Streptococcus faecalis* wurden beispielsweise für Tetracain in 10 mM-Lösungen nach 5 – 10 min Inkubationszeit beobachtet. Membranschäden mit resultierendem K^+ -Verlust und Entstehung von Membranfragmenten traten für Nupercain und Chlorpromazin bereits in mikromolaren Konzentrationen auf. Wenn also die schwach antibakterielle Wirkung der LA tatsächlich auf Membraneffekten beruht, sollten stark oberflächenaktive Verbindungen wie Fomocain-Derivate [vgl. 4.5.2.] bereits in

deutlich geringeren Konzentrationen toxisch auf grampositive Bakterien wirken und damit zumindest in der Oberflächenanästhesie lokalantibiotisch das Infektionsrisiko reduzieren. Dieses Postulat sollte in folgenden *In-vitro*-Untersuchungen auf seinen Gehalt geprüft werden. Durch die Einbeziehung von gramnegativen Bakterienarten in die Untersuchungen sollte ferner das Bild vom Wirkprofil der Substanzen komplettiert werden.

Von fungistatischen und fungiziden Wirkungen der LA Lidocain, Bupivacain und Benzydamin bei Hefen berichteten Pina-Vaz et al. [2000]. Die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) des Benzydamin von 12,5 – 50 µg/ml (40 – 161 µM) für *Candida*-Arten rechtfertigen neben den bakteriziden, analgetischen und antiphlogistischen Eigenschaften der Substanz deren Einsatz in Vaginalspüllösungen bei durch Mischflora verursachter Vaginitis. Die minimalen Hemmkonzentrationen für Lidocain und Bupivacain von 5 – 40 mg/ml (21 – 171 mM) bzw. 2,5 – 10 mg/ml (8,7 – 34,7 mM) liegen allerdings fast 3 Zehnerpotenzen über denen des Benzydamin (so dass fraglich ist, ob allen Substanzen der gleiche Wirkmechanismus zugrunde liegt). Auch für Prilocain setzten fungistatische Effekte bei *C. albicans* erst ab Inkubationen der 2%igen (90,8 mM) Lösungen ein [Aydin 2001].

Fungistatische Effekte von LA werden durch Pina-Vaz [Pina-Vaz et al. 2000] auf eine Störung des Stoffwechsels zurückgeführt. In höheren, nicht-therapeutischen Konzentrationen (30 – 50 mg/ml Bupivacain bzw. Lidocain) wirken die Testsubstanzen hingegen fungizid. Permeabilitätssteigerungen für K^+ und für den ansonsten nicht membrangängigen Fluoreszenzmarker FUN-1¹ machen für so hohe Konzentrationen die Zerstörung der Zytoplasmamembran als Hauptmechanismus des Zelluntergangs wahrscheinlich. Ein anderer Mechanismus für die Fungistase wurde von Rodrigues et al. [2000] vermutet, der für *Candida*-Arten eine Ca^{2+} -Kanalblockade durch Lidocain (0,075 % – 0,125 %) bzw. Ropivacain (0,125 – 0,25 %) mit resultierender Inhibition der Bildung der Keimröhren beschrieb.

Da Oe 9000 eine deutlich höhere Oberflächenaktivität als die klassischen LA aufweist (vgl. 4.5.2.), lag auch hier die Hypothese nahe, Oe 9000 habe eine entsprechend stärkere fungizide Wirkung auf *Candida*-Arten als die klassischen LA. Neben der Prüfung dieser Annahme sollte untersucht werden, ob fungistatische oder fungizide Effekte auch gegenüber weiteren Pilzarten existieren. Die Testung zahlreicher Oe 9000-Derivate sollte die Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen ermöglichen. Als Referenzen wurden Lidocain und Tetracain mitgeführt.

Die Prüfung auf antimikrobielle Aktivitäten der Substanzen wurde von Frau Dr. Möllmann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Brakhage vom HKI Jena durchgeführt. Alle Substanzen wurden im Konzentrationsbereich von 100 – 1000 µg/ml in Müller-Hinton-Medium (entsprechend 164 – 4130 µM) in Agardiffusionstests getestet. Als direktes Maß für die antimikrobielle Wirksamkeit diente die Größe der Hemmhöfe nach 18- bzw. 48-stündiger Inkubation bei 37 °C der Mikroorganismen mit Testsubstanz.

¹ IUPAC-Name: 2-Chlor-4-[(Z)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2(3H)-yliden)methyl]-1-phenylchinolinium-iodid

3.4.2.2. Ergebnisse und Diskussion der antimikrobiellen Untersuchungen

Alle Verbindungen, die in einer Konzentration von 100 µg/ml in mindestens einem Testsystem für antimikrobiell wirksam befunden wurden, sind in Tab. 13 aufgeführt (für 1 mg/ml siehe Anhang).

Alle untersuchten Mikroorganismen verhielten sich in dieser gewählten Konzentrationsstufe indifferent gegenüber Oe 9000 und – mit Ausnahme von POMPBuOH – gegenüber den eingesetzten Oe 9000-Metaboliten. Ebenfalls wirkungslos waren die Referenz-LA und 2-Nitro-Oe 9000. Da ausschließlich therapeutisch relevante Effekte von Interesse waren, erschien die Untersuchung von Lösungen > 1 mg/ml nicht sinnvoll.

Wie postuliert, zeigte die Substanz mit der höchsten Oberflächenaktivität, OeDimer, gegenüber den grampositiven Keimen *Bacillus subtilis*, *Mycobacter vaccae* und dem *Staphylococcus aureus*-Stamm 511 B3 deutliche Hemmeffekte, überraschenderweise blieben hingegen der *S. aureus*-Stamm 134/94 R9 und *Enterococcus faecalis* durch die OeDimer-Präsenz unberührt. Ursachen könnten in Unterschieden im Membranaufbau liegen.

Substanz		Fomocain-HCl	POMPBA-m-HCl	OeDimer	POMPBUOH	Referenz
Bakterienstamm/ Pilzstamm	Resistenz gegen	Größe der Hemmhöfe [mm]				
Grampositive Bakterien						
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 B1	-	0	0	13,5	0	28
<i>Enterococcus faecalis</i> 1528 R10	Meth, Vanc	0	0	0	0	16
<i>Staphylococcus aureus</i> SG 511 B3	-	0	0	11	0	17
<i>Staphylococcus aureus</i> 134/94 R9	AG, Cip, T	0	0	0	0	0
<i>Mycobacterium vaccae</i> IMET 10670 M4	-	14 p	23, (28 p)	19	0	19
Gramnegative Bakterien						
<i>Escherichia coli</i> SG 458 B4	Meth, Vanc	0	0	0	0	28, (30 p)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SG 137 B7	Meth, Vanc, Dox	0	0	0	0	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K 799/61 B9	- ¹⁾	0	0	0	0	20
Pilze						
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> 549 H4	-	0	0	0	0	17 p
<i>Candida albicans</i> H8 BMSJ 212	-	0	0	0	0	21
<i>Penicillium notatum</i> JP 36 P12	-	0	13	0	13 p	18

Tab. 13: Antimikrobielle Wirkungen von Oe 9000-Derivaten der Konzentration 100 µg/ml nach 24 h-Inkubation (bzw. 48 h-Inkubation). Referenz = Gemisch Ciprofloxacin (5 µg/ml)/Amphotericin B (10 µg/ml). p = partielles Wachstum innerhalb der Hemmzone (nicht die gesamte Bakterienpopulation wird gehemmt). Oe 9000-HCl, Oe 9000-N-oxid, 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, Oe 7000-HCl, POMPBA, POMPBAmEt-HCl, POMPEs, 2-Nitro-Oe 9000, BHABBA, Methyl-BHABBA, Tetracain-HCl, Lidocain-HCl zeigten mit 100 µg/ml in keinem der Testsysteme eine Wirkung. Meth = Methicillin, Vanc = Vancomycin, Cip = Ciprofloxacin, AG = Aminoglykoside, T = Tetracycline. 1) Penetrationsmutante Zelllinie, hyperempfindlich gegenüber zahlreichen Antibiotika

Fragen wirft die antimikrobielle Wirkung von Fomocain, POMPBAm und OeDimer gegenüber *Mycobacterium vaccae* auf, da sich weder Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten lassen, noch Beziehungen zu den Oberflächenaktivitäten der Verbindungen bestehen. Die vergleichsweise potente Bakterizidie gegenüber dieser Bakterienart veranlasste uns, die Wirkung bei anderen *Mycobacterium*-Arten zu testen und die MHK zu bestimmen (Tab. 14). Die MHK von Fomocain-HCl, POMPBAm-HCl und OeDimer lagen bei allen untersuchten Mykobakterienstämmen zwischen 3 – 100 µg/ml. Am empfindlichsten reagierten dabei *M. smegmatis* und *M. vaccae*, während toxische Effekte auf *M. fortuitum* und *M. aurum* erst bei höheren Konzentrationen einsetzten. Am stärksten antibiotisch zeigten sich OeDimer und POMPBAm-HCl gegenüber *M. smegmatis* bzw. *M. vaccae* mit MHK von etwa 2 – 6 µg/ml (ca. 3 – 22 µmol/l). Sie sind damit zwar noch mit dem Faktor 3 – 18 dem potenten Ciprofloxacin (MHK = 0,4 µg/ml, entsprechend 1,2 µM) unterlegen, könnten aber eventuell als Leitstrukturen dienen, um neue Antibiotika zur Therapie der Lepra oder der Tuberkulose zu entwickeln.

Substanz	Lösungsmittel	<i>M. smegmatis</i> SG 987	<i>M. aurum</i> SB 66	<i>M. aurum</i> DSM 43536	<i>M. vaccae</i> IMET 10670	<i>M. fortuitum</i> B
Oe 9000-HCl	DMSO/MeOH	125	250	n. b.	31,2	125
Fomocain-HCl	DMSO/MeOH	62,5	125	100	7,8	62,5
POMBAm-HCl	DMSO/MeOH	15,6	15,6	50	2	15,6
OeDimer	DMSO/MeOH	15,6	31,2	50	2	15,6
Ciprofloxacin	Aqua dest.	0,4	< 0,05	0,78	0,78	0,1
DMSO/MeOH		500	500	> 100	500	500

Tab. 14: Minimale Hemmkonzentrationen von Substanzen in µg/ml. n. b. = nicht bestimmt

Die eingangs aufgestellte Hypothese einer starken *Candida*-toxischen Wirkung der Oe 9000-Derivate wurde experimentell widerlegt. Selbst das enorm oberflächenaktive OeDimer vermochte nicht, die Zellwände der Pilze zu zerstören.

Aus dem Vergleich der Konzentrationen der Oe 9000-Derivate mit denen der antimikrobiellen Referenzen Amphotericin B und Ciprofloxacin wird ersichtlich, dass die antimikrobielle Wirkpotenz der untersuchten Verbindungen – abgesehen von der Bakterizidie gegenüber Mykobakterien – insgesamt vergleichsweise gering ist und damit für einen therapeutischen Einsatz der Oe 9000-Derivate als Anti-

biotika nicht ausreichen würde. Auch ein therapeutisch bedeutsamer lokalantibiotischer Nebeneffekt nach Oe 9000- oder Fomocain-Applikation auf Haut und Schleimhaut ist nicht zu erwarten.

3.4.3. Antioxidative Wirkungen von Oe 9000 und seinen Derivaten

Aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit zählen Hyperoxid-Ionen ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikale (HO^{\cdot}) und Peroxylradikale (HOO^{\cdot} oder ROO^{\cdot}) neben anderen zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Sie können mit zahlreichen Biomolekülen (z.B. Membranlipiden, Proteinen, DNA) reagieren, diese schädigen oder deren Funktionalität einschränken oder fehlleiten.

ROS werden für Alterungsprozesse und auch für pathophysiologische Prozesse u.a. bei der Entstehung von M. Alzheimer, Arteriosklerose, M. Parkinson, ischämisch-inflammatorischen Erkrankungen und Sonnenbrand (Dermatitis solaris) mit verantwortlich gemacht [Al Omar et al. 2005, Sakurai et al. 2005]. Sie entstehen beispielsweise bei der Zellatmung in den Mitochondrien, bei oxidaseabhängigen Biotransformationsprozessen, bei der Immunabwehr oder nach prolongierter UV-Exposition der Haut. Durch antioxidative Schutzmechanismen werden ihre Bildung reduziert, ihre Halbwertszeiten verkürzt und damit ihre zellschädigenden Wirkungen vermindert. Allerdings kann besonders unter pathophysiologischen Bedingungen die Bildungsrate reaktiver Sauerstoffspezies die Kapazität der antioxidativen Schutzsysteme übersteigen [Förstermann 2003]. Sogenannter „oxidativer Stress“ führt in der Folge zu Zellschäden, -entartungen und -tod. Beispielsweise ist die durch UV-Licht induzierte Hautschädigung mit ihrer intensiven ROS-Bildung wichtigster Risikofaktor für die Entstehung von Hauttumoren [Blum et al. 2002].

Ein therapeutischer Ansatz für eine schnelle Abheilung des Sonnenbrands stellt möglicherweise die Gabe antioxidativer Substanzen dar. LA mit antioxidativen Eigenschaften könnten hier zusätzlich zum analgetischen Effekt einen Beitrag zum beschleunigten Abklingen der Inflammation leisten.

Oe 9000, Fomocain und alle in dieser Arbeit synthetisierten Oe 9000-Derivate sowie die Referenzen Lidocain und Tetracain wurden daher durch die Arbeitsgruppe von Dr. Härtl am HKI Jena auf ihre antioxidativen Eigenschaften in zellfreien *In-vitro*-Modellen untersucht. Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) und Xanthinoxidase (XOD) dienten dabei als ROS-generierende Enzyme. Die Prinzipien beider Tests sind im Methodenteil unter 4.4.3. umrissen.

3.4.3.1. Ergebnisse des XOD-Tests

Nur die Phenole 4-OH-Oe 9000 und 4-OH-Oe 9000-N-oxid minderten (ab 0,05 mM) im XOD-Test die Luminol-vermittelte Chemolumineszenz (CL). Die Wirkung war zu Versuchsbeginn am stärksten ausgeprägt. Erst nach einer lag-Phase nahm die CL signifikant zu. Damit sind 4-OH-Oe 9000 und dessen N-Oxid als schwache ROS-Fänger einzustufen. Alle anderen Oe 9000-Derivate zeigten weder Radikalfängereigenschaften noch einen XOD-inhibitorischen Effekt. Auch bei Lidocain, Tetracain

und Fomocain blieb im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 – 50 µg/ml eine Wirkung aus. Bei den Oe 9000-Derivaten ist offensichtlich die phenolische OH-Gruppe für den Angriff des Radikals am *exo*-Zyklus notwendig.

Da die Radikalfängereigenschaften nur schwach ausgeprägt waren, wurde auf vertiefende Untersuchungen verzichtet.

3.4.3.2. Ergebnisse des HRP-Tests

Im Gegensatz zur Referenzsubstanz N-Acetyl-L-cystein zeigten die Oe 9000-Derivate und alle übrigen getesteten Verbindungen im Konzentrationsbereich von 0,4 – 40 µg/ml keine Verminderung der Lucigenin-vermittelten CL.

3.4.3.3. Diskussion

Die hier aufgeführten Ergebnisse sind im Zusammenhang mit der von Lupp et al. [2003] erbrachten Studie zu betrachten. Darin wies Oe 9000 im Chemolumineszenz-Test in Rattenvollblut ab einer Konzentration von 10^{-5} mol/l einen konzentrationsabhängigen Hemmeffekt auf. Die Hemmung der NADPH-/Fe²⁺-stimulierten Lipidperoxidation erfolgte erst ab Konzentrationen von 10^{-4} mol/l, bei der Luminol-vermittelten Chemolumineszenz in Rattenlebermikrosomen sogar erst ab 10^{-3} mol/l.

Während bei jenen Versuchen die CYP-abhängige und die leukozytäre ROS-Bildung im Vordergrund standen, zielten der XOD-Test und der HRP-Test vorwiegend auf die Radikalfängereigenschaften ab. Im XOD-Test wird die Reaktionsfähigkeit der Testsubstanzen mit H₂O₂ und O₂⁻ geprüft [Wippich 2003], während im HRP-Test zusätzlich Hydroxylradikal-*Scavenger*-Eigenschaften erfasst werden [Chen et al. 1999].

Auf dem deutschen Markt existieren zurzeit nur Benzocain- und Lidocain-haltige Präparate zur Schmerzkupierung bei Sonnenbrand (Anaesthesin[®]-Salbe, Anaesthecomp[®] N-Gel) [Lennecke 2005, Rote Liste 2006]. Die enthaltenen LA zeigen *in vitro* keine (Benzocain) oder nur eine schwache (Lidocain) antioxidative Wirkung, die nicht auf Radikalfängereigenschaften beruht [Guanaydin 2001, Kang et al. 1998, Lenfant 2004] und klinisch nur von untergeordneter Bedeutung ist.

Auch wenn die phenolischen Metaboliten des Oe 9000 im XOD-Test eine CL-Minderung bewirkten, kann kein zusätzlicher Gewinn hinsichtlich antioxidativer Eigenschaften durch eine Oe 9000-Applikation auf die Haut gegenüber Lidocain festgestellt werden, da in der Haut nicht mit einer ausreichenden Bildung dieser Oe 9000-Metaboliten zu rechnen ist. Anders könnte die Situation allerdings für Applikationen aussehen, bei denen Oe 9000 in höheren Konzentrationen zur Resorption gelangt.

3.5. Biophysikalische Untersuchungen

3.5.1. Untersuchung des Wirkmechanismus von Oe 9000

Dass LA Na^+ -Ströme inhibieren, ist bereits seit den 50iger Jahren bekannt [Shanes 1959]. Allerdings wurden erst seit den 1990-iger Jahren einzelne Na_v -Kanal-Isoformen identifiziert, lokalisiert, heterolog exprimiert und biophysikalisch charakterisiert [Elliot und Elliot 1993]. Dabei wurde erkannt, dass die einzelnen Isoformen verschiedenartige Funktionen bei der Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen haben [Gold 1999 a]. Welche Wirkformen und -qualitäten LA an einzelnen Na_v -Kanal-Isoformen entfalten, ist für das Verständnis ihrer Modulierung des Schmerzgeschehens vonnöten und daher Gegenstand aktueller Forschung [Bräu et al. 1998 und 2000, Olschewski 1998, Scholz 1998].

Eine Reihe von klassischen Ester- und Anilid-LA wie Benzocain, Procain, Lidocain, Prilocain, Bupivacain u.a. greifen sowohl an TTX-r als auch an TTX-s Na_v -Kanälen inhibitorisch an. Die Selektivitätsunterschiede zu den verschiedenen Kanaltypen sind für die untersuchten Verbindungen allerdings relativ gering [Scholz 1998].

Da bisher lediglich für Fomocain die Blockade von Ca^{2+} -Kanälen [Zamponi 1996] festgestellt worden war, sonst aber keine Erkenntnisse über den molekularen Wirkmechanismus von Fomocain-Derivaten vorlagen, sollte nun mittels *Patch-Clamp*-Untersuchungen an Hinterwurzelganglienzellen (*dorsal root ganglion cells*, DRG-Zellen) die Wirkungsweise von Oe 9000 an Na_v -Kanälen näher beleuchtet werden. Die Somata der DRG-Zellen sind im Gegensatz zu den freien, sensorischen Nervenendigungen experimentell und klinisch leicht zugänglich [Schmidt und Schaible 2006]. Außerdem sind die physiologischen Eigenschaften der Somata den Eigenschaften ihrer Terminalen ähnlich, weshalb an ihnen die Mechanismen der AP-Generierung und AP-Weiterleitung nozizeptiver Impulse untersucht werden können [Romas 2006].

Da sich Oe 9000 bereits bei der Ratte als potentes Oberflächen- und Leitungsanästhetikum erwiesen hatte [Fleck et al. 2003], konnte ein Angriff an Na_v -Kanälen als wahrscheinlich angesehen werden. Im Vordergrund der Untersuchungen standen die für die Nozizeption bedeutenden TTX-r Na^+ -Ströme.

TTX-r Na^+ -Ströme in DRG-Zellen sind hauptsächlich durch die Öffnung zweier Na_v -Kanaltypen bedingt, dem langsam inaktivierenden $\text{Na}_v1.8$ und dem persistenten $\text{Na}_v1.9$. Beide Kanaltypen werden fast ausschließlich in nozizeptiven Neuronen exprimiert [Romas 2006, Wood et al. 2004]. Während die $\text{Na}_v1.8$ -Kanäle eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des entzündlichen Schmerzes spielen sollen [Akopian et al. 1999, Gold 1999 a, Rush et al. 2004], verursachen die $\text{Na}_v1.9$ eine Depolarisation des Ruhepotentials um 10 bis 15 mV, beeinflussen dadurch die Inaktivierung der TTX-s Na^+ -Kanäle und verstärken Stimuli unterhalb des Schwellenpotentials, was zu einer Erleichterung der AP-Auslösung führt [Black et al. 2003, Herzog et al. 2001, Rush und Waxman 2004].

Die Versuche wurden in einer Kooperation mit dem Institut für Neurophysiologie der medizinischen Fakultät (Leiter: Prof. Dr. H.-G. Schaible) und dem Bereich Biophysik der FSU Jena durchgeführt, wobei Dr. G. Natura die Experimente von Studiosus C. Feller anleitete. In Vorversuchen an unmodifi-

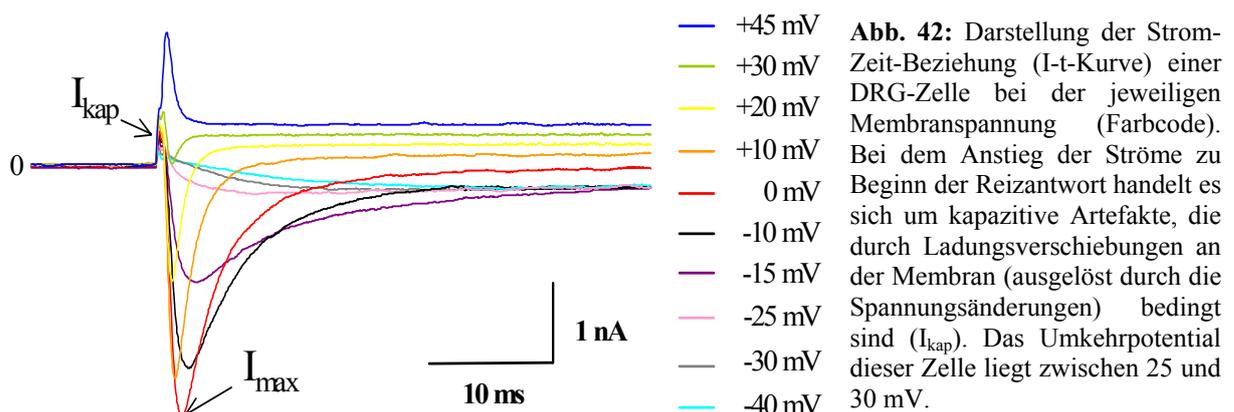
zierten Phospholipid-Modellmembranen (*black lipid membranes, BLM*) wurde für Oe 9000 und Fococain gezeigt, dass sie im Konzentrationsbereich von 1 – 10 $\mu\text{mol/l}$ keine signifikanten Veränderungen des Ohmschen Widerstands der BLM bewirken [Dahse und Sack 2006].

Zur Prüfung der Wirkung von Oe 9000 auf das spannungsabhängige Öffnungs- und Schließverhalten der TTX-r Na_v -Kanäle in kleinen bis mittelgroßen DRG-Neuronen ($\varnothing 18\text{-}35 \mu\text{m}$) wurde die *Patch-Clamp*-Technik im Ganzzellmodus (*whole-cell recording*) angewendet. Bei dieser Technik werden Ströme, die über die gesamte Zellmembran fließen, abgeleitet. Das erhaltene Gesamtstrom-Signal resultierte entsprechend aus der Summe der Einzelkanalströme.

Mit Hilfe eines speziellen Messprotokolls (siehe 4.5.1.3.) konnten TTX-r Na^+ -Ströme an der Zellmembran ausgelöst und unter dem Einfluss von Oe 9000 registriert werden. Vor der Substanzapplikation wurden die Qualität der Abdichtung zwischen Pipette und Zellmembran überprüft (*Seal* mit $> 2 \text{ G}\Omega$), die hervorgerufenen Ströme über 5 min aufgenommen (Kontrollmessungen) und das Erhalten einer stabilen Stromamplitude sichergestellt.

3.5.1.1. TTX-r Na^+ -Ströme einer DRG-Zelle

In Abb. 42 ist die Stromantwort einer DRG-Zelle auf Rechteckspannungen von -40 bis $+45 \text{ mV}$ dargestellt. Unter Versuchsbedingungen betrug das Verhältnis der Na^+ -Konzentrationen $[\text{Na}^+]_{\text{extrazellulär}}/[\text{Na}^+]_{\text{intrazellulär}}$ etwa 2,5. Das Na^+ -Gleichgewichtspotential, das sich aus der Nernst-Gleichung ergab, lag entsprechend bei $+27 \text{ mV}$ und lag in der Nähe des in den Messungen erfassten Umkehrpotentials. Im Spannungsbereich von -40 mV bis zum Umkehrpotential strömten Natriumionen entsprechend ihrem elektrochemischen Gradienten ins Zellinnere. Wurde das Umkehrpotential überschritten, waren hingegen Auswärtsströme zu messen (vgl. Abb. 42: positive Ströme bei $+45 \text{ mV}$).



Aus dem Verlauf der Kurven ließ sich das Öffnungsverhalten der TTX-r Kanäle $\text{Na}_v1.8$ und z.T. $\text{Na}_v1.9$ in Abhängigkeit von der Spannung ableiten. Bei einem Haltepotential von -70 mV lagen nahezu alle $\text{Na}_v1.8$ -Kanäle der Zelle im geschlossenen Zustand vor, während die überwiegende Zahl der $\text{Na}_v1.9$ -Kanäle inaktiviert war und damit bei Auslösung eines depolarisierenden Spannungspulses allenfalls einen sehr kleinen Beitrag zum Gesamtstromsignal leisteten. Sobald das Schwellenpotential

der TTX-r Na_v -Kanäle überschritten wurde (ca. -70 mV für $\text{Na}_v1.9$ [Cummins et al. 1999] und ca. -25 mV für $\text{Na}_v1.8$), öffneten sich die Kanäle, die zuvor im geschlossenen Zustand vorlagen, und es resultierte ein Stromsignal. Bei negativen Spannungen im Bereich von -70 mV bis -30 mV waren keine nennenswerten Na^+ -Nettoströme zu verzeichnen, da der Schwellenwert für $\text{Na}_v1.8$ noch nicht erreicht war. Bei positiveren Spannungswerten stieg die Stromstärke schnell bis zum Maximum an, fiel dann aber aufgrund der Inaktivierung der Na_v -Kanäle wieder ab.

Vor dem Anlegen eines neuen Rechteckpulses wurde das Haltepotential von -70 mV über 2 s lang eingestellt, was die Überführung der inaktiven Kanäle in den geschlossenen Zustand bewirkte (vor allem für $\text{Na}_v1.8$). Nur geschlossene Kanäle waren bereit, auf eine erneute Depolarisation mit Öffnen zu reagieren.

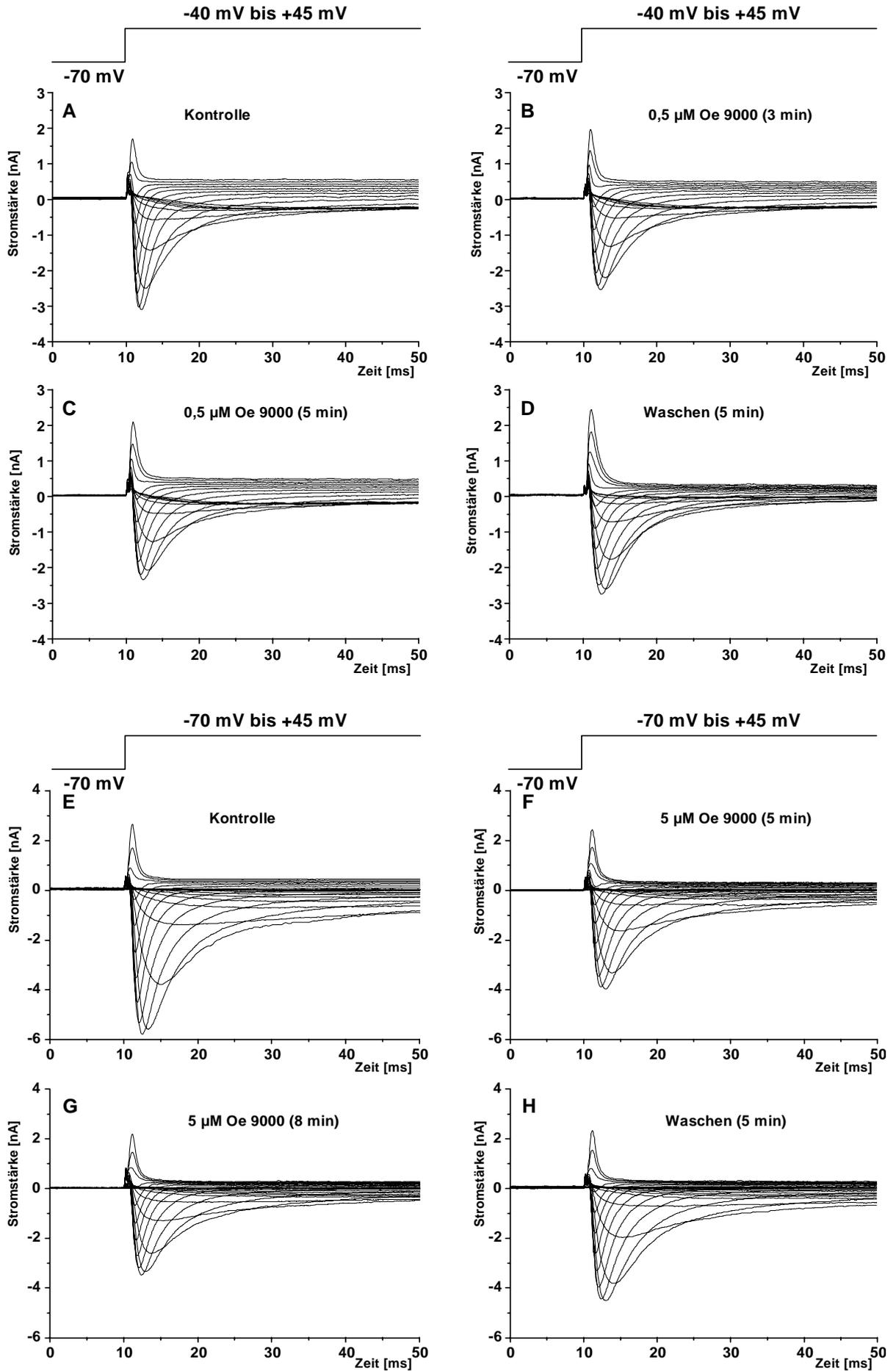
3.5.1.2. Beeinflussung der Na^+ -Ströme durch Oe 9000

Der Einfluss von Oe 9000 auf die TTX-r Na^+ -Ströme in DRG-Zellen wurde im Konzentrationsbereich von $0,5 - 50 \mu\text{M}$ untersucht. Die Applikation des LA erfolgte dabei jeweils extrazellulär durch Austausch der reinen Badlösung durch eine Oe 9000-haltige Badlösung. Wie bei den klassischen LA setzte die Wirkung nach einer Latenzzeit ein, was als Indiz gewertet werden konnte, dass der Wirkstoff erst nach Membranpermeation von intrazellulärer Seite her Zugang zu seiner Bindungsstelle erfuhr. Die deutlichsten Unterschiede in den Strommaxima zwischen Probe und Kontrolle traten im Allgemeinen bei einer angelegten Spannung von -5 mV zu Tage, nachfolgend beschriebene Stromamplituden beziehen sich daher auf diesen Wert.

Bereits ab einer Konzentration von $0,5 \mu\text{mol/l}$ Oe 9000 konnte eine reproduzierbare und eindeutige Reaktion der Neuronen festgestellt werden. In den Teilbildern A-D der Abb. 43 sind entsprechende Stromantworten eines Neurons vor und nach Oe 9000-Applikation und nach 5-minütiger Auswaschphase dargestellt. Die Zeitabhängigkeit der Wirkung wurde schon bei der niedrigsten Konzentration deutlich: während die Spitzenstromamplitude 3 min nach Zugabe des Wirkstoffs um lediglich 16 % abnahm, zeigte sie sich nach 5 min immerhin um 26 % vermindert. Nach anschließender Auswaschung des Lokalanästhetikums stiegen die Stromstärken wieder signifikant an, wenn auch nicht vollständig bis zum Ausgangsniveau (Abb. 43, D).

Abb. 43 (siehe nächste Seite): Effekt von Oe 9000 ($0,5$ bzw. $5 \mu\text{M}$) auf TTX-r Na^+ -Ströme an jeweils einer DRG-Zelle. **A:** stabile Ableitung der Ströme an einer Zelle vor der Oe 9000-Applikation, **B und C:** Oe 9000 ($0,5 \mu\text{M}$) reduziert 3 min (bzw. 5 min) nach Zugabe in die Badlösung die durch eine Spannung von -5 mV ausgelöste Spitzenstromstärke von $-3,1$ nA auf $-2,6$ nA (bzw. auf $-2,3$ nA). **D:** Nach 5-minütigem Auswaschen des Wirkstoffs steigt die Spitzenstromstärke wieder an. **E - H:** Oe 9000 ($5 \mu\text{M}$) reduziert die Spitzenstromstärke 8 min nach Applikation auf 60 % des Ausgangsniveaus. Die Amplituden steigen nach dem Auswaschen wieder an.

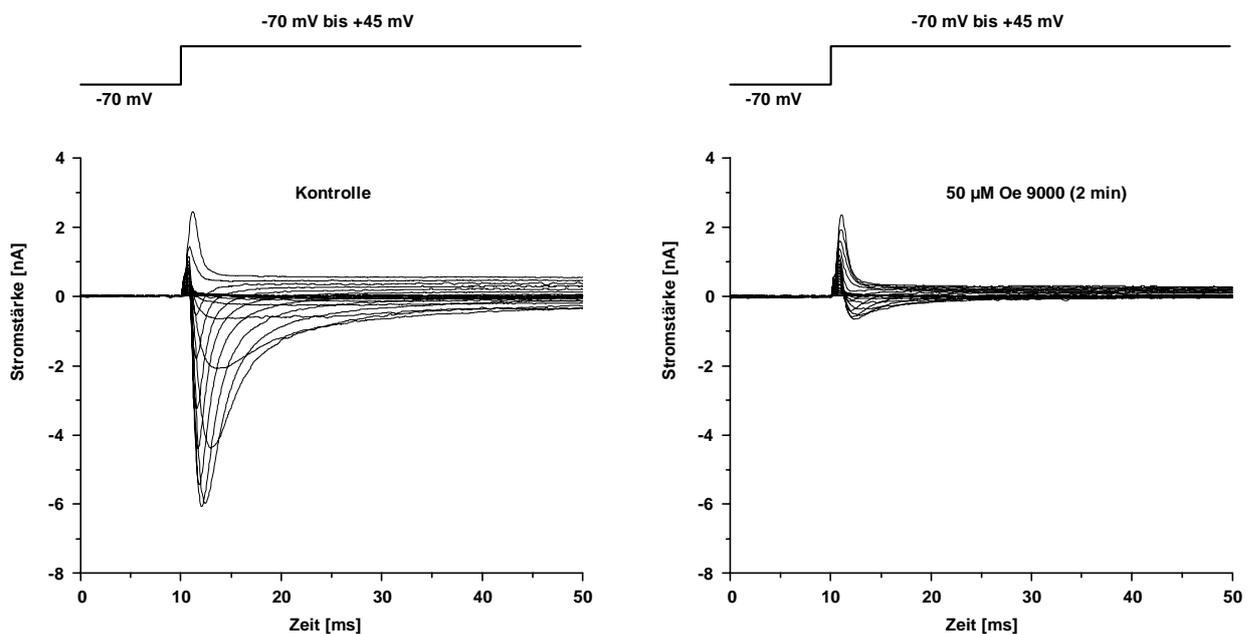
Ströme wurden durch Spannungspulse von -70 mV (bzw. -40 mV) bis $+45$ mV in 5 mV-Schritten verursacht. Das Haltepotential betrug -70 mV, die Pulse wurden im 2 s-Takt wiederholt.



Erwartungsgemäß bewirkte ein Anstieg der Oe 9000-Konzentration ein beschleunigtes und verstärktes Einsetzen der inhibitorischen Wirkung (vgl. Abb. 43, E – F). So wurde die Spitzenstromamplitude nach Applikation einer 5 μM Lösung nach 5 min auf 2/3 des Ausgangsniveaus gesenkt, nach weiteren 3 min sogar auf 60 %. Auch hier erhöhte sich die Amplitude nach Auswaschung der Substanz, was beweist, dass die beobachteten Effekte durch die Na_v -Kanalblockade und nicht durch die parallel einhergehende stetige Abnahme der Stromamplitude (*run down*), die z.B. durch Auswaschen intramolekularer Bestandteile wie ATP oder IP_3 verursacht wird, bedingt sind [Romas 2006]. Konzentrationen von $\geq 10 \mu\text{M}$ Oe 9000-Lösungen führten nach hinreichender Verteilungszeit zur fast vollständigen Blockade der Na^+ -Ströme.

Der durch die Auswaschung des LA bedingte Amplitudenzuwachs der zuvor durch 0,5 – 25 μM Oe 9000 geblockten Ströme war signifikant. Die 5-minütige Auswaschphase reichte hingegen nicht aus, um die Stromstärken wieder ansteigen zu lassen, wenn zuvor 50 μM Lösungen appliziert worden waren (Abb. 44). Neben erhöhtem Zeitbedarf für die Einstellung des Verteilungsgleichgewichts war hierfür auch die Möglichkeit der bei dieser Konzentration einsetzenden Zytotoxizität des Oe 9000 in Betracht gezogen worden. Da aber an verschiedenen Zellen der Erhalt der Vitalfunktionen über mindestens 30 min nach Applikation 50 μM Oe 9000-Lösung nachgewiesen werden konnte, war die bereits nach 1 min beobachtete Reduktion der Stromamplituden der Na_v -Kanalblockade zuzuschreiben. Die Oe 9000-Konzentration, bei der die Stromamplituden halbmaximal reduziert wurden (IC_{50}), lag für den tonischen Block zwischen 5 – 10 $\mu\text{mol/l}$. Für die Bestimmung dieses Wertes wurde die Hemmung der maximalen Ströme (bei 0 bzw. -5 mV , s.u.) 5 min nach Oe 9000-Zugabe zugrunde gelegt.

Abb. 44: Die Applikation von 50 μM Oe 9000 bewirkte innerhalb von 2 min eine praktisch vollständige Inhibition der TTX-r Na^+ -Ströme.



Aus den I-t-Kurven lassen sich Strom-Spannungs-Beziehungen ableiten und damit Erkenntnisse über das Öffnungsverhalten der TTX-r Na_v -Kanäle in Abhängigkeit von der angelegten Spannung gewinnen. Abb. 45 zeigt die aus der Auswertung von 10 DRG-Neuronen resultierenden Stromdichte-Spannungs-Kurven (I-V-Kurven) vor (schwarz) und nach Applikation von $10 \mu\text{M}$ Oe 9000 (rot). Die Stromdichten wurden über die Normierung der gemessenen Stromstärken auf die Größe der Zellen mit Hilfe der Membrankapazitäten erhalten. Bei allen Zellen war die im Folgenden dargestellte Veränderung der Membraneigenschaften durch den Wirkstoff zu beobachten.

Im Spannungsbereich von -70 bis -30 mV waren weder vor noch nach Zugabe des Lokalanästhetikums nennenswerte Ströme zu messen, da die TTX-r Na_v -Kanäle entweder inaktiviert vorlagen ($\text{Na}_v1.9$) oder der Schwellenwert noch nicht erreicht worden war ($\text{Na}_v1.8$). Depolarisierende Spannungen, die für die Kontrollen ab einem Betrag von -25 mV die Öffnung eines Teils der Na_v -

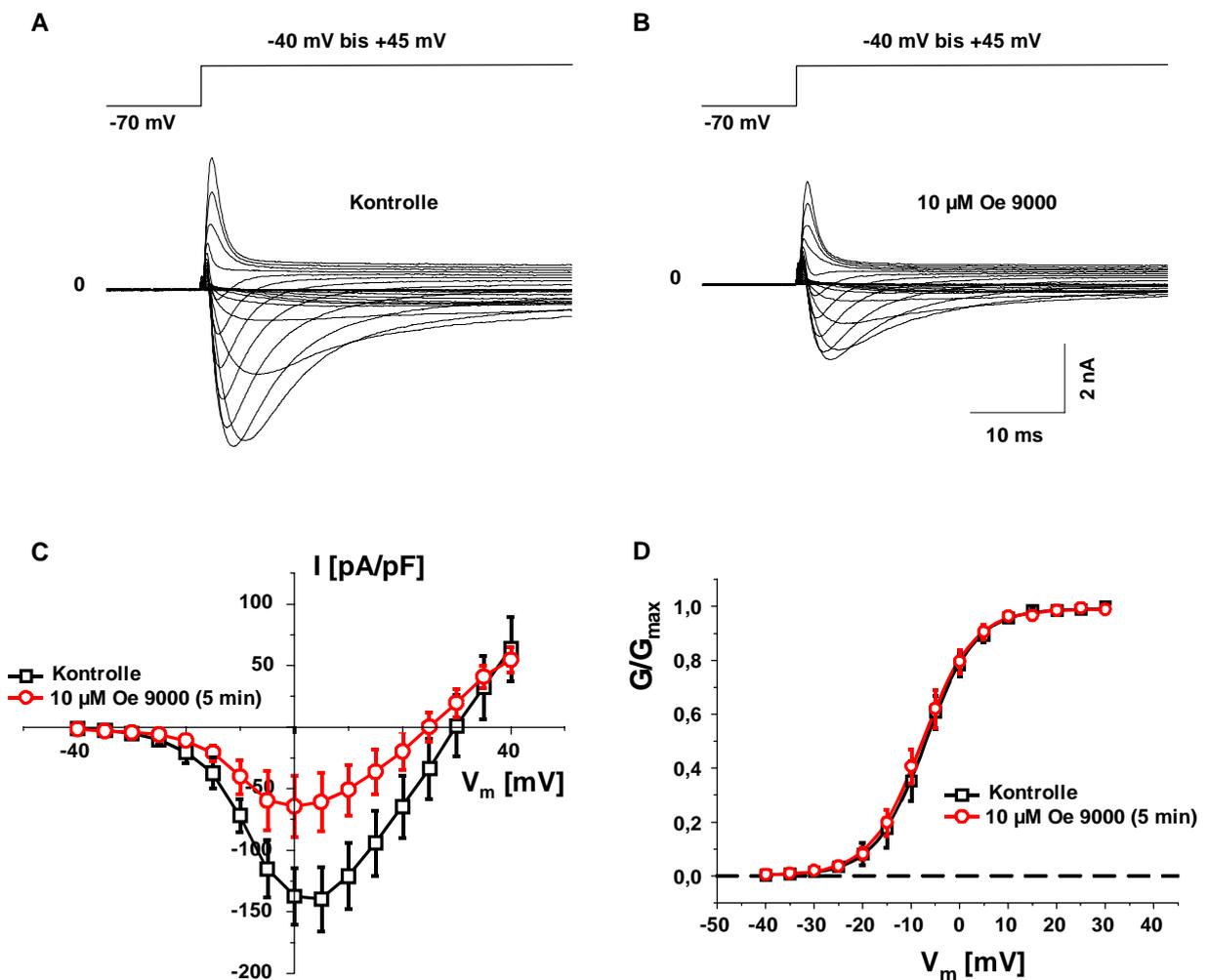


Abb. 45: Der Effekt von $10 \mu\text{M}$ Oe 9000 auf die TTX-r Na^+ -Ströme durch DRG-Zellmembranen (5 min nach Substanzzugabe). Wie in **A** und **B** gezeigt, wurde eine Verminderung der maximalen Spitzenstromamplituden von -136 pA/pF auf -64 pA/pF gemessen. **C:** Aus der Stromdichte-Spannungs-Kurve geht hervor, dass maximale gemittelte Stromdichten bei Spannungen von $+5$ mV (Kontrolle) bzw. 0 mV (Oe 9000) erhalten wurden; Erklärung siehe Text. Die Darstellung der normierten Membranleitfähigkeit (G/G_{max} , in **D**) verdeutlicht, dass Oe 9000 den Anstieg k und die Spannung, die zu halbmaximaler Membranleitfähigkeit führt, unbeeinflusst lässt. Für die Erstellung der Kurven **C** und **D** wurden die I-t-Beziehungen von 10 DRG-Zellen ausgewertet.

Kanäle der Zelle auslösten, führten ebenfalls zu Na_v -Kanalöffnungen bei den Verumproben. Die gemittelten Stromdichten lagen vor der Oe 9000-Zugabe allerdings für alle Na^+ -Einwärtsströme bei höheren Beträgen als danach. So betragen die gemittelten Stromdichten der Amplitudenmaxima (I_{\max}) – $159,5 \pm 21,6$ pA/pF vor und $-93,5 \pm 28,4$ pA/pF nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Oe 9000 ($n = 10$). Das Lokalanästhetikum verursachte eine leichte Verschiebung der Spitzenstromamplitude zu negativeren Potentialen hin (von $+5$ mV auf 0 mV). Die I-V-Kurven lassen außerdem eine Verschiebung des Umkehrpotentials (siehe Schnittpunkt mit der Abszisse) in die gleiche Richtung erkennen. Dieser Effekt konnte – wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung – bei allen Konzentrationsstufen beobachtet werden.

Permeieren neben Na^+ auch andere Ionen (z.B. K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HCO_3^-) durch die Membran, stimmt das Umkehrpotential nicht mehr mit dem Na^+ -Gleichgewichtspotential überein und kann dann nicht mehr mit der Nernst-Gleichung beschrieben werden. Da die Leitfähigkeiten für K^+ und Ca^{2+} hier weitestgehend durch den Einsatz von dazu entsprechenden Kanalinhhibitoren unterdrückt wurden, könnte die Verschiebung des Umkehrpotentials in die hyperpolarisierende Richtung möglicherweise durch die relative Zunahme der Chloridleitfähigkeit oder durch eine Veränderung des Selektivitätsfilters am Na_v -Kanal verursacht sein.

Die Leitfähigkeit G der Membran für Na^+ nimmt mit der Zahl der offenen Na_v -Kanäle zu. Die Gesamtleitfähigkeit der Zellmembran resultiert aus der Offen-Wahrscheinlichkeit der Einzelkanäle und ist damit sowohl von der angelegten Spannung als auch von den Geschwindigkeiten für die Aktivierung und Inaktivierung der Kanäle abhängig. Die Berechnung der Leitfähigkeit ist unter 4.5.1.4. beschrieben. Die Darstellung der normierten Membranleitfähigkeit (G/G_{\max}) in Abhängigkeit von der angelegten Spannung (Abb. 45, in D) gibt entsprechend Aufschluss über den Prozentsatz geöffneter Na_v -Kanäle nach einem depolarisierenden Spannungspuls relativ zur maximalen Anzahl geöffneter Kanäle (G_{\max}).

Für Oe 9000 wurde im Vergleich zur Kontrolle weder eine signifikante Verschiebung der halbmaximalen Spannung für die Aktivierung $V_{0,5}$ (ohne $-7,0 \pm 0,1$ mV; mit $-7,8 \pm 0,32$ mV) noch eine signifikante Verschiebung oder Veränderung des Neigungsfaktors k (ohne $5,2 \pm 0,1$ mV; mit $5,3 \pm 0,1$ mV) festgestellt. Eine Verschiebung der Kurve in die negative Richtung wäre gleichbedeutend mit einer Erhöhung der Membranleitfähigkeit und kann mit einer Verschiebung des Schwellenwerts zu negativeren Membranpotentialen einhergehen, sodass dann mit einer verstärkten neuronalen Aktivität zu rechnen wäre. Ein solcher Effekt wurde beispielsweise für das CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) an Subpopulationen von DRG-Zellen beobachtet und ließ sich durch eine Modulation der Na_v -Kanäle über die Proteinkinasen A oder C erklären [Natura et al. 2005]. Eine Parallelverschiebung der Kurve in die positive Richtung bedeutet entsprechend eine bei positiveren Membranpotentialen einsetzende Öffnung der TTX-r Na_v -Kanäle. Dass die Membranleitfähigkeitskurve des Oe 9000 nicht signi-

fikant von der der Kontrolle abweicht, weist also darauf hin, dass das LA den spannungsabhängigen Öffnungsprozess des Na_v -Kanals unverändert lässt.

3.5.1.3. Verhalten von Oe 9000 an Na_v -Kanälen unter dem Einfluss repetitiver Spannungspulse

Eine charakteristische Eigenschaft fast aller LA ist ihre ausgeprägte *use dependence*, also die Zunahme ihrer inhibitorischen Wirkung bei wiederholter Depolarisation der Membran einer Nervenzelle. Es wurde daher geprüft, ob auch Oe 9000 diesen Effekt zeigt. Das Messprotokoll wurde entsprechend abgeändert (vgl. Abb. 46, Teilbild A oben).

Nach Depolarisation der Membran einer mittelgroßen DRG-Zelle durch eine sprunghafte Spannungsänderung von -70 mV auf -5 mV wurde die Spitzenstromamplitude nach etwa 3 ms erreicht (Abb. 46, A). Folgt weitere 19 Spannungspulse mit einer Frequenz von 0,5 Hz, wurde die Amplitude lediglich um 6,2 % verkleinert, da die Kanäle (überwiegend $\text{Na}_v1.8$) in den Interpulsperioden in den geschlossenen Zustand zurückgekehrt waren.

Die Zugabe von $5 \mu\text{M}$ Oe 9000 senkte die Stromamplitude nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts der Substanz bereits beim ersten depolarisierenden Spannungspuls auf 86 % des Ausgangsniveaus (tonischer Block, vgl. 3.5.1.2.). Folgt hier 19 Spannungspulse mit einer Frequenz von 0,5 Hz, wurde die Spitzenstromamplitude um 27,8 % gesenkt. Die Wirkstärke des Oe 9000 nahm also durch das wiederholte Auslösen von Na^+ -Strömen zu. Diese *use dependence* wurde im gesamten Konzentrationsbereich beobachtet und kam bei höheren Oe 9000-Konzentrationen stärker zum Tragen als bei geringer konzentrierten Lösungen.

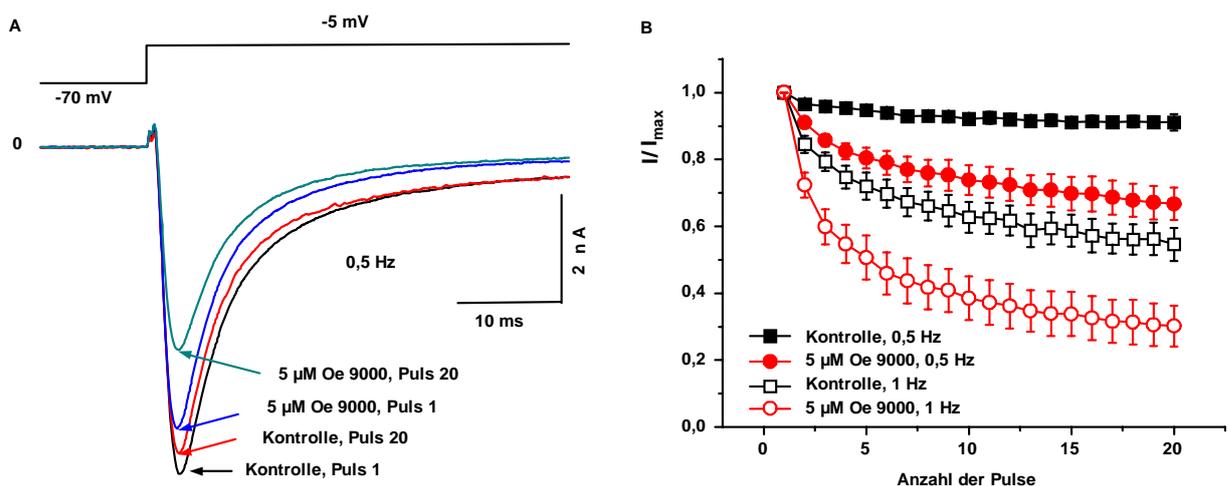


Abb. 46: **A:** I-t-Beziehung für eine DRG-Zelle nach dem Auslösen von einem oder von 20 depolarisierenden Spannungspulsen vor (schwarze und rote Kurve) und nach Oe 9000-Applikation (blaue und grüne Kurve). Die Blockade der Na^+ -Ströme durch das Lokalanästhetikum nahm durch die Erhöhung der Pulszahl deutlich zu. Die Länge der Interpulsperioden betrug jeweils 2 s. **B:** Abhängigkeit der maximalen Stromamplituden von der Zahl und der Frequenz der depolarisierenden Spannungspulse (-5 mV) vor (schwarz) und nach (rot) Zugabe von $5 \mu\text{M}$ Oe 9000. Die Kurven basieren auf der Auswertung von 8 Zellen. Um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen großen Zellen zu gewährleisten, wurden die Spitzenströme auf die beim ersten Spannungspuls ausgelösten Spitzenströme normiert (I/I_{max}).

Die Ursache für den frequenzabhängigen Block ist noch nicht gänzlich geklärt. Üblicherweise wird das Phänomen entweder über eine erhöhte Affinität oder einen verbesserten Zugang des Lokalanästhetikums zum offenen oder inaktivierten Zustand über die *Modulated-Receptor*-Hypothese [Hille et al. 1977] bzw. die *Guarded-Receptor*-Hypothese [Starmer 1984] erklärt.

3.5.1.4. Latenz bis zum Wirkeintritt

Die Geschwindigkeit des Einsetzens der Wirkung nach Applikation eines LA ist klinisch bedeutsam. In der Lokalanästhesie ist in der Regel ein rasches Anfluten der Substanz erwünscht. Die Verteilung ist in erster Linie von Größe, Form, Lipophilie und pK_s -Wert des Lokalanästhetikums sowie vom pH-Wert des umgebenden Milieus abhängig. Begünstigende Faktoren für einen schnellen Wirkeintritt sind wegen bevorzugten Membraneintritts besonders eine hohe Amphiphilie und ein niedriger pK_s -Wert [Courtney und Strichartz 1987, Tetzlaff 2000].

Im *Patch-Clamp*-Versuch war der Wirkeintritt bereits 1 min nach Zugabe der 50 μ M Lösung anhand der Reduktion der Ausgangsstromstärke um 50 % zu beobachten. Vergleichsdaten zu anderen LA liegen nicht vor. Die gute Löslichkeit des Oe 9000 in Wasser- und Lipidphasen sollte dessen Membrandurchtritt erleichtern ($\log P = 3,0$, Wennek-Klose 2005), nachteilig wirkte sich allerdings der hohe pK_s -Wert von 8,37 (bei 25 °C, Wennek-Klose 2005) auf die Permeationsgeschwindigkeit aus, womit zu erwarten ist, dass die Geschwindigkeit des Wirkeintritts des Oe 9000 im Mittelfeld zwischen dem *in vivo* und *in vitro* spät zur Wirkung kommenden Procain ($\log P = 1,9$, $pK_s = 9,1$, Strichartz und Sanchez et al. 1990) und dem schnell permeierenden Etidocain ($\log P = 3,7$, $pK_s = 8,1$, Strichartz und Sanchez et al. 1990) liegt.

3.5.1.5. Zusammenfassung der Wirkung des Oe 9000 an TTX-r Na_v -Kanälen

Oe 9000 zeigte eine potente, konzentrationsabhängige und reversible Hemmwirkung auf die TTX-r Na^+ -Ströme an DRG-Zellen adulter Ratten. Die Spitzenstromamplitude wurde geringfügig in den negativen Bereich verschoben, die Spannungsempfindlichkeit des Öffnungs- und Inaktivierungsprozesses des Na_v -Kanals wurde durch das Lokalanästhetikum nicht signifikant verändert. Wurden die Na_v -Kanäle repetitiv depolarisiert, nahm die inhibitorische Blockadewirkung des Oe 9000 progressiv zu (*use dependence*). Mit seiner IC_{50} von ca. 5 – 10 μ mol/l im tonischen Block ist Oe 9000 (ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV) an TTX-r Na_v -Kanälen in DRG-Zellen der Ratte in die Gruppe der potentesten LA einzuordnen, wie aus dem vorsichtigen Vergleich mit unter ähnlichen Messbedingungen aufgenommenen Literaturdaten hervorgeht: Die IC_{50} -Werte liegen für Bupivacain bei 63 ± 6 μ mol/l für Ropivacain bei 50 ± 6 μ mol/l [Bräu 1998] und für Lidocain bei 128 ± 19 μ mol/l [Bräu 2001]. Trotz einiger struktureller Besonderheiten des Oe 9000 im Molekülbau scheint der Angriff an TTX-r Na_v -Kanäle dem der klassischen LA zu entsprechen.

Diese Untersuchungen werden im Rahmen einer Diplomarbeit fortgeführt. Die ersten Ergebnisse zu dem im gleichen Modell untersuchten Fomocain belegen dessen reversible inhibitorische Wirkung auf

TTX-r Na^+ -Ströme. In seiner Wirkpotenz scheint Fomocain dem Oe 9000 entweder ebenbürtig oder schwach unterlegen zu sein [Baumgart und Natura 2007].

3.5.2. Bestimmung der Oberflächenaktivitäten von Oe 9000, Fomocain und OeDimer

LA, die dem allgemeinen Bauprinzip nach Löfgren entsprechen, haben amphiphile Eigenschaften [vgl. Kapitel 1.]. Diese Amphiphilie ist Grundlage für deren hohe Oberflächenaktivität, die sich bereits bei kleinen LA-Konzentrationen durch eine starke Reduzierung der Oberflächenspannung γ bemerkbar macht. Ein Maß für die Absenkung der Oberflächenspannung durch Substanzzugabe ist der Lateraldruck Π , der als Differenz der Oberflächenspannungen des reinen Lösungsmittels und der substanzhaltigen Lösung definiert ist. Der Lateraldruck wird wie die Oberflächenspannung in N/m angegeben.

3.5.2.1. Ergebnisse

Die Oberflächenaktivitäten von Oe 9000, Fomocain und OeDimer wurden durch Messung der Oberflächenspannung γ untersucht. Tetracain und Lidocain wurden als Referenzen mitgeführt. Um eine Vergleichbarkeit zum Verhalten der Substanzen *in vivo* zu gewährleisten, erfolgten die Untersuchungen in isotonischer Lösung bei physiologischem pH-Wert von 7,4 und im Konzentrationsbereich von 0 – 250 $\mu\text{mol/l}$.

In Abb. 47 ist der Lateraldruck gegen die molaren Konzentrationen der Testsubstanzen aufgetragen. Die Verbindungen zeigten erhebliche Unterschiede in ihren Oberflächenaktivitäten, wie aus den Anstiegen der Kurven ersichtlich wird. Beim Einsatz äquimolarer Konzentrationen der Testsubstanzen

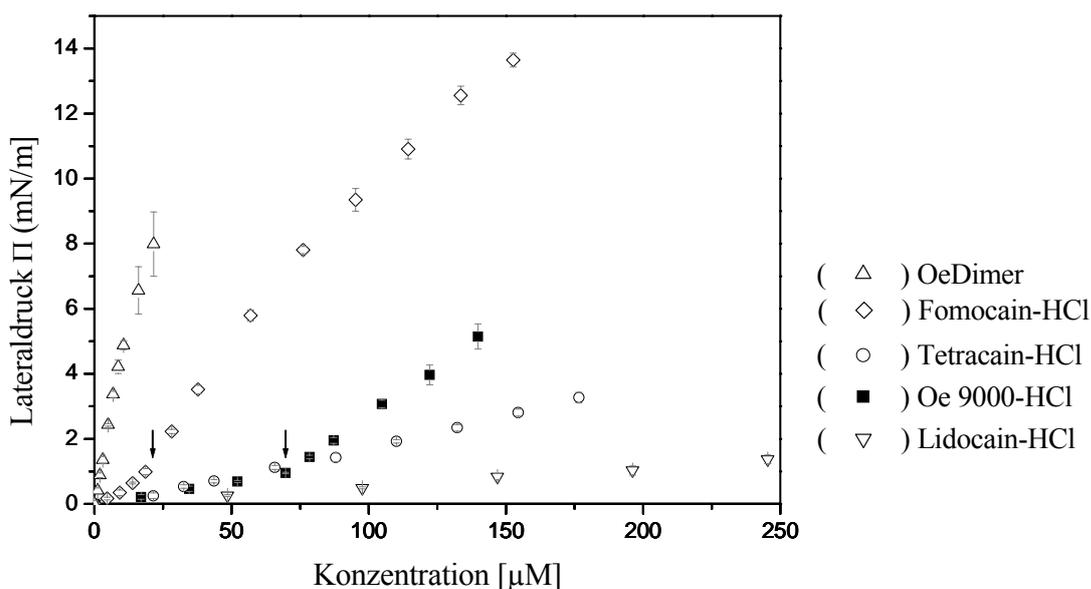


Abb. 47: Bestimmung des Lateraldrucks in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanzen mit der Wilhelmy-Plättchen-Methode. Die geringe Löslichkeit des OeDimer bei pH 7,4 limitierte den untersuchbaren Konzentrationsbereich.

senkte Lidocain die Oberflächenspannung in geringerem Ausmaß als die übrigen LA. Beim Fomocain fiel auf, dass es noch deutlich höhere Lateraldrücke als Oe 9000 bewirkte. Den größten Oberflächeneffekt zeigte jedoch OeDimer. So betragen die Verhältnisse der Anstiege der Lateraldruck-Konzentrations-Kurven (im linearen Bereich) für OeDimer zu Oe 9000 beispielsweise 35:1, und für OeDimer zu Lidocain sogar 87:1. Während Lidocain, Tetracain und OeDimer im untersuchten Konzentrationsbereich eine gleichbleibende oder gering abnehmende Steigung der Kurven zeigten, wiesen Fomocain und Oe 9000 eine sprunghafte Änderung des Anstiegs auf, vergleiche hierzu die Markierungen in Abb. 48. Ein solches Verhalten ist für zahlreiche Tenside beschrieben und ist auf den Phasenübergang vom gasanalogen in den flüssig-expandierten Zustand zurückzuführen [Aratono et al. 1984]. Das Auftreten des Phasenübergangs wurde auch für Tetracain, Dibucain und Bupivacain bei pH 5 – 5,5 im millimolaren Konzentrationsbereich gezeigt, während für Procain, Lidocain und Mepivacain unter gleichen Bedingungen kein derartiges Verhalten zu beobachten war [Matsuki et al. 1994].

3.5.2.2. Diskussion

Die konzentrationsabhängige Änderung der Oberflächenspannung (bzw. des Lateraldrucks) gibt Aufschluss über das Adsorptionsverhalten von Molekülen an einer Grenzfläche zwischen polarem und unpolarem Medium. Die Adsorption entspricht der Überschusskonzentration Γ der gelösten Moleküle in der Oberfläche. Das Verhältnis von Γ zu c verändert sich mit der molaren Konzentration c der Testsubstanz in der Lösung. Um verschiedene Substanzen unabhängig von diesen Änderungen miteinander vergleichen zu können, wird folgende Beziehung als Oberflächenadsorptionsfähigkeit α bei unendlicher Verdünnung definiert [Abe et al. 1988]:

$$\alpha = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\Gamma}{c} \quad (1)$$

Für sehr verdünnte Lösungen im gasanalogen Zustand kann ein 2-dimensionales Gasmodell angewendet werden, dem die Annahme zu Grunde liegt, dass die Moleküle in der Oberfläche interaktionsfrei bleiben. Unter dieser Annahme gilt zwischen dem Lateraldruck Π , der Oberfläche A und der Stoffmenge der Substanz in der Oberfläche n folgende Beziehung [Hiemenz und Rajagopalan 1997]:

$$\Pi \cdot A = n \cdot R \cdot T \quad (2)$$

Die Konstanten bezeichnen die allgemeine Gaskonstante R und die Temperatur T . Durch Einführen der Überschusskonzentration Γ der gelösten Moleküle in der Oberfläche mit

$$\Gamma = \frac{n}{A} \quad (3)$$

ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\Gamma = \frac{\Pi}{RT} \quad (4)$$

Für sehr verdünnte Lösungen wurde gezeigt, dass die Konzentration c linear von der Oberflächenspannung γ bzw. dem Lateraldruck Π abhängig ist [Aratono et al. 1983]. Für die vermessenen Substanzen ergab die lineare Regression zwischen c und Π bei starken Verdünnungen entsprechend eine enge Korrelation, sodass ein gasanaloger Zustand in guter Näherung angenommen werden konnte. Da sich unter diesen Bedingungen Lateraldruck Π und Überschusskonzentration Γ gemäß Gleichung (4) proportional zueinander verhalten, resultierte auch ein linearer Zusammenhang zwischen Γ und c . Der Anstieg der Γ - c -Kurve entspricht der substanzspezifischen Oberflächenadsorptionsfähigkeit α .

Wie in Tab. 15 dargestellt, nehmen sowohl der Verteilungswert $\lg D$ (n-Octanol/Puffer pH 7,4) als auch die Adsorptionsfähigkeit an Oberflächen in der Reihenfolge Lidocain < Oe 9000 < Tetracain < Fomocain < OeDimer zu. Das OeDimer weist mit Abstand die größte Adsorptionsfähigkeit von allen untersuchten Substanzen auf.

Das Verhalten von Tensiden, aber auch von Arzneistoffen wie Tetracyclinen und Erythromycinderivaten in Grenzflächen wurde vielfach in Bezug auf ihre zytotoxischen Eigenschaften diskutiert [Dujovne und Grunt 1975, Rosen et al. 1999, Yasuhara et al. 1979]. Die Oberflächenadsorptionsfähigkeit ist nach Rosen et al. [1999] ein wichtiger Parameter zur Beschreibung zytotoxischer Membraneffekte und könnte eine Erklärung für die unter 3.4.1. beschriebene Zytotoxizität der Oe 9000-Derivate, insbesondere der Verbindung OeDimer sein.

Substanz	pK _s	lgP	lgD (pH7,4)	$\alpha * 10^4$ [kg/m ²]
OeDimer	8.77	4.99	3.60	1907
Fomocain-HCl	7.64	3.86	3.42	196
Tetracain-HCl	8.24	3.49	2.59	72
Oe 9000-HCl	8.77	3.56	2.17	54
Lidocain-HCl	8.53	2.36	1.20	22

Tab. 15: Oberflächenabsorptionsfähigkeit α der untersuchten Verbindungen (berechnet unter Zugrundelegung der Lateraldrücke). $\lg P$ = Verteilungskoeffizient (n-Octanol/Wasser), $\lg D$ = Verteilungswert (n-Octanol/Puffer pH 7,4), berechnet mit dem Programm ACD/ChemSketch 5.11

4. Material und Methoden

4.1. Synthesen

4.1.1. Synthese von Oe 9000 und dessen Hydrochlorid

1-(4-Chlorbutyl)-4-(chlormethyl)benzen, 2

34,0 g (0,20 mol) (4-Chlorbutyl)benzen (**1**), 15,0 g Paraformaldehyd und 9,0 g (0,066 mol) frisch geschmolzenes ZnCl₂ werden 30 min bei 40 °C gerührt. Dann werden unter intensivem Rühren 35 g (0,29 mol) SOCl₂ so zugetropft, dass die Temperatur 50 °C nicht überschreitet. Nach beendeter Zugabe wird noch 2 h bei 50 °C weiter gerührt (DC-Kontrolle, FM 8). Überschüssiges SOCl₂ wird unter Eisbadkühlung mit Wasser zersetzt. Nach dem Abkühlen wird mit CH₂Cl₂ aufgenommen, die org. Phase mit Wasser gewaschen und über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird im Hochvakuum destilliert.

Bei 115 °C und 1,3 Pa gehen 24 g (55 % d. Th.) **2** als schwach gelbes Öl über, das noch ca. 19 % des ortho- sowie 1 % des meta-Isomerenprodukts enthält (GC-MS, Retentionsreihenfolge: 1. ortho, 2. meta, 3. para).

EI-MS: m/z [%] = 216 [23, M⁺], 181 [100], 167 [5], 139 [91], 117 [13], 104 [34], 91 [29], 77 [13].

1-(4-Chlorbutyl)-4-(phenoxymethyl)benzen, 3

In 100 ml frisch destilliertem Aceton werden 6,0 g (0,028 mol) des vorstehenden Isomeregemisches und 2,6 g (0,028 mol) Phenol gelöst und dann 7,7 g (0,056 mol) K₂CO₃ zugefügt. Der Ansatz wird 4 Tage unter Rühren am Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle, FM 8). Nach beendeter Reaktion wird mit Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden zunächst mit 10%iger Na₂CO₃-Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Man trocknet über wasserfreiem Na₂SO₄, filtriert und destilliert das LM am Rotationsverdampfer (RV) ab. Die Aufreinigung des Produkts erfolgt sc über Kieselgel 60 (FM 5, R_fProdukt = 0,8) und durch anschließende dreimalige Umkristallisation bei 0 °C aus Methanol. Ausbeute: 3,5 g **3** (45 % d. Th.). Die farblosen Kristalle, die bei RT zerfließen, sind noch mit 4 % des entsprechenden ortho-Isomers verunreinigt (GC-MS).

EI-MS: m/z [%] = 274 [2, M⁺], 181 [100], 145 [2], 117 [13], 104 [19], 91 [13], 77 [4], 65 [5].

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 7,07-7,38 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,83-6,94 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 4,95 [2H, s, benzyl], 3,42-3,56 [2H, t, J = 6,3, -CH₂Cl], 2,52-2,74 [2H, t, J = 7,0, -Ph-CH₂-CH₂-], 1,60-1,84 [4H, m, -CH₂-CH₂-].

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ [ppm] = 158,9, 141,7, 134,6, 129,5, 128,6, 127,8, 120,9, 114,8, 69,8, 44,9, 34,8, 32,1, 28,5.

2,2'-[4-(4-Phenoxymethylphenyl)butylimino]diethanol, Oe 9000

3,0 g (0,011 mol) **3** werden mit 1,9 g (0,022 mol) LiBr und 0,22 g (0,55 mmol) Methyltrioctylammoniumchlorid versetzt und auf 125 °C erhitzt. Die Umhalogenierung ist bei dieser Temperatur nach 1 h Rühren abgeschlossen. Es folgt die Zugabe von 5,0 g (0,048 mol) Diethanolamin bei 95 °C. Man setzt noch 48 h unter Rühren bei 95-100 °C um (DC-Kontrolle, FM 9). Nach beendeter Reaktion wird mit Wasser aufgenommen, mit K_2CO_3 schwach alkalisch gestellt und viermal mit Dichlormethan extrahiert.

Die vereinten org. Phasen werden über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet und am RV entfernt. Es verbleibt ein kristalliner Rückstand, der nach Umkristallisation aus heißem Methanol 2,80 g Oe 9000 (74,0 % d. Th.) als farblose Kristalle vom Schmp. 52 °C (HPLC-Reinheit > 99,9 %) ergibt.

Die Ausbeute über 3 Stufen, berechnet auf eingesetztes **1**, beträgt 18 % d. Th.

ESI-MS: m/z [%] = 366 [2, (M+Na) $^+$], 344 [100, (M+H) $^+$], 250 [9].

^1H -NMR (CD_3OD): δ [ppm] = 7,15-7,41 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,87-7,07 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,03 [2H, s, benzyll], 3,54-3,70 [4H, t, $J = 5,9$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$], 2,50-2,75 [8H, m, $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ + $\text{N}(\text{CH}_2)_3$], 1,44-1,77 [4H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$].

^{13}C -NMR (CDCl_3): δ [ppm] = 160,3, 143,5, 136,1, 130,5, 129,6, 128,8, 121,9, 115,9, 70,8, 60,7, 57,6, 56,1, 36,5, 30,4, 27,4.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1246, 754, 1030, 1009, 2940, 3382.

Oe 9000-Hydrochlorid

Man löst 1,0 g der erhaltenen Base in Ether und tropft unter Rühren HCl_g in Ether hinzu. Beim Stehenlassen bei 2 °C fällt das Hydrochlorid aus. Der Niederschlag wird aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute: 0,76 g Oe 9000-HCl (70 % d. Th.) vom Schmp. 140 °C.

4.1.2. Synthesen der stickstoffhaltigen Metaboliten

4.1.2.1. 2,2'-[4-(4-Phenoxymethylphenyl)butylimino]diethanol-N-oxid, Oe 9000-N-oxid

Es werden 138 mg (0,383 mmol) Oe 9000 in 2 ml Methanol gelöst und mit dem gleichen Volumen an wässriger Wasserstoffperoxidlösung (30 %) versetzt. Dabei fällt ein Teil der Base wieder aus. Nach 48 h Rühren bei RT (DC-Kontrolle, FM 14, $R_{f_{\text{Produkt}}} = 0,23$) wird das dreifache Volumen Wasser zugesetzt und auf 0 °C gekühlt. Nach Zentrifugation lässt sich der Niederschlag vom Solvens abtrennen und anschließend mit Wasser waschen. Es wird erneut zentrifugiert. Der Niederschlag wird vom Waschwasser befreit und in Ethylacetat gelöst. Die organische Phase wird erst mit wenig

0,1%iger Na₂S₂O₃-Lösung, dann mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und am RV vom Solvens befreit.

Ausbeute: 87 mg Oe 9000-N-oxid (60 % d. Th.), farblose Kristalle vom Schmp. 105 °C.

ESI-MS: m/z [%] = 398 [0,5, (M + K)⁺], 382 [1, (M + Na)⁺], 360 [100, (M + H)⁺], 266 [0,5], 145 [2].

¹H-NMR (CD₃OD): δ [ppm] = 7,00-7,30 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,73-6,91 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 4,92 [2H, s, benzyl], 3,78-4,01 [4H, t, J = 4,7 Hz, -CH₂OH], 3,27-3,58 [6H, m, N(CH₂)₃], 2,46-2,72 [2H, t, J = 7,4 Hz, -Ph-CH₂-CH₂-], 1,43-1,88 [4H, m, -CH₂-CH₂-].

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1245, 761, 3331, 1012, 1077, 2928.

4.1.2.2. 2-[4-(4-Phenoxymethylphenyl)butylamino]ethanol-Hydrochlorid, POMPBAmeEt-HCl

0,5 g (1,8 mmol) **3** in 6 ml frisch destilliertem Dioxan ergeben mit 1,19 g (19,8 mmol) 2-Aminoethanol unter Zusatz von 0,053 g (0,32 mmol) Kaliumiodid nach 72 h Rühren bei 90 °C ein orange gefärbtes Stoffgemisch (DC-Kontrolle, FM 7). Nach Abziehen des Lösungsmittels am RV wird der Rückstand mit Dichlormethan aufgenommen. Man wäscht einmal mit Wasser und befreit die vereinten organischen Extrakte vom Solvens.

Die Anwesenheit des durch Zweifachalkylierung entstandenen tertiären Amins (R_f = 0,95) im Produktgemisch, macht eine sc Aufreinigung notwendig (Kieselgel 60, FM 7). Das Elutionsmittel der Fraktionen wird am RV entfernt. Man nimmt mit Ether auf, wäscht mit Wasser, trocknet über Na₂SO₄, filtriert, engt die Lösung ein, fällt nach Zugabe von Petrolether das Hydrochlorid mit HCl_g in Ether und kristallisiert aus Isopropanol um.

Ausbeute: 0,211 g POMPBAmeEt (35 % d. Th.), farblose Kristalle vom Schmp. 169 – 170 °C.

ESI-MS: m/z [%] = 338 [1, (M + K)⁺], 322 [4, (M + Na)⁺], 300 [100, (M + H)⁺], 282 [1], 206 [38], 145 [13].

¹H-NMR der Base (CDCl₃): δ [ppm] = 7,13-7,41 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,88-7,05 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,01 [2H, s, benzyl], 3,56-3,71 [2H, t, J = 5,1, -CH₂OH], 2,56-2,80 [6H, m, -Ph-CH₂-CH₂- + HN(CH₂)₂], 1,45-1,76 [4H, m, -CH₂-CH₂-].

¹³C-NMR der Base (CDCl₃): δ [ppm] = 158,9, 142,2, 134,5, 129,5, 128,6, 127,7, 120,9, 114,8, 69,8, 60,6, 51,3, 49,4, 35,5, 29,6, 29,1.

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1245, 753, 2867, 2929, 1010, 1497, 2823, 3250, 1597.

Charakterisierung des Nebenprodukts 2-{Bis[4-(4-phenoxymethylphenyl)butylamino]}ethanol, Bis(POMPBA)meEt

ESI-MS: m/z [%] = 560 [1, (M + Na)⁺], 538 [100, (M + H)⁺], 480 [2], 460 [2], 444 [1], 368 [11].

$^1\text{H-NMR}$ der Base (CDCl_3): δ [ppm] = 7,13-7,41 [12H, m, arom.], 6,88-7,05 [6H, m, arom.], 5,02 [4H, s, benzyl], 3,65-3,75 [2H, t, $J = 5,0$ $-\text{CH}_2\text{OH}$], 2,54-2,84 [10H, m, $-\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2-$ + $\text{HN}(\text{CH}_2)_2$], 1,49-1,76 [8H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$].

$^{13}\text{C-NMR}$ der Base (CDCl_3): δ [ppm] = 158,8, 141,6, 134,6, 129,5, 128,6, 127,8, 120,9, 114,8, 69,8, 57,6, 56,2, 53,7, 35,2, 28,8, 25,2.

IR (des Hydrochlorids, KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1245, 762, 2867, 2929, 1014, 1489, 1597, 2937, 1032, 693, 3295

4.1.2.3. Natrium-*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-[4-(4-phenoxyethylphenyl)butyl]glycinat, Oe 9000-

Säure, Na-Salz

0,11 g (0,79 mmol) Bromessigsäure werden in 0,8 ml Methanol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Man tropft vorsichtig 0,71 ml einer eisgekühlten methanolischen KOH-Lösung (63 mg/ml) bei 0 °C hinzu. Es fällt das Kalium-Salz aus, was durch Zugabe von wenigen ml MeOH wieder in Lösung gebracht wird. Man tropft diese Lösung bei 0 °C in eine gerührte Suspension aus 0,10 g (0,35 mmol) POMPBAmeEt, 0,11 g (0,79 mmol) Kaliumcarbonat und 2 ml MeOH. Es wird über 15 min bei dieser Temperatur gerührt, anschließend erwärmt man auf 60 °C für 16 h. Die Synthesekontrolle wird hplc vorgenommen (HPLC-System 1, $t_{\text{Produkt}} \sim 23$ min, $t_{\text{Edukt}} \sim 25$ min). Am RV wird die Hälfte des Lösungsmittels entfernt. Durch Zugabe eines Ether-AN-Gemisches (60/40, V/V) fallen die anorganischen Bestandteile und das Kalium-bromacetat aus. Man zentrifugiert und trennt vom Niederschlag ab. Der Überstand wird vom LM befreit. Nach dem Aufnehmen des Produkts in 1 mM NaOH-Lösung wird durch Zugabe eines MeOH-Isopropanol-Ether-Gemischs die Substanz präzipitiert.

Ausbeute: 72 % d. Th. Oe 9000-Säure, Natriumsalz, weiße Kristalle, hplc-Reinheit 83 %.

ESI-MS (der Säure, neg. Modus): m/z [%] = 356 [100, $(\text{M} - \text{H})^-$], 255 [18].

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ [ppm] = 7,16-7,41 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,87-7,08 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,02 [2H, s, benzyl], 4,25-3,88 [2H, d, $J = 66$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-COO}^-$], 3,54-3,59 [2H, t, $J = 5,5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$], 2,48-2,74 [6H, m, $-\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2-$ + $\text{RN}(\text{CH}_2)_2$], 1,44-1,77 [4H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ [ppm] = 180,0, 160,3, 143,5, 136,1, 130,5, 129,6, 128,8, 121,9, 115,9, 71,0, 60,7, 59,9, 59,0, 58,0 36,4, 30,5, 27,1.

IR (des Natriumsalzes) [cm^{-1}] = 1598, 1407, 2932, 1246, 1497, 1334, 1010, 755

4.1.2.4. 4-OH-Oe 9000

4-[4-(4-Chlorbutyl)benzyloxy]phenyl-benzoat, **4**

In 80 ml frisch destilliertem Aceton werden 5,2 g (0,025 mol) des Isomerengemisches (**2**, **2a**, **2b**) gelöst, 5,4 g (0,025 mol) 4-Hydroxyphenyl-benzoat suspendiert und dann 4,0 g (0,029 mol) K_2CO_3 zugefügt. Der Ansatz wird 4 Tage unter Rühren am Rückfluss unter Stickstoff erhitzt (DC-Kontrolle, FM 1). Nach beendeter Reaktion wird mit 50 ml 0,2 M-HCl-Lösung aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden zunächst mit 10%iger $NaHCO_3$ -Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Man trocknet über Na_2SO_4 , filtriert und destilliert das LM am RV bei 40 °C ab. Die Aufreinigung des Produkts erfolgt sc über Kieselgel 60 (FM 3, $Rf_{Produkt} = 0,75$) und durch anschließende zweimalige Umkristallisation bei 0 °C aus einer Methanol-Aceton-Mischung (50 + 50, V/V). Ausbeute: 3,2 g **4** (32 % d. Th.), farblose Kristalle. Sie sind noch mit 5 % des ortho- und 1 % des meta-Isomers verunreinigt (GC-MS).

EI-MS: m/z [%] = 394 [2, M^+], 181 [100], 145 [4], 117 [7], 105 [44], 91 [16], 77 [25], 51 [4].

1H -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] = 8,08-8,14 [2H, d, arom. H-2, H-6], 7,50-7,59 [1H, t, arom. H-4], 7,38-7,46 [2H, d, arom. H-3, H-5], 7,26-7,31 [2H, d, $J = 8,0$ Hz, arom. H-2'', H-6''], 7,10-7,16 [2H, d, $J = 8,0$ Hz, arom. H-3'', H-5''], 7,03-7,08 [2H, d, $J = 9,1$ Hz, arom. H-2', H-6'], 6,92-6,95 [2H, d, $J = 9,1$ Hz, H-3', H-5'], 4,89 [2H, s, benzyl], 3,42-3,52 [2H, t, $J = 6,3$, $-CH_2-Cl$], 2,54-2,62 [2H, t, $J = 7,5$, $-Ph-CH_2-CH_2-$], 1,63-1,84 [4H, m, $-CH_2-CH_2-$].

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] = 165,5, 156,6, 144,6, 141,8, 134,4, 133,5, 130,2, 129,7, 128,6, 127,8, 122,5, 115,5, 70,4, 44,9, 34,8, 32,1, 28,5.

2,2'-(4-[4-(4-Hydroxy-phenoxy)methyl]phenyl)butylimino}diethanol, 4-OH-Oe 9000

Die Umsetzung von 1,0 g (2,53 mmol) **4** in 7,5 ml absolutem Dioxan mit dem vierfachen Überschuss Diethanolamin (1,33 g entsprechend 12,7 mmol) ergibt nach fünftägiger Umsetzung unter Rühren bei 95-101 °C ein Gemisch, welches neben dem angestrebten Produkt auch das entsprechende N-Oxid enthält. Der Reaktionsverlauf lässt sich dc (FM 12, Detektion: UV, Dragendorffs Reagenz bzw. Bromcresolgrün; $Rf_{Produkt} = 0,84$, $Rf_{4-OH-Oe\ 9000-N-oxid} = 0,55$) verfolgen. Nach beendeter Reaktion wird das LM am RV entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Der pH-Wert 9 wird mit 5%iger NaOH-Lösung eingestellt. Anschließend erfolgen die Extraktion mit Ether sowie das Waschen der vereinten Etherphasen mit Wasser. Durch SC (Kieselgel 60, FM 12) kann das Produkt von seinem N-Oxid und nicht umgesetztem Edukt getrennt werden. Die Eluate werden einrotiert. Die in Ether aufgenommene Base wird durch Zugabe von wenig Toluol ausgefällt und anschließend im Vakuum unter Stickstoff getrocknet. Das als Nebenprodukt (wahrscheinlich durch Luftoxidation unter Dioxanbeteiligung) entstandene N-Oxid wird aus heißem Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 125 mg (13,7 % d. Th.) 4-OH-Oe 9000, beigefarbene Kristalle vom Schmp. 192 – 193 °C sowie 200 mg (21,0 % d. Th.) farblose Kristalle des N-Oxids vom Schmp. 150 °C.

ESI-MS: m/z [%] = 398 [0,5, $(M + K)^+$], 382 [2, $(M + Na)^+$], 360 [100, $(M + H)^+$], 250 [3].

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 7,29-7,37 [2H, d, J = 7,9 Hz, arom. H-2', H-6'], 7,14-7,17 [2H, d, J = 7,9 Hz, arom. H-3', H-5'], 6,80-6,83 [2H, d, J = 8,9 Hz, arom. H-3, H-5], 6,67-6,82 [2H, d, J = 8,9 Hz, arom., H-2, H-6] 4,94 [2H, s, benzyl], 3,55-3,68 [4H, t, J = 4,0 Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$], 2,55-2,71 [8H, m, $-\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{- + HN}(\text{CH}_2)_3$], 1,47-1,77 [4H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 150,7, 149,6, 140,4, 133,5, 126,6, 125,8, 114,2, 114,0, 68,9, 57,6, 54,6, 53,1, 33,5, 27,3, 24,4.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1511, 1234, 1046, 3227, 2941.

4.1.2.5. 2,2'-{4-[4-(4-Hydroxy-phenoxy)methyl]phenyl}butylimino}diethanol-N-oxid,

4-OH-Oe 9000-N-oxid

Es werden 40 mg (0,111 mmol) 4-OH-Oe 9000 in 1 ml Methanol gelöst und mit 1 ml Wasserstoffperoxidlösung (30 %) versetzt. Der Verlauf wird dc mit FM 12 als Elutionsmittel kontrolliert. Nach 24 h Umsetzung wird durch weitere Zugabe von Methanol und Kühlung auf 0 °C das N-Oxid gefällt. Die Umkristallisation des Produkts aus heißem Methanol ergibt farblose Kristalle vom Schmp. 150 °C. Ausbeute: 37 mg 4-OH-Oe 9000-N-oxid (88 % d. Th.).

ESI-MS: m/z [%] = 414 [0,5, (M + K)⁺], 398 [1, (M + Na)⁺], 376 [100, (M + H)⁺], 360 [3], 267 [0,5], 250 [1], 145 [1], 122 [1].

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ [ppm] = 7,25-7,33 [2H, d, J = 7,9 Hz, arom. H-2', H-6'], 7,16-7,21 [2H, d, J = 7,9 Hz, arom. H-3', H-5'], 6,81-6,85 [2H, d, J = 8,9 Hz, arom. H-3, H-5], 6,67-6,82 [2H, d, J = 8,9 Hz, arom. H-2, H-6], 4,94 [2H, s, benzyl], 3,78-4,03 [4H, t, J = 5,9 Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$], 3,31-3,54 [6H, m, $\text{N}(\text{CH}_2)_3$], 2,45-2,72 [2H, t, J = 7,7 Hz, $-\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$], 1,62-1,91 [4H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 150,9, 149,8, 139,9, 134,0, 126,7, 125,9, 114,5, 114,1, 69,2, 65,5, 54,6, 33,3, 26,7, 21,0.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1234, 1510, 1003, 828, 2926, 1077.

4.1.3. Synthesen der stickstofffreien Referenzsubstanzen POMPuOH, POMPBA, POMPBAld und POMPEs

4.1.3.1. 4-(4-Phenoxy)methylphenyl)butanol, POMPuOH

400 mg (1,46 mmol) **3** ergeben bei der Umsetzung mit 198 mg (2,91 mmol) Natriumformiat unter Zusatz von 24 mg (0,073 mmol) Tetrabutylammoniumbromid bei einer Temperatur von 125 °C den entsprechenden Ameisensäureester. Nach 4 h ist die Veresterung beendet (DC-Kontrolle, FM 6).

Die Hydrolyse zu POMPuOH wird mit 4 ml wässriger NaOH (20 mg/ml) über 16 h bei 30 °C durchgeführt. Dabei fällt das Produkt feinkristallin aus. Die Umkristallisation aus heißem Wasser und

anschließende Trocknung über P_4O_{10} ergibt DC-reine gelbliche Plättchen, die bei 52,5 – 53,5 °C schmelzen. Ausbeute: 336 mg POMPBuOH (90 % d. Th.).

EI-MS: m/z [%] = 256 [2, M^+], 163 [100], 145 [19], 130 [7], 117 [46], 104 [20], 91 [15].

1H -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] = 7,18-7,47 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,93-7,12 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,07 [2H, s, benzy], 3,62-3,77 [2H, t, $J = 6,5$ Hz, $-CH_2OH$], 2,63-2,78 [2H, t, $J = 7,3$ Hz, $-Ph-CH_2-CH_2-$], 1,57-1,87 [4H, m, $-CH_2-CH_2-$].

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] = 158,9, 142,2, 135,5, 129,5, 128,7, 127,7, 120,9, 114,9, 69,9, 62,8, 35,4, 32,3, 27,5.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1248, 747, 2928, 2914, 1496, 2857, 1010.

4.1.3.2. POMPBA

4-(4-Phenoxymethylphenyl)butyronitril, POMPBuNi

1,30 g (4,3 mmol) 1-(3-Brompropyl)-4-(phenoxymethyl)benzen, 347 mg (5,3 mmol) KCN und 1 ml Triethylenglycol werden in einem Rundkolben auf 130 °C erhitzt und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle, FM 5) wird in Wasser gegossen und erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und vom Solvens befreit.

Die Umkristallisation des Rückstands aus einer heißen Wasser-AN-Mischung (10 + 1, V/V) und die anschließende Trocknung über P_4O_{10} ergeben farblose Kristalle vom Schmp. 86 °C. Ausbeute: 88,3 % d. Th., Rohausbeute 98,9 % d. Th.

ESI-MS (negativer Modus): m/z [%] = 269 [75, (M-H) $^-$], 212 [24], 197 [30], 175 [100, (M-Phenol) $^-$], 131 [29], 123 [62].

1H -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] = 7,07-7,38 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,81-6,99 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 4,96 [2H, s, benzy], 2,64-2,80 [2H, t, $J = 7,5$ Hz, $-Ph-CH_2-CH_2-$], 2,17-2,31 [2H, t, $J = 7,3$ Hz, $-CH_2-CN$], 1,80-2,00 [2H, quint, $J = 7,3$ Hz, $-Ph-CH_2-CH_2-$].

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ [ppm] = 158,8, 139,5, 135,4, 129,5, 128,7, 128,0, 121,0, 119,5, 114,8, 69,7, 34,1, 26,9, 16,4.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1247, 1237, 753, 1015, 1599, 1499, 1031, ... , 2240 ($-C\equiv N$).

4-(4-Phenoxymethylphenyl)buttersäure, POMPBA

50 mg (0,199 mmol) POMPBuNi werden mit 0,5 ml (3,1 mmol) 25%iger NaOH und 1 ml Triethylenglycol vorsichtig auf 130 °C erhitzt. Beim Erreichen der Temperatur wird der Rückflusskühler aufgesetzt, und man rührt weitere 13 h bei gleicher Temperatur. Nach dem Abkühlen erfolgt die Aufarbeitung durch Zugabe des fünffachen Volumens Wasser und Fällung des Produkts durch Zutropfen 15%iger Salzsäure. Nach Zentrifugation lässt sich der Niederschlag vom Solvens

abtrennen und anschließend mit Wasser waschen. Der Niederschlag wird in Ether aufgenommen, die etherische Phase erneut mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und vom Solvens befreit.

Ausbeute: 44 mg POMPBA (80 % d. Th.), farblose Kristalle vom Schmp. 120 °C.

EI-MS (nach Trimethylsilylierung mit BSTFA): 342 [1, M⁺], 327 [0,5, (M-CH₃)⁺], 309 [2], 249 [47], 181 [10], 159 [8], 117 [100, [(CH₃)₃Si-O-C=O]⁺], 104 [8], 75 [12]

¹H-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 7,08-7,32 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,82-6,94 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 4,95 [2H, s, benzyl], 2,54-2,67 [2H, t, *J* = 7,6 Hz, -Ph-CH₂-CH₂-], 2,24-2,36 [2H, t, *J* = 7,3 Hz, -CH₂-COOH], 1,81-1,97 [2H, quint, *J* = 7,5 Hz, -Ph-CH₂-CH₂-].

¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 179,5, 158,8, 141,1, 134,8, 129,5, 128,7, 127,7, 120,9, 114,8, 69,8, 34,7, 33,2, 26,2.

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1247, 1702 (>C=O), 1172, 1261, 2930, 748, ... , 3287 (-OH).

4.1.3.3. 4-(4-Phenoxymethylphenyl)butanal, POMPBAld

Zu einer gerührten Lösung von POMPBU_{Ni} (44,6 mg; 0,18 mmol) in 1,3 ml Dichlormethan wird bei –73 °C innerhalb von 3 min tropfenweise DIBALH (0,35 ml; 0,25 mmol) hinzugefügt. Nach weiteren 7 min wird die Reaktion durch vorsichtige Zugabe gesättigter NH₄Cl-Lösung (0,5 ml) gestoppt. Der Ansatz wird auf RT gebracht. Nach Zugabe von 5 Tropfen 10%iger Salzsäure wird 5 min gerührt und dann mit Ether extrahiert. Die Etherphase wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, mit wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet, eingengt und das Produkt durch Zugabe von Petrolether präzipitiert.

Ausbeute: 45 mg POMPBAld (96 % d. Th.), farbloser amorpher Feststoff, der sich beim Stehenlassen an der Luft gelblich färbt und beim Erwärmen unter Zersetzung schmilzt.

EI-MS: m/z [%] = 254 [2, M⁺], 161 [45], 117 [100], 104 [8], 91 [7], 77 [54].

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9,80 [1H, s, -CHO], 7,10-7,42 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,85-7,06 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,05 [2H, s, benzyl], 2,55-2,80 [2H, t, *J* = 7,5 Hz, -Ph-CH₂-CH₂-], 2,40-2,52 [2H, t, *J* = 7,5 Hz, -CH₂-CHO], 1,85-2,20 [2H, t, *J* = 7,5 Hz, -CH₂-CH₂-CHO].

¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 202,3, 158,8, 141,0, 134,9, 129,5, 128,7, 127,8, 120,9, 114,8, 69,8, 43,1, 34,7, 23,6.

4.1.3.4. [4-(Phenoxymethyl)phenyl]essigsäure, POMPEs

Die Reaktion wird wegen der Oxidationsempfindlichkeit von Natriumphenolat unter Inertbegasung (N₂) durchgeführt:

Zu 0,495 g (2,16 mmol) der in 20 ml Aceton weitestgehend in Lösung gebrachten 4-(Brommethyl)-phenylessigsäure werden bei 56 °C zu 0,456 g (3,92 mmol) in Aceton suspendiertem Natriumphenolat

über 45 min lang zugetropft. Es werden 0,304 g (2,2 mmol) Kaliumcarbonat und 0,22 mmol TBAB zugefügt. Man lässt 72 h lang unter Rückfluss sieden (DC-Kontrolle, FM 10, Detektion mit Millons Reagenz) und füllt aus dem Ansatz entwichenes Aceton in regelmäßigen Abständen wieder auf, sodass dessen Volumen stets zwischen 10 und 50 ml liegt. Das Hydrogencarbonat wird mit 5%iger Essigsäure entfernt und die Lösung anschließend mit verdünnter Natronlauge auf pH 8 gestellt. Die wässrige Phase wird durch einmaliges Schütteln mit Dichlormethan von Phenol befreit. Beim Ansäuern mit verd. HCl fällt das Produkt kristallin aus. Nach dem Filtrieren werden die schwach rosa gefärbten Kristalle mit verd. HCl gewaschen, in heißem Wasser unter Ammoniakzugabe gelöst und durch Ansäuern erneut zur Kristallisation gebracht.

Die Substanz wird in Ether aufgenommen, die etherische Phase über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und vom Solvens befreit.

Ausbeute: 519 mg POMPEs (99 % d. Th.), farblose Kristalle vom Schmp. 122 °C (vgl. Czasch 1976: Schmp. 111-112 °C).

EI (nach Trimethylsilylierung mit BSTFA): 314 [2, M⁺], 299 [5, (M-CH₃)⁺], 221 [43], 177 [23], 131 [10], 117 [3], 104 [17], 73 [100].

¹H-NMR (d₆-DMSO): δ [ppm] = 7,20-7,39 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,84-6,98 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 5,05 [2H, s, benzyl], 3,56 [2H, s, -Ph-CH₂-COOH].

¹³C-NMR (CDCl₃): δ [ppm] = 172,6, 158,3, 135,4, 134,5, 129,4, 129,3, 127,6, 120,6, 114,7, 68,8, 38,4.

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1731 (>C=O), 1134, 1233, 1260, 1510, ... , 783, ... , 2965, 3429 (-OH).

4.1.4. Synthesen der postulierten Metaboliten POMPBA_m und BHABBA

Die im Folgenden aufgeführten Vorschriften für die Friedel-Crafts-Acylierung, Haloformreaktion, nukleophile Substitution und Veresterung basieren auf Vorschriften für die homologen Verbindungen mit Propylen-Zwischenkette nach Sgoff [Sgoff 1975] und Seeling [Seeling 1994].

4.1.4.1. 4-(4-Phenoxymethylphenyl)butylamin-Hydrochlorid, POMPBA_m-HCl

Zu 0,130 g LiAlH₄ (3,4 mmol) in 20 ml abs. Ether werden 0,43 g (1,7 mmol) des in Ether teils gelösten, teils suspendierten POMPBA_n zugetropft, sodass das LM gelinde siedet. Danach erhitzt man noch 3 h unter Rückfluss. Nach beendeter Umsetzung zum Imin wird mit Eis gekühlt und vorsichtig mit 1 ml Eiswasser hydrolysiert, der Niederschlag abgesaugt und noch zweimal mit Ether gewaschen. Anschließend trocknet man über wasserfreiem Na₂SO₄ und zieht das LM am RV ab. Das gelbliche Rohprodukt erstarrt im Kühlschrank.

Die Fällung des Hydrochlorids erfolgt durch das Zutropfen von HCl_g in Ether, nachdem die Substanz in Ether gelöst wurde und einige Tropfen Petrolether hinzugefügt wurden.

Ausbeute: 0,34 g (78 % d. Th.) POMPBAm-HCl, farblose DC- und GC-MS-reine Kristalle vom Schmp. 206-207 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (Base, CDCl_3): δ [ppm] = 7,10-7,30 [6H, m, arom. H-2', H-3', H-5', H-6' + H-3, H-5], 6,87-6,92 [3H, m, arom. H-2, H-4, H-6], 4,95 [2H, s, benzyl], 2,50-2,66 [4H, m, -Ph- CH_2 - CH_2 - + $\text{H}_2\text{N-CH}_2$ -], 1,20-1,67 [4H, m, - CH_2 - CH_2 -].

$^{13}\text{C-NMR}$ (Base, CDCl_3): δ [ppm] = 158,9, 142,4, 134,4, 129,5, 128,6, 127,7, 120,9, 114,8, 69,8, 42,1, 35,5, 33,5, 28,7.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1247, 1597, 1585, 1496, 748, 2928, 2857, 1030, 1009, ... , 3340

Elektrospray-Ionisation (ESI)-MS: m/z [%] = 278 [2, (M+Na) $^+$], 294 [4, (M+K) $^+$], 256 [33], 145 [100]

4.1.4.2. BHABBA

1-[4-(4-Brombutyl)phenyl]ethanon, 8

5,00 g (23,4 mmol) **7** werden in eine auf 0 °C temperierte Suspension aus 3,77 g (0,028 mol) wasserfreiem AlCl_3 , 5,55 g (0,071 mol) Acetylchlorid und 20 ml Schwefelkohlenstoff unter Rühren getropft. Orangefärbung zeigt die Bildung des Aluminium-Komplexes an. Man rührt noch 90 min lang bei 0 - 2 °C und gießt anschließend auf eine Mischung aus Eis und konz. Salzsäure. Nach dreimaliger Extraktion mit Dichlormethan, zweifachem Waschen der vereinten organischen Phasen mit Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 , Filtration und Abziehen des LM am RV werden 6,4 g eines schwach gelben Rohprodukts erhalten, welches noch durch 3,3 % des ortho-Derivats sowie ein nicht näher charakterisiertes Nebenprodukt (ca. 12 %) verunreinigt ist.

Zur spektroskopischen Beschreibung des Ketons werden 900 mg des Rohproduktes sc gereinigt (Kieselgel 60, Säulenbeladung 1,25 %, FM 2). Die restlichen 5,5 g werden ohne weitere Aufreinigung im folgenden Syntheseschritt verwendet.

Bei der Reinsubstanz handelt es sich um eine farblose, leichtfließende Flüssigkeit.

Ausbeute (Rohprodukt): 107 % (d. Th., GC-Reinheit: 84 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 7,83-7,85 und 7,17-7,22 [4H, AB-System, arom.], 3,32-3,40 [2H, t, - CH_2Br], 2,57-2,67 [2H, t, Ph- CH_2 -], 2,52 [3H, s, CH_3 -CO-], 1,68-1,86 [4H, m, - CH_2 - CH_2 -].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 197,9, 147,6, 135,2, 128,2, 128,6, 35,0, 33,5, 32,1, 29,5, 26,6.

4-(4-Brombutyl)benzoesäure, 9

5,5 g (18,0 mmol) **8** werden bei 0 °C in 83 ml einer gerührten Lösung von 7,1 g Natriumhydroxid (0,177 mol) und 10,1 g (0,126 mol) Brom in Wasser/Dioxan (6/5, V/V) über 20 min getropft. Nach weiteren 2 h ist die Reaktion beendet. Die Suspension wird zweimal mit Ether ausgezogen. Aus der wässrigen Phase fällt durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure das Reaktionsprodukt aus. Man

filtriert und wäscht mit Wasser. Die Umkristallisation des Produkts aus einer Toluol-Petrolether-Mischung ergibt farblose Kristalle vom Schmp. 135 °C.

Ausbeute: 4,0 g 4-(4-Brombutyl)benzoesäure (86 % d. Th.).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 8,05-8,10 und 7,28-7,35 [4H, AB-System, arom.], 3,42-3,51 [2H, t, $-\text{CH}_2\text{Br}$], 2,72-2,80 [2H, t, Ph-CH_2-], 1,77-2,00 [4H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 172,2, 148,4, 130,4, 128,6, 127,1, 35,1, 33,4, 32,1, 29,5.

4-{4-[Bis(2-hydroxyethyl)amino]butyl}benzoesäure, **BHABBA**

3,86 g (15,0 mmol) **9** werden mit 15,77 g (150 mmol) Diethanolamin versetzt und über 2,5 h bei 65 °C umgesetzt. Das Einsetzen der Reaktion zeigt sich durch das Aufsteigen von braunen Dämpfen und der Verfärbung der Lösung nach gelb. Die Reaktionskontrolle erfolgt dc (FM 13; Detektion mit UV, Bromcresolgrün).

Nach beendeter Reaktion wird mit 0,01 M NaOH aufgenommen und zweifach mit Ether geschüttelt, um Reste nicht umgesetzter 4-(4-Brombutyl)benzoesäure zu entfernen. Da sich das Produkt nicht aus der wässrigen Phase extrahieren lässt, wird mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und die Lösung zur Trockne einrotiert. Überschüssiges Diethanolamin wird sc entfernt (Kieselgel 60, FM 11).

Ausbeute: 3,46 g (82,1 % d. Th., DC-rein), farbloser, amorpher, leicht hygroskopischer Feststoff vom Schmp. 122 °C.

ESI-MS: m/z [%] = 304 [12, $(\text{M}+\text{Na})^+$], 282 [100, $(\text{M}+\text{H})^+$], 264 [7]

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ [ppm] = 7,88-7,92 [2H, d, arom. H-2, H-6], 7,22-7,28 [2H, d, arom. H-3, H-5], 3,83-3,93 [4H, t, $J = 5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$], 3,17-3,39 [6H, m, $\text{H}^+\text{N}(\text{CH}_2)_3$], 2,68-2,77 [2H, t, $J = 6,7$ Hz, $-\text{Ph-CH}_2-\text{CH}_2-$], 1,64-1,86 [4H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$]

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ [ppm] = 173,3, 144,7, 134,1, 129,3, 127,7, 55,7, 55,1, 53,8, 34,6, 27,8, 23,1

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1387, 1373, 1548, 1592, 3104, 1061, 2936.

4-{4-[Bis(2-hydroxyethyl)amino]butyl}benzoesäuremethylester-Hydrochlorid, **Methyl-BHABBA-HCl**

Abweichend von der Vorschrift nach Seeling wurde die Veresterung statt mit gasförmigem Chlorwasserstoff mit konzentrierter Schwefelsäure durchgeführt:

1,1 g (3,7 mmol) BHABBA in 100 ml abs. Methanol werden unter Zugabe von 0,5 g (5 mmol) konz. Schwefelsäure (98 %) unter Rückflusskühlung 14 h sieden gelassen. Der Verlauf der Reaktion lässt sich dc mit FM 11 verfolgen. Nach beendeter Reaktion wird mit NaHCO_3 neutralisiert, filtriert und das LM vollständig am RV entfernt. Nach dem Aufnehmen der weißen Kristalle mit verdünntem Ammoniak (pH 9) wird viermal mit Ether extrahiert. Die mit Wasser gewaschenen vereinten organischen Phasen ergeben nach dem Trocknen über Na_2SO_4 , Filtration und Zugabe von HCl_g in

Ether das Hydrochlorid des Esters, das sich zunächst in Tröpfchen am Glasrand niederschlägt und nach 24stündigem Stehenlassen und Abnehmen des Überstands schmutzig-weiß auskristallisiert. Die Umkristallisation aus einer 50 °C warmen Isopropanol-Aceton-Mischung (1/20, V/V) durch Petrolether-Zugabe ergibt 0,66 g (59,6 % d. Th.) des weißen, DC-reinen Hydrochlorids vom Schmp. 94 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7,90-7,97 [2H, d, arom. H-2, H-6], 7,31-7,38 [2H, d, arom. H-3, H-5], 3,83-3,93 [7H, m, $-\text{COOCH}_3$ sowie $-\text{CH}_2\text{OH}$], 3,25-3,41 [6H, m, $\text{H}^+\text{N}(\text{CH}_2)_3$], 2,72-2,82 [2H, t, $J = 6,9$ Hz, $-\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2-$], 1,64-1,92 [4H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$].

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 168,6, 148,8, 130,7, 129,7, 129,2, 56,6, 56,4, 55,1, 52,5, 36,1, 29,0, 24,3.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1709, 1282, 1093, 3278, 3314, 1425, 1106, ..., 2878, ..., 756, 1609.

4.1.5. Synthesen von OeDimer und 2-Nitro-Oe 9000

4.1.5.1. OeDimer

1,4-Bis[4-(4-chlorbutyl)benzyloxy]benzen, (11)

In 90 ml frisch destilliertem Aceton werden 4,01 g (0,018 mol) des Isomerenmischungs (**2**, **2a**, **2b**) und 2,1 g (0,018 mol) Hydrochinon gelöst und dann 5,5 g (0,036 mol) K_2CO_3 zugefügt. Der Ansatz wird 4 Tage unter Rühren am Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle, FM 4). Nach beendeter Reaktion wird mit Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden zunächst mit 10%iger Na_2CO_3 -Lösung und anschließend mit Wasser gewaschen. Man trocknet über wasserfreiem Na_2SO_4 , filtriert und destilliert das LM am Rotationsverdampfer (RV) ab. Die Aufreinigung des Produkts erfolgt sc (Kieselgel 60, FM 5). Durch anschließendes Waschen der einrotierten Fraktionen mit siedendem Methanol-Ethanol-Gemisch (etwa 1:1, V/V) wird das ortho-substituierte Nebenprodukt entfernt.

Ausbeute: 1,54 g **11** (47 % d. Th.), weiße Kristalle, die bei 120 – 121 °C schmelzen.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 7,25-7,30 [4H, d, $J = 7,9$, arom. H-2', H-6', H-2'', H-6''], 7,09-7,14 [4H, d, $J = 7,9$, arom. H-3', H-5', H-3'', H-5''], 6,82-6,85 [4H, s, arom. -O-Ph-O-], 4,90 [4H, s, benzyll], 3,44-3,51 [4H, t, $J = 6,2$, $-\text{CH}_2\text{-Cl}$], 2,54-2,62 [4H, t, $J = 7,0$, $-\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2-$], 1,65-1,82 [8H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 153,2, 141,6 134,8, 128,6, 127,8, 115,8, 70,6, 44,9, 34,8, 32,1, 28,6.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1506, 1231, 1017, 2940, 1459, 815, 834, 1039, 2864.

2,2'-(4-{4-[4-(4-{4-[Bis(2-hydroxyethyl)]aminobutyl}phenylmethoxy)phenoxyethyl]phenyl}-butylimino)diethanol, OeDimer

Die Synthese erfolgte in 2 Schritten, deren erster an eine Vorschrift von Kobayashi et al. [1998] angelehnt war.

0,694 g (1,47 mmol) **11** werden mit 0,511 g (5,89 mmol) LiBr und 0,060 g (0,15 mmol) Trioctylmethylammoniumchlorid versetzt und unter Rühren auf 125 °C gebracht, wobei das Alkylhalogenid vollständig aufschmilzt. Die Bildung des höherschmelzenden Alkylbromids erfolgt innerhalb von 45 min und zeigt sich durch die Erstarrung des Gemisches. Nach dem Absenken der Temperatur auf 95 °C erfolgt die Zugabe von 2,9 g Diethanolamin (27,6 mmol). Man setzt noch 48 h bei 95 – 100 °C bis zum vollständigen Verschwinden des Alkylhalogenids um (FM 12, Detektion: UV, Dragendorffs Reagenz, Bromcresolgrün).

Nach beendeter Reaktion wird mit Wasser aufgenommen, mit K₂CO₃ schwach alkalisch gestellt und vierfach mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Extrakte werden mit wenig Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das LM am RV entfernt.

Die einmalige Umkristallisation aus siedendem Toluol (ca. 80 ml/g Produkt) führt zu 0,744 g (83,0 % d. Th.) dc- und hplc-reinen (> 99,9 %) farblosen Kristallen vom Schmp. 115 – 116 °C.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,33-7,38 [4H, d, *J* = 8,0 Hz, arom.], 7,18-7,23 [4H, d, *J* = 8,0 Hz, arom.], 6,92 [4H, s, arom.], 4,99 [4H, s, benzyl], 3,55-3,68 [8H, t, *J* = 5,3 Hz, -CH₂OH], 2,53-2,73 [16H, m, -Ph-CH₂-CH₂- + N(CH₂-)₃], 1,47-1,76 [8H, m, -CH₂-CH₂-].

¹³C-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 153,2, 142,1, 134,6, 128,6, 127,7, 115,8, 70,6, 59,6, 56,0, 54,6, 33,5, 29,1, 26,6.

IR (KBr): 1/λ [cm⁻¹] = 1511, 1228, 1209, 1029, 1020, 2934, 3345, 2856.

4.1.5.2. 2-Nitro-Oe 9000

1-[4-(4-Chlorbutyl)phenylmethoxy]-2-nitrobenzen, 12

In 120 ml frisch destilliertem Aceton werden 10,4 g (0,050 mol) des Regiomeregemisches (**2**, **2a**, **2b**) und 7,0 g (0,050 mol) 2-Nitrophenol gelöst und anschließend 7,7 g (0,056 mol) K₂CO₃ zugefügt. Der Ansatz wird 4 Tage unter Rühren am Rückfluss erhitzt (DC-Kontrolle, FM 7). Nach beendeter Reaktion wird auf 0 °C gekühlt und der Ansatz filtriert. Das Filtrat wird einmal mit Petrolether extrahiert, um nicht umgesetztes Edukt zu entfernen. Die acetonhaltige Phase wird bis zur Trockene einrotiert. Man nimmt in Dichlormethan auf, wäscht zweimal mit kleinen Volumina verdünnter NaOH-Lösung (pH 10), anschließend mit Wasser. Die Dichlormethanphasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und am RV vom LM befreit. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgt sc (FM 5). Man erhält eine gelbe Flüssigkeit, die noch mit 5 % 1-[2-(4-Chlorbutyl)phenylmethoxy]-2-nitrobenzen verunreinigt ist (GC-Reinheit).

EI-MS: m/z [%] = 181 [100, (M-Nitrophenol)⁺], 145 [1], 117 [9], 104 [17], 91 [25], 78 [6], 63 [3].

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 7,84-7,90 [1H, d, J = 8,1 Hz, arom. H-3], 7,47-7,59 [1H, t, J = 8,1 Hz, arom. H-5], 7,34-7,40 [2H, d, J = 8,1, H-3', H-5'], 7,20-7,26 [2H, d, J = 8,1, H-2', H-6'], 7,10-7,18 [1H, d, J = 8,1 Hz, arom. H-6], 6,99-7,09 [1H, t, J = 8 Hz, arom. H-4], 5,23 [2H, s, benzyl], 3,54-3,68 [2H, t, J = 5 Hz, $-\text{CH}_2\text{Cl}$], 2,63-2,77 [2H, t, $-\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2-$], 1,70-1,96 [4H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 151,9, 142,0, 140,2, 134,1, 133,1, 128,7, 127,2, 125,7, 120,7, 115,1, 71,1, 44,9, 34,8, 32,0, 28,5.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1525, 1607, 1278, 1351, 744, 1254, 1487, 856, ..., 2939, 2863.

2,2'-[4-[4-(2-Nitro-phenoxy)methyl]phenyl]butylimino]diethanol, 2-Nitro-Oe 9000

2,00 g (6,3 mmol) **12** werden mit dem einfachen molaren Überschuss LiBr (12,5 mmol, entsprechend 1,09 g) und 127 mg (0,3 mmol) Trioctylmethylammoniumchlorid versetzt und unter Rühren auf 100 °C gebracht. Die Umhalogenierung erfolgt innerhalb von 50 h. Das so erhaltene Reaktionsgemisch ist hochviskös und von dunkeloranjer Farbe.

Nach dem Absenken der Temperatur auf 80 °C gibt man 3,95 g (37,5 mmol) Diethanolamin hinzu. Man setzt noch bis zum vollständigen Verschwinden des Alkylhalogenids (DC-Kontrolle, FM 12; Detektion mit UV, Dragendorffs Reagenz, Bromcresolgrün) 48 h lang bei 80 °C um.

Nach beendeter Reaktion wird mit wenig Wasser aufgenommen, mit K_2CO_3 schwach alkalisch gestellt und zweifach mit Dichlormethan sowie dreifach mit Ethylacetat extrahiert. Man tocknet die vereinten organischen Extrakte über wasserfreiem Na_2SO_4 und entfernt das LM am RV.

Das Rohprodukt wird in 10 ml Toluol bei 60 °C gelöst, bei 40 °C vorsichtig mit 30 ml Petrolether versetzt und anschließend auf -18 °C gekühlt, sodass sich das hochvisköse Produkt am Glasrand abscheidet. Dieser Reinigungsschritt wird noch einmal in gleicher Weise wiederholt.

Da durch zweifache Substitution 2,2'-[4-(4-[[Bis(2-hydroxyethyl)amino]methyl]phenyl)-butylimino]diethanol entsteht, das mit Dragendorffs Reagenz eine orange Färbung ergibt, wird eine sc Aufreinigung vorgenommen (Kieselgel 60, FM 12).

Ausbeute: 0,75 g 2-Nitro-Oe 9000 (31 % d. Th.), orangefarbenes Öl hoher Viskosität. Das Produkt weist eine HPLC-Reinheit von lediglich 93 % auf.

ESI-MS: m/z [%] = 327 [0,5, (M + K) $^+$], 311 [2, (M + Na) $^+$], 389 [100, (M + H) $^+$], 250 [5], 145 [4].

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 7,82-7,90 [1H, d, J = 8 Hz, arom. H-3], 7,47-7,59 [1H, t, J = 8 Hz, arom. H-5], 7,34-7,40 [2H, d, J = 8,1, H-3', H-5'], 7,20-7,26 [2H, d, J = 8,1, H-2', H-6'], 7,10-7,18 [1H, d, J = 8 Hz, arom. H-6], 6,99-7,09 [1H, t, J = 8 Hz, arom. H-4], 5,22 [2H, s, benzyl], 3,54-3,68 [4H, t, J = 5,5 Hz, $-\text{CH}_2\text{OH}$], 2,50-2,75 [8H, m, $-\text{Ph-CH}_2\text{-CH}_2-$ + $\text{N}(\text{CH}_2)_3$], 1,44-1,77 [4H, m, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$].

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ [ppm] = 152,0, 142,5, 140,2, 134,1, 133,0, 128,7, 127,2, 125,7, 120,6, 115,2, 71,1, 59,6, 56,0, 54,6, 35,5, 29,1, 26,6.

IR (KBr): $1/\lambda$ [cm^{-1}] = 1525, 1607, 1279, 1255, 2937, 745, 1044, 2861, 3380.

4.2. Analytische Methoden

4.2.1. Chromatographische Methoden

4.2.1.1. Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Für die Verlaufskontrollen der Synthesen wurden speziell für jedes Trennproblem die Methoden entwickelt und optimiert. Als Trägermaterial dienten DC-Alufolien mit Kieselgel 60-Beschichtung und Fluoreszenzindikator F₂₅₄ (VWR, Darmstadt). Die eingesetzten Fließmittelkomponenten entsprachen mindestens dem Reinheitsgrad *purum* und wurden vor ihrer Verwendung destilliert. Über die Zusammensetzung der Elutionsmittel informiert Tab. 16.

Die Detektion der Analyten erfolgte visuell unter Ausnutzung der substanzbedingten Fluoreszenzlöschung im UV-Licht (254 nm) und/oder der Farbentwicklung nach Einsatz spezifischer Sprühreagenzien. Die Detektionsgrenze für Oe 9000-Derivate mit Phenoxymethylphenyl-Struktur lag im unteren µg-Bereich und konnte durch den Einsatz von Millons Reagenz (VWR, Darmstadt) zu noch kleineren Massen verschoben werden. Orangefärbungen nach dem Besprühen mit Dragendorffs Reagenz (Herstellung nach EuAB) waren indikativ für die Anwesenheit tertiärer Amine.

Das Sprühreagenz kam entsprechend bei Syntheseverlaufskontrollen im letzten Schritt der Herstellung

Fließmittelbezeichnung	Fließmittelkomponenten	Volumina [ml]
FM 1	Petrolether/Dichlormethan	10 + 90
FM 2	Petrolether/Dichlormethan	20 + 80
FM 3	Petrolether/Dichlormethan	25 + 75
FM 4	Petrolether/Dichlormethan	45 + 55
FM 5	Petrolether/Dichlormethan	50 + 50
FM 6	Petrolether/Dichlormethan	60 + 40
FM 7	Petrolether/Dichlormethan	70 + 30
FM 8	Petrolether/Dichlormethan	75 + 25
FM 9	Hexan/Ethylacetat	75 + 25
FM 10	Dichlormethan/MeOH	95 + 5
FM 11	Dichlormethan/Methanol/Ammoniak-Lösung 26 %	30 + 70 + 4
FM 12	Dichlormethan/Methanol/Ammoniak-Lösung 26 %	50 + 50 + 1,25
FM 13	Dichlormethan/Methanol/Ammoniak-Lösung 26 %	50 + 50 + 6,25
FM 14	Ethanol/Diethylamin	95 + 5

Tab. 16: Übersicht über die verwendeten Fließmittel

der stickstoffhaltigen Metaboliten zum Einsatz. Mit Bromcresolgrün-Lösung (40 mg/100 ml Ethanol 96 %, neutralisiert mit 0,1 N-NaOH) und $\text{Co}(\text{SCN})_2$ -Lösung (aus 3 g NH_4SCN und 1 g CoCl_2 in 20 ml Wasser) ließen sich auch primäre und sekundäre Amine detektieren.

Die Phenole 4-OH-Oe 9000 und 4-OH-Oe 9000-N-oxid färbten sich nach dem Besprühen mit 2,6-Dibromchinonchlorimid-Lösung (Gibbs Reagenz, 40 mg/ml in Methanol) und nachfolgendem Einbringen in eine Ammoniak-Atmosphäre blau.

Die sc Trennungen wurden mit Hilfe von Kieselgel der Korngröße 63 – 200 μm mit einem mittleren Porendurchmesser von 60 Å vorgenommen (Kieselgel 60, VWR, Darmstadt). Wenn nicht anders vermerkt, betrug die Masse des zu trennenden Stoffgemischs 1 % der Masse des Kieselgels. Um Fraktionsvergrößerung durch lange Diffusionszeiten zu vermeiden, wurde die Elution mit maximaler Tropfgeschwindigkeit, aber ohne Anlegen eines äußeren Überdrucks durchgeführt.

4.2.1.2. GC-MS

Die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (EI) diente der Identitätssicherung und Reinheitsbestimmung aller Oe 9000-Metaboliten und sonstiger flüchtiger Syntheseprodukte. Da Oe 9000-Derivate mit intaktem Diethanolamin- oder Aminoethanol-Rest nicht direkt gc-gängig sind, wurde zuvor mit N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA, > 98,0 %, Fluka, Taufkirchen) derivatisiert.

Durchführung der Silylierung

Aufgrund der starken Hydrolyseempfindlichkeit der silylierten Verbindungen musste der Eintrag von Wasser strengstens vermieden werden. Jegliche Substanzüberführung erfolgte daher über Hamilton- und Kunststoff-Spritzen durch Septen hindurch. Zur Herstellung des Silylierungsgemisches versetzte man in einem HPLC-Vial 1 ml trockenes Pyridin (> 99,8 %, purissimum, über Molekularsieb; VWR, Darmstadt) mit 50 μl BSTFA. Zu 100 – 150 μg Analysensubstanz wurden 100 μl des Silylierungsgemisches gegeben. Man füllte mit 500 μl Pyridin auf, erwärmte 10 min bei 35 °C und injizierte innerhalb von 10 min in das GC-MS-Gerät (Injektionsvolumen 1 μl).

Geräteeinstellungen

Für die GC-MS-Messungen wurde ein G 1800C, GCD-Plus-System (Hewlett Packard, Palo Alto, USA) mit EI-Massenspektrometer verwendet. Die Chromatographie (Trägergas Helium 0,9 bar) der Oe 9000-Derivate wurde an einer HP-5ms Kapillarsäule (Länge 30 m, 0,25 mm ID, Film 0,25 μm , J & W Scientific) mit folgenden Einstellungen durchgeführt: Injektor 250 °C, Detektor 300 °C, Temperaturprogramm mit 100 °C für 3 min, danach heizen auf 300 °C mit 10 K/min, Endtemperatur halten für 19 min, Gesamtlaufzeit 42 min.

4.2.1.3. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC mit UV-Detektion kam zur Lösung verschiedenartiger Problemstellungen zum Einsatz. Sie war unentbehrlich zur Reinheitsprüfung der synthetisierten Verbindungen, zur Identifizierung und Quantifizierung der aus den Inkubationsversuchen stammenden Metaboliten und für Untersuchungen zu Stabilitäten der Metaboliten und Aktivitäten der verwendeten Enzyme.

Die Konzentration des pH-modifizierenden Agens und der Anteil an organischem LM wurden für jedes Trennproblem optimiert. Wenn nicht anders vermerkt, wurde bei RT und mit einer Detektionswellenlänge von 222 nm gearbeitet.

HPLC-Säulen und Vorsäulen

Zur Trennungen der Metaboliten wurden folgende Säulen auf ihre Eignung getestet:

- Säule 1: LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm), VWR, Darmstadt
- Säule 2: LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 100 RP-18e (5 µm), VWR, Darmstadt
- Säule 3: LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 60 RP-select B (5 µm), VWR, Darmstadt
- Säule 4: LiChroCART[®] 125-4 LiChrospher[®] 100 RP-8 (5 µm), VWR, Darmstadt
- Säule 5: Phenomenex[®] Gemini 5u C18 110 A, Phenomenex, Aschaffenburg
- Säule 6: Phenomenex[®] Luna 5µ NH₂ 100A 150 x 2,00 5 micron, Phenomenex, Aschaffenburg
- Säule 7: Nanosäule C18 PepMap100, 5 µm, 100 Å, 75 µm × 15 cm, LC Packings/Dionex, Idstein

Während die Säulen 1 – 4 nur geringe Unterschiede in ihren Selektivitäten für die Metaboliten aufwiesen und nur im pH-Bereich 1 – 8 einsetzbar waren, zeichnete sich die Säule 5 durch ihren erweiterten Arbeitsbereich von pH 1 – 12 aus, sodass die Amine erstmalig in ihrer Basenform eluiert werden konnten. Auch die Säule 6 ist im erweiterten pH-Bereich von 1,5 – 11 einsetzbar, eignet sich aber mit AN-Wassergemischen aufgrund geringer Wechselwirkungen mit den Phase-I-Metaboliten nicht, jene aufzutrennen.

Die Säulen 1 – 4 wurden in Verbindung mit einer LiChroCART[®] 4-4 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm)-Vorsäule verwendet, Säule 5 wurde durch die Vorsäule Phenomenex[®] Gemini C18 4 × 3,00 mm geschützt.

HPLC-Geräte

Gerät A (HPLC-Systeme 1 – 4, 7)

Gerätekonfiguration: Steuermodul SCL-6B, Pumpen LC-8A, UV-Detektor SPD-7A, Injektor SIL-6B, Bus-Modul CBM-10A, Software Class-LC10, alle Anlagenteile von Shimadzu Europa GmbH, Duisburg.

Gerät B (HPLC-Systeme 2, 3, 5, 6)

Probengeber, Steuermodul, Binäre Pumpen, Software u. Diodenarray-Detektor gehörten dem System HP1100 von Hewlett-Packard an. Dieses Gerät wurde ausschließlich in Kombination mit dem ESI-MS-Gerät 1 verwendet.

Gerät C (HPLC-System 8)

Probengeber, Steuermodul, Binäre Pumpen, Software u. UV-Detektor gehörten dem System UltiMate™ Nano LC an (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), Autosampler: Famos™. Dieses Nano-LC-Gerät wurde ausschließlich in Kombination mit dem ESI-MS-Gerät 2 verwendet.

HPLC-Fließmittel

Zur Herstellung der Fließmittelgemische dienten LM der Spezifikation „gradient grade“ von Fisher Scientific, Schwerte, bzw. VWR, Darmstadt. Entionisiertes Wasser wurde über den Mischbett-Wasservollentsalzer Seradest SD 2000 gewonnen und vor Verwendung über eine Filteranlage (Sartorius, Göttingen) durch die Membranfilter RC 58 von Schleicher und Schuell, Dassel, (< 0,2 µm) filtriert.

Die Entgasung der Fließmittel erfolgte durch 5minütige Ultraschalleinwirkung (Sonorex super RK 156 BH) bzw. durch Heliumbegasung (Qualitätsnorm 5.0, entspricht 99,999% He) über 15 min. Methanol-Wasser-Fließmittelgemische zeigten auf den verwendeten RP-Säulen im Allgemeinen im Vergleich zu AN/Wasser-Gemischen ein vermindertes Differenzierungsvermögen für die zu untersuchenden Oe 9000-Derivate.

HPLC-System 1

Dieses System wurde für die Trennung und Quantifizierung von BHABBA, Phenol, 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, POMPBA, POMPBuOH entwickelt.

Säule: LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18e (5 µm)

Fließmittel: *Komponente A*: 0,1 % TFA (m/V, Endkonz.) und 1 mM Natrium-1-octansulfonat in AN/Wasser-Gemisch 32,3/67,8 (V/V)

Komponente B: 0,1 % TFA (m/V, Endkonz.) und 1 mM Natrium-1-octansulfonat in AN/Wasser 64,6/35,4 (V/V)

Flussrate: 0,73 ml/min

Gradient: stufenförmiger Gradient von 0 auf 100 % B (V/V) nach 11,5 min

HPLC-System 2

Dieses System wurde für die Trennung und Quantifizierung von Oe 9000, Oe 9000-N-oxid, POMPBAmEt und POMPBuOH entwickelt.

Säule: Gemini 5u C₁₈ 110 A
Fließmittel: AN/Ammoniumcarbonat-Puffer pH 9,9 = 45/55 (isokratisch)
Flussrate: 0,8 ml/min

Die Herstellung des Ammoniumcarbonat-Puffers pH 9,9 erfolgte durch Lösen von 25 mmol (NH₄)₂CO₃ in 1000 ml Wasser und Einstellung der Lösung mit konz. Ammoniak-Lösung (26 %) auf pH 9,9.

HPLC-System 3

Dieses System wurde zur Identitätsprüfung auf POMPEs entwickelt.

Säule: LiChroCART[®] 125-4 LiChrospher[®] 100 RP-8 (5 µm)
Fließmittel: 0,21 % TFA (Endkonzentration, m/V) in AN/Wasser 45/55 (V/V), isokratisch
Flussrate: 1 ml/min

HPLC-System 4

Dieses System wurde zur Quantifizierung des 4-Nitrophenol-β-D-Glucuronids entwickelt, um die Aktivitäten der Glucuronidasen zu prüfen.

Säule: LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 100 RP-18e (5 µm)
Fließmittel: AN/Wasser 29,6/70,4 (V/V), isokratisch
Detektion: 302 nm
Flussrate: 0,73 ml/min

HPLC-System 5

Dieses System, gekoppelt mit dem ESI-MS-Gerät 1, wurde zur Identitätsprüfung auf zahlreiche Oe 9000-Metaboliten entwickelt.

Säule: LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm)
Fließmittel: AN/TFA (0,2 % Endkonzentration, m/V) in Wasser = 60/40 (V/V)
Flussrate: 0,73 ml/min

HPLC-System 6

Dieses System wurde zur Aufnahme der Online-UV-Spektren und ESI-MS-Spektren von 4-OH-Oe 9000 und 4-OH-Oe 9000-N-oxid entwickelt.

Säule: LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 µm)

Fließmittel: TFA (auf 0,1 % Endkonzentration, m/V) in AN/Wasser = 32/68 (V/V) über 13 min;
linearer Gradient über 2 min auf TFA (0,1 % Endkonz., m/V) in AN/Wasser = 65/35
(V/V) über 18 min

Flussrate: 0,73 ml/min

HPLC-System 7

Dieses System eignet sich ebenfalls zur Analyse des 4-Nitrophenol- β -D-Glucuronids.

Säule: Phenomenex[®] Luna 5 μ NH₂ 100A 150 x 2.00 5 micron

Fließmittel: AN/Ammoniumcarbonat-Puffer pH 6,75 = 85/15

Flussrate: 0,73 ml/min

Die Herstellung des Ammoniumcarbonat-Puffers pH 6,75 erfolgte durch Lösen von 25 mmol (NH₄)₂CO₃ in 1000 ml Wasser und Einstellung der Lösung mit Eisessig auf pH 6,75.

HPLC-System 8

Dieses System diente der Vortrennung der Metaboliten vor der massenspektrometrischen Analyse.

Säule: Nanosäule C₁₈ PepMap100, 5 μ m, 100 Å, 75 μ m x 15 cm

Fließmittel: *Komponente A*: Ameisensäure (0,1 % Endkonz., V/V) in AN/Wasser = 5/95 (V/V)
Komponente B: Ameisensäure (0,1 % Endkonz., V/V) in AN/Wasser = 80/20 (V/V)

Flussrate: 0,27 μ l/min

Gradient 0 – 8 min 5 % B dann von 8 – 28 min linearer Gradient auf 50 % B;
von 28,0 – 28,5 min linearer Gradient auf 95 % B;
von 28,5 – 39 min 95 % B;
von 39,0 – 39,5 min linearer Gradient auf 5 % B;
Gesamtlaufzeit 60 min

4.2.1.4. Hochdruckflüssigchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS)

ESI-MS-System 1

Dieses System wurde kombiniert mit dem HPLC-System 2 im negativen Modus betrieben oder kombiniert mit den HPLC-Systemen 3, 5 und 6 im positiven Modus eingesetzt.

Gerät: Single-Quadrupole-Gerät API 165TM

Interface: Turbo Ion Spray Source

Fokussierungspotential: \pm 230 V

Entclusteringpotential: \pm 30 V

Eingangspotential: \pm 10 V

Ionensprayspannung: \pm 4500 V

Modus:	positiv / negativ
ESI-Interface-Temperatur:	350 °C
Split:	1:5
Massenbereich (m/z):	150 – 450 bzw. 200 – 580 im positiven Modus 90 – 580 im negativen Modus

RP-HPLC-Analysen mit ESI-MS-System 1 wurden mit dem HPLC-Gerät der Serie HP 1100 von Hewlett-Packard durchgeführt.

ESI-MS-System 2

Dieses System wurde kombiniert mit HPLC-System 8 betrieben.

Gerät:	LCQ-Deca XP-Massenspektrometer.
Ionensprayspannung:	1500 V
Kapillarspannung:	41 V
Eingangspotential:	-52 V
ESI-Interface-Temperatur:	200 °C
Massenbereich (m/z):	190 – 600
Modus:	positiv

Wahl des internen Standards

Der Einsatz eines Internen Standards erwies sich für die Gewährleistung der Reproduzierbarkeit als notwendig, um kleine Fehler, die beim Pipettieren, Lyophilisieren und Injizieren auftraten, zu kompensieren. Da für die Metaboliten zu erwarten war, dass sie eine gegenüber der Muttersubstanz erhöhte Hydrophilie aufweisen würden, fiel mit POMPBuNi die Wahl auf eine vergleichsweise lipophile Substanz, um Koelutionen zu vermeiden. Die Substanz trägt den gleichen Chromophor wie Oe 9000, absorbiert also sowohl bei 222 nm als auch bei 271 nm, weist bei neutralem pH-Wert auch im wässrigen Milieu eine hinreichende Stabilität über Tage auf und lässt sich leicht in AN in Lösung bringen. Optimale Endkonzentration in den Proben: 20 – 30 µg/ml für eine 50 µl-Injektion.

4.2.2. Spektroskopische Methoden

4.2.2.1. Kernresonanzspektroskopie

Die ^1H -, ^{13}C -NMR und C_H -COSY-Spektren wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Günther im Institut für Organische Chemie der FSU Jena mit dem AvanceTM 250- bzw. AvanceTM 400 MHz-Spektrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten) aufgenommen. Je nach Löslichkeit der Verbindungen fanden die LM CD_3OD , CDCl_3 , DMSO-D_6 und D_2O Anwendung.

4.2.2.2. IR-Spektroskopie

Die Festsubstanzen wurden als KBr-Presslinge mit einem FTIR-Spektrometer (Nicolet Avatar 370, Thermo Electron Corporation, Dreieich) vermessen. Flüssigkeiten wurden zuvor als dünner Film auf die KBr-Presslinge aufgetragen.

4.2.3. Weitere analytische Methoden

4.2.3.1. Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte der synthetisierten Feststoffe wurden mit einem Gerät des Typs Meltemp II (Laboratory Devices, Holliston, USA) mit angeschlossenem Digitalthermometer Fluke 51KJ (Fluke, Moorestown, USA) bestimmt. Alle Schmelzpunktangaben sind unkorrigiert.

4.2.3.2. Massenspektrometrie

Allen zugrundeliegenden Massenspektren wurde eine GC- oder HPLC-Trennung vorgeschaltet, sodass etwaige Verunreinigungen der Substanzen nicht im angegebenen Massenspektrum zu finden sind. [vgl. Kapitel 4.2.1.2. bzw. 4.2.1.3.].

4.2.3.3. Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen

Oe 9000-N-oxid, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, 4-OH-Oe 9000, POMPBA, POMPBuOH, POMPBAEt sowie Oe 9000-Säure wurden im Konzentrationsbereich zwischen $8 \cdot 10^{-5}$ bis $1,6 \cdot 10^{-4}$ M in Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37 °C in Anwesenheit von Sauerstoff über 4 d gelagert. Die Analyse der gelagerten Lösungen erfolgt mit Hilfe der HPLC-Systeme 1 oder 2 unter Verwendung von Oe 9000-HCl als IS.

4.3. Biopharmazeutische Untersuchungsverfahren

4.3.1. *In-vitro*-Metabolisierung von Oe 9000 und Oe 9000-Metaboliten mit Leberhomogenaten

4.3.1.1. Materialien

Tris-KCl-Puffer pH 7,4

KCl (VWR, Darmstadt)	11,5 g
Tris (Sigma-Aldrich, Steinheim)	30,5 g

HCl 36 % (VWR, Darmstadt)	ca. 15 ml
Wasser	ad 1000,0 ml

Tris und KCl werden zunächst in 900 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Salzsäure auf pH 7,4 mittels kalibrierter pH-Elektrode eingestellt. Man erhitzt zum Sieden, korrigiert ggf. den pH-Wert der abgekühlten Lösung und füllt mit Wasser ad 1000,0 ml auf.

Phosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M)

Na ₂ HPO ₄ x 10 H ₂ O (VWR, Darmstadt)	19,1 g
KH ₂ PO ₄ (VWR, Darmstadt)	1,8 g
Wasser	ad 1000,0 ml

Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,4 ist mittels kalibrierter pH-Elektrode ggf. unter Verwendung von konz. H₃PO₄ vorzunehmen.

Kofaktorlösung für CYP

NADP ⁺ (Fluka, Taufkirchen)	16 mg
Glucose-6-phosphat (Fluka, Taufkirchen)	40 mg
MgCl ₂ -Lösung (0,1 M)	1,0 ml
Phosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M)	19,0 ml

Unmittelbar vor Verwendung der Lösung wird die *In-situ*-Bildung von NADPH + H⁺ durch Zugabe von 10,0 µl Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus Bäckerhefe, 197 IU/mg, (Fluka, Taufkirchen) gestartet.

Lösungen für die Proteingehaltsbestimmung

Lösung A:	5 mg/ml Cu ₂ SO ₄ x 5 H ₂ O in Wasser
Lösung B:	10 g Na ₂ CO ₃ + 0,1 g Natriumtartrat + 10,0 ml 0,5 M-NaOH-Lösung mit Aqua dest. ad 100,0 ml
Lösung C:	10 ml Lösung B + 1 ml Lösung A
Lösung D:	1 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz (Wolframato- und Molybdat-Heteropolysäuren, VWR, Darmstadt) ad 10,0 ml

4.3.1.2. Gewinnung der Leberhomogenate

Schlachtfrische, körperwarmer Schweineleber (vom Schlachthof Jena) wird sofort auf Eis gelegt, fein geschnitten und mit eiskaltem Tris-KCl-Puffer pH 7,4 gewaschen. Jeweils 90 g Leberstücke werden mit 180 ml Tris-KCl-Puffer versetzt und mittels Mixer (Waring[®] commercial blender, 22000 U/min, 1 min) und Ultra Turrax (T25, Jahnke&Kunkel, IKA[®]-Labortechnik, 13500 U/min über 30 s) homogenisiert. Die Homogenate werden 20 min lang bei 10000 x g bei 1 °C zentrifugiert (Beckman-Ultrazentrifuge Optima[®]-LE mit Festwinkelrotor 70 Ti, Beckman Instruments, USA). Ein Teil des

resultierenden 10000 x g-Überstands wird direkt für die Inkubationen verwendet oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der andere Teil wird zur Gewinnung der Mikrosomen 80 min lang bei 140000 x g und $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Man dekantiert den Überstand – die lösliche Fraktion – ab und resuspendiert das Sediment – die Mikrosomen – mit dem doppelten Volumen seiner Auswaage in Tris-KCl-Puffer. Für die Versuche, die einer sorgfältigen Abtrennung von Proteinen der löslichen Fraktion bedürfen, wird ein weiteres Mal zentrifugiert (140000 x g, 30 min, $1\text{ }^{\circ}\text{C}$), dekantiert und ebenso resuspendiert. Mikrosomen lassen sich einige Wochen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahren. Unmittelbar vor der Verwendung der Leberzentrifugate wird mit einem Mikrorührgerät (XENOX-Motorhandstück[®], Proxon GmbH, Niersbach) homogenisiert. Um den Enzymaktivitätsverlust zu minimieren ist während des zügig durchzuführenden Herstellungsprozesses sicherzustellen, dass die Temperatur der Leberfraktionen $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht übersteigt.

4.3.1.3. Gehaltsbestimmung von Cytochrom P-450, Cytochrom b₅ und Gesamtprotein

Gegenüber anderen Hämenzymen, wie beispielsweise Hämoglobin, unterscheiden sich CYP und Cyt. b₅ durch die Besetzung der 5. Ligandenstelle durch Cystein (statt Histidin), was maßgeblich das Redoxverhalten und die spektroskopischen Eigenschaften der CYPs bestimmt. Trotz der Vielzahl an UV-aktiven Verbindungen in Mikrosomen lassen sich Cytochrome der Klasse c aufgrund des langwelligen Absorptionsmaximums ihrer reduzierten Form von ca. 424 – 426 nm photometrisch erfassen.

Für die selektive Gehaltsbestimmung von Cytochrom b₅ und CYP-Isoenzymen werden Unterschiede in ihrem Redoxverhalten gegenüber NADH₂ ausgenutzt. Die Differenzierung der Fe²⁺-Form der CYP-Isoenzyme gegenüber anderen Fe²⁺-haltigen Enzymen gelingt anhand ihrer charakteristischen Eigenschaft, mit CO stabile Komplexe zu bilden, die zwischen 448 – 450 nm maximal absorbieren und daher einst zu ihrem Namen führten.

4.3.1.4. Durchführung der Gehaltsbestimmung von Cytochrom P-450 und Cytochrom b₅

1,0 ml Mikrosomensuspension werden mit Tris-KCl-Puffer pH 7,4 auf 25,0 ml mit Wasser aufgefüllt. Im Wellenlängenbereich von 390 – 600 nm (Beckman DU 670) wird mit dieser Probe zunächst der Blindwert aufgenommen und mit derselben Probe anschließend die Nulllinie aufgezeichnet. Der Zusatz von einer Spatelspitze NADH₂ bewirkt die selektive Reduktion von Cytochrom b₅ in dessen Fe²⁺-haltige Form, was mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 424 nm und einer Zunahme des Absorptionskoeffizienten in diesem Wellenlängenbereich einhergeht. Da gleichzeitig ein Abfall der Basislinie zu beobachten ist, muss eine Basislinienkorrektur vorgenommen werden. Der Gehalt an Cytochrom b₅ ist proportional zur Absorptionsdifferenz ΔE mit: $\Delta E = E_{424\text{ nm}} - E_{470\text{ nm}}$. Durch den Bezug auf die Proteinkonzentration in den Mikrosomen lässt sich ein Vergleich zwischen den einzelnen Homogenaten bezüglich ihres Cyt. b₅-Gehalts ziehen (bei Schweinelebermikrosomen $\Delta E = 0,003 - 0,012$ pro mg mikrosomaler Proteine).

Für die Bestimmung des Gesamtgehalts an CYP-Isoenzymen werden nun durch den Zusatz einer Spatelspitze $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (VWR, Darmstadt) alle verbliebenen Fe^{3+} -haltigen Enzyme reduziert. Zur Bildung des CYP-Kohlenmonoxid-Komplexes wird über 30 s CO (>99,9 %, Merck Schuchardt, Hohenbrunn) eingeleitet, die Küvette verschlossen und das Spektrum aufgezeichnet. Der Gesamtgehalt an CYP-Isoenzymen ergibt sich aus $\Delta E = E_{450 \text{ nm}} - E_{490 \text{ nm}}$ zu $\Delta E_{\text{CYP}} = 2,9 - 3,5 \cdot 10^{-3} / \text{mg}$ und bezieht sich ebenfalls auf den mikrosomalen Proteingehalt.

4.3.1.5. Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Mikrosomen

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit der durch Lowry modifizierten Methode von Folin und Ciocalteu [Lowry 1951]. Als Referenz-Protein für die Kalibriergerade (man trägt Absorption gegen Masse an Protein auf) diente Rinderserumalbumin (Fluka, Taufkirchen) in Tris-KCl-Puffer. Zunächst wurden Peptide und Proteine mit Cu^{2+} -Ionen komplexiert und anschließend mit Wolframsäure und Molybdänsäure oxidiert. Dabei entstanden Wolframblau und Molybdänblau, die photometrisch bei 730 nm quantifiziert wurden. Für die Proteinbestimmung wurden Blindwerte (1,0 ml Tris-KCl mit allen Reagenzien, aber ohne Proteinlösung) sowie Referenzwerte (Rinderserumalbumin-Lösungen 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,2 mg/ml) mitgeführt.

Die Mikrosomen werden in 3 Verdünnungsstufen vermessen. 1,0 ml Mikrosomen werden dazu mit Tris-KCl-Puffer ad 25,0 ml aufgefüllt (1:25). Davon werden 10,0 ml ad 20,0 ml (1:50) und 5,0 ml ad 20,0 ml (1:100) mit Tris-KCl-Pufferlösung aufgefüllt. 1,0 ml dieser verdünnten Mikrosomenproben (bzw. des Blindwerts oder des Standards) werden mit 1,0 ml der frisch bereiteten Lösung C versetzt. Nach 10 min fügt man 3,0 ml Lösung D hinzu und stellte in ein auf 60 °C vortemperiertes Wasserbad für 10 min. Die Proben werden auf RT gebracht und sofort gegen Tris-KCl-Pufferlösung als Blindwert bei 730 nm photometrisch vermessen.

Die Proteinkonzentration in den resuspendierten Mikrosomen errechnete sich mit Hilfe der Formel:

$$c_{\text{Protein}} [\text{mg/ml}] = \frac{1}{3} \cdot V (0,05 \cdot M/S_1 + 0,1 \cdot M/S_2 + 0,2 \cdot M/S_3).$$

V = Verdünnungsfaktor für die Mikrosomenprobe

M = Absorption der Mikrosomenprobe

S_1 = Absorption des 0,05 mg/ml-Proteinstandards

S_2 = Absorption des 0,1 mg/ml-Proteinstandards

S_3 = Absorption des 0,2 mg/ml-Proteinstandards

Mit Hilfe der Proteinkonzentration wurde schließlich der Proteingehalt in den Mikrosomen auf 1 g Leber bezogen. Der Gehalt an mikrosomalen Proteinen belief sich zwischen 2,8 – 4,0 mg/g Leber für das untersuchte Organmaterial.

4.3.1.6. Vorbereitung der Inkubation

In Sovirelgläsern wurden jeweils Leerwerte ohne Substratzusatz aufgenommen, um aus der Leber stammende Matrixbestandteile zu erfassen. Um nicht-enzymatische Reaktionen ausschließen zu

können, wurden Substratproben mit Hitze-inaktivierten Leberhomogenaten sofort analysiert (t_0) sowie nach erfolgter Inkubation (10 min bzw. 40 min, t_x 100 %-Werte). Die Konzentration der Substrat-SL lag für Oe 9000 zwischen 0,6 – 1,34 mM, für alle anderen Substrate bei 0,8 mM in Wasser. Wegen Schwerlöslichkeit von POMPBA in Wasser wurden 8 μ mol der Substanz zunächst in 2 ml DMSO aufgenommen und ad 10,0 ml mit einer Verdünnung des Tris-KCl-Puffers pH 7,4 mit Wasser (1/1, V/V) aufgefüllt.

Probe	Bezeichnung	Substrat	Leberhomogenat	Kofaktorlösung CYP
1a	t_0 100 %-Wert	0,5 ml Substrat-SL	0,5 ml inaktiviert	1 ml
1b	t_0 100 %-Wert	0,5 ml Substrat-SL	0,5 ml inaktiviert	1 ml
2a	t_x 100 %-Wert	0,5 ml Substrat-SL	0,5 ml inaktiviert	1 ml
2b	t_x 100 %-Wert	0,5 ml Substrat-SL	0,5 ml inaktiviert	1 ml
3a	t_x	0,5 ml Substrat-SL	0,5 ml aktiv	1 ml
3b	t_x	0,5 ml Substrat-SL	0,5 ml aktiv	1 ml
3c	t_x	0,5 ml Substrat-SL	0,5 ml aktiv	1 ml
4a	Leerwert	0,5 ml KCl-Tris-Puffer	0,5 ml aktiv	1 ml
4b	Leerwert	0,5 ml KCl-Tris-Puffer	0,5 ml aktiv	1 ml
4c	Leerwert	0,5 ml KCl-Tris-Puffer	0,5 ml aktiv	1 ml

Tab. 17: Inkubation von Leberhomogenaten. Als Substrate dienten Oe 9000-HCl, Oe 9000-N-oxid, POMPBA_{AmEt}-HCl, POMPBA_{Am}-HCl, 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid oder POMPBA

4.3.1.7. Inkubationen und Probenaufarbeitung

Methode 1 zum qualitativen Nachweis der Oe 9000-Metaboliten nach Inkubation von Oe 9000-HCl

Die Inkubationen werden in einem Schüttelwasserbad mit 50 Bewegungen/min bei 38 – 39 °C unter Luftzutritt durchgeführt. Die Inkubationszeit beträgt 40 min. Anschließend wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Proteine werden durch Zusatz von jeweils 100 μ l TFA 30 % gefällt. Die Hälfte der Proben wird TFA-sauer gelassen, die andere Hälfte mit festem Na₂CO₃ auf pH 9 – 10 gebracht (Kontrolle durch pH-Indikatorstäbchen pH 6,5 – 10, VWR, Darmstadt) und zentrifugiert (6000 U/min). Je 1,5 ml vom Überstand werden zur Aufkonzentrierung einer Flüssig-Flüssig-Extraktion über Extrelut[®]-Material (Kieselgur, Säulenfüllung: 1 g pro ml Probelösung) in Extrelut[®]-Säulen N3 unterzogen. Nach 10minütiger Einwirkungszeit wird mit jeweils 25 ml Ether extrahiert, mit Stickstoff bei 40 °C vom Elutionsmittel befreit und anschließend mit 200 μ l AN/Wasser-Gemisch (30/70, V/V) aufgenommen. Injektionsvolumen 50 – 100 μ l.

Die Methode eignete sich zur Identifizierung und Quantifizierung von POMPBA, POMPBuOH, Oe 9000 und POMPBA_mEt. Vorteilhaft war die weitgehende Abtrennung von Matrixbestandteilen. Die als Referenzsubstanzen eingesetzten 4-OH-Derivate und das postulierte BHABBA ließen sich allerdings unter den gewählten Extraktionsbedingungen nur partiell oder gar nicht wiederfinden. Die Methode 1 wurde daher später durch die folgenden Methoden ersetzt.

Methode 2 zum qualitativen Nachweis der Oe 9000-Metaboliten nach Inkubation von Oe 9000-HCl und aller weiteren Substrate

Die Inkubationen werden in einem Schüttelwasserbad mit 50 Bewegungen/min bei 38 – 39 °C unter Luftzutritt durchgeführt. Die Inkubationszeit beträgt 40 min im Falle des Oe 9000-HCl und 10 min für alle anderen Substrate. Anschließend wird im Eisbad abgekühlt. Die Proteine werden mit jeweils 100 µl TFA 30 % präzipitiert. Um nachfolgende Phasentrennungen zu erleichtern, wird jeweils eine Spatelspitze festes MgCl₂ zugesetzt, zentrifugiert (6000 U/min, 2 min) und bei 0 °C mit insgesamt 2,5 ml AN extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation (6000 U/min) werden 700 µl der Acetonitrilphase zur Analyse in HPLC-Vials überführt. Die restliche Lösung wird anschließend mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung (ca. 125 µl) auf pH 7 – 8 gestellt (Kontrolle durch pH-Indikatorstäbchen pH 6,5 – 10, VWR, Darmstadt) und nach Zugabe von 700 µl AN erneut extrahiert. Man kühlt auf 0 °C, zentrifugiert und überführt die organische Phase in HPLC-Vials. Injektion von 100 µl.

Der Vorteil dieser Methode lag in ihrer raschen Durchführbarkeit und der weitgehenden Eliminierung von Störungen durch Matrixbestandteile. Die Empfindlichkeit ließ sich durch Einengen der gewonnenen Extrakte am RV (bei 40 °C) weiter erhöhen, was jedoch nur für eine kleine Probenzahl praktikabel war und für Oe 9000-HCl-Inkubationen nicht zur Identifizierung weiterer Metaboliten beitrug. Aussagen zu den quantitativen Verhältnissen der Metaboliten zueinander waren allerdings nur begrenzt zulässig.

Methode 3 zum quantitativen Nachweis der Oe 9000-Metaboliten nach Inkubation von Oe 9000-HCl

Die Inkubationen werden im Schüttelwasserbad mit 50 Bewegungen/min bei 38 – 39 °C unter Luftzutritt durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 40 min von Oe 9000-HCl und sich anschließender zweiminütiger Abkühlungsphase auf 20 °C wird die Umsetzung durch Zugabe von 1,2 ml frisch destilliertem Aceton gestoppt. Man zentrifugiert (6000 U/min), nimmt 2,800 ml vom Überstand ab und entfernt das Aceton vorsichtig im Stickstoffstrom bei 40 °C über 45 min. Die Proben werden bei –80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert (5*10⁻⁵ bar, –20 °C, Verschlusskappe dazu aufsetzen, aber nicht fest zudrehen). Es wird mit 0,8 ml einer AN-Wasser-Mischung (30/70, V/V) aufgenommen und mit 100 µl IS-Lösung versetzt. Injektion von 100 µl.

Diese Methode ist sowohl für Identitätsprüfungen als auch zur Quantifizierung von 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, Oe 9000, POMPBA_mEt, POMPBA und POMPBuOH geeignet. Der postulierte

Metabolit BHABBA, dessen Extraktion in die Acetonitrilphase wegen seines amphoteren Charakters bei Methode 2 erschwert war, ließ sich mit Methode 3 identifizieren. Zur Prüfung auf POMPBA_m (Reaktion mit Aceton) oder Phenol (Flüchtigkeit) musste hingegen auf Methode 2 zurückgegriffen werden.

Reduktion der N-Oxide

Die N-Oxide wurden durch Zugabe von 25 mg Na₂S₂O₄ pro ml Analysenprobe innerhalb von 45 min bei 40 °C reduziert. Die Abnahme der N-Oxid-Konzentrationen und Zunahme der Aminkonzentrationen ließen sich mittels LC-MS verfolgen.

4.3.2. In-vitro-Metabolisierung von Oe 9000 mit Präzisionsleberschnitten

4.3.2.1. Gewinnung der Leber

Die Versuchsdurchführung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Müller im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena, die ihren reichen Erfahrungsschatz als auch die Lebern zur Verfügung stellte und die Inkubationen vornahm. Die humanen Leberschnitte wurden aus makroskopisch gesundem Gewebe nach partieller Hepatektomie gewonnen und in der gleichen Weise wie die Rattenleberschnitte behandelt.

Zur Gewinnung der Rattenleberschnitte wurden 35 – 45 Tage alte männliche HAN:Wistar-Ratten aus der hauseigenen Zucht des benannten Instituts als Spendertiere genutzt. Die Tiere wurden unter Ether-Anästhesie getötet. Die Lebern wurden entnommen, zerteilt und kurzzeitig in eiskaltem, 12,6 mM, CO₂-gesättigtem Krebs-Henseleit-HEPES-Puffer pH 7,4 aufbewahrt.

Eine hinreichende CYP-Aktivität der Leberschnitte wurde mit Hilfe der ECOD-Reaktion sichergestellt.

4.3.2.2. Vorschrift zur Präparation der Leberschnitte und zur Durchführung der Inkubationen

Zylinderförmige Leberstücke werden manuell mit einer Stanze mit einem Durchmesser von 8 mm gewonnen und anschließend mit einem Krumdieck[®]-Gewebeschneider in Scheiben von 200 – 250 µm Dicke geschnitten. Vier Schnitte mit einer Gesamtmasse von 55 – 80 mg kommen sofort nach ihrer Gewinnung für einen 5 ml-Ansatz zur Anwendung.

Die Inkubation wird in 10 ml Carbogen-gesättigtem Williams Medium E (pH 7,4) durchgeführt, welchem zuvor Insulin (1,38 IU/10 ml), L-Glutamin (2,92 mg/10 ml), Gentamicin (0,5 mg/10 ml), Tylosin (1,0 µg/10 ml) und Ampicillin (100 µg/10 ml) zugesetzt wurde. Die Erlenmeyerkolben werden unter permanenter Carbogenbegasung bei 37 °C über 4 h geschüttelt. Die Substratkonzentration für Oe 9000-HCl beträgt zu Versuchsbeginn 10⁻⁴ mol/l. Nach 30 min, 2 h bzw. 4 h

werden die Schnitte aus dem Inkubationsmedium entfernt und die Metabolisierungsreaktionen durch rasches Einfrieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gestoppt.

4.3.2.3. Probenaufarbeitung zur Identifizierung und Quantifizierung der Phase-I-Metaboliten

Leberschnitte und Inkubationsüberstände werden zunächst voneinander getrennt, die Leberschnitte lyophilisiert und extrahiert (erst mit $600\text{ }\mu\text{l}$ MeOH, anschließend mit $400\text{ }\mu\text{l}$ AN; Ultraschall über 10 min bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) und die zur Trockene (Stickstoff, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) eingedampften Extrakte mit den entsprechenden Inkubationsüberständen vereint.

Es werden 4 Aliquote à 1 ml für die Untersuchung auf Phase-II-Metaboliten und zur Quantifizierung abgenommen und der Rest für qualitative Zwecke mit AN versetzt ($0,54\text{ ml}$ AN pro ml Inkubationsüberstand), wodurch Proteine präzipitieren. Man zentrifugiert, lyophilisiert den Überstand und nimmt in $300\text{ }\mu\text{l}$ AN/Wasser (40/60, V/V) auf. Nach erneuter Zentrifugation erfolgt die Analyse mittels HPLC und/oder LC-MS mit Injektionsvolumina von jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$.

Zur Quantifizierung werden $260\text{ }\mu\text{l}$ der nicht-lyophilisierten Aliquote mit $140\text{ }\mu\text{l}$ IS-Lösung der Konz. $0,0418\text{ mg/ml}$ in AN versetzt, 30 min stehengelassen, zentrifugiert und $100\text{ }\mu\text{l}$ des Überstands injiziert.

4.3.2.4. Probenvorbereitung zur Glucuronididentifizierung

$0,15\text{ ml}$ der aus den Leberschnittinkubationen stammenden nichtlyophilisierten Aliquote werden jeweils mit $0,025\text{ ml}$ Phosphatpuffer pH 6,8 (für *E. coli*-Proben) bzw. mit Acetatpuffer pH 5,5 (für *H. pomatia*-Proben) versetzt. Pro Überstand werden jeweils 8 Inkubationen vorgenommen: 4 ohne Enzymzusatz (zwei bei pH 6,8 und zwei bei pH 5,5), 2 mit *E. coli*- β -D-glucuronidase und 2 mit β -D-Glucuronidase von *Helix pomatia*.

Es wird über 5 h (*E. coli*) bzw. 22 h (*H. pomatia*) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zusätzlich dienen je 2 Proben mit Enzym, aber ohne Substrat, sowie je 2 Proben mit 4-Nitrophenol- β -D-glucuronid als Leerwerte und Kontrollen, um die Enzymaktivitäten sicherzustellen. Den Referenzproben (ohne Enzymzusatz) werden jeweils $0,5\text{ mg}$ D-Glucarsäure-1,4-lacton zugefügt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von $125\text{ }\mu\text{l}$ (*E. coli*) bzw. $250\text{ }\mu\text{l}$ (*H. pomatia*) AN (+ IS) gestoppt. Man zentrifugiert bei 6000 U/min über 2 min. $100\text{ }\mu\text{l}$ vom Überstand werden jeweils injiziert.

4.3.2.5. Probenvorbereitung zur Identifizierung von Arylsulfaten

$0,2\text{ ml}$ der aus den Leberschnittüberständen gewonnenen Aliquote werden mit jeweils $0,025\text{ ml}$ Acetatpuffer pH 5,5 versetzt. Man gibt zu allen Proben jeweils $0,5\text{ mg}$ D-Glucarsäure-1,4-lacton. Die Sulfataseaktivität in Sulfatase-haltigen Proben wird auf 6 IU pro Ansatz gestellt. Die Inkubationen werden mit und ohne Arylsulfatase, Typ VIII vom Seeohr (Sigma) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ über 24 h durchgeführt. Zusätzlich werden Leberschnittkontrollwerte (ohne Oe 9000) mit und ohne Arylsulfatase inkubiert. Zusätzlich dienen je 2 Proben mit Enzym, aber ohne Substrat, sowie je 2 Proben mit 4-

Nitrobrenzcatechinsulfat als Leerwerte bzw. Kontrollen, um die Enzymaktivitäten sicherzustellen. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 322 μl AN (+ IS) gestoppt. Man zentrifugiert und injiziert jeweils 100 μl vom Überstand in das HPLC-Gerät (Methoden 1 und 2).

4.3.3. *In-vivo*-Biotransformationsversuch von Oe 9000-HCl an der Ratte

Aufzucht und „Handling“ der Tiere erfolgten am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU. Für alle Tierversuche lag eine Genehmigung der Tierschutzkommission des Freistaates Thüringen vor. Vier weiblichen HAN:Wistar-Ratten wurde jeweils eine Lösung von Oe 9000-HCl in 0,9 %iger steriler NaCl-Lösung i.p. als Bolus appliziert. Die Dosis von 40 mg/kg KM wurde dabei mit einem Injektionsvolumen von 2 ml/100 g KM verabreicht.

Kot und Urin konnten getrennt im Stoffwechselkäfig gesammelt werden und wurden nach jeweils 6, 24, 48 und 72 h entnommen. Vor der Urinentnahme wurden die Ratten durch mechanischen Druck auf die Blase zum Urinieren angeregt. Die Ratten hatten zu Versuchsbeginn das Alter von 11 Wochen und 5 Tagen erreicht und wogen zwischen 190 und 228 g.

Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Von derselben Rattenpopulation wurden Urin und Fäzes als Leerwerte gewonnen.

4.3.3.1. Aufarbeitung der Harnproben

Zur Abtrennung von Zell- und Futterbestandteilen wurden die gewogen Harnproben sofort nach ihrer Gewinnung bei 6000 U/min über 5 min zentrifugiert, dekantiert, aliquotiert, bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren oder wie folgt für die Messung vorbereitet. Man versetzte jeweils 700 μl Urin mit 200 μl AN und anschließend mit 100 μl IS-Lösung (0,1 mg/ml in AN), was die Präzipitation der durch Futter eingetragenen Proteine bewirkte. Die Proben wurden zentrifugiert und jeweils 100 μl injiziert.

4.3.3.2. Aufarbeitung der Kotproben

Der Kot wurde sofort nach Gewinnung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Der gefrorene Kot wurde mit einer Pinzette von Haaren und Futterbestandteilen befreit, gewogen und lyophilisiert. Der getrocknete Kot wurde anschließend in der Reibschale pulverisiert und homogenisiert. Man versetzte jeweils 60 mg des homogenisierten Kots mit 2 ml MeOH und extrahierte die Metaboliten über 30 min bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Ultraschallbad unter häufigem Schütteln. Es folgte eine Zentrifugation bei 5000 U/min über 5 min. 700 μl des Überstands wurden mit 70 μl IS-Lösung (0,1 mg/ml in Methanol) versetzt. Injektion von 100 μl .

4.3.4. Umsetzung von POMPBAld mit ALDH-1

Zur Herstellung der POMPBAld-Stammlösung werden 500 µg POMPBAld mit 20 µl DMSO in Lösung gebracht und mit Wasser ad 1,0 ml aufgefüllt.

Man fügt zu 300 µl Tris-KCl-Puffer (pH 8) und 2220 µl Wasser 200 µl der POMPBAld-Stammlösung hinzu. Es werden 100 µl 1,33 %ige β -NAD⁺-Lösung, 100 µl 3 M-KCl-Lösung, 30 µl 0,35 M-2-Mercaptoethanol-Lösung zugesetzt (alle drei Lösungen in Wasser). Die Reaktion wird mit 0,05 IU ALDH-1 (von *Saccharomyces cerevisiae*, kalium-aktiviert, Sigma-Aldrich) gestartet. Man inkubiert 40 min lang bei 37 °C im Schüttelwasserbad. 600 µl Lösung werden entnommen und mit 400 µl AN versetzt. Man zentrifugiert 3 min lang bei 6000 U/min und injiziert 10 µl des Überstands (HPLC-System 1). Referenzwerte (ohne Enzym) und Leerwerte (ohne Substrat) werden in gleicher Weise behandelt.

4.4. Pharmakologisch-toxikologische Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen

4.4.1. Test auf antiproliferative Wirkungen der Substanzen

Adhärenz wachsende Zellen der L-929-Mausfibroblastenlinie (DSMZ, ACC 2) und als Suspensionskultur wachsende Zellen der K-562-Zelllinie (DSMZ, ACC 10) werden mit verschiedenen Verdünnungsstufen der Testsubstanzen im Konzentrationsbereich von 1 – 50 µg/ml (für OeDimer zusätzlich 0,4 – 1 µg/ml) in Mikrotiterplatten (NUNC®, Roskilde, Dänemark) angesetzt und standardmäßig drei Tage lang bei physiologischen Bedingungen inkubiert. Als Zellkulturmedium dient dabei RPMI 1640 (GIBCO-BRL) mit Zusätzen von 25 µg/ml Gentamicinsulfat (Cambrex, B-4800, Verviers, Belgien), 10 % hitzeinaktiviertem FKS (GIBCO-BRL) und GlutaMax-1 (GIBCO-BRL).

Vor der Einsaat von 10000 Zellen pro Kavität in die Mikrotiterplatten erfolgt eine Qualitätsüberprüfung des Zellmaterials durch das Cell Counter and Analyser System[®]-1 (CASY-1), ein Zytoanalyse-Verfahren, das die Bestimmung von Verteilungskurven der Zelldurchmesser ermöglicht, mit deren Hilfe sich Zelldichte (Zellzahl/ml), Gesamtzellvolumen, mittleres Zellvolumen, Zellvoluminaverteilung und Zellgrößenveränderungen beurteilen lassen.

Ziel ist die Bestimmung der Konzentration, die eine halbmaximale Antiproliferation (GI₅₀, vgl. engl. growth inhibition) bewirkt. Die Messung erfolgt mittels CASY1-Zellanalysator (Schärfe, Reutlingen) oder durch Extinktionsmessung im Mikrotiterplatten-Reader (Sunrise, TECAN, 660 nm).

Für das erste Verfahren wird nach der Inkubation der K-562-Zellen der Inhalt jeder Mikrotiterplatten-Kavität 1 : 50 mit physiologischer Salzlösung (CASYTON, Schärfe) verdünnt und mit dem CASY1-Zellanalysator im Zelldurchmesserbereich von 0 – 30 µm analysiert.

Bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle werden mit Hilfe eines integrierten Auswerteprogramms (CASYSSTAT) Dosis-Wirkungskurven erstellt, aus denen sich u.a. die GI_{50} -Werte ablesen lassen. Die Erfassung der Proliferation der adhärennten L-929-Zellen erfolgt durch Extinktionsmessung nach vorausgehender Fixierung mit Glutaraldehyd 25 % und Färbung mit Methylenblau 0,05 % der lebenden Zellen. Ungebundener Farbstoff wird durch anschließendes Waschen entfernt. Nach Elution des gebundenen Methylenblaus mittels 0,2 ml 0,33 N-HCl wird im Mikrotiterplatten-Reader die optische Dichte (OD) aller Kavitäten gemessen. Mit Hilfe des Auswerteprogramms "Magellan" wird die GI_{50} ermittelt, indem nach Leerwertkorrektur die OD-Werte der jeweiligen Substanzkonzentration untereinander gegen den OD-Mittelwert aller Negativkontrollen verrechnet werden.

4.4.2. Test auf Zytotoxizität

Pro Mikrotiterplatten-Kavität werden 1×10^4 HeLa-Zellen (DSMZ, ACC 57) in 0,2 ml Kulturmedium RPMI 1640 (GIBCO-BRL) eingesät. Die Mikrotiterplatten werden ohne Testsubstanz standardmäßig (bei 37 °C, 5 % CO_2 und ca. 95 % relativer Luftfeuchtigkeit) 48 h unter physiologischen Bedingungen inkubiert, um subkonfluente Monolayer zu erzeugen. Danach werden die Monolayer mit Verdünnungsstufen der Testsubstanzen versetzt und 72 h lang unter physiologischen Bedingungen inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit werden nach Glutaraldehyd-Fixierung (25%) und Methylenblau-Färbung (0,05 %) die OD der einzelnen Vertiefungen aller Kavitäten der Mikrotiterplatte bei 660 nm mit einem Mikrotiterplatten-Reader (Sunrise, Tecan) gemessen und die CC_{50} sowie die CC_{10} mit Hilfe des Auswerteprogramm „Magellan“ durch Vergleich der jeweiligen OD mit dem Mittelwert der Zellkontrollen bestimmt.

Da die Vorinkubation der HeLa-Zellen bereits zur Bildung einer subkonfluenten Monolayer führt, ist die Zytolyse bei der nachfolgenden Inkubation mit der Testsubstanz für die Bewertung ausschlaggebend.

4.4.3. Test auf Radikalfängereigenschaften und antioxidative Wirkungen der Oe 9000-Derivate

4.4.3.1. Meerrettichperoxidase-Tests (HRP-Test)

Testprinzip

Der zellfreie Test erfolgte im Mikrotitermaßstab nach der Patentvorschrift von [Wyrwa et al. 2003].

Peroxidasen katalysieren die Dehydrogenierung von verschiedenen Phenolen und Endiolen mit Hilfe von H_2O_2 unter Bildung von Wasser. Die HRP ist ein Hämenzym, das neben der Peroxidase-Funktion die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu $\text{O}_2^{\cdot-}$ sowie die Bildung von $\text{HO}\cdot$ aus H_2O_2 vermittelt

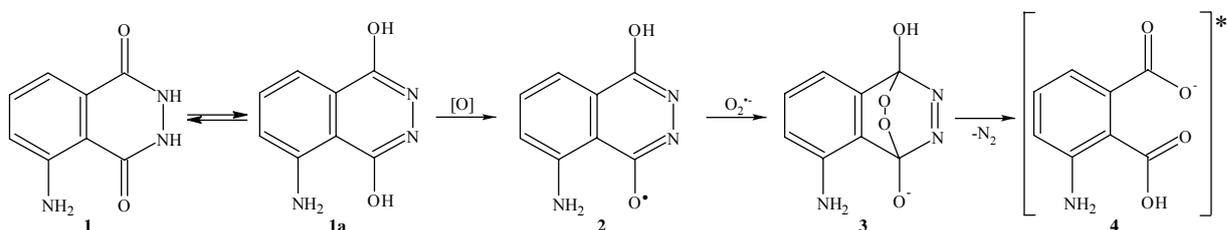


Abb. 48: Nachweis von Hyperoxid-Ionen durch Luminol (1): Das Luminol-Tautomer 1a wird durch molekularen Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid zum Luminolradikal (2) oxidiert, das mit Hyperoxid-Ionen zum Dioxetan (3) reagiert. 3 zerfällt unter Stickstoffabspaltung und Bildung der angeregten 2-Aminophthalsäure (4). Modifiziert nach Faulkner et al. 1993

[Chen und Schopfer 1999]. Die gebildeten ROS lassen sich mit Luminol chemoluminometrisch nachweisen. Die Acylhydrazidfunktion des Luminol wird dabei über verschiedene Zwischenstufen unter Bildung von molekularem Stickstoff oxidativ umgesetzt. Die Spezifität des Nachweises für einzelne ROS und der Mechanismus der Reaktionen ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Die Chemolumineszenz ist wahrscheinlich nach Reaktion des $\text{O}_2^{\cdot-}$ mit einem Luminolradikal und gefolgt Dioxetanbildung durch den Übergang von angeregter 2-Aminophthalsäure in ihren Grundzustand bedingt (Abb. 48). Die freigesetzten Photonen werden über einen Chemolumineszenzdetektor erfasst.

Die im Test verwendeten Substrate sind Wasserstoffperoxid und Sauerstoff, als Kosubstrat fungiert NADH. Substanzen, die mit Wasserstoffperoxid, Hyperoxid-Ionen oder Hydroxylradikalen vergleichsweise rasch reagieren (Antioxidantien oder Radikalfänger) oder solche, die die HRP inhibieren, mindern im Versuch daher die Ausbeute an emittierten Lichtquanten. Als Referenzantioxidans dient N-Acetyl-L-cystein ($\text{IC}_{50} = 2,5 - 5 \mu\text{g/ml}$, entspr. $15 - 30 \mu\text{M}$), das unter den gegebenen Bedingungen zum entsprechenden Disulfid oxidiert wird. Die Chemolumineszenzminderung durch die Testsubstanz wird bei gegebener Konzentration ins Verhältnis zur N-Acetyl-L-cystein-bedingten Chemolumineszenzminderung gesetzt.

Die Differenzierung zwischen Radikalfängern und Enzymhemmern gelingt über die Verfolgung der Reaktionskinetik. Während bei Radikalfängern eine lag-Phase zu beobachten ist, fehlt diese bei den Enzymhemmern. Es zeigt sich stattdessen eine über die gesamte Versuchsdauer geminderte Chemolumineszenz.

Durchführung des Meerrettichperoxidase-Tests (HRP-Test)

Zur Herstellung der Luminol-Lösung werden 4 mg Luminol (Sigma) in 100 μl DMSO gelöst und ad 10,0 ml mit PBS pH 7,4 ($352 \mu\text{M}$) aufgefüllt. Anschließend werden 50 μl Luminol-Lösung, 50 μl HRP-Lösung (0,066 IU/ml in PBS, EC 1.11.1.7, Typ VI-A aus Meerrettichperoxidase, Sigma) und

50 µl Lösung der Testsubstanz (entsprechend 0,1 µg, 1 µg oder 10 µg Substanz in PBS) oder alternativ der Referenzsubstanz (NAC-Lösung = 200 µg/ml in PBS) sowie 50 µl PBS in die Kavitäten einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Weiße Kombiplatte 8, Labsystems, Helsinki, Finnland) pipettiert. Nach ca. 1 min Wartezeit und Inkubation bei 37 °C wird einmal mit dem Mikrotiterplattenreader Labsystems Luminoskan RS gemessen. Mit einer Mehrkanalpipette startet man die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1,59 mM-Wasserstoffperoxidlösung in PBS. Es folgen sofort weitere 19 Messungen mit je 1 s Messzeit pro Kavität.

Relative Lichteinheiten (RLU) werden als Einzelwerte, Mittelwerte, Maximalwerte und graphische Kurvenverläufe ausgewertet. Der RLU-Mittelwert ohne Substanzzugabe (Luminol, HRP, H₂O₂ und PBS) wird gleich 100 % gesetzt, und die RLU-Mittelwerte der Ansätze mit den unterschiedlichen NAC- oder Testsubstanz-Konzentrationen werden auf den 100%-Wert relativiert. Die Bewertung der Scavenger-Aktivität oder der HRP-Hemmaktivität erfolgt in Abhängigkeit von der NAC-Wirkung.

4.4.3.2. Xanthinoxidase-Test

Die XOD ist ein im Purinkatabolismus involviertes zytosolisches Enzym [Wippich 2003]. Das Metalloflavoprotein katalysiert hauptsächlich in Leber und Dünndarmschleimhaut die Umsetzung des aus dem Nukleotidabbau stammenden Hypoxanthin zu Xanthin und des Xanthin zu Harnsäure. In den zwei katalytischen Zentren enthält es komplexiertes Molybdän in den Oxidationsstufen IV, V und VI sowie Fe-S-Cluster, die komplexe Elektronenübergänge vermitteln, bei denen aus molekularem Sauerstoff Hyperoxid-Ionen und Wasserstoffperoxid gebildet werden [Voet 1994]. Die Xanthinoxidase wird daher üblicherweise bei der *In-vitro*-Untersuchung von Arzneistoffen auf antioxidative Eigenschaften als Generator von Hyperoxid-Ionen eingesetzt.

Die Prüfung der Oe 9000-Derivate auf ROS-Scavenger-Eigenschaften erfolgte nach einer Vorschrift von Pierce [Pierce et al. 1995]. ROS wurden mittels Lucigenin-vermittelter CL im zellfreien Versuch detektiert.

Durchführung des XOD-Tests (nach Pierce 1995)

100 µl Lucigenin ($5 \cdot 10^{-4}$ M), 50 µl XOD (Grad III, Sigma, 0,1 IU/ml) und 50 µl Lösung der Testsubstanz (4 – 200 µg/ml) werden in Kavitäten gegeben. Nach dem Temperieren der Platte auf 37 °C über 15 min wurden die Hintergrund-Chemolumineszenz-Aufnahmen in 5-Minuten-Intervallen über 15 Minuten getätigt. Anschließend wurden jeweils 50 µl Hypoxanthin (Sigma, 10 mg/ml) zugegeben, um die Reaktion zu starten. Die Messungen wurden im 5-Minuten-Takt über insgesamt 30 min durchgeführt und die Ergebnisse als prozentuale Reduktion der Gesamt-CL, die durch die Testsubstanz nach 30 min hervorgerufen wurde, ausgedrückt.

4.4.4. Untersuchung der antibiotischen und antifungalen Wirkungen von Oe 9000 und seinen Derivaten

4.4.4.1. Test auf Wachstumsinhibierung einiger Mykobakterien

Die Testsubstanzen werden in DMSO in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und mit Methanol auf 0,4 mg/ml verdünnt. Zur Bestimmung der MHK werden von dieser Lösung ausgehend Verdünnungsreihen mit Müller-Hinton-Bouillon (Difco Laboratories, Detroit, USA) in Mikrotiterplatten (Greiner, Deutschland) hergestellt, die nach Zugabe der Mykobakterien als Inokulum eine in Halbschritten abgestufte Konzentration von 100 µg/ml bis zu 0,05 µg/ml aufweisen. Als Testorganismen werden *Mycobacterium smegmatis* SG 987, *M. vaccae* IMET 10670, *M. aurum* SB66 und *M. aurum* DSM 43536 verwendet, die aus dem hauseigenen Bestand des Hans-Knoell-Instituts (HKI) oder aus der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) stammen.

Die Mykobakterien werden zuvor als Inokulum in Test-Nährlösung (Glycerol 1 %, Fleischextrakt 0,5 %, Pankreas-verdautes Caseinpepton 0,5 %, NaCl 0,3 %, Aqua dest., pH 7,0) 48 h bei 32 °C unter Agitation wachsen gelassen. Das Inokulum wird mit McFarland Standard 0,5 (BioMerieux, Laupheim, Deutschland) eingestellt und hat eine Endkonzentration in der Mikrotiterplatte von $5 \cdot 10^5$ KBE/ml. Die Mikrotiterplatten werden nach Inokulation der Verdünnungsreihen der Testsubstanzen mit den jeweiligen Mykobakterienstämmen 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem automatischen Plattenreader Nepheloscan Ascent 1.4 (Labsystems, Vantaa, Finnland) nephelometrisch vermessen.

Die niedrigste Konzentration, bei der keine messbare Trübung auftritt, wird festgestellt und als minimale Hemmkonzentration (MHK) angegeben. Dabei wird das Wachstum in den Kavitäten mit Testsubstanz mit dem Wachstum in den Kavitäten ohne Testsubstanz verglichen. Referenzwerte (Inokulum ohne Testsubstanz und LM) und Leerwerte (ohne Inokulum) werden als Kontrollen mitgeführt.

4.4.4.2. In-vitro-Testung auf antibiotische Wirksamkeit im Agardiffusionstest

Die eingesetzten Mikroorganismen stammten z.T. aus Kultursammlungen (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) z.T. aus dem Kulturbestand des HKI (*Escherichia coli* SG 458, *Pseudomonas aeruginosa* SG 137, *Staphylococcus aureus* SG 511 B3). Die klinischen Isolate *S. aureus* 134/94 und *Enterococcus faecalis* 1528 wurden freundlicherweise von W. Witte (Robert Koch-Institut, Werningerode) zur Verfügung gestellt. *P. aeruginosa* K799/61 wurde von Zimmermann et al. [1980] charakterisiert. Außerdem wurden Kulturen von *Sporobolomyces salmonicolor* 549 H4, *Candida albicans* H8 BMSJ 212 und *Penicillium notatum* JP 36 P12 verwendet.

Nach dem Suspendieren von 10^5 KBE/ml Testorganismen in geschmolzenem und temperiertem Müller-Hinton-Medium (Difco) wurden die Kulturplatten gegossen. Nach der Erstarrung des

Agarmediums in Petrischalen wurden Kavitäten von 9 mm Durchmesser ausgeschnitten und jeweils mit 50 µl der Probenlösung (100 µg/ml) gefüllt. Die Größe der Hemmhöfe wurde nach 18stündiger Inkubation bei 37 °C vermessen.

4.5. Biophysikalische Untersuchungsverfahren

4.5.1. Patch-Clamp-Untersuchungen

Die Biophysikalische Charakterisierung des Na_v-Kanal-Angriffs durch Oe 9000-HCl wurde in *Patch-Clamp*-Untersuchungen an Hinterhornanglienzellen der Ratte vorgenommen.

4.5.1.1. Gewinnung der Primärzellen

Adulte männliche HAN:Wistar-Ratten im Alter von 60 Tagen wurden mit Ether getötet. DRG-Zellen wurden von allen Rückenmarkssegmenten befreit. Die Zellen wurden bei 37 °C mit in Hams F-12-Medium (Sigma, Deisenhofen) gelöster Kollagenase Typ II (215 IU/ml, GibcoBRL, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen) über 100 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4, GibcoBRL) wurden die DRG-Zellen über 11 min bei 37 °C in 10000 IU/ml Trypsin-haltigem (Sigma) DMEM (Sigma) inkubiert. Anschließend wurden die Ganglien durch leichte Bewegung und durch Aufziehen durch eine polierte Pasteurpipette voneinander zu einzelnen Zellen getrennt. Die dispergierten Zellen wurden zentrifugiert (500 x g, 5 min), dreimal mit DMEM gewaschen und erneut zentrifugiert. In der Standardkultur wurden die neuronalen Pellets in Hams F-12-Medium, das 10⁻³ M L-Glutamin (Sigma), 10 % Hitze-inaktiviertes Pferdeserum (GibcoBRL), 100 IU/ml Penicillin (GibcoBRL), 100 µg/ml Streptomycin (GibcoBRL) und 10 ng/ml Nervenwachstumsfaktor (NGF 7S, Böhringer Mannheim GmbH, 68298, Mannheim) enthielt, suspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, in Hams F-12-Medium (mit L-Glutamin, inaktiviertem Pferdeserum, Penicillin, Streptomycin, NGF, s.o.) resuspendiert und dann auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 13 mm verteilt (1 – 1,5 Ganglien/Deckgläschen), die zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet worden waren (50 µg/ml, Sigma). Die Neuronen wurden bei 37 °C in angefeuchteter und mit 3,5 oder 5 % CO₂ angereicherter Luft gehalten. Die Kulturen wurden täglich mit Hams F-12-Medium versehen.

4.5.1.2. Ganzzell-Patch-Clamp-Messungen

Ströme von DRG-Neuronen wurden bei Raumtemperatur mit der *Ganzzell-Patch-Clamp*-Technik (Axopatch 200B Amplifier, Axon Instruments, USA) gemessen. Elektrodenspitzen (1,0 – 3,0 MΩ) wurden aus Kapillarglas ($\varnothing_{\text{außen}} = 1,7$ mm, Kimax, Vineland, USA) mit Hilfe des Sutter-P-97-Mikroelektrodenziehers hergestellt. Die Lösung in der Messpipette enthielt 140 mM CsCl, 10 mM

NaCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, 2 mM Na₂-ATP, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,2. Spannungspulse wurden über die pCLAM 7.01 Software (Axon Instruments, USA) gesteuert. Hochfrequentes Rauschen (> 5 kHz) wurde durch den Einsatz verschiedener Filter eliminiert. Außerdem wurden alle Signale mit einem analogen 4-Pol-Besselfilter gefiltert und mit dem Interface Digidata 1200, Axon Instruments, USA digitalisiert (5 kHz). Der Spannungsabfall am Serienwiderstand wurde über den Verstärkerstromkreis minimiert (Kompensation 75 – 85 %). Vor der Messung wurde sichergestellt, dass der Serienwiderstand größer als der Pipettenwiderstand, aber kleiner als der dreifache Pipettenwiderstand war. Für Präsentationszwecke wurden Daten mit einem 500 oder 250 Hz-Gauss-Filter behandelt.

Die Messungen erfolgten mit DRG-Zellen, die zuvor 12 – 48 h in Kultur gehalten worden waren. Deckgläschen mit Zellen wurden in die Messkammer überführt. Die Messkammer war auf einem inversen Zeiss-Mikroskop angebracht. Die Zellen wurden kontinuierlich mit Standard-HEPES-Puffer folgender Zusammensetzung gespült: 35 mM NaCl, 72,5 mM Cholinchlorid, 5 mM KCl, 30 mM Tetraethylammoniumchlorid, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM CdCl₂, 10 mM Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,4. Cd²⁺-Ionen und Tetraethylammoniumchlorid wurden zugesetzt, um Ca²⁺- bzw. K⁺-Ströme zu blocken. 500 nM TTX wurden zugefügt, um TTX-s Na⁺-Ströme zu blocken.

Wurde Oe 9000-HCl getestet, wurde der Standard-HEPES-Puffer durch Oe 9000-haltigen HEPES-Puffer ersetzt. Oe 9000-HCl wurde in bidestilliertem H₂O gelöst und dann zu HEPES-Puffer gegeben.

4.5.1.3. Aufnahme der Ströme

Ein Standard-*Voltage-Clamp*-Protokoll wurde genutzt, um Vergleichbarkeit von Daten, die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen erhalten worden waren, zu gewährleisten. Ganzzell-Einstellungen wurden vorgenommen, nachdem ein festes Seal (> 2 GΩ) erhalten und die Pipettenkapazität mit dem Verstärkerstromkreis kompensiert worden war. Zu Beginn wurde das Ruhemembranpotential im *Current-Clamp*-Modus gemessen. Nach dem Umschalten in den *Voltage-Clamp*-Modus wurden Na⁺-Ströme beim Anlegen verschiedener Spannungsstufen aufgenommen. Ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV wurden die Neuronen mit in 5 mV-Schritten steigenden Spannungspulsen auf +45 mV depolarisiert und die Stromstärken im Zeitintervall von 50 ms gemessen. Das Intervall zwischen den Pulsen betrug 2 s.

Bevor die Wirkung von Oe 9000 auf TTX-r Na⁺-Ströme geprüft wurde, wurden die Neuronen zunächst in HEPES-Puffer untersucht. Das *Voltage-Clamp*-Protokoll wurde mehrfach angewendet, um sicherzustellen, dass die Aufnahmebedingungen stabil waren. Anschließend wurde der Puffer durch eine Oe 9000-Lösung (0,5 – 50 μM in HEPES-Puffer) ersetzt und das Spannungsprotokoll etwa alle 2 min angewendet. Am Schluss wurde wieder zu HEPES-Puffer-Lösung umgeschaltet und das Wiederkehren der Na⁺-Ströme untersucht.

4.5.1.4. Datenanalyse

Die Daten wurde mit Hilfe der pCLAMP 7.01-Software (Axon Instruments, USA) und Origin 6.1-Software (Microcal Software Northampton) analysiert. Die Stromdichten wurden errechnet durch Dividieren des Spitzenstroms (I_{Spitze}), welcher bei gegebenem Membranpotential (V_m) ausgelöst wurde, durch die Zellkapazität (C_m). Die Membranleitfähigkeit (G) für jedes Potential wurde aus dem zugehörigen Spitzenstrom durch Gebrauch der Gleichung $G = I / (E - E_{\text{Rev}})$ errechnet (I = Spitzenstromamplitude; E = Membranpotential; E_{Rev} = Umkehrpotential des Na^+ -Stroms). Normalisierte Spitzenmembranleitfähigkeit (G/G_{max}) und die Daten, die den relativen Abfall des Spitzenstromes während der Gleichgewichts-Inaktivierung (I/I_{max}) beschreiben, wurden mit einer Boltzmannfunktion angepasst (I/I_{max} oder $G/G_{\text{max}} = [1 + \exp(V_{1/2} - V_m/k)]^{-1}$, wobei $V_{1/2}$ das Membranpotential ist, das halbmaximale Ströme oder Leitfähigkeit hervorruft. V_m ist das Vorpuls-Membranpotential und k ist der Neigungsfaktor der Funktion. Zeitkonstanten für Aktivierung und Inaktivierung wurden durch Anpassen der Aktivierungs- und Inaktivierungsphase der TTX-r Na^+ -Ströme mit einer einfachen Exponentialfunktion erhalten. Alle angegebenen Daten sind als Durchschnitte \pm Standardfehler zu verstehen. n = Zahl der getesteten Zellen. Signifikanz wurde für $P < 0,05$ angenommen.

Für die Darstellung der I-V-Kurven wurden die durchschnittlichen Spitzenströme für jede Spannung genutzt. Die Größe der Neuronen wurde aus den Kapazitäten unter Zugrundelegung der spezifischen Membrankapazität von $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ errechnet.

4.5.2. Charakterisierung der oberflächenaktiven Eigenschaften einiger Verbindungen mittels Wilhelmy-Platten-Methode

Bei der Wilhelmy-Platten-Methode wird das die zu analysierende Lösung enthaltende Untersuchungsgefäß angehoben, bis die Unterkante des Platinplättchens in Kontakt mit der Flüssigkeit kommt, dabei benetzt wird und die Platte in die Lösung zieht. Hierbei wird zunächst die resultierende Gesamtkraft als vektorielle Summe der nur an der Flüssigkeitsoberfläche wirkenden Wilhelmy-Kraft und der von der Eintauchtiefe abhängigen Auftriebskraft erfasst. Die an einer Feinwaage aufgehängte Platte wird wieder exakt auf Niveau der Oberfläche zurückgezogen und daraus resultierend nur die Wilhelmy-Kraft gemessen. Die Oberflächenspannung berechnet sich nach folgender Formel:

$$\gamma = \frac{F}{L \cos \theta}$$

γ	Oberflächenspannung
F	die auf die Waage wirkende Gesamtkraft
L	Länge der benetzten Platte
θ	Kontaktwinkel

$$F = F_w + F_a$$

F_w	Wilhelmy-Kraft
F_a	Auftriebskraft

Die Platte besteht aus angerautem Platin und wird in sauberem Zustand optimal benetzt, sodass der Kontaktwinkel θ nahe 0 ist. Der Term $\cos\theta$ entspricht etwa 1. In die Berechnungen gehen daher nur die gemessene Kraft und die Länge des Plättchens ein.

4.5.2.1. Herstellung der Phosphatpufferlösung pH 7,4 (0,05 M):

NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O (HPLC- <i>grade</i> , VWR, Darmstadt)	0,142 g
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O (p.A., VWR, Darmstadt)	0,707 g
Natriumchlorid (reinst, Merck, Darmstadt)	0,519 g

Die Substanzen wurden in 100,0 ml ultrafiltriertem Wasser (Direct-Q™ S, Millipore, Billerica, USA) gelöst und der pH-Wert wurde auf pH 7,4 ggf. mit H₃PO₄ (85%, p.A., VWR, Darmstadt) eingestellt.

4.5.2.2. Durchführung der Messungen

Die Oberflächenspannung γ wurde im Konzentrationsbereich der Testsubstanzen von 0,2 – 66,5 $\mu\text{g/ml}$ mit Hilfe des halbautomatischen Tensiometers Krüss K12 im kleinen Untersuchungsgefäß ($\varnothing = 44,5$ mm, Höhe = 28,0 mm, Mindestfüllvolumen $V = 11$ ml) unter Verwendung eines angerauten Platinplättchen bestimmt (Abmessungen $L \times B \times H = 19.9 \times 0.2 \times 10$ mm). Es wurden jeweils 3fach-Bestimmungen durchgeführt. Eine Messung umfasste den Mittelwert aus 10 im 10-s-Takt aufgenommenen Einzelmesswerten. Vor jeder Messreihe wurde das Plättchen sorgfältig gespült und vorsichtig gegläht. Die Messungen erfolgten in der mittels Wasserbad (Julabo F25, HC) temperierten Messzelle bei $25,0 \pm 0,5$ °C. Es wurden jeweils 12 ml der Phosphatpufferlösung pH 7,4 (0,05 M) vorgelegt und unter Rühren schrittweise die mind. 1 h zuvor hergestellte Stammlösung der Testsubstanz (10 mg /ml in DMSO, *gradient grade*, Fisher Scientific, Loughborough, UK) mit einer Hamilton®-Spritze zugegeben. Zur Herstellung der OeDimer-SL wurde dem DMSO 4 mM Salzsäure zugesetzt (1 ml HCl + 15 ml DMSO). Vor jeder Messung wurde 10 min unter Rühren temperiert bzw. äquilibriert. Zur Messung wurde der Rührer abgestellt. Der Anteil von DMSO in der gepufferten Lösung überstieg 0,5 % (m/m) nicht. In dieser Konzentration hat DMSO keinen messbaren Einfluss auf die Oberflächenspannung der Lösung. Die Daten wurden mit der Software „Laboratory Desktop 2.5.0.2305“ ausgewertet.

5. Zusammenfassung

Seit der Synthese des Fomocain vor 50 Jahren gab es kontinuierlich Bestrebungen, dessen Molekülstruktur zu derivatisieren um Lokalanästhetika mit günstigeren physikochemischen Eigenschaften und erhöhter lokalanästhetischer Wirkpotenz zu erhalten. In umfangreichen pharmakologisch-toxikologischen Prüfungen von weit über 100 Fomocain-Derivaten fiel dabei das relativ gut wasserlösliche Diethanolamin-Derivat Oe 9000 als lang und potent wirkendes Oberflächen- und Leitungsanästhetikum auf. Wegen seines ausgezeichneten Wirkungs-Toxizitäts-Profiles hob es sich im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz (topisch oder systemisch appliziert) von anderen Fomocain-Abkömmlingen positiv ab.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Metabolisierung des Oe 9000 in verschiedenen *In-vitro*-Biotransformationsmodellen und eine erste pharmakologisch-toxikologische Charakterisierung der gebildeten Phase-I-Metaboliten. Außerdem wurde im letzten Teil der Arbeit die Inhibition von spannungsabhängigen Na^+ -Strömen an Nervenzellen untersucht und damit ein Beitrag zur Klärung des Wirkmechanismus auf molekularer Ebene geleistet.

Die *In-vitro*-Untersuchungen zur Oe 9000-Metabolisierung erfolgten in Inkubationsversuchen mit Homogenaten aus Schweineleber und mit Präzisionsleberschnitten von Ratte und Mensch.

Um die hierzu benötigten analytischen Methoden entwickeln zu können, wurden zunächst zahlreiche Phase-I-Metaboliten postuliert und synthetisiert. Bei den Synthesen dieser neuartigen Referenzsubstanzen konnte häufig auf bewährte Syntheseverfahren zurückgegriffen werden. Die Verbindungen wurden intensiv spektroskopisch und massenspektrometrisch charakterisiert und ihre Reinheit hplc und gc geprüft.

Die inkubierten Proben wurden zunächst mittels RP-HPLC mit UV-Detektion analysiert. Die meisten Verbindungen konnten mit einem Gradienten von AN in wässriger TFA (0,1 %, V/V) in Anwesenheit des Ionenpaarreagenzes Na^+ -octylsulfonat (1 mM) getrennt werden. Eine Alternative stellte die isokratische Trennung der Verbindungen auf einer alkalistabilen RP-Säule mit AN in wässrigem Ammoniumcarbonat-Puffer pH 9,9 dar. In diesem Fließmittel lagen zahlreiche Verbindungen in einer anderen Protonierungsstufe vor, so dass sich große Unterschiede im Retentionsverhalten gegenüber der ersten Methode ergaben. Generell waren Trennungen, die sich mit einer Methode als schwierig erwiesen, mit der jeweils anderen Methode problemlos zu erzielen.

Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte zunächst durch Koinjektionen von Referenzsubstanzen oder durch Vergleich der Retentionszeiten von Probe und Referenz in aufeinander folgenden HPLC-Läufen. Zusätzlich wurde Online-MS-Detektion durchgeführt. Im positiven Modus konnten alle N-haltigen Metaboliten anhand ihrer $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ionen nachgewiesen werden. Im alkalischen Fließmittel ließen sich die Säuren anhand ihrer $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ionen beobachten. Der Neutralstoff POMPuOH bildete mit keiner der beschriebenen Methoden detektierbare Ionen. Ein wichtiges Identitätsmerkmal war

außerdem den Online-UV-Spektren zu entnehmen, denn sie vermochten Aufschluss über den Ort der metabolischen Veränderung im Molekül zu geben.

Die Quantifizierung der Abbauprodukte erfolgte mittels HPLC. Die Methoden wurden mit Hilfe der speziell synthetisierten Referenzsubstanzen validiert. Gute Linearität und Wiederholpräzision wurden für Oe 9000 und seine Metaboliten nachgewiesen.

Nach Inkubationen von $10000 \times g$ -Überständen aus Schweinelebern mit Oe 9000 wurden jeweils 6 Metaboliten identifiziert. Die quantitativ wichtigsten Biotransformationsreaktionen waren die N-Oxidation der Muttersubstanz, die Oe 9000-N-oxid hervorbrachte, und die oxidative Desaminierung, die nach gefolgter Redoxreaktion des intermediär anzunehmenden Aldehyds zu POMPBA und POMPBUOH führte. Daneben traten die am *exo*-Zyklus in 4-Stellung oxygenierten Verbindungen 4-OH-Oe 9000 und dessen N-Oxid 4-OH-Oe 9000-N-oxid sowie POMPBA_mEt, das Produkt einer oxidativen Desalkylierung, auf. Dieselben Metaboliten wurden erhalten, wenn mit Schweinelebermikrosomen umgesetzt wurde.

Nach Inkubation von Rattenleberschnitten wurde das Auftreten von 5 Phase-I-Metaboliten beobachtet. Die beim Schwein quantitativ so bedeutsame oxidative Desaminierung trat bei der Ratte gänzlich zurück. Stattdessen entstand durch Oxidation einer alkoholischen Hydroxylfunktion zur entsprechenden Carbonsäure der Metabolit Oe 9000-Säure. Wie auch beim Schwein wurden die Metaboliten Oe 9000-N-oxid und die 4-oxygenierten Derivate identifiziert. Die beim Fomocain vielfach beschriebene oxidative Dearylierung war beim Oe 9000 nur von untergeordneter Bedeutung. Das hieraus resultierende Phenol war nur in Spuren zu finden.

Die Präzisionsleberschnitte eigneten sich ferner zum Studium der Phase-II-Reaktionen. Anhand von Spaltungsversuchen mit Glucuronidasen und Sulfatasen wurde die Bildung von Phase-II-Metaboliten des Oe 9000, vor allem nach dessen 4-Oxygenierung, nachgewiesen. Da es sich hierbei nur um indirekte Nachweisverfahren handelte, waren keine gesicherten Aussagen zur Struktur der Phase-II-Metaboliten zu treffen.

In einem Ganztiersversuch an Ratten wurde nach i.p. Oe 9000-Applikation gezeigt, dass die im *In-vitro*-Versuch gefundenen Metaboliten tatsächlich auch *in vivo* gebildet und ausgeschieden werden. Alle Phase-I-Metaboliten, die mit Rattenleberschnitten gefunden wurden (mit Ausnahme des nur in Spuren aufgetretenen Phenols) waren in den separat und in Fraktionen gesammelten Exkrementen nachweisbar. Das Auftreten der Muttersubstanz und der Metaboliten wurde nur innerhalb der ersten 48 h beobachtet. Auch das Glucuronid des 4-OH-Oe 9000 wurde nachgewiesen.

Wie verläuft die Oe 9000-Metabolisierung beim Menschen, und welches Modelltier spiegelt diese am besten wider? Antwort gaben die Inkubationen von menschlichen Leberschnitten mit Oe 9000. Da nur Leber von einer Patientin für die Untersuchung zur Verfügung stand, kann kein Anspruch auf Allgemeingültigkeit abgeleitet werden, allerdings zeigten die Versuche, dass sowohl oxidative Desaminierung – analog der Metabolisierung beim Schwein – als auch Bildung von Oe 9000-Säure,

vergleichbar mit der Situation bei der Ratte, stattfanden. Zusätzlich waren die Metaboliten Oe 9000-N-oxid und 4-OH-Oe 9000, die beiden Spezies gemeinsam waren, auch beim Menschen zu identifizieren. Die Inkubation humaner Präzisionsleberschnitte brachte keine Metaboliten hervor, die nicht in einer der genannten Spezies aufgetreten waren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich Ratte und Schwein komplementär in ihrer Oe 9000-Metabolisierung im Hinblick auf eine Ergebnisextrapolation auf den Menschen verhalten.

Bei der Prüfung der Substanzen auf Zytotoxizität an HeLa-Zellen erwiesen sich Oe 9000 und der Metabolit POMPBA_mEt mit CC₅₀-Werten von 20,3 bzw. 19,4 µmol/l nur wenig stärker zytotoxisch als Fomocain (CC₅₀ = 30,3 µmol/l). Die Biotransformation ging in diesem *In-vitro*-Experiment bei allen weiteren Metaboliten mit einer Detoxifizierung einher. Durch Einbeziehung neuer strukturverwandter Oe 9000-Derivate in die Untersuchungen, ließ sich der Einfluss der Substitution am *exo*-Zyklus, der Stickstoffbasizität oder auch der N-Oxidation auf die Zytotoxizität ableiten. Die Zytotoxizität beruht vermutlich auch auf den hohen Oberflächenaktivitäten der Verbindungen, die zu Membranstörungen führen könnten. Obwohl die Zytotoxizität der Fomocaine deutlich stärker ins Gewicht fällt als bei Tetracain oder Lidocain ist ihre Gesamtttoxizität vergleichsweise gering. Ferner gab es für keine der geprüften Verbindungen einen Anhalt für zytostatisches Verhalten.

Oe 9000 und seine Metaboliten wiesen in zellfreien Systemen – mit Ausnahme der Phenole – keine nennenswerten antioxidativen Eigenschaften auf. Auch gegenüber den meisten Mikroorganismen verhielten sie sich im Konzentrationsbereich von 1 – 50 µg/ml indifferent. Aus der Reihe der getesteten Oe 9000-Derivate fiel allerdings die stark antibakterielle Wirkung des OeDimer und des POMPBA_m gegenüber verschiedenen Mykobakterien-Arten auf.

Da bisher keine gesicherten Erkenntnisse über den Wirkmechanismus des Oe 9000 auf molekularer Ebene bestanden, wurde die Arbeit durch eine *Patch-Clamp*-Studie an Hinterwurzelganglienzellen der Ratte abgerundet und damit die Wirkung an spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen charakterisiert.

Oe 9000 stellte sich mit einer IC₅₀ von 5 – 10 µmol/l als hochpotenter Inhibitor TTX-resistenter Na⁺-Ionenströme (vor allem des Na_v1.8-Kanals) heraus (vgl. Procain: IC₅₀ = 518 µmol/l, Bräu et al. 1998). Seine dosisabhängige und reversible Wirkung setzte bereits im submikromolaren Konzentrationsbereich ein und war deutlich von der Frequenz der vorgegebenen Spannungspulse abhängig (sog. *use dependence*).

Diese Ergebnisse am spannungsabhängigen Na⁺-Kanal erklären und erweitern die von Fleck et al. [2003] angestellten Beobachtungen zu den oberflächen- und leitungsanästhetischen Wirkungen des Oe 9000 und belegen, dass dieses Lokalanästhetikum zu den potentesten bekannten Fomocainen gehört und ein viel versprechender Kandidat zur Erschließung neuer Therapiegebiete sowie zur Entwicklung neuer Applikationsformen für eine erfolgreiche Kupierung des Schmerzes ist.

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AN	Acetonitril
AP	Aktionspotential
arom.	aromatisch
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
C.	Candida
CC ₅₀ , CC ₁₀	cytotoxic concentration 50 bzw. 10
CL	Chemolumineszenz
COSY	Correlated Spectroscopy
CYP	Cytochrom P450
d	Dublett
dd	Doppeldublett
DC, dc	Dünnschichtchromatographie, dünn-schichtchromatographisch
Def.	Deformationsschwingung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSZM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
d. Th.	der Theorie
E.	Escherichia
ECOD	7-Ethoxycumarin-O-Deethylierung
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EKG	Elektrokardiogramm
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylierung
ESI	Elektrospray-Ionisation
FKS	fetales Kälberserum
FM	Fließmittel
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-(Spektroskopie)
GC, gc	Gaschromatographie, gaschromatographisch
H.	Helix pomatia
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HKI	Hans-Knöll-Institut
HPLC, hplc	Hochdruckflüssigchromatographie, mittels HPLC
HRP	Meerrettichperoxidase

i.p.	intraperitoneal
IS	interner Standard
IU	International units
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Kopplungskonstante
KBE	Koloniebildende Einheit
Konz.	Konzentration
KM	Körpermasse
Na _v -Kanal	spannungsabhängiger Natriumionenkanal
LA	Lokalanästhetikum, -a
LD ₅₀	Letale Dosis 50
LM	Lösungsmittel
m	Multiplett
M.	Mycobacterium
MeOH	Methanol
MHK	minimale Hemmkonzentration
MS	Massenspektrometrie
MTOAC	Methyltrioctylammoniumchlorid
n	Anzahl
NCCLS	national committee on clinical laboratory standards
NAC	N-Acetyl-L-cystein
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD	optische Dichte
p.A.	pro analysi
P.	Pseudomonas
PABA	para-Aminobenzoesäure (4-Aminobenzoesäure)
PBS	Phosphatpufferlösung
PEB	Plasmaeiweißbindung
PNS	peripheres Nervensystem
ppm	parts per million
PROD	Pentoxyresorufin-O-Depentylierung
quint	Quintett
rel. Int.	relative Intensität
Rf	retention factor
RLU	relative light units
RP	Umkehrphase

RPMI 1640	am Rosewell Park Memorial Institut entwickeltes Zellkulturmedium
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RV	Rotationsverdampfer
s	Singulett
S.	Staphylococcus
SC, sc	Säulenchromatographie, säulenchromatographisch
Schmp.	Schmelzpunkt
SL	Stammlösung
t	Triplett
$t_{1/2}$	Plasmahalbwertszeit
TFA	Trifluoressigsäure
TMS	Trimethylsilyl- bzw. trimethylsilyliert
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
TTX-r	Tetrodotoxin-resistent
TTX-s	Tetrodotoxin-sensitiv
U	Umdrehungen
USP	United States Pharmacopeia
Val.	Valenzschwingung
XOD	Xanthinoxidase
ZNS	Zentralnervensystem

Literaturverzeichnis

Abe I, Kamaya H, Ueda I (1988) *Activated carbon as a biological model: comparison between activated carbon adsorption and oil-water partition coefficient for drug activity correlation.* Journal of Pharmaceutical Sciences 77(2): 166-8.

Åkerman SBA (1975) *Surface anesthetic properties of the new local anesthetic amide etidocaine (Duranest). Laboratory evaluation.* British Journal of Anaesthesia 47(9): 923-7.

Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, Smith A, Kerr BJ, McMahon SB, Boyce S, Hill R, Stanfa LC, Dickenson AH, Wood JN (1999) *The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways.* Nature Neuroscience 2(6): 541-48.

Albright GA (1979) *Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine or bupivacaine.* Anesthesiology 51(4): 285-7.

Al-Omar MA, El-Subbagh HI, Beedham C, Smith J (2005) *Role of molybdenum hydroxylases in diseases.* Saudi Pharmaceutical Journal 13(1): 1-13.

Amiel H, Koch PS (2007) *Tetracaine hydrochloride 0.5% versus lidocaine 2% jelly as a topical anesthetic agent in cataract surgery - comparative clinical trial.* Journal of cataract and refractive surgery 33(1): 98-100.

Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2003) *Cytochromes P450: how to study their structure and function and which animal model to choose.* Nova Acta Leopoldina 87(329): 11-20.

Arakawa M, Aoyama Y, Ohe Y (2003) *Block of the sacral segments in lumbar epidural anaesthesia.* British Journal of Anaesthesia 90(2): 173-8.

Aratono M, Uryu S, Hayami Y, Motomura K, Matuura R (1984) *Phase transition in the adsorbed films at water/air interface.* Journal of Colloid and Interface Science 98(1): 33-8.

Arias HR, Blanton MP (2002) *Molecular and physicochemical aspects of local anesthetics acting on nicotinic acetylcholine receptor-containing membranes.* Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 2(4): 385-410.

Arias HR, Bhumireddy P (2005) *Anesthetics as chemical tools to study the structure and function of nicotinic acetylcholine receptors.* Current Protein and Peptide Science 6(5): 451-72.

Arthur GR (1987) *Pharmacokinetics of local anesthetics.* Handbook of Experimental Pharmacology 81(Local Anesth.): 165-86.

Atanassoff PG, Weiss BM, Brull SJ, Horst A, Kulling D, Stein R, Theiler I (1996) *Compound motor action potential recording distinguishes differential onset of motor block of the obturator nerve in response to etidocaine or bupivacaine.* Anesthesia and analgesia 82(2): 317-20.

Axelsson K, Nydahl PA, Philipson L, Larsson P (1989) *Motor and sensory blockade after epidural injection of mepivacaine, bupivacaine, and etidocaine - a double-blind study.* Anesthesia & Analgesia 69(6): 739-47.

Aydin ON, Eyigor M, Aydin N (2001) *Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anaesthetics.* European journal of anaesthesiology 18(10): 687-94.

Bacsik CJ, Swift JQ, Hargreaves KM (1995) *Toxic systemic reactions of bupivacaine and etidocaine.* Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 79(1): 18-23.

Bader AM, Concepcion M, Hurley RJ, Arthur GR (1988) *Comparison of lidocaine and prilocaine for intravenous regional anesthesia.* *Anesthesiology* 69(3): 409-12.

Bardsley H, Gristwood R, Baker H, Watson N, Nimmo W (1998) *A comparison of the cardiovascular effects of levobupivacaine and rac-bupivacaine following intravenous administration to healthy volunteers.* *British Journal of Clinical Pharmacology* 46(3): 245-9.

Bartfield JM, Holmes TJ, Raccio-Robak N (1994) *A comparison of proparacaine and tetracaine eye anesthetics.* *Academic emergency medicine* 1(4): 364-7.

Baumgart M und Natura G (2007) persönliche Mitteilung.

Bazaz BSF, Salt WG (1983) *Local anesthetics as antimicrobial agents: structure-action considerations.* *Microbios* 37(147): 45-64.

Beedham C (1997) *The role of non-P450 enzymes in drug oxidation.* *Pharmacy World & Science* 19(6): 255-263.

BfArM (2003): *Löschungsliste von Arzneimitteln (Ende der Verkehrsfähigkeit am 30. 06. 2003)*
<http://www.bkhd.de/files/Loeschliste-20030630.pdf>

Black JA, Cummins TR, Yoshimura N, de Groat WC, Waxman SG (2003) *Tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8/SNS and Nav1.9/NaN in afferent neurons innervating urinary bladder in control and spinal cord injured rats.* *Brain Research* 963(1,2): 132-138.

Blum A, Volkenandt M (2002) *Skin cancer.* *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946) 127(33): 1679-81.

Blume H, Oelschläger H (1978) *Drug metabolism by rat liver mitochondria.* *Arzneimittel-Forschung* 28(6): 956-60.

Blume H, Oelschläger H (1981) *Biotransformation of the local anesthetic fomocaine by rat liver mitochondria.* *Arzneimittel-Forschung* 31(10): 1731-5.

Bokesch PM, Post C, Strichartz G (1986) *Structure-activity relationship of lidocaine homologs producing tonic and frequency-dependent impulse blockade in nerve.* *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 237(3): 773-81.

Boljka M, Kolar G, Vidensek J (1994) *Toxic side effects of local anaesthetics on the human cornea.* *The British journal of ophthalmology* 78(5): 386-9.

Bräu ME, Elliott JR (1998) *Local anaesthetic effects on tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents in rat dorsal root ganglion neurones.* *European journal of anaesthesiology* 15(1): 80-8.

Bräu ME, Branitzki P, Olschewski A, Vogel W, Hempelmann G (2000) *Block of neuronal tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents by stereoisomers of piperidine local anesthetics.* *Anesthesia & Analgesia (Baltimore)* 91(6): 1499-1505.

Bräu ME, Dreimann M, Olschewski A, Vogel W, Hempelmann G (2001) *Effect of drugs used for neuropathic pain management on tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents in rat sensory neurons.* *Anesthesiology* 94(1): 137-44.

Bräunig B, Busch AE, Mutschler E, Wess J, Oelschläger H (1989) *Antiarrhythmic activity of the local anesthetic fomocaine and some of its analogs.* *Arzneimittel-Forschung* 39(11): 1436-9.

- Breitmaier E (2005)** *Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen*. 3. Aufl. 2005. Houston, Texas, Tübingen, Bonn. Weinheim: Wiley-VCH.
- Brewitt H, Bonatz E, Honegger H (1980)** *Morphological changes of the corneal epithelium after application of topical anesthetic ointments*. *Ophthalmologica* 180(4): 198-206.
- Bryant MS, Simmons HF, Harrell RE, Hinson JA (1994)** *2,6-Dimethylaniline-hemoglobin adducts from lidocaine in humans*. *Carcinogenesis* 15(10): 2287-90.
- Büch HP, Rummel W (1996)** *Lokalanästhetika*. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Hrsg.: W. Rummel, Spektrum Akad., Heidelberg, 7. Auflage: 227 - 33
- Burm AGL, Van Kleef JW, Gladines MPRR, Olthof G, Spierdijk J (1986)** *Epidural anesthesia with lidocaine and bupivacaine: effects of epinephrine on the plasma concentration profiles*. *Anesthesia & Analgesia* 65(12): 1281-4.
- Burmester MD, Schlüter KD, Daut J, Hanley PJ (2005)** *Enantioselective Actions of Bupivacaine and Ropivacaine on Coronary Vascular Resistance at Cardiotoxic Concentrations*. *Anesthesia & Analgesia* 100(3): 707-12.
- Butterworth JF, Strichartz GR (1990)** *Molecular mechanisms of local anesthesia: a review*. *Anesthesiology* 72(4): 711-34.
- Buxton ILO (2006)** *Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution, metabolism, and elimination*. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (Hrsg.) Goodman & Gilman's the Pharmacological basis of therapeutics, 11. Ausg., New York u.a., McGraw-Hill, 1-40.
- Byrne MF, Mitchell RM, Gerke H, Goller S, Stiffler HL, Golioto M, Branch MS, Jowell PS, Baillie J (2004)** *The need for caution with topical anesthesia during endoscopic procedures, as liberal use may result in methemoglobinemia*. *Journal of clinical gastroenterology* 38(3): 225-9.
- Calnan CD (1980)** *Allergy to the local anaesthetic dipiperodon*. *Contact dermatitis* 6(5): 367.
- Casati A, Putzu M (2005)** *Bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine: are they clinically different?* *Best Practice & Research, Clinical Anaesthesiology* 19(2): 247-68.
- Cashman JR (2000)** *Human flavin-containing monooxygenase: substrate specificity and role in drug metabolism*. *Current Drug Metabolism* 1(2): 181-91.
- Cashman JR (2002)** *Human flavin-containing monooxygenase (form 3): Polymorphisms and variations in chemical metabolism*. *Pharmacogenomics* 3(3): 325-39.
- Cashman JR, Zhang J (2002)** *Interindividual differences of human flavin-containing monooxygenase 3: Genetic polymorphisms and functional variation*. *Drug Metabolism and Disposition* 30(10): 1043-52.
- Catterall WA (1999)** *Molecular properties of brain sodium channels: an important target for anticonvulsant drugs*. *Advances in neurology* 79: 441-56.
- Catterall WA (2000)** *From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels*. *Neuron* 26(1): 13-25.
- Catterall WA, Mackie K (2006)** *Local anesthetics*. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (Hrsg.) Goodman & Gilman's the Pharmacological basis of therapeutics, 11. Ausg., New York u.a., McGraw-Hill: 1-40

- Cederholm I, Aakerman B, Evers H (1994)** *Local analgesic and vascular effects of intradermal ropivacaine and bupivacaine in various concentrations with and without addition of adrenaline in man.* Acta Anaesthesiologica Scandinavica 38(4): 322-7.
- Challapalli V, Tremont-Lukats IW, McNicol ED, Lau J, Carr DB (2005)** *Systemic administration of local anesthetic agents to relieve neuropathic pain.* Cochrane database of systematic reviews (Online) (4): CD003345.
- Chambon-Mougenot R, Riote M, Bringuier J, Chambon P (1970)** *In vivo and in vitro study of intestinal and hepatic N - oxidation of N,N -diethylnicotinamide (Coramine).* Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales 164(4): 856-60.
- Chen SX, Schopfer P (1999)** *Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase.* European Journal of Biochemistry 260(3): 726-35.
- Clare JJ, Tate SN, Nobbs M, Romanos MA (2000)** *Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets.* Drug Discovery Today 5(11): 506-20.
- Coleman MD, Taylor CH (1997)** *Bioactivation of benzocaine to a methemoglobin-forming metabolite by rat and human microsomes in vitro.* Environmental Toxicology and Pharmacology 3(1): 47-52.
- Colwell CW Jr (2004)** *The use of the pain pump and patient-controlled analgesia in joint reconstruction.* American journal of orthopedics 33(5 Suppl.): 10-2.
- Concepcion MA (1989)** *Spinal anesthetic agents.* International Anesthesiology Clinics 27(1): 21-5.
- Cone EJ, Tsadik A, Oyler J, Darwin WD (1998)** *Cocaine metabolism and urinary excretion after different routes of administration.* Therapeutic Drug Monitoring 20(5): 556-60.
- Courtney KR, Kenneth R (1980)** *Structure-activity relations for frequency-dependent sodium channel block in nerve by local anesthetics.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 213(1): 114-9.
- Courtney KR, Strichartz GR (1987)** *Structural elements which determine local anesthetic activity.* Handbook of Experimental Pharmacology 81(Local Anesth.): 53-94.
- Covino BG (1987)** *Toxicity and systemic effects of local anesthetic agents.* Handbook of Experimental Pharmacology 81(Local Anesth.): 187-212.
- Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Akopian AN, Wood JN, Waxman SG (1999)** *A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons.* The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 19(24): RC43.
- Czasch HJ (1976)** *Basische Phenylbenzyläther mit lokalanästhesierender Wirkung.* Dissertation, Frankfurt (Main).
- Dahse I und Sack H (2006):** persönliche Mitteilung, unveröffentlichte Daten
- Dahshan A, Donovan GK (2006)** *Severe methemoglobinemia complicating topical benzocaine use during endoscopy in a toddler: a case report and review of the literature.* Pediatrics 117(4): e806-9.
- Davis L, Britten JJ, Morgan M (1997)** *Cholinesterase. Its significance in anaesthetic practice.* Anaesthesia 52(3): 244-60.

- Davies RJ (2003)** *Buffering the pain of local anaesthetics: A systematic review*. *Emergency medicine* 15(1): 81-8.
- DeLuca A, Pröbstle T, Brinkmeier H, Rüdell R (1991)** *The different use dependences of tocainide and benzocaine are correlated with different effects on sodium channel inactivation*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 344(5): 596-601.
- Desille M, Corcos L, L'Helgoualc'h A, Fremond B, Campion JP, Guillouzo A, Clement B (1999)** *Detoxifying activity in pig livers and hepatocytes intended for xenotherapy*. *Transplantation* 68(10): 1437-43.
- Dobrydnjov I, Samarutel J (1999)** *Enhancement of intrathecal lidocaine by addition of local and systemic clonidine*. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 43(5): 556-62.
- Dohi S, Kitahata LM, Toyooka H, Ohtani M, Namiki A, Taub A (1979)** *An analgesic action of intravenously administered lidocaine on dorsal-horn neurons responding to noxious thermal stimulation*. *Anesthesiology* 51(2): 123-6.
- Dolphin CT, Cullingford TE, Shephard EA, Smith RL, Phillips IR (1996)** *Differential developmental and tissue-specific regulation of expression of the genes encoding three members of the flavin-containing monooxygenase family of man, FMO1, FMO3 and FMO4*. *European journal of biochemistry / FEBS* 235(3): 683-9.
- Dony P, Dewinde V, Vanderick B, Cuignet O, Gautier P, Legrand E, Lavand'homme P, De Kock M (2000)** *The comparative toxicity of ropivacaine and bupivacaine at equipotent doses in rats*. *Anesthesia and analgesia* 91(6): 1489-92.
- Drasner K (2005)** *Chloroprocaine spinal anesthesia: back to the future?* *Kommentar in: Anesthesia and analgesia* 100(2): 549-52.
- Dujovne CA, Grunt H (1975)** *Liver cell culture toxicity and surfactant potency of erythromycin derivatives*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 32(1): 11-20.
- Dünges W (1969)** *Ortho-aryloxymethylierte ω -Amino-alkyl-benzole – Synthese und lokalanästhetische Wirkung*. Dissertation, Univ. Frankfurt (Main).
- Ebell MH (2006)** *Systemic lidocaine or mexiletine for neuropathic pain*. *American family physician* 74(1): 79
- Eggleston ST, Lush LW (1996)** *Understanding allergic reactions to local anesthetics*. *The Annals of pharmacotherapy* 30(7-8): 851-7.
- Ekins S (1996 a)** *Past, present, and future applications of precision-cut liver slices for in vitro xenobiotic metabolism*. *Drug Metabolism Reviews* 28(4): 591-623.
- Ekins S (1996 b)** *Short-term maintenance of phase I and II metabolism in precision-cut liver slices in dynamic organ culture*. *Drug Metabolism and Disposition* 24(3): 364-6
- Ewald (1985)** *Synthese und Biotransformation von 1-Morpholino-3-[4-phenoxy]¹⁴C]methylphenyl]-propan-Hydrochlorid (¹⁴C-Fomocain-HCl)*, Dissertation Univ. Frankfurt (Main).
- Fang Q, Lei Y, Jiang C, Hao J, Zeng M, Zhou M, Jiang L (1998)** *Studies on synthesis of diallyl ether of bisphenol A using phase transfer catalysts*. *Sichuan Lianhe Daxue Xuebao, Gongcheng Kexueban* 2(5): 89-95

- Fleck C, Kamena M, Tschritter L, Kersten L, Seeling A, Glassl P, Oelschläger H (2001)** *Local anaesthetic effectivity and toxicity of fomocaine, five N-free fomocaine metabolites and two chiral fomocaine derivatives in rats compared with procaine.* *Arzneimittel-Forschung* 51(6): 451-58.
- Fleck C, Wennek-Klose J; Wange J, Oelschläger H (2004)** *Effects and toxicity of new fomocaine derivatives and of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion compounds in rats.* *Arzneimittel-Forschung* 54(5): 265-74.
- Förstermann E (2003)** *Vergleichende Untersuchung möglicher pro- oder antioxidativer Eigenschaften verschiedener Pflanzen-Phenole in vitro.* Dissertation, Univ. Jena.
- Fozzard HA, Lee PJ, Lipkind GM (2005)** *Mechanism of local anesthetic drug action on voltage-gated sodium channels.* *Current Pharmaceutical Design* 11(21): 2671-2686.
- Gasser R, Tynes RE, Lawton MP, Korsmeyer KK, Ziegler DM, Philpot RM (1990)** *The flavin-containing monooxygenase expressed in pig liver: primary sequence, distribution, and evidence for a single gene.* *Biochemistry* 29(1): 119-24.
- Gazzotti F, Bertellini E, Tassi A (2001)** *Best indications for local anaesthetics: bupivacaine.* *Minerva anesthesiologica* 67(9 Suppl. 1): 9-14.
- Gissen AJ, Covino BG, Gregus J (1982)** *Differential sensitivity of fast and slow fibers in mammalian nerve. III. Effect of etidocaine and bupivacaine on fast/slow fibers.* *Anesthesia & Analgesia* 61(7): 570-5.
- Glöckner R, Kuhn DU, Rost M, Scheele J, Müller D (2003)** *Metabolism of model xenobiotics in human liver slices.* *Nova Acta Leopoldina* 87(329): 163-9.
- Glöckner R, Rost M, Pissowotzki K, Müller D (2001)** *Monooxygenation, conjugation and other functions in cryopreserved rat liver slices until 24 h after thawing.* *Toxicology* 161(1-2): 103-9.
- Glöckner R, Spittel B, Rost M, Müller D (2003)** *Influence of insulin on viability and function of precision-cut rat liver slices.* *Nova Acta Leopoldina* 87(329): 171-81.
- Glöckner R, Steinmetzer P, Dröbner C, Müller D (1998)** *Application of cryopreserved precision-cut liver slices in pharmacotoxicology – principles, literature data and own investigations with special reference to CYP1A1-mRNA induction.* *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie* 50(4-6): 440-9.
- Gold MS (1999 a)** *Tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents and inflammatory hyperalgesia.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(14): 7645-9.
- Gold MS (1999 b)** *Inflammatory mediator-induced modulation of TTX-R INa: an underlying mechanism of inflammatory hyperalgesia.* *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 42: 111-2.
- Graf BM, Martin E, Bosnjak ZJ, Stowe DF (1997)** *Stereospecific effect of bupivacaine isomers on atrioventricular conduction in the isolated perfused guinea pig heart.* *Anesthesiology* 86(2): 410-19.
- Gristwood RW (2002)** *Cardiac and CNS toxicity of levobupivacaine. Strength of evidence for advantage over bupivacaine.* *Drug Safety* 25(3): 153-63.
- Groban L, Butterworth J (2003)** *Lipid reversal of bupivacaine toxicity: Has the silver bullet been identified?* *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 28(3): 167-9.

- Gunaydin B, Demiryurek AT (2001)** *Interaction of lidocaine with reactive oxygen and nitrogen species*. European journal of anaesthesiology 18(12): 816-22.
- Halldin MM, Bredberg E, Angelin B, Arvidsson T, Askemark Y, Elofsson S, Widman M (1996)** *Metabolism and excretion of ropivacaine in humans*. Drug Metabolism and Disposition 24(9): 962-8.
- Herzog RI, Cummins TR, Waxman SG (2001)** *Persistent TTX-resistant Na⁺ current affects resting potential and response to depolarization in simulated spinal sensory neurons*. Journal of neurophysiology 86(3): 1351-64.
- Hiemenz PC, Rajagopalan R (Hrsg.) (1997)** *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. 3. überarb. und erweiterte Ausgabe (Dekker, New York): S. 311.
- Hille B (1977)** *Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction*. Journal of General Physiology 69(4): 497-515.
- Iida H, Ohata H, Iida M, Nagase K, Uchida M, Dohi S (2001)** *The differential effects of stereoisomers of ropivacaine and bupivacaine on cerebral pial arterioles in dogs*. Anesthesia & Analgesia 93(6): 1552-56.
- Irle S, Luckefahr MH, Tomalla M (2005)** *Topical anesthesia as routine procedure in cataract surgery - evaluation of pain and complications in 1010 cases*. Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde 222(1): 36-40.
- Jage J (1993)** *Circulatory effects of vasoconstrictors combined with local anesthetics*. Anesthesia & pain control in dentistry 2(2): 81-6.
- Jindra A, Helia O (1971)** *Metabolism of fomocaine (Panacaine) in the rat and guinea pig*. Cesko-Slovenska Farmacie 20(10): 372-5.
- Jindra AJ, Helia O, Jindra A (1973)** *Dearalkylation of fomocaine isomers by microsomal monooxygenase system of rabbit liver*. Experientia 29(4): 395-6.
- Jindra A, Vargova E, Helia O (1977)** *Fomocaine-N-oxide, an important metabolite of the biotransformation of fomocaine (Erbocaine)*. Pharmazie 32(8-9): 496-8.
- Jindrova N (1976)** *Biliary metabolites and the extrahepatic occurrence of fomocaine metabolites in the rat*. Pharmazie 31(8): 580-1.
- Jurima-Romet M, Casley WL, Leblanc CA, Nowakowska M (2000)** *Evidence for the catalysis of dextromethorphan O-demethylation by a CYP2D6-like enzyme in pig liver*. Toxicol in Vitro 14(3): 253-63.
- Kang MY, Tsuchiya M, Packer L, Manabe M (1998)** *In vitro study on antioxidant potential of various drugs used in the perioperative period*. Acta Anaesthesiologica Scandinavica 42(1): 4-12.
- Kaukinen S, Eerola R, Eerola M, Kaukinen L (1978)** *A comparison of carticaine and lidocaine in spinal anaesthesia*. Annals of clinical research 10(4): 191-4.
- Kaukinen L, Kaukinen S, Karkkainen S (1986)** *Epidural anesthesia with carticaine in cesarean section. A comparison with bupivacaine*. Regional-Anästhesie 9(3): 79-83.
- Kitagawa N, Oda M, Totoki T (2004)** *Possible mechanism of irreversible nerve injury caused by local anesthetics. Detergent properties of local anesthetics and membrane disruption*. Anesthesiology 100(4): 962-7.

- Kitamura S, Terada A, Inoue N, Kamio H, Ohta S, Tatsumi K (1998)** *Quinone-dependent tertiary amine N-oxide reduction in rat blood*. Biological & pharmaceutical bulletin 21(12): 1344-7.
- Kitamura S, Sugihara K, Tatsumi K (1999)** A unique tertiary amine N-oxide reduction system composed of quinone reductase and heme in rat liver preparations. Drug Metabolism and Disposition 27(1): 92-7.
- Kobayashi Y, Nakano M, Kumar GB, Kishihara K (1998)** *Efficient Conditions for Conversion of 2-Substituted Furans into 4-Oxygenated 2-Enoic Acids and Its Application to Synthesis of (+)-Aspicilin, (+)-Patulolide A, and (-)-Pyrenophorin*. Journal of Organic Chemistry 63 (21): 7505-15.
- Knothe H, Beckmann I, Kiesel K, Oelschläger H (1980)** *The antibacterial activity of a gel for burns and wounds containing tyrothricin, fomocaine, diphenhydramine and 8-hydroxyquinoline*. Arzneimittel-Forschung 30(4): 667-70.
- Knudsen K, Suurkula MB, Blomberg S, Sjoevall J, Edvardsson N (1997)** *Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers*. British Journal of Anaesthesia 78(5): 507-14.
- Koch K (1970)** *Beiträge zur Analytik und Pharmakokinetik des Lokalanästhetikums Fomocain*. Dissertation, Univ. Frankfurt (Main).
- Komai H, McDowell TS (2001)** *Local anesthetic inhibition of voltage-activated potassium currents in rat dorsal root ganglion neurons*. Anesthesiology 94(6): 1089-95.
- Kozody R, Ready LB, Barsa JE, Murphy TM (1982)** *Dose requirement of local anaesthetic to produce grand mal seizure during stellate ganglion block*. Canadian Anaesthetists' Society journal 29(5): 489-91.
- Kudo K, Hino Y, Ikeda N, Inoue H, Takahashi S (2001)** *Blood concentrations of tetracaine and its metabolite following spinal anesthesia*. Forensic Science International 116(1): 9-14.
- Kudrow L, Kudrow DB, Sandweiss JH (1995)** *Rapid and sustained relief of migraine attacks with intranasal lidocaine: preliminary findings*. Headache 35(2): 79-82.
- Kuhn UD, Rost M, Müller D (2001)** *Para-nitrophenol glucuronidation and sulfation in rat and human liver slices*. Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie 53(1): 81-7.
- Kuschel S (2006)** *Dose-finding-study of Levobupivacaine vs Bupivacaine for elective caesarean section in spinal anaesthesia*. Dissertation, Univ. Frankfurt (Main).
- Lee-Son S, Wang GK, Concus A, Crill E, Strichartz G (1992)** *Stereoselective inhibition of neuronal sodium channels by local anaesthetics*. Anesthesiology 77(2): 324-35.
- Lele SS, Bhave RR, Sharma MM (1983)** *Fast and very slow reactions: phase transfer catalysis*. Chemical Engineering Science 38(5): 765-73.
- Lenfant F, Lahet JJ, Courderot-Masuyer C, Freysz M, Rochette L (2004)** *Lidocaine has better antioxidant potential than ropivacaine and bupivacaine: in vitro comparison in a model of human erythrocytes submitted to an oxidative stress*. Biomedicine & Pharmacotherapy 58(4): 248-54.
- Lennecke (2005)** *Krebsrot statt urlaubsbraun*. Deutsche Apotheker Zeitung 27: 53-4
- Lewis DFV (2001)** *Guide to cytochromes P450: structure and function*, 1. Auflage, Taylor & Francis, London, New York.

Listing (2001) unveröffentlichte Daten.

Liu PL, Feldman HS, Giasi R, Patterson MK, Covino BG (1983) *Comparative CNS toxicity of lidocaine, etidocaine, bupivacaine, and tetracaine in awake dogs following rapid intravenous administration.* *Anesthesia & Analgesia* 62(4): 375-9.

Longobardo M, Delpon E, Caballero R, Tamargo J, Valenzuela C (1998) *Structural determinants of potency and stereoselective block of hKv1.5 channels induced by local anesthetics.* *Molecular Pharmacology* 54(1): 162-9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-75.

Loy S (2003) *Tierexperimentelle Untersuchungen zur lokalanästhetischen Wirkung sowie Abklärung der Toxizität von einigen neuen Morpholin- und Diethanolaminderivaten aus der Gruppe der Fomocaine.* Dissertation, Univ. Jena.

Lupp A, Glöckner R, Danz M, Müller D (2002) *Cryopreserved precision-cut rat liver slices: morphology and cytochrome P450 isoforms expression after prolonged incubation.* *Toxicology in Vitro* 16(6): 749-58.

Lupp A, Knauthe S, Karge E, Jung B, Listing M, Oelschläger H, Müller D, Klinger W, Fleck C (2003) *Differential interactions of newly synthesized fomocaine derivatives with the cytochrome P450 system in vitro.* *Nova Acta Leopoldina* 87(329): 239-52.

Lyons G, Columb M, Wilson RC, Johnson RV (1998) *Epidural pain relief in labour: potencies of levobupivacaine and racemic bupivacaine.* *British Journal of Anaesthesia* 81(6): 899-901.

Maizels M, Scott B, Cohen W, Chen W (1996) *Intranasal lidocaine for treatment of migraine: a randomized, double-blind, controlled trial.* *JAMA: the journal of the American Medical Association* 276(4): 319-21.

Mandel HG (1971) *Pathways of drug biotransformation: Biochemical Conjugations.* In: La Du BN, Mandel HG, Way E.L. (Hrsg.) *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*, 1. Ausg., Baltimore, S. 527-45.

Martignoni M, Monshouwer M, de Kanter R, Pezzetta D, Moscone A, Grossi P (2004) *Phase I and phase II metabolic activities are retained in liver slices from mouse, rat, dog, monkey and human after cryopreservation.* *Toxicology in Vitro* 18(1): 121-28.

Martindale (1996) *The extra pharmacopoeia. Evaluated information on the world's drugs and medicines.* Reynolds JEF (Hrsg.) 31. Ausg. (Royal Pharmaceutical Soc., London).

Matheus J (1977) *Stabilität und Biotransformation lokalanästhesierender Phenylbenzyläther.* Dissertation, Univ. Frankfurt (Main).

Matsuki H, Hashimoto S, Kaneshina S, Yamanaka (1994) *Surface Adsorption and Volume Behavior of Local Anesthetics.* *Langmuir* 10(6): 1882-7.

McKillop D, McCormick AD, Millar A, Miles GS, Phillips PJ, Hutchison M (2005) *Cytochrome P450-dependent metabolism of gefitinib.* *Xenobiotica* 35(1): 39-50.

McLeod GA, Davies HTO, Munnoch N, Bannister J, Macrae W (2001) *Postoperative pain relief using thoracic epidural analgesia: Outstanding success and disappointing failures.* *Anaesthesia* 56(1): 75-81.

- Meyer H (1899)** *Zur Theorie der Alkoholnarkose*. Archiv der Experimentellen und Pathologischen Pharmakologie 42: 109-18.
- Moll F, Rathert P (2001)** *Zur Entwicklung des Kathetergleitgels*. Der Urologe B 41(3): 272-75.
- Moore DC, Bridenbaugh LD, Thompson GE, Balfour RI, Horton WG (1978)** *Bupivacaine: a review of 11,080 cases*. Anesthesia and analgesia 57(1): 42-53.
- Moore DC, Spierdijk J, vanKleef JD, Coleman RL, Love GF (1982)** *Chloroprocaine neurotoxicity: four additional cases*. Anesthesia and analgesia 61(2): 155-9.
- Mutschler E (2001)** *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8. völlig neu bearb. und erw. Aufl. (Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart).
- Nachev PK (1982)** *Bindung der lokalanästhetisch wirkenden Fomocaine an Blutproteine und Gewebeeweiß*. Dissertation, Univ. Frankfurt (Main).
- Natura G, von Banchet GS, Schaible HG (2005)** *Calcitonin gene-related peptide enhances TTX-resistant sodium currents in cultured dorsal root ganglion neurons from adult rats*. Pain 116(3): 194-204.
- Nau C, Wang GK (2004)** *Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na⁺ channels*. Journal of Membrane Biology 201(1): 1-8.
- Newton DJ, McLeod GA, Khan F, Belch JJF (2005)** *Vasoactive characteristics of bupivacaine and levobupivacaine with and without adjuvant epinephrine in peripheral human skin*. British Journal of Anaesthesia 94(5): 662-67.
- Nieschulz O, Hoffmann I, Pependiker K (1958)** *Pharmacology of N-[3-(4-phenoxyethyl)phenyl]propyl-morpholine, an amino ether with local anesthetic action*. Arzneimittel-Forschung 8: 539-44.
- O'Brien JE, Abbey V, Hinsvark O, Perel J, Finster M (1979)** *Metabolism and measurement of chloroprocaine, an ester-type local anesthetic*. Journal of Pharmaceutical Sciences 68(1): 75-8.
- Oda A, Ohashi H, Komori S, Iida H, Dohi S (2000)** *Characteristics of ropivacaine block of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons*. Anesthesia and analgesia 91(5): 1213-20.
- Oelschläger H (1957)** Habilitationsschrift, Univ. Hamburg.
- Oelschläger H (1959)** *Preparation of the amino ether N-[3-[4-(phenoxyethyl)-phenyl]propyl]morpholine with local anesthetic properties, and relations between toxicity and the basic component in N-[3-[4-(phenoxyethyl)phenyl]propyl]-amines*. Arzneimittel-Forschung 9: 313-21.
- Oelschläger H, Temple DJ, Temple CF (1975)** *Metabolism of the local anesthetic fomocaine (1-morpholino-3-[p-phenoxyethylphenyl]propane) in the rat and dog after oral application*. Xenobiotica 5(5): 309-23.
- Oelschläger H, Czasch HJ, Iglesias-Meier J, Ehlers E, Götze G (1978)** *Syntheses of new compounds with local anesthetic activity, IX: Syntheses of new phenyl benzyl ethers*. Archiv der Pharmazie 311(2): 81-97.
- Oelschläger H, Rothley D (1979)** *Bioavailability and local anesthetic effect of a tyrothricin, fomocaine, diphenhydramine, and 8-hydroxyquinoline combination gel for burns and wounds*. Arzneimittel-Forschung 29(4): 693-7

- Oelschläger H, Rothley D, Müller M (1982)** *The antihistaminic effect of a gel for burns and wounds containing tyrothricin, fomocaine, diphenhydramine and 8-hydroxyquinoline.* *Arzneimittel-Forschung* 32(1): 72-5.
- Oelschläger H, Hädrich I, Dannhardt G (1991)** *New environmentally friendly synthesis of 3-(4-chloromethylphenyl)propyl chloride, an intermediate in the technical production of fomocaine.* *PZ Wissenschaft* 4(4): 159-65.
- Oelschläger H (2000)** *Fomocaine from the chemical, pharmacokinetic and pharmacologic viewpoint: current status and overview.* *Pharmazie in unserer Zeit* 29(6): 358-64.
- Oelschläger H, Glassl P, Seeling A, Wange J, Listing M, Jung B (2001)** *Synthesis and pharmacologic action of chiral fomocaine ((4-[2-methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl)-phenyl-ether and (4-(1-methyl-3-(morpholin-4-yl)propyl]benzyl)-phenyl-ether). 13. Synthesis of new compounds with local anesthetic action.* *Die Pharmazie* 56(8): 620-5.
- Oertel R, Rahn R, Kirch W (1997)** *Clinical pharmacokinetics of articaine.* *Clinical Pharmacokinetics* 33(6): 417-25.
- Ogata N, Tatebayashi H (1993)** *Kinetic analysis of two types of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglia.* *The Journal of physiology* 466: 9-37.
- Ogata N, Ohishi Y (2002)** *Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels.* *Japanese Journal of Pharmacology* 88(4): 365-77.
- Olinga P, Merema M, Hof IH, de Jong KP, Slooff MJH, Meijer DKF, Groothuis GMM (1998)** *Effect of human liver source on the functionality of isolated hepatocytes and liver slices.* *Drug Metabolism and Disposition* 26(1): 5-11.
- Olschewski A, Hempelmann G, Vogel W, Safronov BV (1998)** *Blockade of Na⁺ and K⁺ currents by local anesthetics in the dorsal horn neurons of the spinal cord.* *Anesthesiology* 88(1): 172-9.
- Overton E (1901)** *Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie.* G. Fischer, Jena
- Patel D, Chopra S, Berman MD (1989)** *Serious systemic toxicity resulting from use of tetracaine for pharyngeal anesthesia in upper endoscopic procedures.* *Digestive diseases and sciences* 34(6): 882-4.
- Petersen KL, Rowbotham MC (2000)** *Will ion-channel blockers be useful for management of nonneuropathic pain?* *The journal of pain: official journal of the American Pain Society* 1(3 Suppl) 26-34.
- Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Sansonetty F, Martinez-De-Oliveira J, Fonseca AF, Mardh PA (2000)** *Antifungal activity of local anesthetics against Candida species.* *Infectious diseases in obstetrics and gynecology* 8(3-4): 124-37.
- Puente NW, Josephy PD (2001)** *Analysis of the lidocaine metabolite 2,6-dimethylaniline in bovine and human milk.* *Journal of Analytical Toxicology* 25(8): 711-5.
- Purcell SM, Dixon SL (1985)** *Allergic contact dermatitis to dyclonine hydrochloride simulating extensive herpes simplex labialis.* *Journal of the American Academy of Dermatology* 12 (2 Pt 1) 231-4.
- Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA (1994)** *Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics.* *Science* 265(5179): 1724-8.

- Rapoport AM, Bigal ME, Tepper SJ, Sheftell FD (2004)** *Intranasal medications for the treatment of migraine and cluster headache.* CNS Drugs 18(10): 671-85.
- Ravindran RS, Bond VK, Tasch MD, Gupta CD, Luerssen TG (1980)** *Prolonged neural blockade following regional analgesia with 2-chloroprocaine.* Anesthesia and analgesia 59(6): 447-51.
- Raymond SA, Gissen AJ (1987)** *Mechanisms of differential nerve block.* Handbook of Experimental Pharmacology 81(Local Anesth.): 95-164.
- Reisner LS, Hochman BN, Plumer MH (1980)** *Persistent neurologic deficit and adhesive arachnoiditis following intrathecal 2-chloroprocaine injection.* Anesthesia and analgesia 59(6): 452-4.
- Reuter N, Meyer F, Ziegenmeyer J, Bock M (1975)** *Action of fomocaine on heart and circulation.* Arzneimittel-Forschung 25(12): 1900-6.
- Rigler ML, Drasner K, Krejcie TC, Yelich SJ, Scholnick FT, DeFontes J, Bohner D (1991)** *Cauda equina syndrome after continuous spinal anesthesia.* Anesthesia and analgesia 72(3): 275-81.
- Rodrigues AAG, Pina-Vaz C, Mardh PA, Martinez-de-Oliveira J, Freitas-da-Fonseca A (2000)** *Inhibition of germ tube formation by Candida albicans by local anesthetics: an effect related to ionic channel blockade.* Current Microbiology 40(3): 145-8.
- Rodrigues AD, Kukulka MJ, Ferrero JL, Cashman JR (1995)** *In vitro hepatic metabolism of ABT-418 in chimpanzee (Pan troglodytes): a unique pattern of microsomal flavin-containing monooxygenase-dependent stereoselective N'-oxidation.* Drug Metabolism and Disposition 23(10): 1143-52.
- Romas T (2006)** *Die Interaktion von Prostaglandin E₂-Rezeptoren (EP_{2,4}) an Hinterwurzel-ganglienzellen der adulten Ratte: Modulation der TTX-R Na⁺-Ströme.* Dissertation, Univ. Tübingen.
- Rosen MJ, Fei L, Zhu YP, Morrall SW (1999)** *The relationship of the environmental effect of surfactants to their interfacial properties.* Journal of Surfactants and Detergents 2(3): 343-7.
- Rote Liste® (2006)** www.rote-liste.de
- Rush AM, Waxman SG (2004)** *PGE₂ increases the tetrodotoxin-resistant Na_v1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins.* Brain Research 1023(2): 264-271.
- Sakurai H, Yasui H, Yamada Y, Nishimura H, Shigemoto M (2005)** *Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light: a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection.* Photochemical & Photobiological Sciences 4(9): 715-20.
- Santos AC, Pedersen H, Harmon TW, Morishima HO, Finster M, Arthur GR, Covino BG (1989)** *Does pregnancy alter the systemic toxicity of local anesthetics?* Anesthesiology 70(6): 991-5.
- Sauder G, Jonas JB (2003)** *Topical versus peribulbar anaesthesia for cataract surgery.* Acta ophthalmologica Scandinavica 81(6): 596-9.
- Schatton W (1977)** *Beziehungen zwischen chemischer Struktur und Biotransformation bei Fomocainen bei variiertem Aminoalkylgruppe.* Dissertation, Univ. Frankfurt (Main).
- Schmidt RF, Schaible HG (2006).** *Neuro- und Sinnesphysiologie.* Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

- Schmidt RM, Rosenkranz HS (1970)** *Antimicrobial activity of local anesthetics: lidocaine and procaine*. The Journal of infectious diseases 121(6): 597-607.
- Schmidt W (1994)** *Synthese, Analytik und Biotransformation tertiärer N-Oxide sowie ein neuartiger, zu Lactamen führender Sauerstoff-Shift*. Dissertation, Univ. Frankfurt (Main)
- Scholz A (2002)** *Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels*. British Journal of Anaesthesia 89(1) 52-61.
- Schonemann NK, van der Burght M, Arendt-Nielsen L, Bjerring P (1992)** *Onset and duration of hypoalgesia of lidocaine spray applied to oral mucosa - a dose response study*. Acta anaesthesiologica Scandinavica 36(7): 733-5.
- Schutz A, Gund HJ, Pschorn U, Aicher B, Peil H, Müller A, De Mey C, Gillissen A (2002)** *Local anesthetic properties of ambroxol hydrochloride lozenges in view of sore throat: clinical proof of concept*. Arzneimittel-Forschung 52(3): 194-9.
- Scott DB, Lee A, Fagan D, Bowler GMR, Bloomfield P, Lundh R (1989)** *Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine*. Anesthesia & Analgesia 69(5): 563-9.
- Scott DA, Emanuelsson BM, Mooney PH, Cook RJ, Junestrand C (1997)** *Pharmacokinetics and efficacy of long-term epidural ropivacaine infusion for postoperative analgesia*. Anesthesia & Analgesia 85(6): 1322-30.
- Seeling A (1996)** *Synthese und Analytik der Metabolite des Lokalanästhetikums Fomocain sowie Abklärung ihrer Wirkung und Toxizität*. Dissertation, Univ. Frankfurt (Main).
- Seeling A, Leuschner F, Oelschläger H (2001)** *Physico-chemical, pharmacological, and toxicological properties of fomocaine metabolites*. Arzneimittel-Forschung 51(1): 7-17.
- Sgoff H (1975)** *Biotransformation des Lokalanästhetikums Fomocain in vitro*. Dissertation Univ. Frankfurt (Main).
- Shanes AM, Freygang WH, Grundfest H, Amatniek E (1959)** *Anesthetic and calcium action in the voltage clamped squid giant axon*. Journal of General Physiology 42: 793-802.
- Silva MT, Sousa JC, Polonia JJ, Macedo PM (1979)** *Effects of local anesthetics on bacterial cells*. Journal of bacteriology 137(1): 461-8.
- Simon MAM, Vree TB, Gielen MJM, Booij LHDJ (1997)** *Comparison of the disposition kinetics of lidocaine and (\pm)-prilocaine in 20 patients undergoing intravenous regional anesthesia during day case surgery*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics 22(2): 141-6.
- Simon MAM, Vree TB, Gielen MJM, Booij LHDJ, Lagerwert AJ (2002)** *Similar motor block effects and disposition kinetics between lidocaine and (\pm)-mepivacaine in patients undergoing axillary brachial plexus block during day case surgery*. TheScientificWorld [online computer file], 2 1298-311.
- Skalova L, Nobilis M, Szotakova B, Wsol V, Kvasnickova E (1998)** *Induction and inhibition of cytochrome P450-catalyzed reduction of biologically active benfluron N - oxide*. Drug Metabolism and Drug Interactions, 14(4): 221-33.
- Slatter JG, Adams LA, Bush EC, Chiba K, Daley-Yates PT, Feenstra KL, Koike S, Ozawa N, Peng GW, Sams JP, Schuette MR, Yamazaki S (2002)** *Pharmacokinetics, toxicokinetics, distribution, metabolism, and excretion of linezolid in mouse, rat, and dog*. Xenobiotica 32(10): 907-24.

- Song R, Wang Y, Chen L (2001)** *Synthesis of N,N-diethylaminoethyl 4-methylbenzyl ether by phase transfer catalysis*. *Huaxue Shiji* 23(2): 97-8.
- Soucek P, Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P, Guengerich FP (2001)** *Minipig cytochrome P450 3A, 2A and 2C enzymes have similar properties to human analogs*. *BMC Pharmacol* 1: 11
- Starmer CF, Grant AO, Strauss HC (1984)** *Mechanisms of use-dependent block of sodium channels in excitable membranes by local anesthetics*. *Biophysical Journal* 46(1): 15-27.
- Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Roth HJ (2005)** *Medizinische Chemie, Targets und Arzneistoffe*. 1. Aufl. (Dt. Apotheker-Verl., Stuttgart): S. 162-6.
- Stratford AF, Zoutman DE, Davidson JSD (2002)** *Effect of lidocaine and epinephrine on Staphylococcus aureus in a guinea pig model of surgical wound infection*. *Plastic and reconstructive surgery* 110(5): 1275-9.
- Strichartz GR, Ritchie JM (1987)** *The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues*. *Handbook of Experimental Pharmacology* 81(Local Anesth.): 21-52.
- Strichartz GR, Sanchez V, Arthur GR, Chafetz R, Martin D (1990)** *Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficients and pK_a values of clinically used drugs*. *Anesthesia & Analgesia (Baltimore)* 71(2): 158-70.
- Tetzlaff JE (2000)** *Clinical pharmacology of local anesthetics*. 1. Auflage, Butterworth-Heinemann, Woburn
- Thomas J, Morgan D, Vine J (1976)** *Metabolism of etidocaine in man*. *Xenobiotica* 6(1): 39-48.
- Tönnes SW, Thiel M, Walther M, Kauert GF (2003)** *Studies on metabolic pathways of cocaine and its metabolites using microsome preparations from rat organs*. *Chemical research in toxicology* 16(3): 375-81.
- Valenzuela C, Delpon E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ (1995 a)** *Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers*. *Biophysical Journal* 69(2): 418-27.
- Valenzuela C, Snyders DJ, Bennett PB, Tamargo J, Hondeghem LM (1995 b)** *Stereoselective block of cardiac sodium channels by bupivacaine in guinea pig ventricular myocytes*. *Circulation* 92(10): 3014-24.
- Van de Velde M, Dreelinck R, Dubois J, Kumar A, Deprest J, Lewi L, Vandermeersch E (2006)** *Determination of the Full Dose-Response Relation of Intrathecal Bupivacaine, Levobupivacaine, and Ropivacaine, Combined with Sufentanil, for Labor Analgesia*. *Anesthesiology, Volume Date 2007*, 106(1): 149-156.
- Vester-Andersen T, Christiansen C, Hansen A, Sorensen M, Meisler C (1981)** *Interscalene brachial plexus block: area of analgesia, complications and blood concentrations of local anesthetics*. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 25(2): 81-4.
- Vine J, Morgan D, Thomas J (1978)** *The identification of eight hydroxylated metabolites of etidocaine by chemical ionization mass spectrometry*. *Xenobiotica* 8(8): 509-13.
- Vladimirov M, Nau C, Mok WM, Strichartz G (2000)** *Potency of bupivacaine stereoisomers tested in vitro and in vivo: biochemical, electrophysiological, and neurobehavioral studies*. *Anesthesiology* 93(3): 744-55.

- Voet D, Voet J (1994)** *Lehrbuch der Biochemie*. Beck-Sickinger AG (Hrsg.) 1. korrigierter Nachdruck der 1. Aufl. (Wiley-VCH, Weinheim).
- Vogel G (1980)** *Synthese und pharmakologische Eigenschaften neuer Benzylamine mit lokalanästhetischer Wirkung*. Dissertation, Univ. Frankfurt (Main).
- Vree TB, Gielen MJM (2005)** *Clinical pharmacology and the use of articaine for local and regional anaesthesia*. Best Practice & Research, Clinical Anaesthesiology 19(2): 293-308.
- Wange J (2006)** *Synthese, Racemattrennung und pharmakologische Prüfung neuer chiraler Fomocainderivate*. Dissertation, Univ. Jena.
- Wennek-Klose J (2005)** *Einschlußverbindungen von Fomocain und neuen Fomocain-Derivaten zur parenteralen und nasalen Applikation*. Dissertation, Univ. Jena.
- Wimberley N, Willey S, Sullivan N, Bartlett JG (1979)** *Antibacterial properties of lidocaine*. Chest 76(1): 37-40.
- Wippich N (2003)** *Nachweismöglichkeiten reaktiver Sauerstoffspezies am Beispiel der Xanthin- und der NAD(P)H-Oxidase*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wood JN, Boorman JP, Okuse K, Baker, MD (2004)** *Voltage-gated sodium channels and pain pathways*. Journal of Neurobiology 61(1): 55-71.
- Wunderer H, Weiser T (2004)** *Local anesthetics for pain relief in pharyngitis*. Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten 27(10): 342-7.
- Wyrwa R, Härtl A, Bräuer R (2003)** *Preparation of antiarthritic steroids from dehydroandrostenolone*. Ger. Offen. DE 10226311, Appikations-Nummer: DE2002-10226311 Datum: 20020611.
- Yarov-Yarovoy V, McPhee JC, Idsvoog D, Pate C, Scheuer T, Catterall WA (2002)** *Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na⁺ channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block*. Journal of Biological Chemistry 277(38): 35393-401.
- Yasuhara H, Dujovne CA, Ueda I (1979)** *Relationship between surface activity and toxicity to Chang liver cultures of tricyclic antidepressants*. Pharmacology 18(2): 95-102.
- Zahalka HA, Sasson Y (1986)** *One-pot conversion of primary alkyl chlorides and dichlorides into alcohols, diols, and ethers via formic ester intermediates under phase-transfer conditions*. Synthesis 9: 763-5.
- Zamponi GW, Soong TW, Bourinet E, Snutch TP (1996)** *β Subunit coexpression and the $\alpha 1$ subunit domain I-II linker affect piperidine block of neuronal calcium channels*. Journal of Neuroscience 16(8): 2430-43.
- Zener JC, Harrison DC (1974)** *Serum enzyme values following intramuscular administration of lidocaine*. Archives of Internal Medicine 134(1): 48-9.
- Zimmer M (1991)** *Synthese und Biotransformation von thioanalogen Fomocainen*. Dissertation, Frankfurt (Main).
- Zink W, Graf BM, Sinner B, Martin E, Fink RHA, Kunst G (2002)** *Differential effects of bupivacaine on intracellular Ca²⁺ regulation: potential mechanisms of its myotoxicity*. Anesthesiology 97(3): 710-6.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Struktur und Funktion von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen am Bsp. des Na_v1.2-Kanals aus Rattenhirn
- Abb. 2:** 3D-Modell der Interaktion eines LA mit den S6-Segmenten der Domänen I, III und IV des Na_v1.2-Kanals der Ratte
- Abb. 3:** Lokalanästhetika vom Typ I: Basisch substituierte Benzoessäureester
- Abb. 4:** Lokalanästhetika vom Typ II und vom Typ III: Basisch substituierte Arylcarbonsäureamide und basisch substituierte Anilide
- Abb. 5:** Lokalanästhetika der Typen IV-VII: Basisch substituierte Aryl-alkyl-ketone (IV), basisch substituierte Aryl-alkyl-ether (V), basisch substituierte Alkylbenzyl-phenyl-ether (VI), basisch substituierte Phenylcarbamate (VII)
- Abb. 6:** Lokalanästhetika, die nicht dem allgemeinen Strukturprinzip entsprechen
- Abb. 7:** Hauptmetabolisierungswege wichtiger Lokalanästhetika
- Abb. 8:** In den Exkrementen von Ratte und Beagle identifizierte Metaboliten des Fomocain
- Abb. 9:** Syntheschema zur Darstellung der Metaboliten 4-OH-Oe 9000, 4-OH-Oe 9000-N-oxid, Oe 9000 und POMPBAmEt.
- Abb. 10:** Synthese des Metaboliten POMPBuOH
- Abb. 11:** Synthese des als IS verwendeten POMPBuNi und der Metaboliten POMPBA, POMPBAlD sowie des postulierten Metaboliten POMPBAm
- Abb. 12:** Synthese des postulierten Metaboliten POMPEs
- Abb. 13:** Synthese der postulierten Metaboliten BHABBA und Methyl-BHABBA
- Abb. 14:** Synthese von 2-Nitro-Oe 9000
- Abb. 15:** Entstehung von Bis(POMPBA)AmEt als Nebenprodukt bei der Synthese von POMPBAmEt.
- Abb. 16:** Zählweise der Atome zur NMR-Auswertung für Oe 9000
- Abb. 17:** ¹³C-NMR-Spektrum (250 MHz) von Oe 9000 in CDCl₃
- Abb. 18:** ¹H-NMR-Spektrum von Oe 9000 in CD₃OD, 250 MHz
- Abb. 19:** Online-UV-Spektren von Oe 9000-N-oxid und 4-OH-Oe 9000
- Abb. 20:** IR-Spektren von POMPBuNi, Oe 9000-N-oxid, Oe 9000 im Vergleich zur Leitsubstanz Fomocain
- Abb. 21:** GC-MS des zweifach trimethylsilylierten POMPBAm zu dessen Identitätssicherung und Reinheitsprüfung

- Abb. 22:** Online-EI-Massenspektren von POMPBuOH, POMPBAmEt, POMPBuNi und POMPBA nach Derivatisierung mit BSTFA und gc Trennung.
- Abb. 23:** Identitätsbeweis von POMPBuOH nach Inkubation von Schweinelebermikrosomen mit Oe 9000-HCl
- Abb. 24:** Identifizierung von POMPBAmEt durch Online-ESI-MS nach Inkubation von Oe 9000-HCl mit Schweinelebermikrosomen
- Abb. 25:** HPLC-Analyse von Oe 9000-Metaboliten nach 40 min Inkubation von 10000 × g-Überständen bzw. Mikrosomen mit Oe 9000
- Abb. 26:** Quantifizierung von Oe 9000 und seinen Metaboliten nach Inkubation von 10000 × g-Überständen bzw. Mikrosomen vom Schwein mit Oe 9000-HCl über 40 min.
- Abb. 27:** HPLC-Chromatogramm und Online-ESI-Massenspektrum von Peak 9 nach Inkubation von 10000 x g-Überständen mit POMPBAmEt-HCl
- Abb. 28:** HPLC-Chromatogramm und Online-ESI-Massenspektrum von Peak 1 nach Inkubation von 10000 × g-Überständen mit Oe 9000-N-oxid.
- Abb. 29:** Biotransformationswege des Oe 9000 und Oe 9000-N-oxid beim Schwein
- Abb. 30:** Metabolismus von Oe 9000-HCl an Rattenleberschnitten. Dargestellt sind die Chromatogramme für die Leberschnitt-Inkubationen mit Oe 9000-HCl und die Kontrollen für verschiedene Inkubationszeiten (30 min, 2 h, 4 h).
- Abb. 31:** HPLC-Chromatogramme nach Inkubation von Rattenleberschnitten mit Oe 9000-HCl
- Abb. 32:** HPLC-Chromatogramme der indirekten Bestimmung von Glucuroniden und Arylsulfaten nach zweistündiger Inkubation von Rattenleberschnitten mit Oe 9000 und anschließendem Phase-II-Metaboliten-Spaltungsversuch mit β -D-Glucuronidase aus *Escherichia coli* bzw. *Helix pomatia*
- Abb. 33:** HPLC-Chromatogramme der indirekten Bestimmung von Arylsulfaten nach 4 h Inkubation von Rattenleberschnitten mit Oe 9000 und anschließender Arylsulfatspaltung mit Sulfatase aus Seeohr-Innereien über 24 h
- Abb. 34a:** Quantifizierung der Phase-I- und Phase-II-Metaboliten nach Inkubation von Rattenleberschnitten mit Oe 9000-HCl.
- Abb. 34b:** Schema zur Biotransformation des Oe 9000 nach Inkubation von Rattenleberschnitten
- Abb. 35:** HPLC-Untersuchungen der Rattenkotfraktionen nach einmaliger i.p. Applikation eines Oe 9000-HCl-Bolus. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf des Auftretens der Metaboliten in den verschiedenen Fraktionen.
- Abb. 36:** HPLC-Untersuchungen der Rattenkotfraktionen nach einmaliger i.p. Applikation eines Oe 9000-HCl-Bolus
- Abb. 37:** Identifizierung von Oe 9000-Metaboliten nach i.p. Applikation von Oe 9000-HCl bei Ratte 1 und den Ratten 2 – 4
- Abb. 38:** Inkubation von Menschenleberschnitten über 4 h mit und ohne Oe 9000

- Abb. 39:** Verlauf der Phase-I-Metabolisierung von Oe 9000-HCl mit humanen Präzisionsleberschnitten eines Patienten
- Abb. 40:** Übersicht über die Phase-I-Biotransformationswege nach Inkubation von humanen Leberschnitten mit Oe 9000
- Abb. 41:** Zytotoxische und antiproliferative Wirkungen von Oe 9000-Derivaten im Vergleich zu Lidocain und Tetracain.
- Abb. 42:** Darstellung der Strom-Zeit-Beziehung (I-t-Kurve) einer DRG-Zelle bei der jeweiligen Membranspannung
- Abb. 43:** Effekt von Oe 9000 (0,5 bzw. 5 μM) auf TTX-r Na^+ -Ströme an jeweils einer DRG-Zelle.
- Abb. 44:** Die Applikation von 50 μM Oe 9000 bewirkte innerhalb von 2 min eine praktisch vollständige Inhibierung der TTX-r Na^+ -Ströme.
- Abb. 45:** Der Effekt von 10 μM Oe 9000 auf die TTX-r Na^+ -Ströme durch DRG-Zellmembranen (5 min nach Substanzzugabe).
- Abb. 46:** I-t-Beziehung für eine DRG-Zelle nach dem Auslösen von einem oder von 20 depolarisierenden Spannungspulsen vor (schwarze und rote Kurve) und nach Oe 9000-Applikation (blaue und grüne Kurve).
- Abb. 47:** Bestimmung des Lateraldrucks in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanzen mit der Wilhelmy-Plättchen-Methode.
- Abb. 48:** Nachweis von Hyperoxidionen durch Luminol

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Ansprechbarkeit der Nervenfasern auf Lokalanästhetika (modifiziert nach Catterall und Mackie 2006)
- Tab. 2:** Biophysikalische Eigenschaften von klonierten und heterolog exprimierten TTX-sensitiven α -Untereinheiten in Säugetier-Zelllinien (nach Clare et al. 2000).
- Tab. 3:** Eigenschaften der α -Untereinheiten der spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle und des konzentrationsabhängigen Na_x -Kanals, modifiziert nach Ogata et al. [2002]
- Tab. 4:** Strukturelle Klassifizierung der Lokalanästhetika
- Tab. 5:** Applikationsformen von Lokalanästhetika (nach Seeling 1996, modifiziert und aktualisiert)
- Tab. 6:** Physikochemische Eigenschaften von Oe 9000 und Fomocain [nach Wennek-Klose 2005]
- Tab. 7:** Strukturformeln und relative Molekulargewichte (M_r) von Oe 9000, postulierten Oe 9000-Metaboliten und weiteren Oe 9000-Derivaten
- Tab. 8:** UV-Maxima der synthetisierten Referenzsubstanzen
- Tab. 9:** Kalibrierung der Referenzsubstanzen mit dem HPLC-System 1
- Tab. 10:** Präzision der Peakflächen der HPLC-Systeme 1 (für POMPBA, POMPBuOH, 4-OH-Derivate, Phenol) und 2 (Oe 9000, Oe 9000-N-oxid und POMPBAmet)
- Tab. 11:** Die für den Arzneistoffmetabolismus wichtigsten CYP-Enzyme in Menschenleber und ihre möglichen Tiermodelle. Modifiziert nach Zuber et al. 2002
- Tab. 12:** Übersicht über Proliferationsinhibitionen bei verschiedenen Zelllinien durch postulierte und tatsächliche Oe 9000-Metaboliten und Oe 9000-Derivate sowie Anilid- und Ester-Lokalanästhetika im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen
- Tab. 13:** Antimikrobielle Wirkungen von Oe 9000-Derivaten der Konzentration 100 $\mu\text{g/ml}$ nach 24 h-Inkubation (bzw. 48 h-Inkubation)
- Tab. 14:** Minimale Hemmkonzentrationen von Substanzen in $\mu\text{g/ml}$
- Tab. 15:** Oberflächenabsorptionsfähigkeit α der untersuchten Verbindungen
- Tab. 16:** Übersicht über die verwendeten Fließmittel.
- Tab. 17:** Inkubation von Leberhomogenaten

Antibiotische Effekte von Oe 9000 und den synthetisierten Referenzsubstanzen in der Konzentrationsstufe 1 mg/ml

Alle Werte bezeichnen die Größe der Hemmhöfe in mm.

Substanz	<i>Bacillus subtilis</i> 6633 B1	<i>Staph. aureus</i> 511 B3	<i>E. coli</i> 458 B4	<i>Pseud. aeruginosa</i> SG 137 B7	<i>Pseud. aeruginosa</i> K799/61B9	<i>Staph. aureus</i> 134/94 R9	<i>Enterococ. faecalis</i> 1528 R10	<i>Mycobact. vaccae</i> 10670 M4	<i>Sporobolom. salmonicolor</i> 549 H4	<i>Candida albicans</i> H8	<i>Penicillum notatum</i> J36P1
Oe 9000-HCl	13 p	0	0	14	0	0	0	21	0	0	0
Oe 9000-N-oxid	10	0	0	0	0	0	0	20 p	0	0	0
4-OH-Oe 9000	10,5	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0
4-OH-Oe 9000-N-oxid	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0
Oe 7000	11	10	0	14,5	0	0	0	23	0	0	0
POMPBA	0	15 p	0	0	0	0	0	20 p	12	0	0
POMPBUOH	14	14	0	14,5	0	14	0	23	17	13	20*
POMPBA _{AmEt} -HCl	13	12	0	14	0	12	0	15	0	0	0
POMPBA _{Am} -HCl	14	15	17	0	0	14	16	35*	0	0	18*
POMPES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fomocain-HCl	11	0	0	0	0	0	0	27*	0	0	0
OeDimer	21*	18*	18	13,5	0	16	15,5	30*	14	11 p	0
POMPBU _{Ni}	0	0	0	0	0	0	0	20 p	0	0	0
2-Nitro-Oe 9000	15	13,5	0	0	14	13	13	20	0	0	0
BHABBA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Methyl-BHABBA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bis(POMPBA) _{AmEt}	14	8	0	0	0	8	13	17	0	0	0
Tetracain-HCl	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0
Lidocain-HCl	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0
DMSO	12 p	14 p	16 p	13	13	13 p	14 p	16 p	20 p	0	15 p
Referenz-Antibiotikum	30,5¹⁾	21,5¹⁾	22¹⁾	26¹⁾	32¹⁾	0 ¹⁾	16¹⁾	21¹⁾	17 p ²⁾	21²⁾	16²⁾

Zeichenerklärung: p = partielle Wachstumsinhibierung. **Fettgedruckte** Zahlen kennzeichnen Werte, bei denen die Hemmhöfe größer als bei dem verdünnten Lösungsmittel waren. ¹⁾ Ciprofloxacin 5 µg/ml in Wasser. ²⁾ Amphotericin B 10 µg/ml in DMSO. War die Hemmung nicht stärker als beim Lösungsmittel, wurde dies mit "0" vermerkt. Substanzen, die auch mit 0,1 mg/ml antibiotisch wirkten, sind mit „*“ gekennzeichnet.

Kalibrierung der Referenzsubstanzen im Rattenkot

Verbindung	Anstieg der Geradengleichung ¹⁾	Regressionskoeffizient r^2
Oe 9000	47357 ²⁾	0,997
Oe 9000-N-oxid	46378 ²⁾	0,997
POMPBU Ni	40874 ³⁾	0,999
4-OH-Oe 9000	36302 ³⁾	0,996
4-OH-Oe 9000-N-oxid	37315 ³⁾	0,995

Kalibrierung der Referenzsubstanzen nach Zugabe zu Rattenkot. ¹⁾ Beim Auftragen der auf den IS korrigierten Peakflächeneinheiten gegen die Konzentrationen (in $\mu\text{mol/l}$) bei einem Injektionsvolumen von 100 μl . Da der Metabolit Oe 9000-Säure nicht in ausreichend hohem Reinheitsgrad zur Verfügung stand, wurde der Anstieg der Geradengleichung des Oe 9000 für dessen Quantifizierung zugrunde gelegt. ²⁾ HPLC-System 2 ³⁾ HPLC-System 1

Patientenprofil der Leberspenderin

Allgemeine Angaben

Geschlecht: weiblich

Alter: 50 Jahre

Körpergröße: 180 cm

Gewicht: 86 kg

Diagnose:

Gallenblasen-Karzinom mit Metastasen in der Leber

keine Vor- oder Begleiterkrankungen

Laborwerte

normal, bis auf:

Hb zu niedrig

Na⁺ zu niedrig

ASAT erhöht

GGT erhöht

AP erhöht

CRP erhöht

Medikation:

keine regelmäßige Medikation

präoperativ: Dormicum[®] (entspr. 7,5 mg Midazolam)

Durchführung der Narkose: Sufentanil, Remifentanil, Propofol, Rocuroniumbromid,
Sevofluran, Nitrazepam

intraoperativ: 1,5 g Cefuroxim, 0,5 g Metronidazol,
250 mg Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat-Na

Lebensgewohnheiten: ohne Alkohol und Nikotin

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Dahse
geboren am: 17.04.1977 in Jena
Familienstand: verheiratet

Schul- und Ausbildungsdaten

Schule: 09/1983 – 08/1991 POS Grete Unrein, Jena
09/1991 – 05/1995 Carl-Zeiss-Gymnasium, Jena
05/1995 Abitur

Hochschulausbildung: 10/1995 – 9/1997 Grundstudium Pharmazie an der FSU Jena
10/1997 – 9/1998 Studienaufenthalt an der Université de Genève
03/1998 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes
10/1998 – 11/2000 Hauptstudium Pharmazie an der FSU Jena

Praktikum: 01/2001 – 07/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
als Stipendiat der Niemann-Stiftung am
Imperial College, London
08/2001 – 01/2002 Semmelweis-Apotheke Jena

Berufsabschluss: 02/2002 – 03/2002 Pharmazeutische Staatsprüfung
und Approbation zum Apotheker

Berufliche Tätigkeit

seit 04/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl
für Pharmazeutische/Medizinische Chemie der
FSU Jena

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena bekannt ist,
- ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen der Arbeit angegeben habe,
- ich weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe noch Dritten unmittelbare oder mittelbare geldwerte Leistungen für Arbeiten erbracht habe, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der Dissertation stehen,
- ich die vorliegende Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- ich die vorliegende Dissertation oder eine in wesentlichen Teilen ähnliche Abhandlung oder eine andere Arbeit nicht als Dissertation in einer anderen Hochschule eingereicht habe,
- mir außer den im Folgenden genannten Personen niemand sonst Unterstützung bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts Unterstützung gewährt hat: Prof. Dr. h.c. mult. H. Oelschläger, Prof. Dr. J. Lehmann, Prof. Dr. I. Dahse, PD Dr. phil. nat. A. Seeling, Dr. rer. nat. Gabriel Natura, Dr. rer. nat. J. Wange, Apothekerin K. Dahse, Apotheker U. Conrad und Herrn C. Feller.

Jena, den 20.02.2007

Thomas Dahse