

Aus dem Walther-Straub-Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. med. P. Eyer

Einfluß von TCDD auf den Arzneimittelstoffwechsel am Beispiel von Imipramin

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Jürgen Christian Auernhammer
Coburg
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Elmar Richter

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. St. Zahler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 6.März 2003

1	EINLEITUNG	1
1.1	Dioxine: Vorkommen, biologische Wirkung, Resorption und Metabolismus	1
1.2	Imipramin als pharmakologische Modells substanz	3
1.3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	5
2	MATERIAL UND METHODIK	6
2.1	Rahmenbedingungen	6
2.2	Material und Chemikalien	6
2.2.1	Versuchstiere	6
2.2.2	Chemikalien, Lösungen und Puffer	7
2.2.3	Instrumente und Geräte	8
2.3	Intraduodenale Applikation von TCDD und Imipramin <i>in vivo</i> (Versuch 1)	10
2.3.1	Versuchsvorbereitungen	10
2.3.1.1	Vorbereitung des Katheters zur Implantation in die Arteria Carotis der Ratte	10
2.3.1.2	Vorbereitung eines Katheters zur Implantation in das Duodenum einer Ratte	11
2.3.2	Operationstechnik	11
2.3.3	Versuchsdurchführung und Blutprobenentnahme	14
2.4	Intragastrale Applikation von TCDD und Imipramin <i>in vivo</i> (Versuch 2)	15

2.4.1	Nüchterne Tiere (Versuch 2a)	15
2.4.2	Gefütterte Tiere (Versuch 2b)	15
2.5	Intrajejunale Applikation von TCDD und Imipramin über einen implantierten Darmkatheter (Versuch 3)	16
2.6	Mikrosomaler Leberstoffwechsel von Imipramin nach TCDD-Induktion (Versuch 4)	17
2.6.1	Gewinnung von Lebermikrosomen	17
2.6.2	Bestimmung des Proteingehaltes der Mikrosomen	17
2.6.3	Bestimmung des Induktionsstatus mit Ethoxyresorufin (Versuch 4a)	18
2.6.3.1	Prinzip und Durchführung	18
2.6.3.2	Erstellung einer Resorufin-Eichgeraden	19
2.6.4	Mikrosomaler Umsatz von Imipramin nach TCDD-Induktion (Versuch 4a)	20
2.7	Extraktion und Analytik	21
2.7.1	Bestimmung der Imipramin-Plasmakonzentrationen	21
2.7.1.1	Probenvorbereitung	21
2.7.1.2	HPLC-Analytik	21
2.8	Auswertung, Datenverarbeitung und Statistik	23
3	ERGEBNISSE	24
3.1	Einfluß von TCDD auf den Imipraminstoffwechsel in vivo	24
3.1.1	Intraduodenale Applikation von Imipramin (Versuch 1)	24

3.1.2	Intragastrale Applikation (Versuch 2)	26
3.1.2.1	Nüchternes Kollektiv (Versuch 2a)	27
3.1.2.2	Gefüttertes Kollektiv (Versuch 2b)	28
3.1.3	Intrajejunale Applikation über einen implantierten Katheter (Versuch 3)	29
3.2	Einfluß von TCDD auf den Imipraminstoffwechsel <i>in vitro</i> (Versuch 4)	30
3.2.1	TCDD-Induktion des Ethoxyresorufin-Stoffwechsels (Versuch 4a)	30
3.2.2	Mikrosomeninkubation mit Imipramin (Versuch 4b)	31
4	DISKUSSION	33
4.1	Bedeutung von Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	33
4.2	Imipramin als pharmakologische Modellsubstanz	34
4.3	Beeinflussung von Stoffwechselfvorgängen durch TCDD	35
4.4	Einfluß von TCDD auf die <i>in vivo</i> -Pharmakokinetik von Imipramin	36
4.4.1	Intraduodenale Applikation	36
4.4.2	Intragastrale Applikation	37
4.4.3	Intrajejunale Applikation	37
4.5	Einfluß von TCDD auf den Imipramin-Stoffwechsel in Lebermikrosomen	38
4.6.	Schlußfolgerungen für den Imipramin-Stoffwechsel	39

5	ZUSAMMENFASSUNG	43
6	LITERATURVERZEICHNIS	44
7	ANHANG	52
7.1	Abbildungen	53
7.2	Tabellen	54
7.3	Chromatogramme	66
7.4	Danksagung	68
7.5	Lebenslauf	69

Abkürzungen

AUC	Area Under Curve
CYP	Cytochrom P450
DMI	Desipramin, Desmethylimipramin, 1,3-Dimethyl-2-imidazolidinon
DMQ	Demethylierungsquotient
EROD	7-Ethoxyresorufin-Odeethylase
Gluc 6P	Glucose-6-phosphat
Gluc 6P DH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
IE	Internationale Einheiten
IMI	Imipramin
IU	International Units
KG	Körpergewicht
KO	Kontrollgruppe
MG	Molekulargewicht
MW	Mittelwert
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
OP	Operation
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PE	Polyethylen
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
TCDD	2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
UV	Ultraviolett
VER	Verumgruppe

1 EINLEITUNG

1.1 Dioxine: Vorkommen, biologische Wirkung, Resorption und Metabolismus

Nur wenige chemische Substanzen haben in der Öffentlichkeit über die letzten 30 Jahre so viel Interesse ausgelöst und negative Schlagzeilen produziert wie Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD; *Abbildung 1*), das "Seveso-Gift". TCDD ist wohl eine der giftigsten bislang bekannten niedermolekularen Verbindungen (Forth, 1977). Sowohl die weite Verbreitung der Substanz als auch das Risiko akzidenteller Aufnahme durch den Menschen haben dazu geführt, daß Dioxine im allgemeinen und insbesondere das Isomer TCDD im Verlauf der vergangenen Jahrzehnte Gegenstand eines enormen Forschungsaufwandes waren.

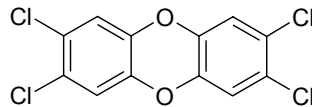
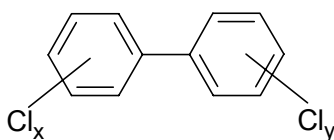


Abbildung 1: Struktur von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin

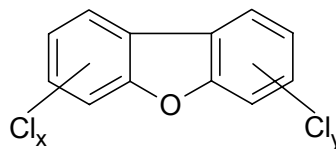
TCDD ist ein chloriertes Phenolderivat und entsteht in der industriellen Chemie als Verunreinigung oder akzidentell vor allem bei der Produktion von Trichlorphenol, welches eine wichtige Grundsubstanz bei der Herstellung von Bakteriziden und Herbiziden ist (Forth, 1977). Neben der Müllverbrennung, als potentielle Kontaminationsquelle, sind thermische Prozesse wie z.B. bei der Kupferrückgewinnung, Kabelverschmelzung, Sekundäraluminium-Herstellung oder auch Automobilabgase mögliche Emissionseinträger (Hagenmaier, 1989).

Bei TCDD handelt es sich in der Umwelt allerdings nur um den Prototyp einer ganzen Reihe von halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen (*Abbildung 2*), welche häufig gemeinsam auftreten und ähnliche toxische Effekte haben (Pitot et al., 1980).

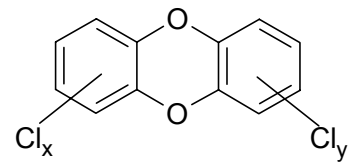
Polychlorierte



Biphenyle
(209 Kongenere)



Dibenzofurane
(135 Kongenere)



Dibenzo-p-dioxine
(75 Kongenere)

Abbildung 2: Strukturen einiger persistenter Organochlorverbindungen

TCDD ist in geringen Mengen in Böden, Flora und Fauna moderner Industriegesellschaften weitverbreitet. Insbesondere durch ihr erhöhtes Vorkommen in der Umgebung von Mülldeponien und Müllverbrennungsanlagen bzw. der Holz- und Papierindustrie, als auch als Inhaltsstoff von kontaminierten Nahrungsmitteln erregt die Substanz weltweit immer wieder Interesse (Travis und Hattemer-Frey, 1991; Fries und Paustenbach, 1990; Conacher et al., 1993; deJong et al. 1993). Die jüngsten Skandale waren die Entdeckung hoher PCB-, Dioxin- und Dibenzofuranbelastungen in belgischen Lebensmitteln (Bernard et al., 2002) und die PCB-Belastung in bayerischen Schulen (Anon 2001). Der Mensch nimmt TCDD vor allem durch kontaminierte Nahrungsmittel auf, insbesondere durch den Verzehr von Fisch aus belasteten Gewässern bzw. Fleisch von kontaminierten Rindern. Die Ingestion und Inhalation von Stäuben sowie in bestimmten Gebieten auch die Aufnahme über die Haut durch kontaminierte Böden stellen weitere mögliche Routen der TCDD-Aufnahme dar. (Fries und Paustenbach, 1990; Hagenmaier, 1989; Paustenbach et al., 1992).

Pharmakokinetische Studien an Labortieren lassen vermuten, daß 50-90% von durch die Nahrung aufgenommenem TCDD absorbiert werden. Die Substanz wird im Fettgewebe und der Leber konzentriert (Huff et al., 1991), weswegen die TCDD-Toxizität sich invers zum Körperfettanteil eines Organismus verhält (Geyer et al., 1993). Das Gift wird langsam verstoffwechselt, die biologische Halbwertszeit liegt zwischen Wochen bei Nagetieren und Jahren beim Menschen (Pirkle et al., 1989). Die hohe Persistenz von TCDD zeigt sich auch bei Bewohnern der am stärksten kontaminierten Zone A in Seveso, die 20 Jahre nach dem Unfall noch 10-fach höhere Plasmakonzentrationen hatten als der Durchschnitt der nicht belasteten Italiener aus dem Norden Mailands (Landi et al., 1998). Der Organismus eliminiert TCDD durch Exkretion von Metaboliten in Galle und Harn, aber auch durch passive Diffusion von TCDD durch die Darmwand (Huff et al., 1991, Moser und McLachlan, 1999).

Die biologische Hauptwirkung von TCDD wird auf seine Bindung an ein Rezeptorprotein, den Ah-Rezeptor, zurückgeführt; es kommt zur Induktion von Cytochrom P450-Enzymen (Portier et al., 1993). Trotz der extrem hohen Toxizität von TCDD (um den Faktor 500 höher als Strychnin) konnte als Akuteffekt beim Menschen bisher lediglich die Chlorakne gesichert werden (Dickson und Buzik, 1993). Unspezifische Vergiftungszeichen, z.B. beobachtet nach dem Unglück von Seveso vom Juli 1976, sind Anorexie, Konjunktivitis, Schlaflosigkeit, Libidoverlust etc. (Forth, 1977). Letale Dosen sind bisher glücklicherweise von Menschen noch nicht aufgenommen worden, es ist kein einziger Todesfall dokumentiert (Rozman, 1989).

Das Interesse der Öffentlichkeit erklärt sich vielmehr durch die kanzerogene Wirkung von TCDD. Bei Ratten erzeugt es maligne Tumoren in Lunge, Nasen-Rachenraum, Schilddrüse, Nebennieren, Leber und der Haut (Huff et al., 1991). Beim Menschen, welcher wahrscheinlich weniger TCDD-empfindlich ist als zahlreiche Labortiere (Dickson und Buzik, 1993), wird eine kanzerogene Wirkung auf Weichteilgewebe, Knochenmark, Schilddrüse und Lunge vermutet. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet besteht jedoch bisher keine Einigkeit

bezüglich des tatsächlich bestehenden Risikos (Ames und Gold, 1992; Johnson, 1993; Kayajanian, 1999).

In der Umwelt ist TCDD generell nur in geringen Spuren vorhanden. Der Nachweis dieser Spuren in biologischen Matrices verlangt eine fortgeschrittene Analytik, die weltweit nur in einer begrenzten Zahl von Speziallaboratorien verfügbar ist. Im Verlauf der vergangenen zwei Jahrzehnte wurden Verfahren entwickelt, die eine Reinigung des biologischen Materials oder von Böden sowie einen zuverlässigen Nachweis bis zur *ppt* (parts per trillion) Größenordnung erlauben (Firestone, 1991; Zwickenpflug und Richter, 1988).

1.2 Imipramin als pharmakologische Modellsubstanz

Imipramin ist der Prototyp der tricyclischen Antidepressiva. Synthetisiert wurde es erstmals im Jahre 1957. Es entsteht aus zwei Molekülen Nitrobenzylchlorid, die zu einem Stilbenderivat kondensiert werden. Unter Katalyse kommt es zur Hydrierung, ein thermischer Ringschluß führt zur Schlüsselsubstanz der Syntheseriehe, dem Imipramin (Auterhoff et al., 1991). Hiervon ausgehend wurde in den folgenden Jahrzehnten eine ganze Reihe von Derivaten synthetisiert.

Seit etwa 30 Jahren ist Imipramin wichtiger Bestandteil der medikamentösen Behandlung depressiver Erkrankungen. Metabolismus und Pharmakokinetik der Substanz sind sowohl klinisch als auch experimentell intensiv untersucht worden. Dies gilt auch im Vergleich zu vielen anderen ähnlich häufig verschriebenen Medikamenten (Gram, 1988).

Die Elimination von Imipramin erfolgt fast ausschließlich über die Leber, d.h. durch Metabolisierung in den Lebermikrosomen. Die zwei Hauptstoffwechselwege sind die Demethylierung zum pharmakologisch ebenfalls aktiven Desipramin und die Hydroxylierung zum 2-OH-Imipramin. Desipramin wird ebenfalls rasch durch 2-Hydroxylierung weiter verstoffwechselt. Humanlebermikrosomen produzieren bei Inkubation mit Imipramin Desipramin (DMI) (84%), 2-OH-Imipramin (10%) und 10-OH-Imipramin (6%) (Lemoine et al., 1993). Eine Demethylierung von Imipramin wurde auch in Dünndarmmikrosomen der Ratte nachgewiesen (Christ et al., 1983). Die Ausscheidung über die Niere erfolgt nach Glukuronidierung. Etwa 90% der Imipramin-Metaboliten im Harn sind solche 2-OH-Metaboliten, von denen wiederum ein großer Anteil glukuronidiert ist (Gram, 1988). Die wichtigsten Stoffwechselwege des Imipramins sind in *Abbildung 3* dargestellt.

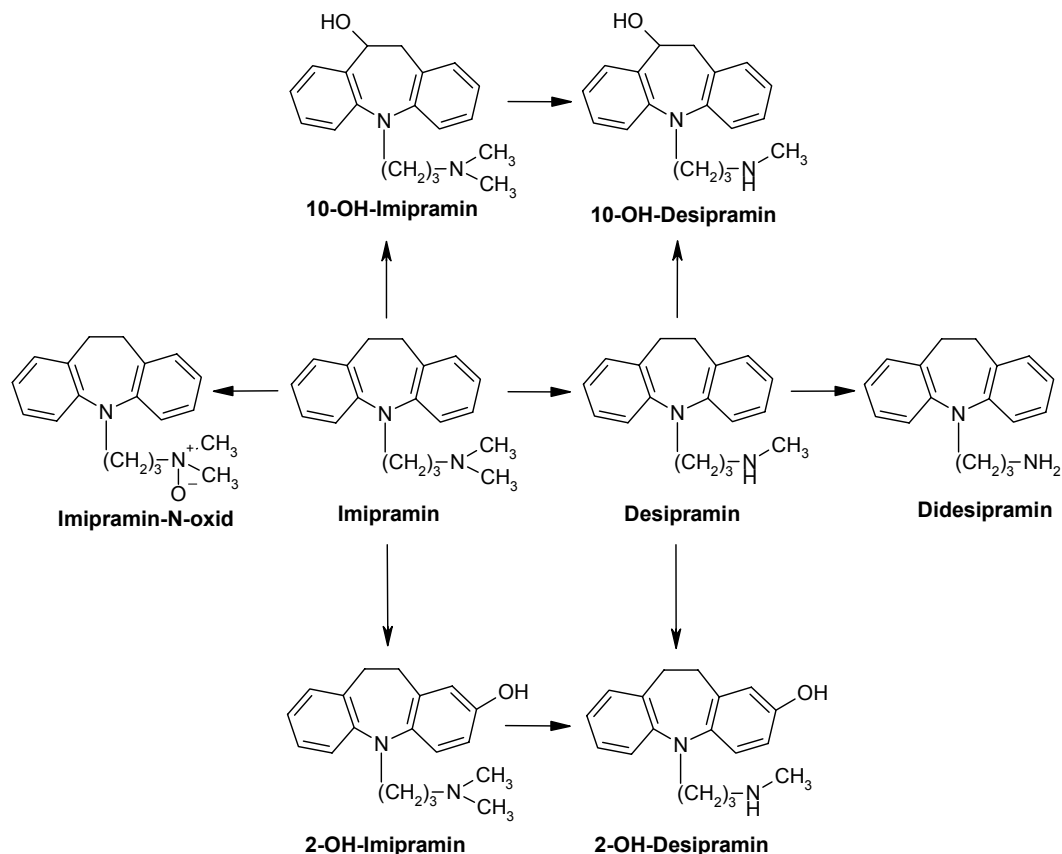


Abbildung 3: Hauptstoffwechselwege von Imipramin

Im klinischen Gebrauch wird Imipramin in einer Dosierung von 100 bis 150 mg täglich in Tablettenform verabreicht. Es wird nach oraler Gabe gut resorbiert, die orale Bioverfügbarkeit liegt zwischen 20 und 70%. Trotz der großen Anzahl von Antidepressiva, die zwischenzeitlich Marktreife erreicht haben und erheblich höhere Marktanteile besitzen, kann davon ausgegangen werden, daß bis heute keine Substanz verfügbar ist, deren klinische Wirksamkeit die des Imipramin bei schweren depressiven Erkrankungen wesentlich übertrifft (Rosenberg, 1993; Workman und Short, 1993). Auch bei Panikattacken und anderen Angstzuständen ist die Wirksamkeit des Imipramins mit einer Ansprechrate von ca. 70% unübertroffen (Wurthmann und Klieser, 1992).

Die Elimination von Imipramin aus dem Organismus unterliegt einer ausgeprägten Variabilität, wodurch sich die interindividuell sehr unterschiedlichen Serumkonzentrationen erklären lassen. Sowohl die Demethylierung wie auch die Hydroxylierung sind großen interindividuellen Schwankungen unterworfen. Die Steady-state-Konzentrationen können bei gleicher oraler Dosis bei verschiedenen Patienten bis zu 50-fache Unterschiede aufweisen, was zu Versuchen geführt hat, die Imipramin-Therapie durch pharmakokinetische Modelle zu optimieren (Furlanut et al, 1993). Die Eliminations-Halbwertszeit aus Plasma liegt zwischen 9 und 24 Stunden. Dabei ist die Steady-state-Konzentration von Imipramin im wesentlichen von der Demethylierung, jene von Desipramin aber von der Hydroxylierungsaktivität abhängig.

Da zahlreiche Medikamente über Stoffwechselwege metabolisiert werden, ist es nicht überraschend, daß eine Reihe von Wechselwirkungen zwischen Imipramin und diversen anderen pharmakologisch aktiven Substanzen beschrieben worden sind. Unter anderem ist dies für Betablocker und Calcium-Antagonisten der Fall (Hermann et al., 1992).

Nachdem die Steady-state-Konzentrationen von Imipramin und Desipramin nicht miteinander korrelieren, ist es naheliegend, Demethylierung und Hydroxylierung verschiedenen Isoenzymen des Cytochrom P450 zuzuordnen. Diese Vermutung konnte inzwischen mit Hilfe von kommerziell verfügbaren Isoenzymen des Cytochrom P450 bewiesen werden (Lemoine et al., 1993; Skjelbo und Brosen, 1992; Su et al., 1993). Demnach sind die Isoenzyme 1A2 und 3A4 hauptsächlich für die N-Demethylierung, das Isoenzym 2D6 für die 2-Hydroxylierung verantwortlich. Bezüglich des Cytochrom P450 1A1, eines 3-Methylcholanthren-induzierbaren Isoenzym, welches auch durch TCDD induziert wird, gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Während das gereinigte Isoenzym eine mehrfach höhere Hydroxylierungsaktivität gegenüber Desipramin aufwies als alle anderen untersuchten Isoenzyme (von Bahr et al., 1986) war der Umsatz in Lebermikrosomen von mit 3-Methylcholanthren induzierten Ratten nicht gesteigert (Rouer et al, 1987).

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Um weitere Aufschlüsse über den Imipramin-Stoffwechsel zu erhalten, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit zunächst der Einfluß von TCDD auf den Metabolismus von Imipramin *in vivo* untersucht. Nach Erhalt von überraschenden Ergebnissen bei intraduodener Imipramin-Applikation durch einen Katheter (Versuch 1) wurde dann versucht, diese Resultate an ungestressten, d.h., nicht operierten Ratten nachzuvollziehen (Versuche 2 und 3).

Dies geschah zunächst durch intragastrale Applikation von Imipramin und TCDD durch Schlündeln, sowohl bei nüchternen (Versuch 2a) als auch bei gefütterten Ratten (Versuch 2b). Mittels HPLC wurden jeweils Imipramin und Desipramin (DMI) im Plasma bestimmt. Zur weiteren Klärung der Ergebnisse wurden dann die Versuche mit intrajejunaler Applikation wiederholt (Versuch 3). Um den Einfluß von TCDD auf die Stoffwechselaktivität der mischfunktionellen Oxygenasen ohne Beeinflussung durch Resorptionsort und dortigen Stoffwechsel beurteilen zu können, wurden schließlich auch Versuche mit Mikrosomeninkubation von TCDD-vorbehandelten Ratten *in vitro* durchgeführt (Versuch 4).

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Rahmenbedingungen

Versuchsort: Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Versuchslabor im Tierkeller, 1.UG des Instituts;

Analytik: Neurochemische Abteilung der Psychiatrischen Universitätsklinik, Labor Dr. Kuss, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Versuchszeitraum: September 1988 bis Juli 1989 (Versuchsdurchführung),
September 1988 bis August 1989 (Analytik).

Die Versuche waren von der Regierung von Oberbayern (AZ 211-2531-130/87) genehmigt. Alle operativen Eingriffe wurden vom Versuchsleiter, Herrn Prof. Dr. Richter, persönlich vorgenommen.

2.2 Material und Chemikalien

2.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittleren Körpergewicht von 200-300 g (Interfauna, Tuttlingen). Sie wurden in einem künstlichen Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 h gehalten und ad libitum gefüttert (Trockenfutter Alma H 1003, Fa. Botzenhardt KG, Kempten) und getränkt. In allen Versuchen wurden die Ratten mit TCDD in öliger Lösung vorbehandelt (Verumgruppen). Die Kontrollgruppen erhielten die entsprechende Menge Öl ohne TCDD-Zusatz.

Für die *in vivo* Versuche wurden folgende Kollektive gebildet: Versuch 1 (intraduodenale Applikation) 11 Ratten (6 in der Kontrollgruppe, 5 in der Verumgruppe), Versuch 2a (intra-gastrale Applikation, nüchtern) 30 Ratten (jeweils 5 Tiere in Kontroll- und Verumgruppe zu drei verschiedenen Zeiten nach Imipraminapplikation), Versuch 2b (intra-gastrale Applikation, gefüttert) 11 Ratten (6 in Kontroll-, 5 in Verumgruppe), Versuch 3 (intraejunale Applikation) wiederum 11 Ratten (6 in Kontroll-, 5 in Verumgruppe).

Der mikrosomale Stoffwechsel von Imipramin wurde nach Induktion durch intra-gastrale Applikation an 12 Versuchstieren durchgeführt (jeweils 6 in Kontroll- und Verumgruppe). Mangelnde zahlenmäßige Übereinstimmung zwischen Kontroll- und Verumgruppe in einzelnen Kollektiven erklärt sich durch den Ausfall von Tieren im Rahmen der Präparation und Versuchsvorbereitung.

2.2.2 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Es wurden im Rahmen der beschriebenen Studie folgende Chemikalien verwendet:

- 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, Reinheitsgrad > 98 %, Promochem, Wesel
- Aceton, p.a., Merck, Darmstadt
- Acetonitril, p.a., Merck, Darmstadt
- Ethylacetat, p.a., Merck, Darmstadt
- n-Hexan, p.a., Promochem, Wesel
- Xylol, p.a., Merck, Darmstadt
- di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat, p.a., Merck, Darmstadt
- Kaliumchlorid, p.a., Merck, Darmstadt
- Magnesiumdichlorid-2-hydrat, p.a., Merck, Darmstadt
- Natriumhydroxidplättchen, p.a., Merck, Darmstadt
- Natriumcarbonat wasserfrei, p.a., Merck, Darmstadt
- Saccharose, p.a., Merck, Darmstadt
- Glucose-6-phosphat, Dinatriumsalz, Boehringer, Mannheim
- Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, aus Hefe, 350 IE/ml, Boehringer, Mannheim
- NADH, Dinatriumsalz 100%, Boehringer Mannheim
- NADP, Dinatriumsalz 98%, Boehringer Mannheim
- Nicotinamid, p.a., Merck, Darmstadt
- Heparin Natriumsalz Biosynth, Riedel-de Haën, Seelze
- Ethoxyresorufin, p.a., Pierce, Rockford, IL, USA
- Resorufin, p.a., Pierce, Rockford, IL, USA
- Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Trometamol, p.a., Merck, Darmstadt
- alle anderen Chemikalien in p.A. Qualität von Merck

An Lösungen und Puffern verwendeten wir folgende Materialien:

<u>NADPH regenerierendes</u>	0,5 mM	NADP ⁺ (MG 787,4)
<u>System:</u>	4,2 mM	Glucose-6-phosphat (MG 304,2)
	0,3 IE /ml	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
	4,2 mM	Magnesiumdichlorid-6-hydrat (MG 203,3)
	4,2 mM	Nicotinamid (MG 122,13)
	in Tris-Puffer (0,15 M; pH 7,4) ad 100 ml gelöst	
<u>Mikrosomen-Puffer, A:</u>	250 mM	Saccharose (MG 342,3)
	mit 5 N NaOH auf pH 7,4 einstellen	
<u>Phosphat-Puffer, pH 7:</u>	71 mM	KH ₂ PO ₄ (MG 136,1)
	67 mM	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (MG 138)
<u>Tris-Puffer 0,15 M:</u>	150 mM	KCl (MG 74,55)
	10 mM	MgCl ₂ · H ₂ O (MG 95,21)

50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MG 121,1)
mit rauchender HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Tris-Puffer 0,066 M:

analoge Zusammensetzung
mit rauchender HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Für die *in vivo* Versuche wurden außerdem folgende Pharmaka und Lösungen benötigt:

- Imipramin-HCl, 5-(3-Dimethylaminopropyl)-10,11-dihydro-5H-di-benz(b,f)azepin
-hydrochlorid in 2 ml Ampullen zu je 25 mg (Tofranil), Ciba-Geigy, Wehr
- Desipramin-HCl, 10,11-Dihydro-5-(3-dimethylaminopropyl)-5H-di-benz(b,f)azepin
-hydrochlorid, Referenzsubstanz von Ciba-Geigy, Wehr
- Intralipid, Pfrimmer u. Co., Erlangen
- Ketamin HCl, 2-(2-Chlorphenyl)-2-(methylamino)cyclohexanon, Injektionslösung
(50 mg/ml Base), Parke-Davis, München
- Combelen, Bayer AG, Leverkusen
- Expafusin, Pfrimmer, Erlangen

2.2.3 Instrumente und Geräte

Zur Präparation der Versuchstiere verwandten wir folgende Instrumente:

- Augenschere, Aesculap, Tuttlingen
- Skalpellhalter Nr. 4, Klingen Nr. 19
- Arterienklemmen, BH 206, Aesculap, Tuttlingen
- Besteck-Wanne
- Fadenschere
- Katheter "Spieß", 22 cm
- Nadelhalter, BM 406, Aesculap, Tuttlingen
- Pinzette, anatom., atr., Aesculap, Tuttlingen
- Pinzette, chir., gerade, Aesculap, Tuttlingen
- Pinzette, anatom., gebogen, Aesculap, Tuttlingen
- Pinzette, anatom., gerade, Aesculap, Tuttlingen
- Sterilisationskasten

an Nahtmaterial:

- Ethibond, 3m, Best. Nr. EH 555 P, Ethicon, Norderstedt
- Nähseide schwarz, (4/0), 3 x 50 cm, Serag Wiesner
- Vicryl (3/0), Ethicon, Norderstedt

an Gerätschaften für den operativen Abschnitt:

- Infusionspumpe, Braun, Melsungen

- Jackett zum Schutz und zur Stabilisierung der Fixationsstelle der Stahlfeder am Nacken der Ratte, Herstellung in der Hauswerkstatt nach Angabe
- Macrolon Einzelkäfig, Ehret GmbH & Co KG, Emmendingen
Maße: oben außen 238 x 138 mm, unten innen 215 x 105 mm,
Höhe 130 mm, Fläche ca. 225cm²
- OP-Tisch, Meuwing-Braun, Süssert Schmidt, Germering
- Polyethylenkatheter, PE 10 für die Kanülierung des Duodenum Art. Nr. 7406, Ulrich, Ulm
- Polyethylenkatheter, PE 20 für die Kanülierung der A. Carotis, Art. Nr. 7401, Ulrich, Ulm
- Schermaschine + Scherkopf, Hauptner München
- Stahlfedern (30 cm lang, 0,5 cm I.D.) mit Knopf zur subkutanen Implantation,
Herstellung in der Hauswerkstatt nach Angabe

Gerätschaften für den analytischen Abschnitt:

- Aufgabensystem: Negretti & Zambra mit 100 µl Dosierschleife
- Automatischer Probengeber, Modell 231/401, Abimed, Düsseldorf
- High Precision Pump, Model 300B, Gynkotek
- Spektrophotometer SP4, Gynkotek, Germering
- UV-Photometer UVD 160-2, Gynkotek, Germering
- Shimadzu C-R3A, Integrator, Chrompack, Frankfurt/Main
- HPLC Säulen
 - Nucleosil 100-5 C18, 4 · 200 mm, Macherey-Nagel, Düren
 - LiChrospher 100 RP18, 5 µm, 4 · 250 mm, Merck, Darmstadt
- Analysenwaagen, H35 und PC 440 Delta Range, Mettler, Holzkirchen
- Digital pH-Meter Typ 645, Knick, Berlin
- Glashomogenisator nach Potter-Elvehjem, 5 ml, 10 ml, 15 ml, Bender & Hobein, München
- Magnetheizrührer, RCT, IKA-Labortechnik, Staufen
- Potter Reax 2000, Heidolph, Lauda
- Vortex Rüttler, Bachofer, Reutlingen
- Trockenschrank U 60, Memmert, Schwabach
- Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen
- Ultraschallbad, Typ H O R , Patz, Wankendorf
- Ultrazentrifuge, TGA-50, Kontron, Eching
- UV-Lampe Osram G176 mit ULTRA-VITOLUX 300 W, Osram München
- Wasserbad mit Schüttler, Modell 676, New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA
- Zentrifuge, centra-M, International Equipment Company, Neadham Heights,
Massachusetts, USA
- Zentrifuge, RC5C, Sorvall Instruments, Bad Homburg
- Clinipette, Einvolumenpipette, 5, 25, 50, 100, 200, 500 µl, Clinicon Mannheim
- Combitips, 0,5, 1,25, 5, 12,5, 50 ml Eppendorf, Hamburg

- Mikroliter GC Spritze, 10, 50, 100 ml, Hamilton, Bonaduz, CH
- Multipette, Handdispenser für Serierendosierungen, plus Adapter für Combitips 50 ml, Eppendorf, Hamburg
- Varipette, Micropipette mit kontinuierlicher Volumenwahl, 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl, Eppendorf Hamburg
- Pipettenspitzen Comfortips, 0,5 - 10 µl, Eppendorf Hamburg
- Reagenzröhrchen 5 ml Inhalt, Polypropylen mit Deckel, Sarstedt
- Reaktionsgefäße Typ 3810, 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg

2.3 Intraduodenale Applikation von TCDD und Imipramin *in vivo* (Versuch 1)

2.3.1 Versuchsvorbereitungen

2.3.1.1 Vorbereitung des Katheters zur Implantation in die Arteria Carotis der Ratte

Ein Polyethylenkatheter PE 20 wird auf 83 cm abgeschnitten. Durch das Einziehen eines Edelstahldrahtes in den Katheter setzt man die Voraussetzung zum Anbringen von zwei Fixierungsknoten, die später den Katheter an der Halsmuskulatur befestigen sollen. Der PE Katheter wird über einer Flamme an den Stellen, an denen die Knoten entstehen sollen, erwärmt und zusammengeschoben. Der Edelstahldraht verhindert hierbei die Stenosierung des Katheterlumens und wird nach der Knotenbildung wieder herausgezogen (siehe *Abbildung 4*).

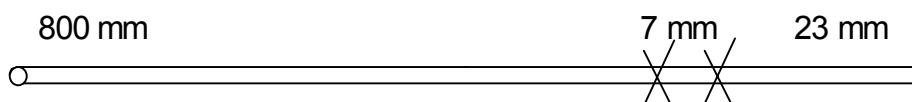


Abbildung 4: Carotis-Katheter PE-Schlauch (PE 20: 0,38 x 1,09 mm), 830 mm

Den ersten Knoten setzt man genau 23 mm von der Katheterspitze entfernt, den zweiten 7 mm hinter den ersten Knoten. So verhindert man das Vorrutschen des implantierten Katheters aus dem Truncus brachiocephalicus in die linke Kammer und die Zerstörung der Aortenklappe. Ca. 1 cm nach dem zweiten Knoten wird der Katheter um einen erwärmten Metallstab, Durchmesser 0,8 cm, geschlungen und eine Minute in ein 80 °C warmes Wasserbad gehalten. Dadurch entsteht eine kleine Schlinge, die später nach der Implantation, für Bewegungen der Ratte Raum läßt; also einen Puffer bildet, der das Verrutschen des Katheters in der A. carotis verhindern soll. Dies erwies sich als sinnvoll, da in den ersten Vorversuchen mehrere Ratten an einer Herzbeutelamponade oder Perforation des Herzens durch Verrutschens des Katheters

ters starben. Der fertige Katheter wird spitz angeschnitten, um das Einführen in die A. Carotis zu erleichtern. Die Katheter werden auf Dichtigkeit und Durchgängigkeit geprüft und können nach der Sterilisation implantiert werden.

2.3.1.2 Vorbereitung eines Katheters zur Implantation in das Duodenum einer Ratte

Zur Anfertigung des Duodenalkatheters wird PE 10 und PE 20 Schlauchmaterial verwendet. 80 cm PE 20 Schlauch wird abgeschnitten, ein Metalldraht eingezogen und auf die oben beschriebene Weise ein Knoten 10 mm vor dem Schlauchende gebildet. Er dient der Fixierung an der Abdominalmuskulatur. Den ersten Metalldraht zieht man heraus und ersetzt ihn durch einen dünneren Metalldraht. Nun werden 60 mm des dünneren PE 10 Schlauches an dem Knotenende auf den Metalldraht aufgezogen und mechanisch adaptiert. Durch eine Gasflamme verschweißt man beide Schläuche miteinander.

10 mm vor dem Ende des PE 10 Schlauches wird noch ein Knoten gebildet, welcher zur Fixierung im Darmlumen dient (siehe *Abbildung 5*).

Der Metalldraht wird nun herausgezogen und der Katheter auf Durchgängigkeit und Dichtigkeit überprüft. Nach der Gassterilisation können die Katheter implantiert werden.

Man verwendet den dickeren PE 20 Schlauch nur subcutan, der elastischere PE 10 Schlauch kann durch die Abdominalwand geführt werden, um das Duodenum zu sondieren. Dies vermeidet Verletzungen, Rupturen und schwere Bauchtraumen durch den starrereren PE 20 Schlauch.

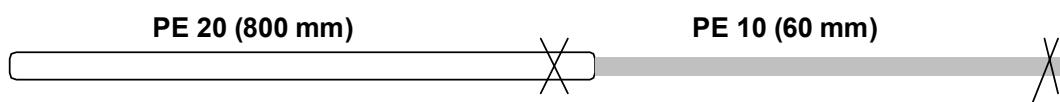


Abbildung 5: Duodenalkatheter (PE 20: 0,38x1,09 mm; Länge 800 mm / PE 10: 0,28x0,61 mm; Länge 60 mm / X = Position der Knoten)

2.3.2 Operationstechnik

Vor der Operation werden die Ratten 24 Stunden nüchtern gesetzt. Die Ratten werden durch intramuskuläre Injektion in die Adduktorenmuskulatur beider Hinterbeine mit Ketamin und Combelen (2 und 1,2 ml/kg Körpergewicht entsprechend 100 und 12 mg/kg) anästhesiert. Der Halsbereich und die Bauchdecke wird rasiert und desinfiziert. Die Ratte wird auf einem gewärmten Op-Tisch fixiert und zuerst im ventralen Halsbereich die A. carotis frei präpariert. Vom dorsalen Halsbereich wird mit Hilfe einer weitlumigen Kanüle der Katheter unter der Haut zur ventralen Seite geführt und anschließend mit heparinisierter Kochsalzlösung gefüllt. Die A. carotis wird nach cranial mit einer Einzelknopfnah abgebunden und caudal mit einer

Klemme möglichst distal abgeklemmt und ohne sie zu durchtrennen mit einer Augenschere eröffnet.

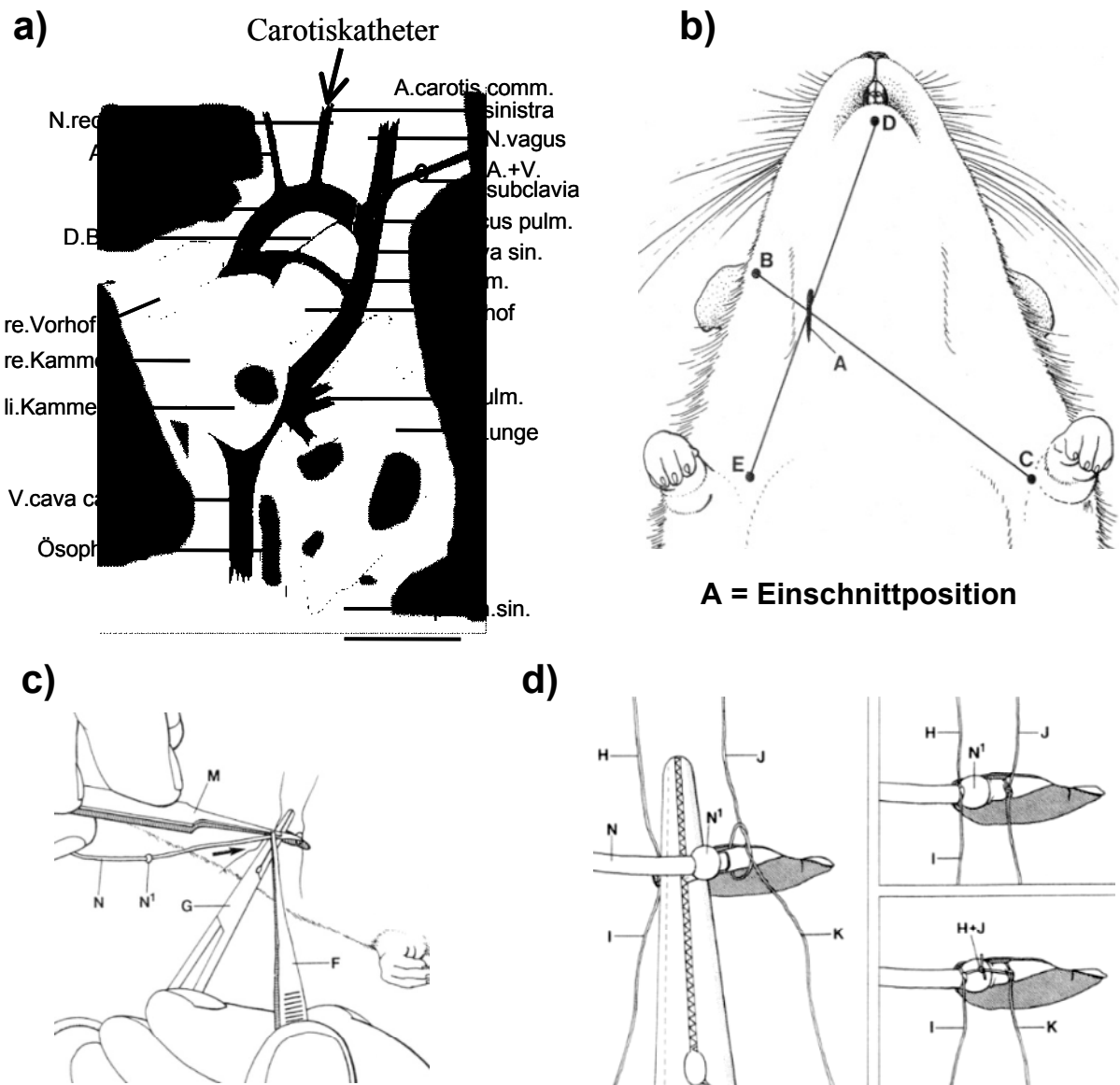


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Kanülierung der A. carotis

a) Anatomische Übersicht (aus Cook, 1965)

b-d) Operatives Vorgehen (aus van Dongen et al., 1990)

Der angespitzte Katheter wird nun unter Öffnen der Klemme in die A. carotis circa 20 mm weit bis kurz vor die Aortenklappe des Herzen eingeführt und mit zwei Einzelknopfnähten in der Arterie vor und nach dem Knoten fixiert, sowie mittels heparinierter Kochsalzlösung auf seine Durchgängigkeit geprüft. Die Spirale des Katheters fixiert man mit zwei Nähten an der Halsmuskulatur. Der Situs wird mit vier Einzelknopfnähten verschlossen.

Jetzt wird die Bauchhöhle in der Linea alba auf 2-3 cm Länge eröffnet. Der Duodenalkatheter wird wiederum vom dorsalen Halsbereich subkutan bis zur Bauchhöhlenöffnung geführt. Durch eine Sonde wird die Abdominalwand perforiert, der Duodenalkatheter durchgezogen und durch eine Einzelknopfnahat am M. rectus abdominis fixiert.

Das Duodenum wird nun aus der Bauchhöhle auf einen mit Kochsalz getränkten Gazestreifen vorgelagert und mit einer Kanüle punktiert. Durch diese Öffnung wird der Duodenalkatheter etwa 1 cm weit vorgeschoben und mit zwei Nähten in der Darmwand fixiert. Nach einer weiteren Fixierung des Katheters am Übergang vom PE 10 zum PE 20 Katheter in der Bauchwand wird diese mit einer fortlaufenden Naht (Peritoneum und Muskelschicht) und Einzelknopfnähten (Haut) verschlossen.

Alle Katheter werden nochmals auf ihre Durchgängigkeit geprüft. Der Gefäßkatheter wird schließlich mit heparinisierter physiologischer Kochsalzlösung (35 IE/ml) gefüllt und durch Abschmelzen an einer Flamme (Feuerzeug oder Streichholz) verschlossen.

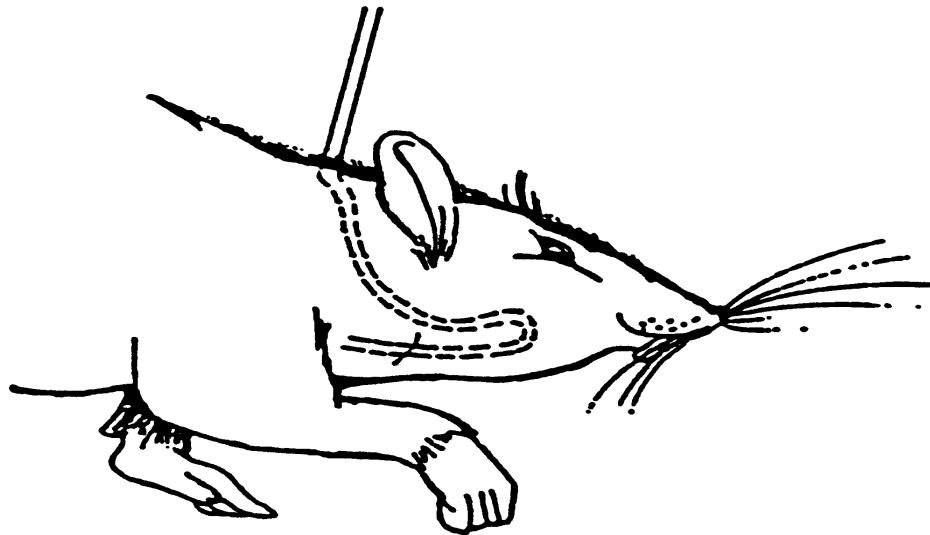


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Verlaufes des A. carotis-Katheters in der Ratte und postoperative Versuchsanordnung.

Noch während der Narkose (48 Stunden vor dem Imipraminversuch werden die Ratten durch TCDD induziert: Über den Duodenalkatheter injiziert man der Verum-Gruppe TCDD, 5 µg/kg Körpergewicht, gelöst in Oliven-Speiseöl (2 ml/kg Körpergewicht) über einen Zeitraum von zwei Minuten mit Hilfe einer Infusionspumpe. Bei der Vergleichsgruppe wird Speiseöl alleine infundiert. Nach der Injektion werden die Katheter beider Gruppen mit 1 ml Intralipid nachgespült. Jetzt wird die Stahlfeder zum Schutz vor dem Verbiß durch die Ratte über die Katheter geschoben und das knopfförmige Ende in der Haut dorsal auf dem Hals eingenäht. Das Jackett wird über die Vorderpfoten gezogen und durch seinen Klettverschluß am Hals verschlossen.

Die Ratten kommen in Makrolon-Einzelkäfige mit Fallbügelverschluß. Die Stahlfeder wird aus dem Deckel herausgeführt und durch eine Metallscheibe gesichert, damit ihr Ende nicht in den Käfig hereingezogen werden kann. Bis zum Erwachen aus der Narkose werden die Tiere durch eine Rotlichtlampe gewärmt. Futter und Wasser steht ad libitum zur Verfügung. Durch Kanülierung der A. carotis und des Dünndarms wird die Applikation der zu untersuchenden Substanz und die Gewinnung der Blutproben an wachen Ratten ermöglicht.

2.3.3 Versuchsdurchführung und Blutprobenentnahme

Die Katheter werden zweimal täglich mit 0,3 bis 0,5 ml heparinierter isotonischer Kochsalzlösung (1750 IE Heparin Na 25000/50 ml Kochsalzlösung) gespült. Am zweiten Tag nach der Operation wird die Imipraminlösung, 25 mg/kg Körpergewicht (2 ml/kg), über den Duodenalkatheter mit der Infusionspumpe innerhalb von 10 Minuten infundiert. (Geschwindigkeit der Pumpe: 4,1 mm/sec, Vorlauf des mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllten Duodenalkatheters 20 sec). Bereits während der Infusion wird nach 5 Minuten die erste Blutprobe aus dem Carotiskatheter entnommen. Über eine mit heparinierter Kochsalzlösung gefüllte 1 ml Einmalspritze werden mittels eines Dreiwegehahnes zuerst 0,05 ml Kochsalzlösung injiziert; der Katheter wird freigespült, eventuelle Thromben werden gelöst. Durch Aspiration gewinnt man 0,1 ml arterielles Blut, das verworfen wird.

Der Dreiwegehahn wird zur Probenentnahme umgelegt und innerhalb zwei bis drei Minuten 0,3 ml arterielles Blut in einer zweiten Einmalspritze gewonnen. Das Blut wird in ein Eppendorf Reaktionsgefäß übergeführt und zur Verhinderung einer Gerinnung mit zwei Ammonium-Heparinatkügelchen versetzt.

Der Volumenverlust, etwa 0,4 ml pro Probenentnahme, wird durch die heparinisierte Kochsalzlösung ersetzt.

Das Entnahmeschema ist 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 480, 1080, und 2400 Minuten nach dem Beginn der Infusion. Nach jeder Probenentnahme wird der Carotis-Katheter durch eine Arterienklemme abgeklemmt oder angeschmolzen.

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Imipramin und Desipramin erfolgte im Labor von Herrn Dr. Kuss mit einer etablierten HPLC-Methode (siehe 3.7).

2.4 Intragastrale Applikation von TCDD und Imipramin *in vivo* (Versuch 2)

2.4.1 Nüchterne Tiere (Versuch 2a)

Zur Überprüfung der Ergebnisse mit nicht operierten (nicht gestressten) Ratten wurden zwei weitere Versuche mit intragastraler Applikation von TCDD als auch von Imipramin durch Schlündeln in den gleichen Dosierungen vorgenommen. Gleichzeitig mit der Vermeidung des Operationsstress wurde auch der Applikationsort geändert.

Vor der Imipramingabe wurde im ersten Versuch den Ratten das Futter entzogen, während im zweiten Versuch die Ratten ad libitum gefüttert wurden.

Die Ratten der Verumgruppe erhalten 5 µg pro kg TCDD, gelöst in 0,6 ml Mazola Sonnenblumenöl, die Kontrollgruppe dagegen nur 0,6 ml reines Mazola Sonnenblumenöl durch Schlündeln verabreicht. Beide Gruppen werden 18 Stunden vor der Imipramingabe nüchtern gesetzt, bei freier Wasserwahl, um das Stressphänomen der Operation mit Nahrungskarenz nachzuempfinden. Zwischen der TCDD-Applikation und der Imipramingabe liegen wiederum 48 Stunden, die Imipraminapplikation beträgt wie in den vorhergegangenen Versuchen 25 mg/kg und wird in einer Lösung von 12,5 mg/ml mit einer Sonde geschlündelt. Die Ratten der Verum- und Kontrollgruppe werden nach 1, 2 und 4 Stunden dekapitiert (jeweils Unterkollektive von 5 Kontroll- und 5 Verumtieren), die Blutproben (2 ml Vollblut pro Ratte) sofort zentrifugiert. Plasmaproben von je 0,1 ml werden zur Bestimmung der Imipramin- und Desipraminkonzentrationen eingefroren.

2.4.2 Gefütterte Tiere (Versuch 2b)

Für Versuch 2b wird der Versuchsablauf der intragastralen Imipramin-Applikation an einem kleineren Kollektiv wiederholt, welches ad libitum gefüttert ist. Sämtliche weiteren Parameter werden konstant gehalten. Um den Verbrauch an Versuchstieren zu verringern und gleichzeitig vergleichbare Aussagen zu erhalten, modifizierten wir die Gewinnung im Sinne einer Entnahme *in vivo* aus dem Retroorbitalsinus. Die Ratten werden in einem Ethertopf kurzfristig narkotisiert, die Blutentnahme aus dem Retroorbitalsinus wird durch Anstechen des medialen Augenwinkels mit einer spitzen Kapillare ermöglicht. Die jeweils ersten 0,5 ml Blut werden verworfen. Je Probenentnahme, nach 1, 2, 4 und 24 Stunden, werden circa 0,6 ml Blut gewonnen, welches sofort zentrifugiert wird. Plasmaproben von je 0,1 ml werden eingefroren.

2.5 Intrajejunale Applikation von TCDD und Imipramin über einen implantierten Darmkatheter (Versuch 3)

Für den folgenden Versuch mit intrajejunaler Applikation modifizierten wir den Operationsplan, da sich die Verwendung eines Carotiskatheters als sehr aufwendig und störanfällig erwiesen hatte. Die Injektion von TCDD und Imipramin erfolgte nun über einen intrajejunalen Katheter, die Blutentnahmen wurden nach 30 min und 60 min aus dem Retroorbitalsinus und nach 120 min durch Dekapitieren gewonnen.

Die Operationsvorbereitung und Operation selbst wurden zum größten Teil schon unter 2.3 beschrieben; nachfolgend werden nur abweichende Fakten angegeben.

Je 5 Ratten der Verum- und 6 der Vergleichsgruppe werden mit Ketamin und Combelen (2,0 und 1,2 ml/kg Körpergewicht entsprechend 100 und 12 mg/kg) anästhesiert. Die Bauchdecke wird rasiert und desinfiziert und in der Linea alba auf 2-3 cm eröffnet. Das Jejunum wird aus der Bauchhöhle auf einen mit isotonischer Kochsalzlösung getränkten Gazestreifen vorgelagert und mit einer Kanüle punktiert. Durch diese Öffnung wird der Jejunal-Katheter 1 cm in das Darmlumen vorgeschoben und mit zwei Nähten in der Darmwand fixiert. Nach einer weiteren Fixierung am Knoten des Übergangs von PE 10 auf den PE 20 Katheter an der Bauchwand wird diese mit einer fortlaufenden Naht (Peritoneum und Muskelschicht) und Einzelknopfnähte (Haut) verschlossen. Der Jejunal-Katheter wird zuvor, wie unter 3.2 beschrieben, unter der Haut zum dorsalen Halsbereich geführt und dort unter dem Schutz einer Stahlfeder aus dem Käfig ausgeleitet.

Den Ratten werden 5 µg/kg TCDD gelöst in Mazola Speiseöl (2 ml/kg), Verumgruppe, beziehungsweise reines Mazolaöl (2 ml/kg), Kontrollgruppe, direkt in den Darm durch den Katheter gespritzt. Die Ratten sind seit 24 Stunden vor dem Versuch nüchtern gesetzt. Wasser steht ad libitum zur Verfügung. 48 Stunden nach der TCDD-Gabe wird der Verum- und Kontrollgruppe die Imipraminlösung (2 ml/kg Körpergewicht; 2,5 mg/ml) direkt über den Katheter mit der Infusionspumpe innerhalb von 10 Minuten in den Darm infundiert (Geschwindigkeit der Pumpe: 4,1 mm/sec, Vorlauf des mit isotonischer Kochsalzlösung gefüllten Jejunal-Katheter: 20 sec). Die Probenentnahme erfolgt erneut nach 30 und 60 min aus dem Retroorbitalsinus und nach 120 min durch Dekapitieren. Die Proben werden zentrifugiert und das Plasma zur weiteren Analytik eingefroren.

2.6 Mikrosomaler Leberstoffwechsel von Imipramin nach TCDD-Induktion (Versuch 4)

2.6.1 Gewinnung von Lebermikrosomen

Zur Untersuchung des Einflusses von TCDD auf die Aktivität der mischfunktionellen Oxygenasen in Bezug auf die Pharmakokinetik von Imipramin führten wir schließlich auch *in vitro* Versuche durch.

Die Ratten erhalten jeweils um 9.00 Uhr morgens mittels Schlundsonde 5 µg TCDD/kg Körpergewicht intragastral appliziert. Das TCDD ist in einer Konzentration von 2,5 ng/ml in Mazola Weizenkeimöl gelöst. Die Kontrollgruppe erhält unter gleichen Versuchsbedingungen reines Speiseöl intragastral in einer Konzentration von 2 ml/kg Körpergewicht verabreicht. Eine Gruppe der Ratten wird nüchtern gehalten, die andere kann ad libitum fressen.

48 Stunden nach Versuchsbeginn werden die Tiere zur Mikrosomenherstellung durch Entbluten in Ethernarkose getötet und ihre Lebern entnommen. Diese werden in ein Becherglas mit Pufferlösung A (0,25 M Sucrose, auf pH 7,4 eingestellt mit 5 N NaOH) gelegt und durch Eis gekühlt. Nach dem Spülen und Wiegen der Lebern werden sie einzeln in ein Becherglas mit 10 ml Pufferlösung A überführt und eine Minute in einem Ultra-Turrax grob zerkleinert. Dann werden sie in einen mit einer Bohrmaschine gekoppelten Glashomogenisator mit 10 bis 15 Hüben gepottert. Um ein zu starkes Überwärmen des Homogenats zu verhindern, wird der Homogenisator stets in Eis gehalten. Anschließend wird das Homogenat in Sorvall Zentrifugenbecher überführt und austariert. Das Homogenat wird 10 min bei 800 g und 20 min bei 10.000 g (bei 4° C) zentrifugiert. Der Überstand wird in Ultrazentrifugenbecher überführt und 60 min bei 105.000 g (bei 4° C) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 6 ml Pufferlösung A aufgenommen, gepottert und nochmals 45 min bei 105.000 g (bei 4° C) zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen und das Pellet mit 6 ml Pufferlösung A aufgenommen und gepottert. Die Mikrosomen werden entweder direkt für die Inkubationen verwendet oder portionsweise zu 1000 µl in Eppendorf Reaktionsgefäßen bei -25° C eingefroren.

2.6.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Mikrosomen

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wird das BCA Protein Assay Reagent (Pierce) verwendet. Hierbei reduziert das Protein Kupfer (II)-Salz nach der Biuret-Reaktion zu Kupfer (I). Kupfer (I) kann mit Cholin-4-carboxylat zu einem violett gefärbten Komplex reagieren, dessen Menge photometrisch bei 578 nm bestimmt wird.

Zuerst wird die BCA-Lösung aus 50 Teilen Reagenz A (BCA-Reagenz, Na₂CO₃, NaHCO₃ und Natriumtartrat in 0,2 N NaOH) und 1 Teil Reagenz B (4%ige CuSO₄ in wäßriger Lösung)

hergestellt. Zur Erstellung einer Eichkurve wird Rinderserumalbumin mit einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml verwendet.

Es werden Proben von 5, 10, 20, 30, 40, 50 µl mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Jeder Probe fügt man 1 ml BCA-Lösung hinzu. Es wird bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und 10 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Extinktion wird danach mit einem Spektralphotometer bei 578 nm (20 °C) gemessen. Die ermittelten Extinktionen werden in ein Koordinatensystem, dessen x-Achse die Proteinkonzentration und dessen y-Achse die Extinktion darstellt, eingetragen und die Eichkurve erstellt.

20 µl der zu bestimmenden Lebermikrosomensuspensionen werden mit 400 µl H₂O verdünnt, davon je 3×20 µl und je 3×40 µl auf 50 µl mit H₂O verdünnt und 1 ml BCA-Lösung dazugegeben. Die Proben werden wie oben beschrieben behandelt und gemessen. Die gemessenen Extinktionen können anhand der erstellten Eichgeraden einer Proteinkonzentration zugeordnet werden.

2.6.3 Bestimmung des Induktionsstatus mit Ethoxyresorufin (Versuch 4a)

2.6.3.1 Prinzip und Durchführung

Die Aktivitätsänderung der Ethoxyresorufindeethylase (EROD) ist ein Indikator für die durch TCDD verursachte Induktion der mikrosomalen Leberenzymen. Zur Bestimmung der EROD-Aktivität läßt man die mikrosomale Lösung mit Ethoxyresorufin als Substrat reagieren (McCormack et al., 1979).

Mikrosomales Protein deethyliert in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei 37 °C vorhandenes Ethoxyresorufin zu Resorufin, welches aufgrund seiner Fluoreszenz gut nachgewiesen werden kann. Die Menge des entstandenen Resorufin gibt Aufschluß über die EROD-Aktivität.

Zur Inkubation werden die Lebermikrosomen wieder aufgetaut und nach der Bestimmung ihres Proteingehaltes soweit mit Tris-Puffer (0,15 M; pH 7,4) verdünnt, daß Ihre Proteinkonzentration zwischen 2 und 3 mg/ml liegt. Im allgemeinen müssen die Mikrosomenlösungen im Verhältnis 1 zu 5 verdünnt werden. Je Ansatz werden 50 µl Mikrosomenlösungen verwendet. Der Enzymcocktail wird durch Lösen der Bestandteile in Tris-Puffer (0,066 M; pH 7,4) hergestellt und besitzt folgende Zusammensetzung:

Ethoxyresorufin (MG: 241,1)	50,0 nmol/Ansatz	12,05 µg/Ansatz
Gluc 6P (MG: 304,2)	10,0 µmol/Ansatz	3,04 mg/Ansatz
Gluc 6P DH (IU/ml: 350)	0,8 IU/Ansatz	2,28 µl/Ansatz

Je Ansatz werden 850 μl Enzymcocktail verwendet. Die Reaktion wird mit 100 μl einer Lösung von 333,36 μg NADPH (MG 833,4) in 100 ml Tris-Puffer (0,066 M; pH 7,4) gestartet. Ein Versuchsansatz umfaßt demnach 1 ml und hat also folgende Zusammensetzung:

50 μl	Mikrosomen-Verdünnung (2-3 mg/ml)
850 μl	Enzymcocktail
100 μl	NADPH-Lösung als Starter

1000 μl	Ansatzvolumen

Der Enzymcocktail (850 μl) und die Mikrosomenlösung (50 μl) werden in einem Reaktionsgefäß 2 min bei 37 °C in einem Schüttelbad vorinkubiert.

Nach 2 min wird die Reaktion mit NADPH (100 μl) gestartet. Je Tierleber wird ein Ansatz sofort, vor dem Zugeben der NADPH Lösung, mit 1 ml Aceton gestoppt. Bei drei Ansätzen wird die mikrosomale Lösung durch Tris-Puffer ersetzt (Leerwert).

Die Reaktionsansätze werden 2 min bei 37 °C im Schüttelbad inkubiert und durch Zugabe von 1 ml Aceton (20 °C) gestoppt. Pro Ansatz werden 3 ml Aqua tridest. hinzugefügt. Das Endvolumen beträgt 5 ml. Ethoxyresorufin hat hier eine Konzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$

Die Inkubationslösungen werden in ihren Reaktionsgefäßen belassen und das Resorufin sofort durch Fluoreszenzphotometrie bei 580 nm Emissionswellenlänge und 530 nm Anregungswellenlänge gemessen. Während der Messungen sollten die Proben unter Luft- und Lichtabschluss gehalten werden.

2.6.3.2 Erstellung einer Resorufin-Eichgeraden

Zur Erstellung einer Eichgeraden wird 11,76 mg Resorufin in 50 ml Aqua tridest. gelöst (= Stammlösung I). 500 μl der Stammlösung I werden in einen 50 ml Meßkolben überführt und mit Tris-Puffer (0,066 M; pH 7,4), Aceton und Aqua tridest. im Verhältnis 1 : 1 : 3 auf 50 ml aufgefüllt (= Stammlösung II). Es werden Proben mit 10, 20, 40, 50, 100, 200, 300 und 500 μl der Stammlösung II entnommen und mit Tris-Puffer 1 : 1 : 3 auf 5 ml aufgefüllt. Die Proben werden fluoreszenzphotometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm bei 580 nm gegen die Puffermischung bestimmt (siehe *Abbildung 8*). Die einzelne Werte finden sich in der Tabelle 9 im Anhang. Die Eichgerade, in der die Konzentration an Resorufin [nmol/l] gegen die Emission aufgetragen ist besitzt eine Steigung von $0,00291 \pm 0,000556$.

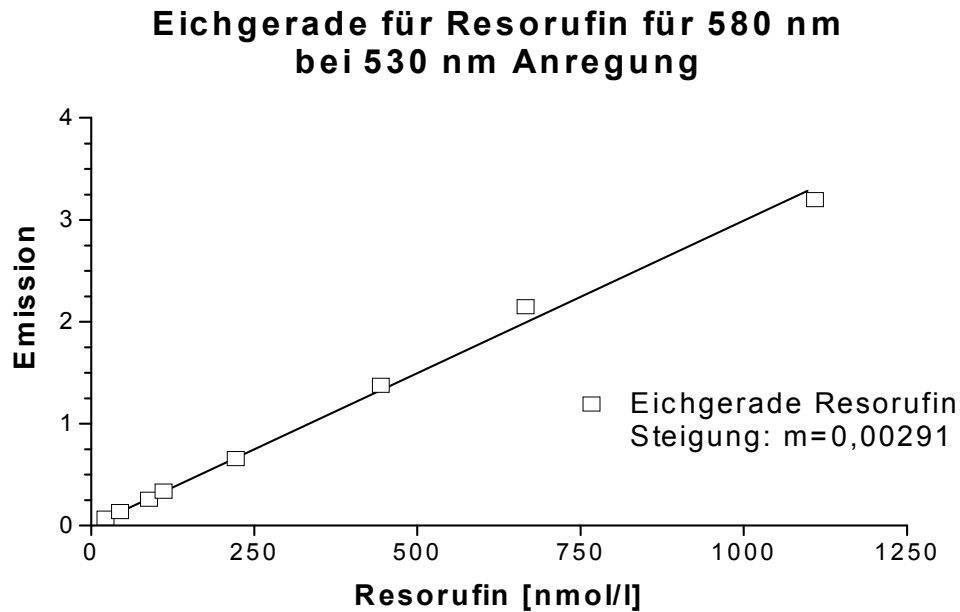


Abbildung 8 Erstellung einer Resorufin-Eichgeraden. Die Emission wurde bei 580 nm nach Anregung bei 530 nm gemessen.

2.6.4 Mikrosomaler Umsatz von Imipramin nach TCDD-Induktion (Versuch 4a)

Zur Bestimmung des Einflusses einer TCDD Induktion werden Lebermikrosomen von Kontroll- und Verumtieren mit Imipramin als Substrat versetzt (nach Krüger et al., 1986). Die Lebermikrosomen werden aufgetaut, der Proteingehalt bestimmt und nach entsprechender Verdünnung (2 – 3 mg/ml) in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei 37 °C mit einer Imipraminlösung in einem Tris-Puffer (0,15 M, pH 7,4) inkubiert. Die Reaktion wird nach 60 min durch den Zusatz von 100 µl 5 N NaOH gestoppt.

Die Imipraminsubstratlösung wird auf eine Konzentration von 100 nmol/ml durch Lösen von 50,64 µl Tofranil (1 ml Tofranil = 12,5 mg Imipramin) in 1 ml Tris-Puffer eingestellt.

Ein Versuchsansatz umfaßt 5 ml und hat folgende Zusammensetzung:

3,5 ml NADPH-regenerierendes System

1,0 ml Substratlösung (100 nmol Imipramin) als Standard

0,5 ml Mikrosomen-Verdünnung (2-3 mg/ml)

5,0 ml Endvolumen des Ansatzes

Die Mikrosomen-Verdünnung und das NADPH-regenerierende System werden in einem 5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und 2 min bei 37 °C in einem Wasserbad mit Schüttler vorinkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe des Substrates (1 ml Imipraminlösung) gestartet und 60 min.

bei 37 °C unter Luftabschluß bei ständigem Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Reaktion durch Proteindenaturierung mit 100 µl 5 N NaOH gestoppt. Die Inkubationslösungen werden in ihren Reaktionsgefäßen belassen und bei –20 °C zur weiteren HPLC-Analytik eingefroren.

2.7 Extraktion und Analytik

2.7.1 Bestimmung der Imipramin-Plasmakonzentrationen

2.7.1.1 Probenvorbereitung

Zur Bestimmung der Konzentration von Imipramin und seinen Metaboliten werden die Proben in einem ersten Arbeitsschritt nach der (modifizierten) Methode von Krüger et al. (1986) extrahiert.

Nach dem Auftauen werden die Proben zunächst gepottert. 200 µl Suspension werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (enthält 200 ng Doxepin als internen Standard) und mit 200 µl NaHCO₃ Puffer pH 10,5 und 1 ml Ether versetzt und verschlossen. Durch das alkalische Milieu können die lipophilen organischen Basen mit Ether extrahiert werden. Der gesättigte Natriumbicarbonatpuffer bewirkt gleichzeitig einen Aussalzeffekt.

Die Mischung wird 5 min geschüttelt, danach 2 min bei 10.000 g zentrifugiert, um eine klare Phasentrennung zu erhalten. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße werden nun 1 min bis zur Phasentrennlinie in flüssigen Stickstoff getaucht. Die untere Wasserphase gefriert, so daß die Etherphase ohne Probleme von der wäßrigen Phase getrennt werden kann. Die Etherphase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 100 µl 0,1-N H₂SO₄ versetzt.

Im sauren Milieu liegen die organischen Basen als wasserlösliche Salze vor und können vom Ether in die wäßrige Phase zurückextrahiert werden. Die Mischung wird 5 min bis zur Einstellung eines Konzentrationsgleichgewichts geschüttelt und 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Ether wird abpipettiert und verworfen. Die restliche Etherphase wird unter N₂ Druck in einer von Kuss entwickelten Abdampfapparatur (anfänglich 4 min bei 1,5 atm, dann 16 min bei 3 atm) abgeblasen und der Etherdampf unter Unterdruck abgesaugt. Die schwefelsaure Lösung enthält nun in konzentrierter Form die zu bestimmenden organischen Basen. Die extrahierten Proben werden zur späteren HPLC-Analyse eingefroren.

2.7.1.2 HPLC-Analytik

Für die folgenden HPLC-Analysen wurde als Integrator der Shimadzu C-R3A, als HPLC Pumpe die High Precision Pump, Model 300B von Gynkotek und als Detektor das Spektrophotometer SP4 von Gynkotek verwendet.

<u>Säule:</u>	Lichrospher 100 RP-18 5 µm,	
<u>Eluent:</u>	250 ml	Acetonitril
	500 ml	Puffer pH 2,3, (1 ml H ₃ PO ₄ 85% ig;)
	1 ml	Triethanolamin
	(mit Aqua tridest. auf 1000 ml aufgefüllt)	
<u>Standards:</u>	10-OH-Desipramin	10-OH-Imipramin
	2-OH-Desipramin	Doxepin (Interner Standard)
	Didesipramin	Desipramin
	Imipramin	Imipramin-N-oxid

Imipramin und seine Metaboliten werden mittels einer 25 cm C18-reversed phase-HPLC-Säule aufgetrennt. Die HPLC Pumpe wird auf einen Fluß von 1,4 ml/min eingestellt. Das bis zu 100 µl betragende Probenvolumen wird in eine 100 µl Probeschleife in einem Aufgabeblock aufgegeben. Durch Umschalten des Ventils wird die Probe in den Analysengang gebracht. Der Nachweis erfolgt im UV-Detektor bei 254 nm, wobei nach dem Ende der Messung das Chromatogramm sowie die Flächeninhalte der Peaks automatisch ausgedruckt werden. Der Integrator wurde auf eine Attenuation von 4 und einem Slope von 2000 eingestellt. Je zwei Gramm der Standard-Substanzen werden in 2 ml Methanol gelöst (1 mg/ml Stammlösungen). 50 µl der Stammlösungen werden mit dem Eluenten auf 50 ml verdünnt (1 ng/µl Standardlösung). Als externer Standard werden zunächst je 100 µl der einzelnen Substanzen getrennt eingespritzt (100 ng/Probe) und die Retentionszeiten ermittelt.

Für weitere Analysen wird eine Mischung der externen Standards hergestellt:

Je 20 µl der Stammlösungen werden mit dem Eluenten auf 20 ml verdünnt (1 ng/µl). Als externer Standard werden 100 µl der Mischung eingespritzt (100 ng/Probe).

Im folgenden HPLC-Chromatogramm erkennt man die Auftrennung von Imipramin und seinen Metaboliten mit den spezifischen Retentionszeiten der Einzelsubstanzen.

Die Trennung von Imipramin, der Metaboliten und Doxepin erfolgt in folgender Reihenfolge: 10-OH-Desipramin, (3,00 min) 10-OH-Imipramin (3,54 min), 2-OH-Desipramin (4,01 min), Doxepin (Interner Standard 7,16 min), Didesipramin (7,74 min), Desipramin (9,26 min), Imipramin (10,58 min), Imipramin-N-oxid (11,56 min). 10-OH-Desipramin und 10-OH-Imipramin konnten mit dieser Methode und Laufmittel nicht zur Basislinie getrennt werden.

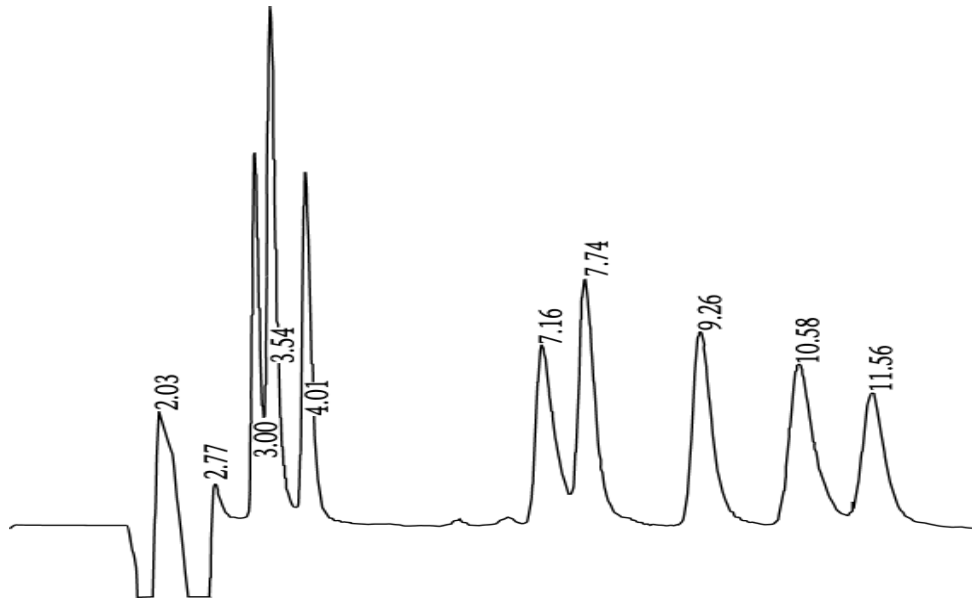


Abbildung 9: HPLC-Chromatogramm mit Auftrennung von Imipramin und seinen Metaboliten in der Zeitachse. Je 100 μl der Standardlösung (100 ng) werden aufgetragen und mittels einer 25 cm C18-reversed phase HPLC-Säule aufgetrennt. Der Nachweis erfolgt durch den UV-Detektor bei 254 nm, wobei nach dem Ende der Messung das Chromatogramm sowie die Flächeninhalte der Peaks automatisch ausgedruckt werden. Die Zahlen geben die Retentionszeiten (Peakmaxima) der einzelnen Standardsubstanzen in Minuten an.

Zur Analyse der extrahierten Proben werden 70 bis 85 μl in die HPLC Anlage eingespritzt. Als interner Standard wird Doxepin benutzt, das in einer Konzentration von 20 $\mu\text{l/ml}$ (entspricht 50 ng/ μl) in NaHCO_3 -Puffer, pH 10,5 gelöst ist (200 ng/Probe). Das Verhältnis zwischen dem eingesetzten inneren Standard in μg pro Probe und der in der anschließenden HPLC Analyse gefundenen Menge in μg ergibt die Wiederfindungsrate und eliminiert rechnerisch die Extraktionsverluste.

Beispiel-Chromatogramme sind im Anhang (Kap. 7.3) abgebildet.

2.8 Auswertung, Datenverarbeitung und Statistik

Die Verarbeitung und Auswertung der Daten wurde auf IBM-kompatiblen PCs unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogramms Excel 5.0 (Microsoft GmbH, Verl) vorgenommen. Die Graphiken wurden unter Benutzung von Prism Vs. 2.01 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) erstellt. Die Textverarbeitung erfolgte mit MS Word (Microsoft GmbH, Verl), mit dem ebenfalls die meisten Abbildungen im Text erstellt wurden. Statistische Auswertungen, soweit mit diesen Programmen nicht durchführbar, wurden mit Hilfe des statistischen Softwarepakets CSS Statistica (Statsoft 1991, Tulsa, OK., USA) vorgenommen. Wir verwendeten den U-Test (Swartz, 1973) in der Modifikation nach Mann-Whitney. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluß von TCDD auf den Imipraminstoffwechsel *in vivo*

Zur Untersuchung der Auswirkung einer TCDD-Vorbehandlung auf den Imipraminstoffwechsel nahmen wir zunächst eine Reihe von *in vivo* Versuchen vor. In einem ersten Versuch implantierten wir Carotis- und Duodenalkatheter (s. Kapitel 2.3) und verabreichten sowohl TCDD als auch das Pharmakon intraduodenal. In weiteren Versuchen erfolgte die Applikation intragastral bei nüchternen und gefütterten Ratten (Kapitel 2.4.2). Schließlich wurde die intraduodenale Applikation unter leicht veränderten Versuchsbedingungen wiederholt (Kapitel 2.5). Gemessen wurden jeweils die Plasmakonzentrationen von Imipramin und seines ebenfalls pharmakologisch wirksamen Hauptmetaboliten Desipramin (Desmethylimipramin). Aufgrund der nur geringen Molmassenunterschiede zwischen Imipramin und Desipramin wurde auf eine Darstellung der Ergebnisse in nmol/ml verzichtet und die gebräuchlichere Angabe in ng/ml gewählt.

3.1.1 Intraduodenale Applikation von Imipramin (Versuch 1)

Über den implantierten intraduodenalen Katheter erhielten die 5 Ratten des Verumkollektivs unmittelbar nach der Operation 5 µg/kg KG TCDD in 2 ml/kg KG Speiseöl, den 5 Ratten der Kontrollgruppe wurde ausschließlich Speiseöl in derselben Dosierung verabreicht. Zwei Tage später wurde über denselben Katheter Imipramin in einer Dosierung von 25 mg/kg KG über 10 Minuten infundiert. Anschließend entnahmen wir nach 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 300 Minuten Blutproben, aus deren Plasma Imipramin und Desipramin bestimmt wurden. Die Rohdaten dieses Versuches sind im Anhang in *Tabelle 1* wiedergegeben.

Abbildung 10 zeigt den Verlauf der Imipramin-Konzentrationen im Plasma. Die TCDD-Vorbehandlung führte gegenüber der Kontrollgruppe zu einer etwa dreifachen Erhöhung der Imipraminkonzentrationen, wobei die Unterschiede zu den Kontrollen wegen der großen Streuung der Werte in der TCDD-Gruppe nicht immer Signifikanz erreichten.

Die Imipramin Werte nach 10 Minuten ($p=0,04$), 90 Minuten ($p=0,028$), 120 Minuten ($p=0,044$) und 180 Minuten ($p=0,028$) waren signifikant, alle anderen Werte wiesen keine Signifikanz auf. Die AUC war im Beobachtungszeitraum 0 bis 300 min von 113 ± 80 auf $433 \pm 380 \mu\text{g} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$ signifikant erhöht.

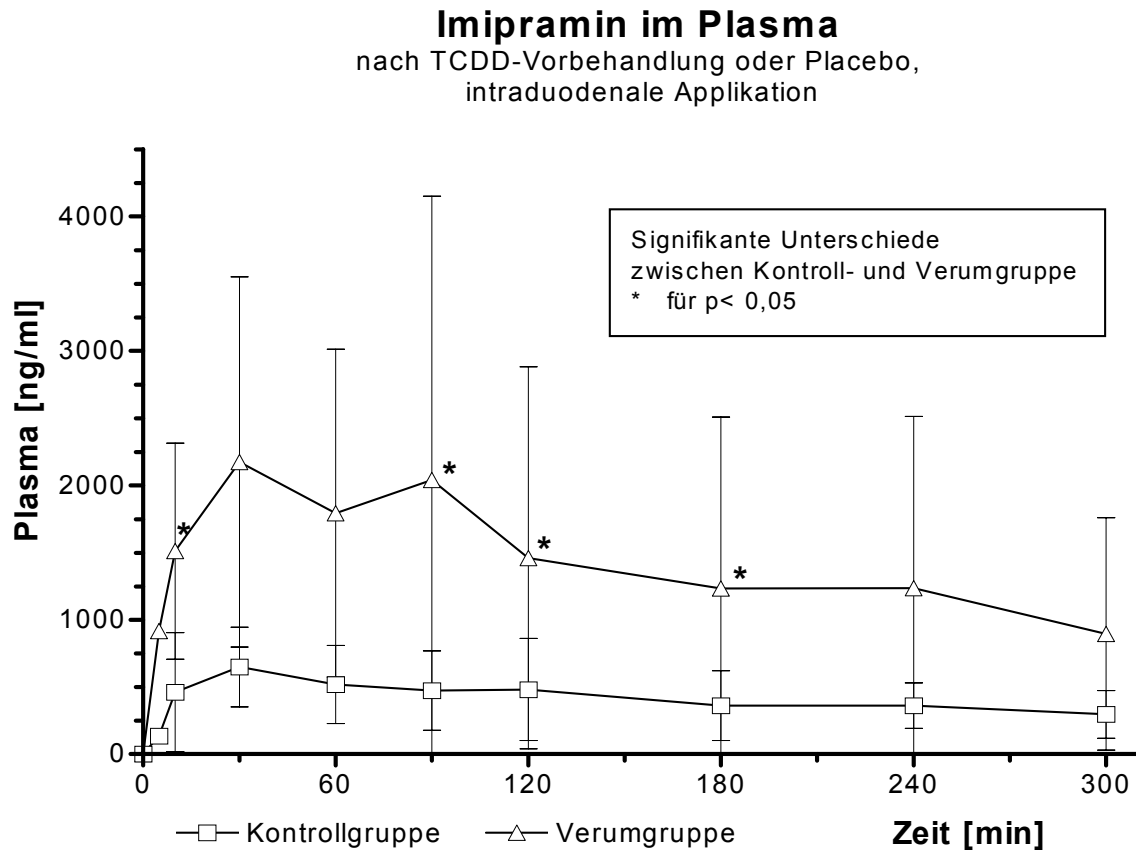


Abbildung 10: Konzentration von Imipramin im Plasma von Ratten nach intraduodener Applikation: Die Tiere hatten 48 Stunden zuvor entweder nur Öl (Kontrollgruppe, n=5) oder TCDD, 5 µg/kg KG (Verumgruppe, n=5) intraduodenal erhalten. Mittelwert und Standardabweichung.

Auch die Konzentration des pharmakologisch aktiven Metaboliten Desipramin war nach Imipramininfusion in das Duodenum bei TCDD vorbehandelten Ratten um das zwei- bis dreifache erhöht. Die AUC war im Beobachtungszeitraum 0 bis 300 min von 221 ± 139 auf 654 ± 200 µg×min×ml⁻¹ signifikant erhöht.

Es ergaben sich für sämtliche Zeiten zwischen 10 und 300 Minuten signifikante Unterschiede mit $p < 0,02$ bis $p = 0,006$. *Abbildung 11* zeigt die Konzentrationsverläufe im Plasma. Für eine Bestimmung der Halbwertszeit von Desipramin war der Beobachtungszeitraum zu kurz.

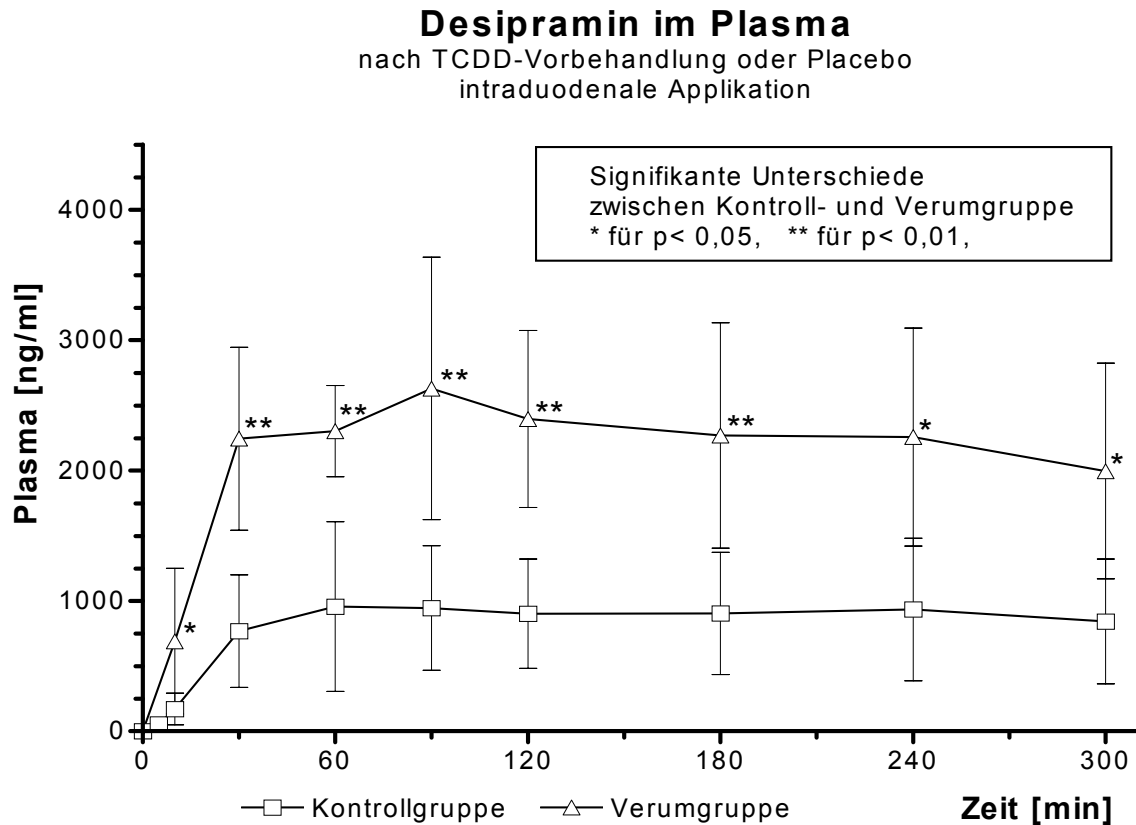


Abbildung 11 Konzentration von Desipramin im Plasma von Ratten nach intraduodener Applikation: Die Tiere hatten 48 Stunden zuvor entweder nur Öl (Kontrollgruppe, $n=5$) oder TCDD, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG (Verumgruppe, $n=5$) intraduodenal erhalten. Mittelwert und Standardabweichung.

3.1.2 Intragastrale Applikation (Versuch 2)

Nach Erhalt der oben beschriebenen unerwarteten Ergebnisse versuchten wir, eine Bestätigung dieser Resultate zu erreichen, ohne die Ratten dem operativen Stress der Implantation von Kathetern auszusetzen. Wir verabreichten daher in Versuch 2 sowohl TCDD als auch Imipramin in denselben Dosierungen intragastral über eine Schlundsonde. Dies geschah zunächst bei nüchternen Tieren (Versuch 2a), in Versuch 2b dann auch an gefütterten Ratten. Die Gewinnung der Blutproben unterschied sich zwischen Versuch 2a und 2b in bezug auf Technik und Timing (s. Kap. 2.4). Bei den nüchternen Ratten wurde das Blut bei je 5 Kontroll- und Verumtieren eine, zwei und vier Stunden nach Imipramingabe durch Enthaupten gewonnen. Bei den gefütterten Tieren wurde nach ein, zwei und vier Stunden das Blut aus dem Retroorbitalsinus gewonnen, die Tiere wurden erst nach 24 Stunden enthauptet. Die Rohdaten dieser Versuche sind im Anhang in den *Tabellen 4 und 5* wiedergegeben.

3.1.2.1 Nüchternes Kollektiv (Versuch 2a)

Bei dem ersten untersuchten Kollektiv von jeweils sechs Ratten in Kontroll- und Verumgruppe wurde eine Nahrungskarenz von 18 Stunden eingehalten. Wasser war den Versuchstieren frei zugänglich. *Abbildung 12* zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

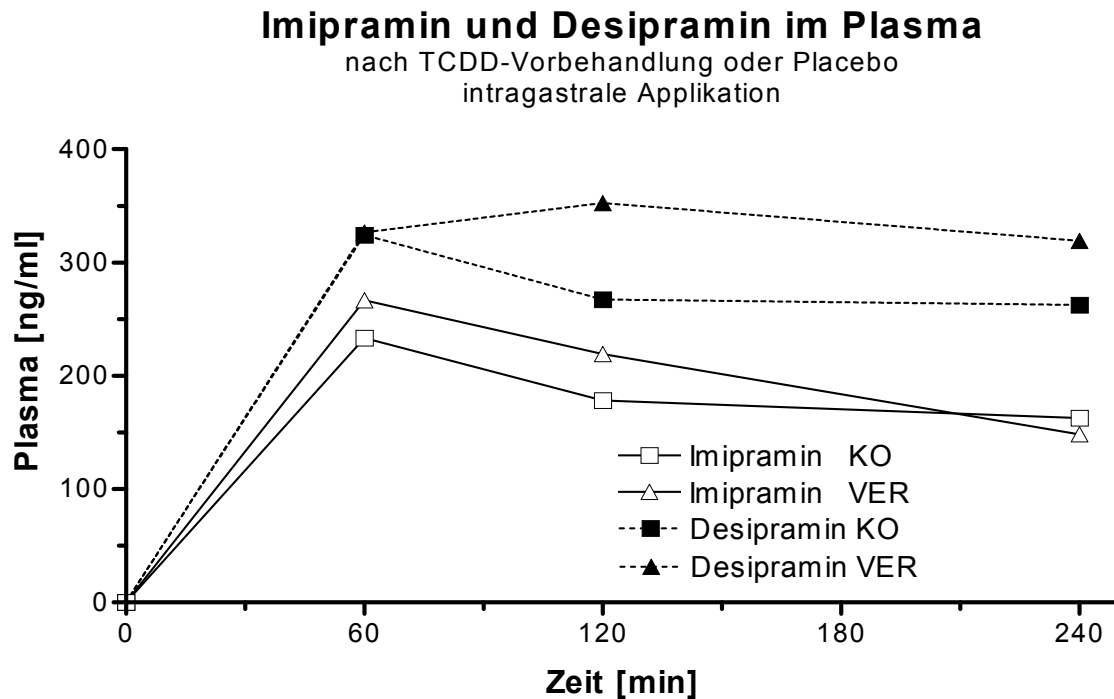


Abbildung 12: Konzentration von Imipramin und Desipramin im Plasma von nüchtern gehaltenen Ratten nach Applikation von Imipramin, 25 mg/kg KG per Schlundsonde. Die Tiere hatten 48 Stunden zuvor entweder nur Öl (Kontrollgruppe, n=6) oder TCDD, 5 µg/kg KG (Verumgruppe, n=6) intragastral erhalten. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und Verumgruppe sind nicht signifikant. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde verzichtet. (*Tabelle 4*).

Sämtliche Einzelwerte für Imipramin der Kontrollgruppe und der Verumgruppe ergaben keine signifikante Unterschiede. Für den aktiven Metaboliten Desipramin waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede meßbar. Die AUC war für Imipramin nicht signifikant von 39 ± 28 auf $45 \pm 5,7 \mu\text{g} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$ erhöht und für Desipramin von 58 ± 19 auf $70 \pm 8,2 \mu\text{g} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$ erhöht. Für eine Abschätzung der Halbwertszeit liegen zu wenig Zeitpunkte vor. Ein gewisser Trend zu erhöhten Werten nach TCDD-Induktion zeigt sich bei Desipramin nach 240 Minuten ($p=0,09$). Die Einzelwerte befinden sich in *Tabelle 4* im Anhang.

3.1.2.2 Gefüttertes Kollektiv (Versuch 2b)

Mit dem gleichen Versuchsaufbau wurde ein Kollektiv von gefütterter Ratten untersucht. *Abbildung 13* zeigt die erhaltenen Ergebnisse: auch hier zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen TCDD-behandelten Ratten und den unbehandelten Tieren.

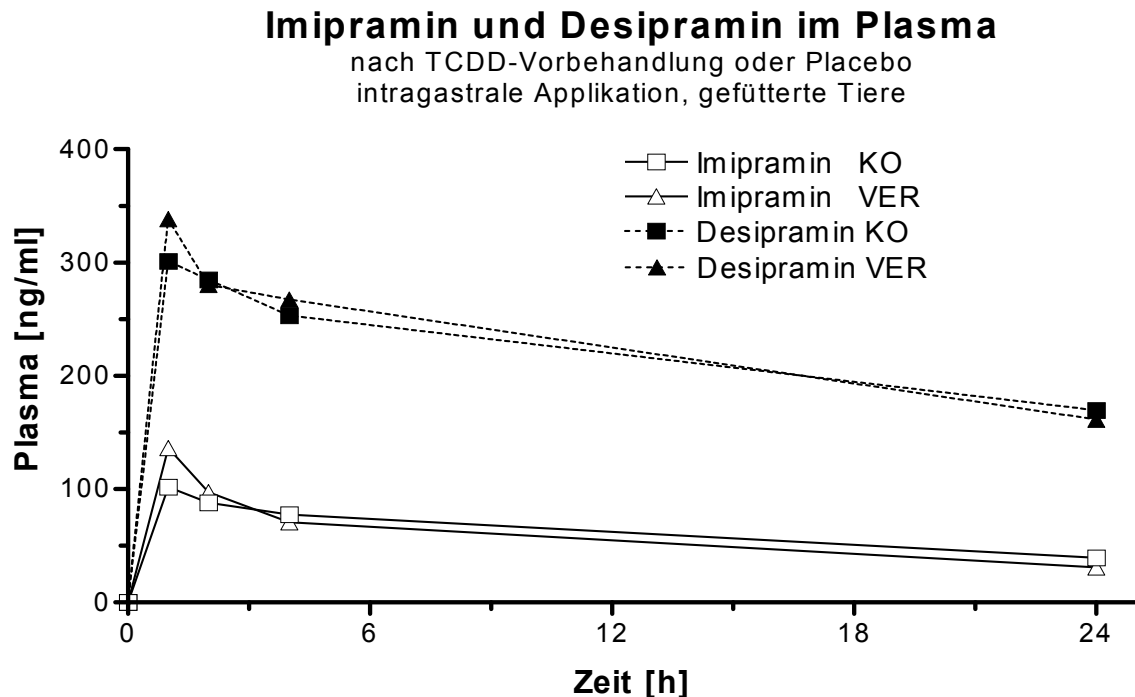


Abbildung 13: Konzentration von Imipramin und Desipramin im Plasma von gefütterten Ratten nach Applikation von Imipramin, 25 mg/kg KG per Schlundsonde. Die Tiere hatten 48 Stunden zuvor entweder nur Öl (Kontrollgruppe, n=6) oder TCDD, 5 µg/kg KG (Verumgruppe, n=6) intra-gastral erhalten. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und Verumgruppe sind nicht signifikant. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde verzichtet (*Tabelle 5*).

Sämtliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Verumkollektiv für Imipramin und Desipramin sind nicht signifikant; der niedrigste p-Wert lag für den Vergleich zwischen Kontroll- und Verumgruppe eine Stunde nach Imipramin-Gabe bei $p=0,10$. Die $AUC_{(0-1440)}$ war für Imipramin nicht signifikant von 88 ± 27 auf $81 \pm 20 \mu\text{g} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$ erniedrigt und für Desipramin nicht signifikant von 31 ± 122 auf $319 \pm 49 \mu\text{g} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$ erhöht. Die Einzelwerte finden sich in *Tabelle 5 und 6* im Anhang. Auf eine Abschätzung der Halbwertszeiten wurde auch in diesem Versuch verzichtet.

3.1.3 Intrajejunale Applikation über einen implantierten Katheter (Versuch 3)

Nachdem es sich als unmöglich erwiesen hatte, die ursprünglichen Ergebnisse mit intraduodenaler Applikation bei intraogastraler Gabe nachzuvollziehen, wurde ein dritter Versuch mit intrajejunaler Implantation eines Darmkatheters durchgeführt. Das verzögerte Anfluten von Imipramin im Darm und die Verdünnungseffekte durch Verdauungsflüssigkeiten wurden als mögliche Ursachen für den ausbleibenden Effekt nach intraogastraler Gabe betrachtet. Auf das komplikationsträchtige Legen eines Carotiskatheters wurde diesmal verzichtet, die Blutproben wurden ähnlich wie in Versuch 2 gewonnen (s. Kapitel 3). Die Kollektive bestanden aus 5 Verum- bzw. 6 Kontrollgruppe. Die Rohdaten sind im Anhang in *Tabelle 7* wiedergegeben.

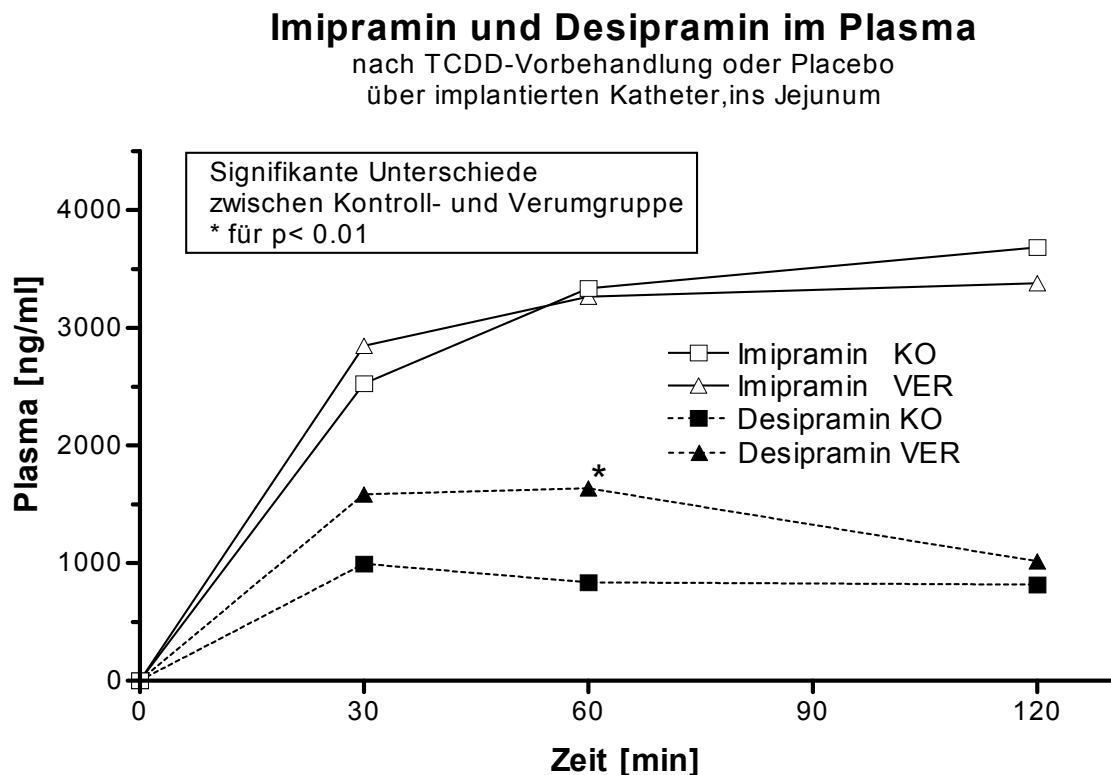


Abbildung 14: Konzentration von Imipramin und Desipramin im Plasma von Ratten nach Applikation von Imipramin, 25 mg/kg KG über einen ins Jejunum implantierten Katheter. Die Tiere hatten 48 Stunden zuvor entweder nur Öl (Kontrollgruppe, n=6) oder TCDD, 5 µg/kg KG (Verumgruppe, n=5) intrajejunal erhalten. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde verzichtet (*Tabelle 7*)

Die *Abbildung 14* zeigt die Plasmakonzentrationen von Imipramin- und Desipramin 30, 60 und 120 Minuten nach Imipramingabe. In Versuch 3 zeigte sich zwar eine tendenzielle Zu-

nahme der Plasmakonzentration in der Verumgruppe gegenüber dem Kontroll-Kollektiv, insbesondere bei der Bestimmung des Metaboliten Desipramin, diese war jedoch nur nach 60 Minuten signifikant ($p=0,009$). Die AUC₍₀₋₁₂₀₎ war für Imipramin von 336 ± 159 auf 354 ± 56 $\mu\text{g}\times\text{min}\times\text{ml}^{-1}$ erhöht und für Desipramin von 92 ± 40 auf 152 ± 36 $\mu\text{g}\times\text{min}\times\text{ml}^{-1}$ erhöht. Nach intrajejunaler Applikation (Versuch 3) der gleichen Menge Imipramin pro kg Körpergewicht werden **4-fach** höhere Plasmakonzentrationen für Desipramin als nach intragastraler Applikation (Versuch 2a und 2b) gemessen. Die Werte befinden sich in *Tabelle 7* im Anhang.

3.2 Einfluß von TCDD auf den Imipraminstoffwechsel *in vitro* (Versuch 4)

Zur Erklärung der in den vorangegangenen *in vivo* Versuchen gewonnenen Ergebnisse führten wir auch *in vitro*-Versuche durch. Diese sollten die Frage klären, ob der beobachtete Effekt einer intraduodenalen Gabe von Imipramin nach TCDD-Vorbehandlung teilweise oder ganz durch Beeinflussung der mikrosomalen Enzymsysteme in der Rattenleber bedingt ist.

TCDD gilt als ein potenter Induktor von Cytochrom P450-Enzymsystemen. Diese Enzymgruppe ist auch an der Verstoffwechslung von Imipramin beteiligt. Um den Effekt der TCDD-Induktion sichtbar zu machen, wurden zunächst Vorversuche zur TCDD-Induktion der Ethoxyresorufin-Deethylase (Verstoffwechslung von Ethoxyresorufin zu Resorufin) durchgeführt. Anschließend wurden die gleichen Mikrosomen mit Imipramin inkubiert.

Die Durchführung der Versuche erfolgte analog zu dem zuvor beschriebenen Versuchsaufbau: Jeweils 6 Ratten erhielten reines Mazola Speiseöl mit oder ohne Zusatz von $5\ \mu\text{g}$ TCDD/kg KG per Schlundsonde verabreicht. Nach 48 Stunden wurden die Tiere getötet und die Lebern zur Mikrosomenherstellung entnommen (s. Kap. 2.6). Das Körpergewicht der Ratten betrug bei Versuchsende in der Kontrollgruppe 286 ± 47 g, in der Verumgruppe 269 ± 38 g. Das Gewicht der gewonnenen Lebern betrug $11,3\pm 1,4$ g in der Kontrollgruppe und $10,7\pm 1,2$ g in der Verumgruppe. Es ergab sich ein Proteingehalt von $15,6\pm 1,6$ mg/ml (Kontrollgruppe) bzw. $15,7\pm 2,3$ mg/ml (Verumgruppe). Der durch Verdünnung eingestellte Proteingehalt des Mikrosomenansatzes betrug schließlich in beiden Gruppen mit $2,69$ mg/ml. Die Rohdaten sind im Anhang in *Tabelle 10 und 12* wiedergegeben.

3.2.1 TCDD-Induktion des Ethoxyresorufin-Stoffwechsels (Versuch 4a)

EROD in der mikrosomalen Proteinfraction katalysiert in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems bei 37 °C die Deethylierung von Ethoxyresorufin zu Resorufin. Nach einer gegebenen Zeit ist die aufgefundene Menge Resorufin proportional zur EROD-Aktivität.

EROD Aktivität in Lebermikrosomen

ohne und mit Induktion durch TCDD

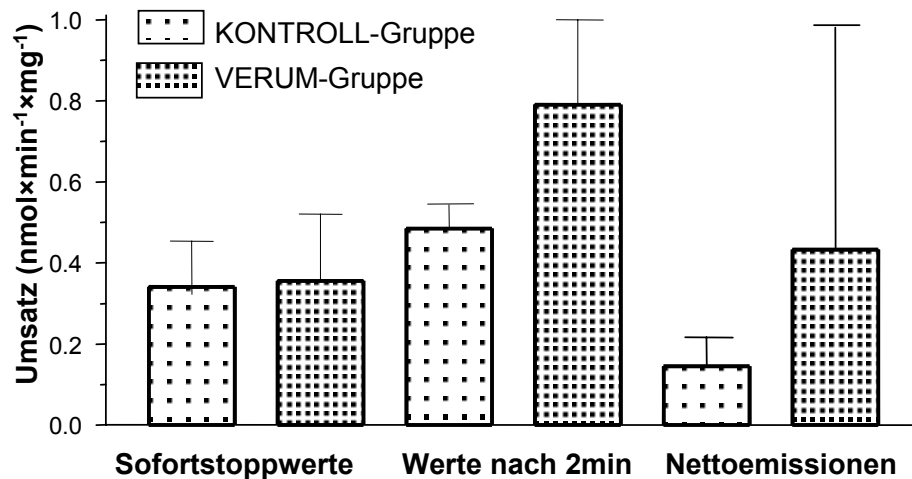


Abbildung 15: Auswirkung einer TCDD-Vorbehandlung auf den Ethoxyresorufin-Umsatz durch Lebermikrosomen der Ratte (Nettoemissionen berechnet für eine Minute Inkubation; n jeweils = 6). Mittelwert und Standardabweichung; Signifikanzniveau für die Differenz nach Mann-Whitney U-Test: $p = 0,0039$.

Verglichen wurden die Emissionswerte der Fluoreszenzphotometrie bei Sofortstopp (0,341 und 0,356 in der Kontroll-, bzw. Verumgruppe) und nach 2 Minuten (0,488 und 0,790 in der Kontroll-, bzw. Verumgruppe). Diese Differenz ist hochsignifikant ($p = 0,0039$).

Zieht man die Nullwerte (Sofortstopp) von den 2 Minutenwerten ab und vergleicht die Nettoemissionen, dann beschleunigt sich der Umsatz um **den Faktor 3** (siehe *Abbildung 15*).

Bei der Kontrollgruppe wurde $9,25 \pm 4,2$ pmol/min/mg Protein Ethoxyresorufin umgesetzt, bei der Verumgruppe $28,3 \pm 2,8$ pmol/min/mg. Die Einzelwerte sind in den *Tabellen 10 und 11* im Anhang.

3.2.2 Mikrosomeninkubation mit Imipramin (Versuch 4b)

Entsprechend dem obengenannten EROD-Modell versuchten wir nun, eine eventuell stattfindende Induktion des Imipramin-Stoffwechsels durch TCDD zu ermitteln. Die Darstellung der Umsätze von Imipramin zu Desipramin und 10-OH-Imipramin in nmol/ml, und in ng/ml ergeben, aufgrund der nur geringen Molmassenunterschiede, äquivalente vergleichbare Daten.

Umsatz von Imipramin, Desipramin und 10-OH-Imipramin

bei Microsomeninkubation über 60 min
ohne und mit Induktion von TCDD

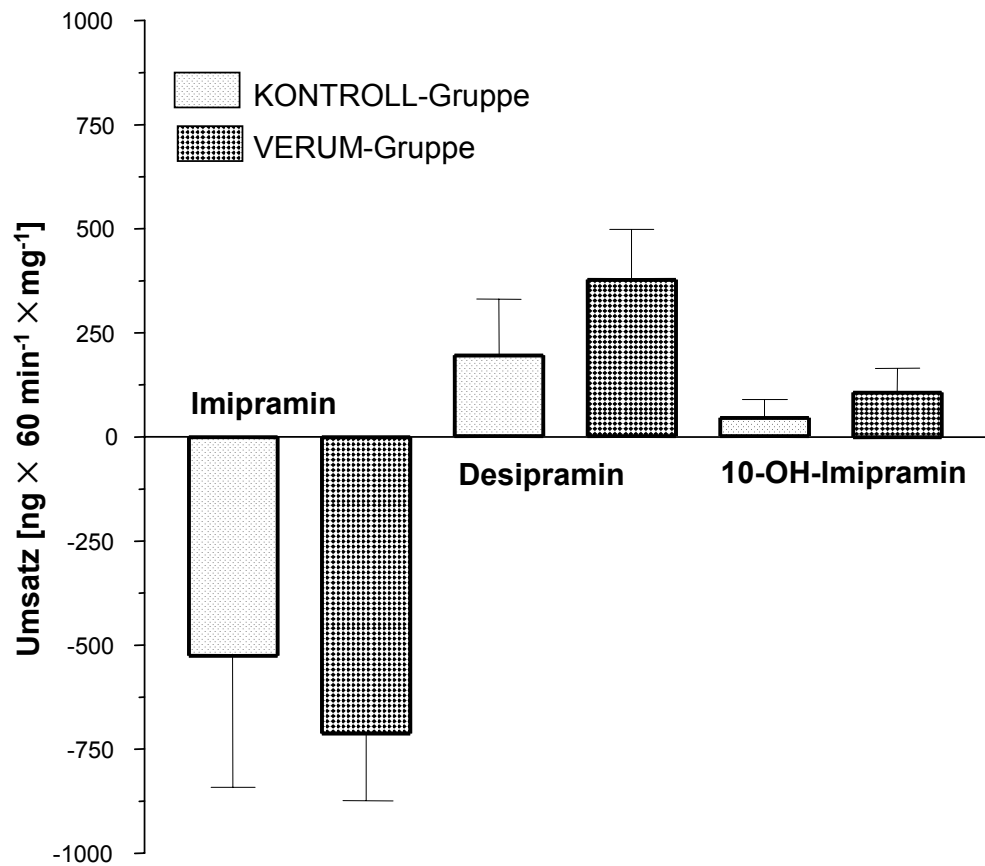


Abbildung 16: Induktion des Imipramin-Stoffwechsels durch TCDD-Vorbehandlung: Verbrauch von Imipramin und Umsatz zu Desipramin und 10-OH-Imipramin nach Inkubation von Lebermikrosomen über 60 Minuten mit n=6. Mittelwert und Standardabweichung.

Wie in Kap. 2 beschrieben, wurde als interner Standard Doxepin verwendet. Die hier angegebenen Imipramin- und Desipramin-Mengen verstehen sich nach Korrektur für den unter Verwendung des internen Standards errechneten Wiederfindungsfaktors.

In den Mikrosomen von TCDD-behandelten Ratten nehmen die Imipraminkonzentrationen stärker ab als bei den Kontrollen (*Abbildung 16*). Wegen der hohen Streuung war dieser jedoch Unterschied nicht signifikant ($p > 0,1$). Dagegen wurden die beiden Hauptmetaboliten Desipramin ($p = 0,022$) und 10-OH-Imipramin ($p = 0,039$) nach TCDD-Induktion in signifikant größeren Mengen gebildet, der Umsatz beschleunigt sich um den **Faktor 2**.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit entstand am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München im Rahmen des Forschungsvorhabens "Untersuchungen zur chronischen Wirkung einer langfristigen Belastung mit TCDD im Spurenbereich", welche zwischen 1986 und 1989 mit Unterstützung des Bayerischen Staatsministeriums für Landesentwicklung und Umweltfragen durchgeführt wurde. In diesem Rahmen erschienen auch Untersuchungen über den Einfluß einer subtoxischen TCDD-Dosis auf den Arzneimittelstoffwechsel interessant, welche in den Jahren 1988 und 1989 vorgenommen wurden. Dies geschah am Beispiel des tricyclischen Antidepressivums Imipramin in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. H.-J. Kuss von der Abteilung Neurochemie der Psychiatrischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

4.1 Bedeutung von Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

Das "Seveso-Gift" Tetrachlorodibenzo-p-dioxin ist eine der giftigsten niedermolekularen Verbindungen, die dem Menschen bekannt sind (Forth, 1977). Obwohl bisher kein einziger Todesfall durch Dioxineinwirkung am Menschen bekannt geworden ist (Rozman, 1989), steht die Substanzgruppe der Dioxine im Rampenlicht einer kritischen Öffentlichkeit wie kaum eine zweite Chemikalie. Dieses Interesse erklärt sich durch eine postulierte kanzerogene Wirkung, beispielsweise auf Nasen-Rachenraum, Haut, Leber, Nebennieren und Schilddrüse (Huff et al., 1991; Dickson und Buzik, 1993), welche jedoch keineswegs als endgültig gesichert angenommen werden kann (Ames und Gold, 1992; Johnson, 1993; Kayajanian, 1999; Steenland et al., 2001).

Bei Dioxinen handelt es sich um eine Substanzgruppe, die in der Umwelt der modernen Industriegesellschaften praktisch ubiquitär ist (Forth, 1977; Fries und Paustenbach, 1990; Travis und Hattemer-Frey, 1991; Conacher et al., 1993). Holz- und Papierindustrie, Chemische Industrie und Mülldeponien bzw. Müllverbrennungsanlagen gelten als Hauptquellen für diese Substanz, die vor allem bei der Herstellung von Herbiziden und bei Verbrennungsprozessen in Anwesenheit chlororganischer Verbindungen entsteht (Forth, 1977). In den letzten Jahren haben unter anderem Fälle Aufsehen erregt, bei denen TCDD als Markersubstanz in den Böden ehemaliger Industrieanlagen bzw. von Mülldeponien aufgefunden wurde.

Besondere Bedenken bestehen im Hinblick auf eine mögliche Kontamination von Muttermilch (Richter et al., 1989; Somogyi und Beck, 1993; LaKind et al., 2001), da die Dioxin-Belastung von Kleinkindern vor allem durch Aufnahme der Substanz beim Stillen gegeben ist (Krüger et al., 1991). In diesem Zusammenhang wurde von eingeschränkter Lernfähigkeit von Kindern durch Dioxin-/PCB-Belastung berichtet (Patandin et al., 1999) Bezüglich der Terato-

genität der Substanz herrscht keine Einigkeit (Couture, 1990). Auch Auswirkungen auf das Immunsystem werden diskutiert (Holsapple, 1991; Neubert, 1993).

Die Belastung mit Dioxinen erfolgt in der Allgemeinbevölkerung zu über 90% mit der Nahrung, wobei Fische den größten Beitrag leisten. In Ländern wie Großbritannien, Niederlande und Deutschland, die seit Ende der 80er Jahre große Anstrengungen unternommen haben, die Eintragsquellen zu minimieren, ist die Belastung über die Nahrung innerhalb von 7 Jahren auf die Hälfte zurückgegangen (Liem et al., 2000). Eine Akkumulation der Dioxine findet vor allem in Leber und Fettgewebe statt (Lakshmanan, 1986; Leung, 1990; Geyer et al., 1993).

Inwieweit diese Kontamination tatsächlich ein relevantes Risiko für die Bevölkerung darstellt, ist noch umstritten (Goodman und Sauer, 1992; Paustenbach et al., 1992; Travis und Hattermer-Frey, 1991; Umbreit et al., 1986). Doch in den letzten 10 Jahren wurden nicht nur bedeutende Fortschritte in der Einschätzung der kanzerogenen Wirkung von Dioxinen gemacht, auch die Analyse von TCDD-Wirkungen im zellulären Bereich erbrachte eine Reihe neuer Erkenntnisse. Die biologische Hauptwirkung des TCDD wird heute auf seine Bindung an ein intrazelluläres Rezeptorprotein, den sogenannten Ah-Rezeptor, zurückgeführt (Andersen et al., 1993), wobei es sich um ein Protein handeln soll, welches den Steroidrezeptoren ähnelt (Hapgood et al., 1989). Es ist also nicht überraschend, daß TCDD eine antiestrogene Wirkung entfaltet (Safe et al., 1991; Lucier et al., 1993; White und Gasiewicz, 1993); tatsächlich werden verwandte Substanzen sogar auf therapeutische Nützlichkeit geprüft. Die letztendliche Wirkung soll auf eine Induktion von bestimmten Isoenzymen der Cytochrom P450-Gruppe, neben anderen vor allem CYP 1A1, 1A2, 1B1, zurückzuführen sein (Portier et al., 1993; Vanden-Heuvel und Lucier, 1993; Walker et al., 1999), welche nach Studien mit Geschlechterdifferenzierung bei weiblichen Individuen deutlich stärker ausgeprägt ist (Csaba et al., 1991).

4.2 Imipramin als pharmakologische Modellsubstanz

Seit Ende der 50er Jahre ist Imipramin als erstes tricyclisches Antidepressivum ein wichtiger Bestandteil der psychiatrischen Pharmacopoeia. Letztendlich wurde es zur Muttersubstanz einer ganzen Reihe von Verbindungen. Dennoch bleibt seine Wirkung bei depressiven Erkrankungen lange unübertroffen (Rosenberg, 1993; Workman und Short, 1993; Wurthmann und Klieser, 1992).

Die weite Verbreitung des Imipramin und seine langfristige klinische Bedeutung, aber auch die Möglichkeit vielfältiger Wechselwirkungen mit einer Anzahl verschiedener anderer pharmakologischer Substanzen (Hermann et al., 1992) haben dazu geführt, daß die Pharmakokinetik dieses tricyclischen Antidepressivums recht gut untersucht ist (Gram, 1988; Krüger et al., 1986; Sallee und Pollock, 1990; Ullmann et al., 2001). Die Pharmakokinetik von Imipramin weist eine ganze Reihe von interessanten Eigenschaften auf. Klinischer Ausdruck dieser

Eigenschaften ist die ausgeprägte interindividuelle Variationsbreite in der Bioverfügbarkeit und dem Metabolismus von Imipramin (Lemoine et al., 1993), welche neben Umweltfaktoren auch auf der genetisch bedingten unterschiedlichen Ausprägung verschiedener Isoenzyme des Cytochrom P450 Systems beruhen dürfte (von Bahr et al., 1985; Brosen, 1988; Skjelbo und Brosen, 1992; Su et al., 1993). Das Alter des Patienten, Begleitmedikation (von Bahr et al., 1985), aber auch Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus können einen Einfluß auf den Metabolismus der Substanz haben (Rouer et al., 1987). Zwar handelt es sich um eine ausgesprochen lipophile Substanz, *in vivo* kommt es jedoch nicht zu einer Akkumulation im Fettgewebe (Gubser et al., 1986).

Demethylierung und Hydroxylierung des Imipramin, die beiden wesentlichen Metabolisierungswege (*Abbildung 3*), können so stark differieren, daß bei gleicher oraler Dosierung die Plasmakonzentrationen um den Faktor 50 variieren können (Furlanut et al., 1993), wobei eine dosisabhängige Kinetik zu beobachten ist (Brosen et al., 1986). Die Fähigkeit von Imipramin, als Induktor mikrosomaler Enzymsysteme zu wirken, ist schon längere Zeit bekannt (Breyer, 1971). Außerdem wurde eine Hemmung des Imipramin-Stoffwechsels durch seine Metaboliten beobachtet (Chiba et al., 1988).

Es besteht ein ausgeprägter First-Pass-Metabolismus so, daß auch die Applikationsroute eine wesentliche Rolle spielt (Beaubien und Pakuts, 1979; Christ et al., 1983). Ein oral applizierter Fremdstoff kann einem dreifachen First-Pass-Metabolismus in den Organen Dünndarm, Leber und Lunge unterliegen. Umgeht man z.B. den Darm durch Applikation in die Pfortader, oder die Leber durch intravenöse Injektion und letztlich die Lunge durch intraarterielle Injektion unmittelbar vor dem linken Vorhof des Herzens, dann erhöht sich die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC), also die Bioverfügbarkeit, jeweils um den Betrag, den das Organ zum First-Pass-Metabolismus beisteuert (Feng und Richter, 1989).

Die Analytik von Imipramin ist bereits längere Zeit etabliert und ein Routinevorgang, welcher automatisiert werden kann (Ni et al., 1988). Es bietet sich daher vor zahlreichen anderen Pharmaka zur Prüfung von Stoffwechsellwirkungen einer TCDD-Belastung an. Die Imipramin und Desipramin Bestimmungen wurden im Rahmen dieser Studie im Jahre 1989 mittels HPLC im Labor Dr. Kuss, Abteilung für Neurochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt.

4.3 Beeinflussung von Stoffwechselfvorgängen durch TCDD

Dioxine scheinen eine ganze Reihe von Stoffwechselfvorgängen zu beeinflussen. Ob bzw. inwieweit diese Einflüsse die Symptome einer Vergiftung mit TCDD erklären können, ist weitgehend unklar. Aus Untersuchungen am Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie geht immerhin hervor, daß das sogenannte "wasting syndrome", der kontinuierliche Körpergewichtsverlust nach TCDD-Vergiftung, womöglich unter anderem auf eine Glu-

coseresorptionsstörung zurückzuführen ist (Richter, et al., 1992). Das Gesamtbild der TCDD-Vergiftung ist jedoch wesentlich komplizierter und spricht für eine Entgleisung des gesamten Energiestoffwechsels (Rozman, 1989). Wie vielfältig die Einflüsse einer TCDD-Belastung sind, zeigte sich im Rahmen des erwähnten Forschungsvorhabens auch am Nebenbefund einer ausgeprägten Steigerung der Kupferspeicherung in Leber und Niere (Elsenhans et al., 1991); außerdem konnte eine deutliche Abnahme der β -Rezeptordichte beobachtet werden (Richter et al., 1989). Insgesamt ergibt sich das Bild einer großen Anzahl komplexer Wechselwirkungen, deren Nebeneinander die unspezifische Art des Vergiftungsbildes erklären dürfte. Selbst auf den Hormonstoffwechsel kann TCDD einwirken (Graham et al., 1988). Bezüglich der Wechselwirkung mit Arzneimitteln ist die Hemmung der biliären Ausscheidung der Metaboliten von Imipramin und z.B. Morphin durch TCDD eine der wenigen vorhandenen Beobachtungen (Berman et al., 1986).

4.4 Einfluß von TCDD auf die *in vivo*-Pharmakokinetik von Imipramin

Zur Prüfung des Einflusses einer TCDD-Induktion auf den Imipramin-Stoffwechsel wurden mehrere verschiedene Ansätze gewählt. Nachdem zunächst bei intraduodener Applikation unerwartete Ergebnisse gewonnen worden waren, überprüften wir diese anhand von intragastraler und intrajejunaler Applikation. In allen Versuchen wurde TCDD (5 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) 48 Stunden vor Imipramin (25 $\text{mg}/\text{kg KG}$) gegeben.

4.4.1 Intraduodenale Applikation

Nach intraduodener Applikation von TCDD und 2 Tage später Imipramin über einen implantierten Katheter kam es zu einer deutlich gesteigerten Bioverfügbarkeit von Imipramin. Neben der Plasmakonzentration von Imipramin selbst war nach TCDD-Gabe auch die seines wichtigsten primären Metaboliten, Desipramin, etwa um den Faktor 3 gegenüber den Kontrollen erhöht.

Trotz des geringen Umfanges der beiden Kollektive war dieser Effekt sowohl bei Imipramin 10, 90, 120 und 180 Minuten nach Applikation ($p < 0,05$) als auch bei Desipramin nach 10-300 Minuten (p zwischen 0,014 und 0,006) statistisch signifikant. Die AUC für Imipramin und Desipramin war im Beobachtungszeitraum von 0 bis 300 min durch TCDD 3,8-fach bzw. 3,0-fach erhöht. Diese erhöhte Bioverfügbarkeit von Imipramin ging aber nicht mit einer verlängerten Halbwertszeit einher. Die Imipramin-Halbwertszeit im Plasma erniedrigte sich bei den TCDD-behandelten Ratten sogar von 4,1 auf 3,2 Stunden, ein Hinweis auf eine gesteigerte Imipramin-Verstoffwechslung als Effekt der TCDD-Induktion. Für eine Bestimmung der Halbwertszeit von Desipramin war der Beobachtungszeitraum zu kurz. Vergleicht man die

DMI-Konzentrationen nach 5 Stunden in Relation zur C_{\max} , dann ist bei den TCDD-behandelten Ratten auch eine um etwa 10% stärkere Abnahme von Desipramin angedeutet. In diesem Versuch war das Imipramin (79 $\mu\text{mol/kg}$) den Ratten in einem mehr als 5000-fachen molaren Überschuß im Vergleich zum TCDD (15,5 nmol/kg) verabreicht worden.

Der gleichsinnige Einfluß von TCDD auf Desipramin und Imipramin zeigt sich auch, wenn man den Demethylierungsquotienten betrachtet (*Tabelle 3, Abbildung 17*). Kontroll- und Verumgruppe im Versuch 1 zeigen keine signifikanten Unterschiede für alle Werte.

4.4.2 Intragastrale Applikation

Ohne zunächst Erklärungsversuche für den in Versuch 1 beobachteten Effekt einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von Imipramin zu entwickeln, wurde der Effekt mit einer Variante des Versuchsablaufes überprüft, bei der auf die aufwendige und störanfällige Katheterimplantation verzichtet wurde. Die bereits in Versuch 1 verwendeten Dosen von TCDD und Imipramin wurden im Abstand von 2 Tagen durch Schlündeln, intragastral verabreicht. Bei dieser Applikationsart ergaben sich wesentlich niedrigere Plasmakonzentrationen für Imipramin als auch für seinen wichtigsten Metaboliten, und zwar sowohl bei gefütterten als auch bei nüchternen Tieren. Die Konzentrationen lagen zwar in den Verumgruppen fast bei allen Tieren geringfügig höher als in den Kontrollgruppen, die Unterschiede waren jedoch zu gering um einen statistisch signifikanten Effekt der TCDD-Vorbehandlung nachzuweisen. Bei den nüchternen Ratten war noch eine gewisse Tendenz zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit gegeben. Die AUC für Imipramin und Desipramin erhöhte sich durch die TCDD Vorbehandlung im Beobachtungszeitraum von 4 Stunden nicht signifikant um das 1,14- bzw. 1,21-fache. Bei den gefütterten Ratten war dagegen keinerlei Unterschied festzustellen.

Auch in diesen Versuchen hatte die TCDD-Vorbehandlung keinen signifikanten Einfluß auf den Demethylierungsquotienten (*Tabellen 4 und 5, Abbildung 17*).

4.4.3 Intrajejunale Applikation

In einem weiteren Versuch mit vereinfachtem Vorgehen ohne Carotiskatheter versuchten wir nun, die in Versuch 1 gewonnenen Ergebnisse noch einmal nachzuvollziehen. Wir gingen dabei von der Überlegung aus, daß die schnellere Anflutungszeit von Imipramin nach intraduodener Applikation von Bedeutung für den TCDD-Effekt sein könnte. Die Substanzen TCDD/Öl und Imipramin wurden diesmal durch einen intrajejunal implantierten Darmkatheter im Abstand von 48 Stunden nach der Op appliziert. Damit nicht für jeden Zeitpunkt die Ratten getötet werden mußten gewannen wir die Blutproben aus dem Retroorbitalsinus. Höhere Plasmakonzentrationen wurden nur für Desipramin erreicht, der Unterschied war aber nur zu einem Zeitpunkt statistisch signifikant und zwar nach einer Stunde ($p=0,009$). Auch die AUC war im Beobachtungszeitraum von 2 Stunden nur bei Desipramin um das 1,65-fache

erhöht ($p=0,0476$). Prinzipiell lassen sich die Ergebnisse von Versuch 3 wohl als Bestätigung der mittels intraduodener Gabe gewonnenen Werte ansehen. Der beobachtete Effekt läßt sich wegen der enorm hohen Standardabweichungen größtenteils nicht statistisch absichern. Die hohen Streuungen könnten zum Teil darauf beruhen, daß für jeden Blutentnahmezeitpunkt verschiedene Ratten genommen wurden, während im ersten Versuch die seriellen Blutabnahmen bei dem gleichen Tier vorgenommen wurden.

Der Demethylierungsquotient unterliegt dagegen nur geringen Streuungen. Er ist zu allen Zeitpunkten bei den TCDD-behandelten Ratten signifikant erhöht (*Tabelle 7, Abbildung 17*).

4.5 Einfluß von TCDD auf den Imipramin-Stoffwechsel in Lebermikrosomen

Ein Erklärungsversuch für die deutlich gesteigerten Imipramin-Plasmakonzentrationen nach intraduodener Applikation und Induktion mit TCDD wäre eine Hemmung des mikrosomalen hepatischen Stoffwechsels. Allerdings ist eher eine Induktion von hepatischen Enzymsystemen durch TCDD zu erwarten (Abraham et al., 1988; Mukerjee, 1998; Portier et al., 1993; Walker et al., 1999). Zur Abschätzung des relativen Einflusses einer Induktion des Imipramin-Stoffwechsels auf die *in vivo* beobachteten Ergebnisse untersuchten wir die Wirkung einer TCDD-Induktion auf den Fremdstoffwechsel in Rattenlebermikrosomen. Hierzu wurde zunächst als Modellsubstanz ein typisches Substrat des TCDD-induzierten Isoenzym von Cytochrom P450 eingesetzt, das Ethoxyresorufin (Abraham et al., 1988; von Bahr et al., 1986, Körner et al., 2002).

Eine TCDD-Vorbehandlung von Ratten mit 5 µg/kg KG oral per Schlundsonde, entsprechend dem für Imipramin-Untersuchungen verwandten Versuchsplan, führte erwartungsgemäß zu einer dreifachen Erhöhung des Ethoxyresorufin-Umsatzes durch Lebermikrosomen der Ratte ($p=0,0039$), welche allerdings nur bedingt mit in der Literatur beschriebenen Werten vergleichbar ist. So war das Ausmaß der Induktion in Versuchen ebenfalls an weiblichen Wistarratten, aber mit subkutaner Applikation, deutlich zeitabhängig und erreichte bei einer Dosis von 0,3 µg/kg KG ihr Maximum erst nach 3-7 Tagen. Trotz der geringeren Dosis und leicht höheren Basalwerten (14,3 gegenüber 9,2 pmol/mg Protein/min) erhöhte sich die EROD-Aktivität um mehr als das 14-fache (Abraham et al., 1988). In der gleichen Versuchsserie erzielte die höchste Dosis, 3 µg TCDD/kg KG eine Steigerung der EROD-Aktivität in der Leber nach 7 Tagen um das 53-fache. Die geringere Induktion in unserem Versuch könnte mit der Applikationsart (oral statt subkutan) und der zu kurzen Zeitspanne zwischen TCDD-Gabe und Tötung der Tiere (2 statt 7 Tage) zusammenhängen.

Ein entsprechender Versuchsaufbau wurde auch für die Überprüfung der Wirkung einer TCDD-Induktion auf den Imipramin-Stoffwechsel in Lebermikrosomen verwandt. Dabei zeigten sich Hinweise auf eine gesteigerte Verstoffwechslung von Imipramin: Nach 60

Minuten wurden nach TCDD-Induktion wurden praktisch doppelt so hohe Desipramin-Werte gemessen wie in der Kontrolle. Diese Unterschiede waren jedoch wegen der großen Streuung der Werte nicht signifikant ($p=0,08$). Auch bezüglich der Bildung von 10-OH-Imipramin ergab sich eine Steigerung um etwa den Faktor 2,5, welche jedoch ebenfalls nicht signifikant war ($p=0,14$).

Die relativ geringen Effekte von TCDD auf den mikrosomalen Imipraminstoffwechsel (*Tabelle 12*) und den Demethylierungsquotienten *in vivo* (*Abbildung 17*) sind nicht überraschend, wenn man die nach Durchführung dieser Arbeit publizierten Daten heranzieht. Während TCDD hauptsächlich die Isoenzyme 1A1, 1A2 und in geringerem Umfang auch das 1B1 des Cytochrom P450 Systems induziert (Leung et al., 1990, Walker et al., 1999) ist für die Demethylierung von Imipramin neben den Isoenzymen 1A2 und 2C19 auch das quantitativ in der Leber viel stärker exprimierte Isoenzym 3A4, für die 2-Hydroxylierung das polymorphe Isoenzym 2D6 hauptverantwortlich (Lemoine et al., 1993; Skjelbo und Brosen, 1992; Su et al., 1993). Bei Patienten mit defizientem Isoenzym 2D6 kam es unter Imipramintherapie zu hoher Akkumulation von DMI mit Todesfolge (Swanson et al., 1997). Auch die Hemmung von 2D6 führt zu einer Erhöhung von AUC und V_{max} von Imipramin und in noch stärkerem Masse von DMI (Albers et al., 2000). Dagegen erhöht die gleichzeitige Gabe von Troleandomycin, ein potenter Inhibitor des Isoenzym 3A4, die AUC von Imipramin um 60%, weil die Demethylierung zu DMI gehemmt wird (Wang, et al., 1997). Auch das polymorphe Isoenzym 2C19 spielt beim Menschen eine Rolle, denn eine geringe Aktivität dieses Enzyms geht ebenfalls mit einer verringerten Demethylierung von Imipramin einher, mit gleichzeitig erhöhter 2-Hydroxylierung (Morinobu et al., 1997).

4.6 Schlußfolgerungen für den Imipramin-Stoffwechsel

Im Rahmen des erwähnten Forschungsvorhabens war die wesentlich gesteigerte Bioverfügbarkeit des tricyclischen Antidepressivums Imipramin nach Vorbehandlung mit einer induzierenden Dosis TCDD ein überraschendes und nicht erwartetes Ergebnis. Eine Hemmung des mikrosomalen hepatischen Stoffwechsels kommt offensichtlich nicht als Erklärung in Betracht. Ganz im Gegenteil ist die Deethylierung von Ethoxyresorufin, eines typischen Substrates der Cytochrom P450-Isoenzymen 1A1 und 1A2, welche durch TCDD induziert werden, massiv gesteigert (Abraham et al., 1988). Auch der qualitative und quantitative Umsatz von Imipramin in den Lebermikrosomen wird offenbar beeinflusst: Wir konnten zumindest einen Trend in Richtung erhöhter Werte für die zwei wichtigsten Metaboliten des Imipramin nach TCDD-Induktion feststellen. Diese Beobachtung stimmt mit dem beschleunigten Abfall der Imipraminkonzentration im Plasma bei TCDD-behandelten Ratten im 1. Versuch überein. Sie widerspricht bis zu einem gewissen Grad den Ergebnissen von Rouer et al. (1987). Nachdem neuere Untersuchungen gezeigt haben, daß die durch TCDD induzierten Isoenzyme in erster

Linie an der Demethylierung von Imipramin beteiligt sind (Lemoine et al., 1993), sollte der Demethylierungsquotient, also das Verhältnis der Plasmakonzentrationen von DMI zu IMI, einen Hinweis auf den gesteigerten *in vivo* Stoffwechsel von Imipramin nach TCDD-Induktion geben. Diese Ergebnisse sind in den *Tabellen 3-5 und 7* und in der *Abbildung 17* zusammengefaßt. Lediglich im dritten Versuch nach intrajejunaler Verabreichung war eine leichte, statistisch signifikante Erhöhung des Demethylierungsquotienten um das 1-3-1,8-fache durch die TCDD-Behandlung zu beobachten.

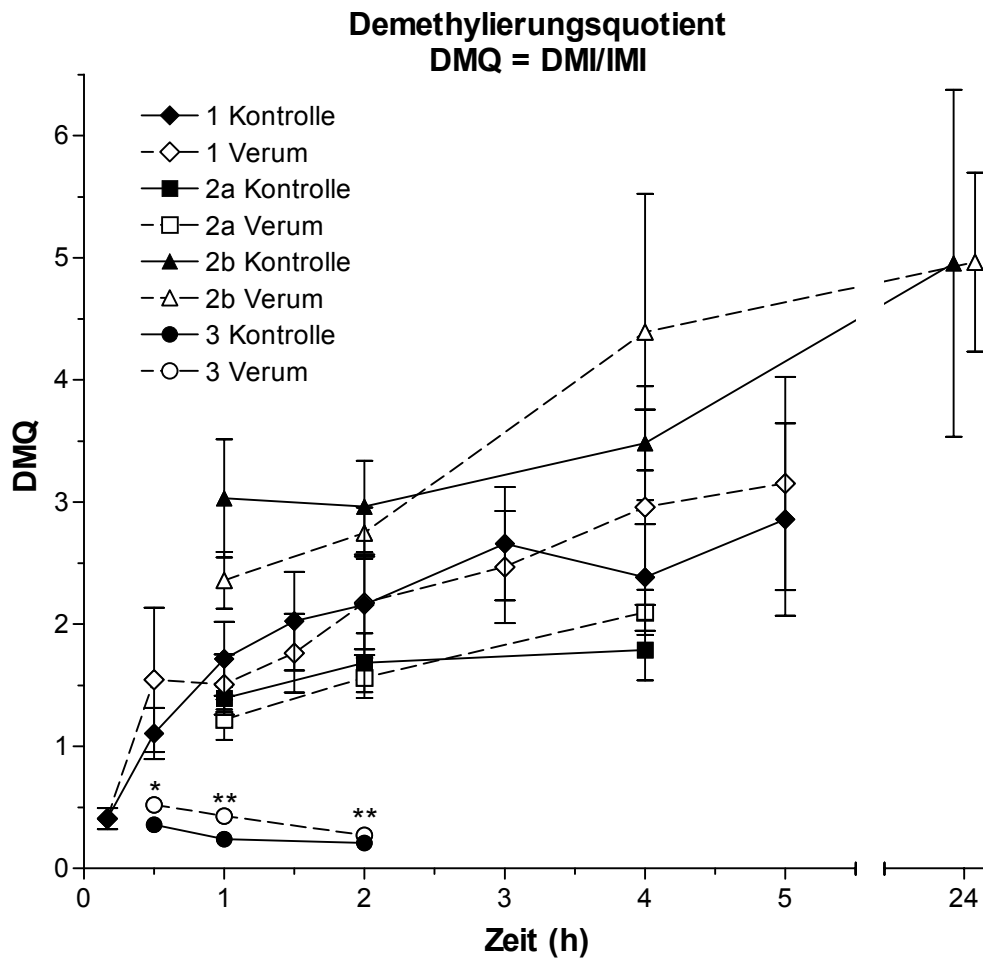


Abbildung 17: Vergleich der Demethylierungsquotienten (DMQ) von Imipramin zu Desipramin (Versuche 1, 2a, 2b und 3). Es wurden 5 µg/kg KG TCDD und 48 Stunden später 25 mg/kg KG Imipramin gegeben. Mittelwert und Standarderror; in den TCDD-behandelten Ratten ist der DMQ signifikant im Vergleich zur Ölkontrolle erhöht (U-Test nach Mann-Whitney: * = p<0,05; ** = p<0,01).

Auch mit der von anderen Autoren beobachteten (Berman et al., 1986) Hemmung der biliären Ausscheidung von Konjugationsprodukten der Imipraminmetaboliten läßt sich der Effekt auf die Bioverfügbarkeit des Pharmakons nicht erklären. Diese Wirkung trat im übrigen nach einer wesentlich höheren TCDD-Dosis von 200 µg/kg KG subcutan auf.

Einer weiteren Hypothese konnte aus zeitlichen und finanziellen Gründen nicht mehr am Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie nachgegangen werden, sie ist aber auch von anderen Arbeitsgruppe unseres Wissens bisher nicht überprüft worden. Stegmann und Bickel haben schon 1977 gezeigt, daß die Bioverfügbarkeit von Imipramin von seiner Anflutungsgeschwindigkeit abhängig ist. Demnach kommt es nach oraler Verabreichung einer therapeutischen Standarddosis zu einer fast vollständigen hepatischen Extraktion des über die Pfortader anströmenden Imipramins. Sobald in der isoliert perfundierten Rattenleber die übliche therapeutischen Dosis um mehr als etwa den Faktor 10 überschritten wird, nimmt die Extraktion des Medikamentes durch die Leber jedoch ab. Das Resultat sind höhere Plasmakonzentrationen und eine erhöhte Bioverfügbarkeit, auch wenn gleichzeitig ein schnellerer Abbau durch Induktion von Leberenzymen stattfindet.

In unseren Versuchen führten die verschiedenen Applikationsarten und Stress erzeugenden Eingriffe bei gleicher Imipramindosis zu sehr unterschiedlichen Plasmakonzentrationen von Imipramin und Desipramin (*Abbildungen 10-14, Tabellen 1,4,5 und 7*). Für Imipramin und Desipramin entstehen, bis 25-fache bzw. 8-fach höhere Plasmakonzentrationen bei intrajejunaler Imipramingabe als bei intragastraler Gabe. Dies macht deutlich wie stark die zu erzielenden Plasmakonzentrationen von der Anflutungsgeschwindigkeit abhängen. Eine Zusammenfassung der *in vivo* Ergebnisse zeigt die *Abbildung 18*, in der die Plasmakonzentrationen von Imipramin und seinem Hauptmetaboliten Desipramin aufsummiert wurden. Bei rascher Anflutung aus dem oberen Dünndarm (Versuche 1 und 3) ist offensichtlich die Aufnahmekapazität der Leber für Imipramin überschritten und es kommt zu wesentlich höheren Plasmakonzentrationen als nach intragastraler Gabe. Zu dieser Hypothese paßt auch die Tatsache, daß in den hier beschriebenen Versuchsreihen eine Imipramindosis verwendet wurde, die etwa um den Faktor 10 über der beim Menschen üblichen therapeutischen Dosis liegt: wir verabreichten 25 mg/kg KG, wohingegen in der Humanmedizin Dosen von 2-3 mg/kg KG (100-200 mg/d) gegeben werden.

Warum im Versuch 1 bei unbehandelten Ratten dieser Effekt sehr viel geringer ausgeprägt war als im Versuch 3 könnte am unterschiedlichen Aufbau dieser Versuche liegen. Die Ratten in Versuch 1 hatten durch Legen eines Carotiskatheters einen erheblich stärkeren Operationsstress. Auch die Entnahme größerer Blutmengen von einem Tier, nur ersetzt durch einen Plasmaexpander, könnten die Ergebnisse bei den Kontrolltieren beeinflußt haben. Damit kann aber noch nicht erklärt werden, warum und wie die TCDD-Behandlung in der Lage wäre einen solchen hypothetischen Effekt aufzuheben.

Es ist denkbar, daß Dioxine aufgrund ihrer hepatischen Akkumulation Bindungsstellen in der Leber besetzen, die nun für Imipramin nicht mehr zur Verfügung stehen. Ein solcher Effekt würde zweifellos ebenfalls zu einer erhöhten Konzentration im Plasma führen. Dennoch erscheint es überraschend, daß derartig geringe Mengen von TCDD (5 µg/kg KG), eine ausge-

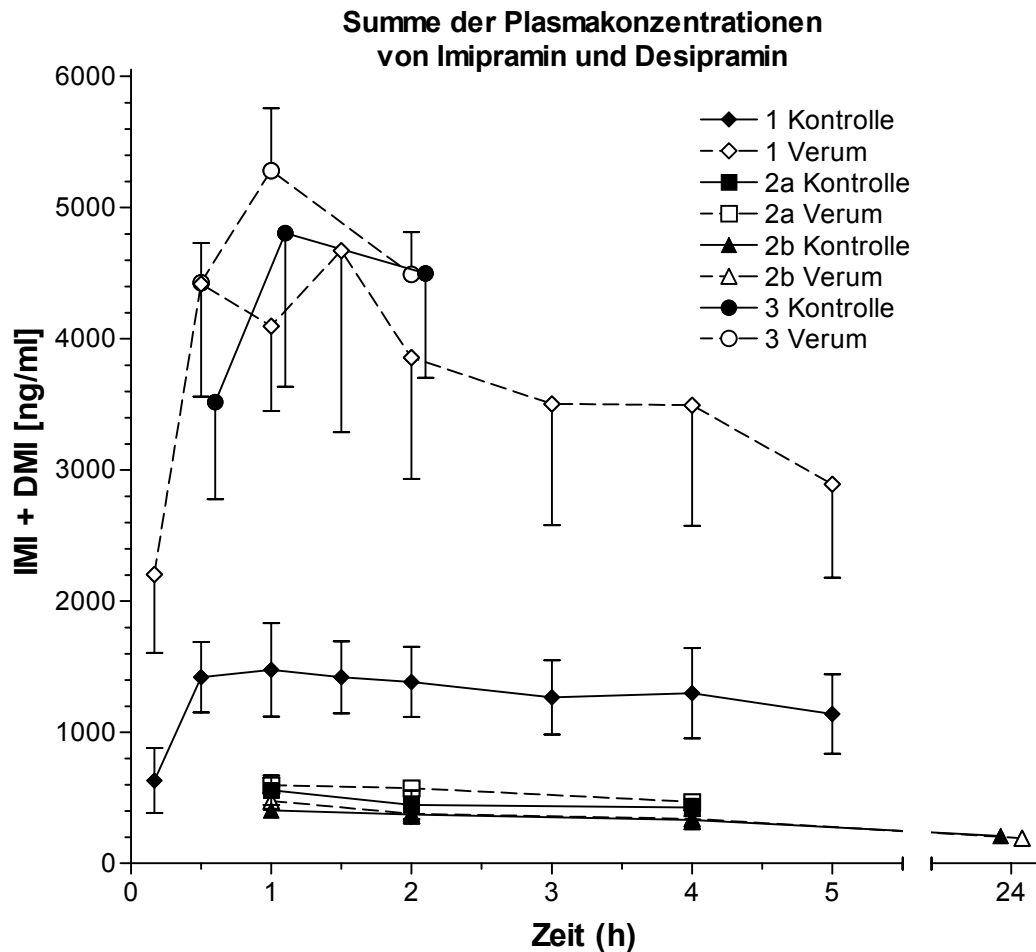


Abbildung 18: Vergleich der Summe der Plasmakonzentrationen von Imipramin und Desipramin nach Imipramingabe in den Kontroll- und Versuchsgruppen der Versuche 1, 2a, 2b und 3. Die TCDD- bzw. Öl-Verabreichung und Imipramin-Gabe erfolgte in den Versuchen 1 und 3 über einen Duodenalkatheter, in den Versuchen 2a und 2b mittels Schlündeln. Es wurden 5 µg/kg KG TCDD und nach 48 Stunden 25 mg/kg KG Imipramin gegeben. Mittelwert und Standarderror.

prägte Wirkung auf die Bioverfügbarkeit eines Pharmakons haben können, welches in **5000-fach höherer Dosis** verabreicht wird (25 mg/kg KG). Man sollte deshalb bei weiteren Untersuchungen auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß TCDD auf Transportproteine in der Leberzellmembran einwirken und damit die Aufnahme von Imipramin und anderen Arzneimitteln hemmen könnte. Solche unter dem Begriff der „multiple drug resistance proteins“ bekannten Transporter bieten neue, noch nicht ausreichend erforschte Möglichkeiten für Arzneimittel/Fremdstoff-Interaktionen (Keppler und Arias, 1997). Es muß aber auch festgestellt werden, daß die in unseren Versuchen verwendete TCDD-Konzentration um mindestens 2-3 Größenordnungen über den Konzentrationen liegt, denen der Mensch über die Nahrung üblicherweise ausgesetzt ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Sevesogift 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD, ist das stärkste bisher vom Menschen in die Umwelt gebrachte Gift. Ein großer Anteil seiner toxischen Wirkungen wird auf das hohe Induktionspotential für fremdstoffmetabolisierende Enzyme zurückgeführt. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung einer nicht letalen TCDD-Belastung auf den Arzneistoffwechsel im Modellversuch an Ratten. Als Pharmakon wurde das gut untersuchte und seit langer Zeit klinisch genutzte Imipramin gewählt.

In allen Versuchen wurden die Ratten 48 Stunden vor Untersuchung des Imipraminstoffwechsels mit einer Einzeldosis von 5 µg TCDD/kg Körpergewicht vorbehandelt. Der Imipraminstoffwechsel wurde entweder *in vivo* durch Bestimmung der Kinetik von Imipramin und seines primären Hauptmetaboliten Desipramin im Plasma der Ratten ermittelt oder *in vitro* durch Messung des Umsatzes in den Lebermikrosomen bestimmt. Dabei wurden die Konzentrationen von Imipramin und seinen Metaboliten mit einer etablierten HPLC-Methode gemessen. Die Applikation von TCDD und Imipramin *in vivo* erfolgte bei den Ratten entweder über einen implantierten Duodenal- bzw. Jejunalkatheter oder durch intragastrale Verabreichung mit einer Schlundsonde. Mehrfache Blutproben von Einzeltieren wurden über einen implantierten Carotiskatheter oder aus dem Retroorbitalsinus gewonnen.

Der induzierende Effekt der TCDD-Behandlung wurde in den Rattenlebermikrosomen anhand der Deethylierung von Ethoxyresorufin zu Resorufin überprüft. Der Umsatz dieses Substrates der Cytochrom P450-Isoenzyme 1A1 und 1A2 wurde durch die TCDD-Behandlung dreifach gegenüber den Kontrollen erhöht. Dagegen wurde der Abbau von Imipramin durch TCDD weder in den Mikrosomen *in vitro*, noch bei den Ratten *in vivo* stimuliert. Im ersten *in vivo* Versuch mit intraduodenaler Applikation erhöhte TCDD entgegen der Erwartung die Plasmakonzentrationen von Imipramin und Desipramin im Versuchszeitraum von 5 Stunden hoch signifikant um mehr als das Dreifache gegenüber den Kontrollen. Diese Steigerung der Bioverfügbarkeit konnte in weiteren Versuchen mit langsamerer Anflutung nach intragastraler Applikation von Imipramin nicht und auch nach intraajejunaler Gabe nur teilweise reproduziert werden.

Die vorliegenden Versuche erlauben keinen Rückschluß auf den Wirkungsmechanismus des paradoxen TCDD-Effekts bei intraduodenaler Imipraminverabreichung. Angesichts der im Vergleich zum Tierversuch wesentlich geringeren TCDD-Belastung ist beim Menschen mit einem solchen Effekt auf den Arzneistoffwechsel jedoch nicht zu rechnen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abraham K, Krowke R, Neubert D: "Pharmacokinetics and biological activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 1.: Dose dependent tissue distribution and induction of hepatic ethoxyresorufin-O-deethylase in rats following a single injection" Arch Toxicol 62 (1988) 359-368

Albers LJ, Reist C, Vu RL, Fujimoto K, Ozdemir V, Helmeste D, Poland R, Tang SW: "Effect of venlafaxine on imipramine metabolism" Psychiatry Res 96 (2000) 235-243

Ames BN, Gold LS: "Animal cancer tests and cancer prevention" Monogr Natl Cancer Inst 1992 (12): 125-132

Andersen ME, Mills JJ, Gargas ML, Kedderis L, Birnbaum LS, Neubert D, Greenlee WF: "Modeling receptor-mediated processes with dioxin: implications for pharmacokinetics and risk assessment" Risk Anal 13 (1993) 25-36

Anon: "PCB – Hinweise zur Beurteilung und Handlungsempfehlungen zur Gesundheitsvorsorge in Schulen und Kindertageseinrichtungen" <http://www.stmgev.bayern.de/a-z/index.html>, 2001

Auterhoff H, Knabe J, Höltje HD: "Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie" Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1991

Beaubien AR, Pakuts AP: "Influence of dose on first-pass kinetics of ¹⁴C-imipramine in the isolated perfused rat liver" Drug Metab Dispos 7 (1979) 34-39

Berman EF, Schaus P, Fujimoto HM: "Comparison of the inhibition of biliary excretion produced by certain inducing agents including 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin" J Toxicol Environm Health 17 (1986) 395-403

Bernard A, Broeckert F, de Poorter G, de Cock A, Hermans C, Saegerman C, Houins G: "The Belgian PCB/dioxin incident; analysis of the food chain contamination and health risk evaluation" Environ Res 88 (2002) 1-18

Breyer U: "Perazine, chlorpromazine and imipramine as inducers of microsomal drug metabolism" Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 272 (1972) 277-288

Brosen K: "The relationship between imipramine metabolism and the sparteine oxidation polymorphism" Thesis, Odense Universitet (Danmark), 1988

Brosen K, Gram LF, Klysner R, Bech P: "Steady state metabolism of imipramine and its metabolites: Significance of dose dependent kinetics" *Eur J Clin Pharmacol* 30 (1986) 43-49

Chiba M, Fujita S, Suzuki T: "Parallel pathway interactions in imipramine metabolism in rats" *J Pharm Sci* 77 (1988) 944-947

Christ W, Hecker W, Junge H, Stille G: "Phase I metabolism of imipramine by microsomes of small intestine in comparison with metabolism by liver microsomes" *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 323 (1983) 176-182

Conacher HB, Page BD, Ryan JJ: "Industrial chemical contamination of foods" *Food Addit Contam* 10 (1993) 129-143

Cook MJ: "The anatomy of the laboratory mouse" Academic Press, London, New York, 1965

Couture LA, Abbott BD, Birnbaum LS: "A critical review of the developmental toxicity and teratogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: recent advances toward understanding the mechanism" *Teratology* 42 (1990) 619-627

Csaba G, Mag O, Inczeffi-Gonda A, Szeberenyi S: "Persistent influence of neonatal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treatment on glucocorticoid receptors and on the microsomal enzyme system" *J Dev Physiol* 15 (1991) 337-340

deJong AP, Liem AK, Hoggerbrugge R: "Study of polychlorinated dibenzodioxins and furans from municipal waste incinerator emissions in The Netherlands: analytical methods and levels in the environment and human food chain" *J Chromatogr* 643 (1993) 91-106

Dickson LC, Buzik SC: "Health risks of "dioxins": a review of environmental and toxicological considerations" *Vet Hum Toxicol* 35 (1993) 68-77

Elsenhans B, Forth W, Richter E: "Increased copper concentrations in rat tissues after acute intoxication with 2,3,7,8-TCDD" *Arch Toxicol* 65 (1991) 429-432

Feng X-C, Richter E: "The role of extrahepatic organs in the first pass metabolism of N-nitrosodibutylamine" *Arch Toxicol Suppl* 13 (1989) :227-229

Firestone D: "Determination of dioxins and furans in foods and biological tissues: review and update" *J Assoc Off Anal Chem* 74 (1991) 375-384

Forth W: "Das Unglück von Seveso" *Dtsch Ärzteblatt* 44: (1977) 2617-2626

Fries GF, Paustenbach DJ: "Evaluation of potential transmission of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-contaminated incinerator emissions to humans via foods" *J Toxicol Environ Health* 29 (1990) 1-43

Furlanut M, Benetello P, Spina E: "Pharmacokinetic optimisation of tricyclic antidepressant therapy" *Clin Pharmacokinet* 24 (1993) 301-318

Geyer HJ, Scheunert I, Rapp K, Gebefügi I, Steinberg C, Kettrup A: "The relevance of fat content in toxicity of lipophilic chemicals in terrestrial animals with special reference to dieldrin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin " *Ecotoxicol Environ Safety* 26 (1993) 45-60

Goodman DG, Sauer RM: "Hepatotoxicity and carcinogenicity in female Sprague-Dawley rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: a pathology working group reevaluation" *Regul Toxicol Pharmacol* 15 (1992) 245-252

Graham M J, Lucier GW, Linko P, Maronpot RR, Goldstein JA: "Increase in cytochrome P450 mediated 17 β estradiol hydroxylase activity in rat liver microsomes after both acute administration and subchronic administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a two-stage hepatocarcinogenesis model" *Carcinogenesis* 9 (1988) 1935-1941

Gram LF: "Imipramine: A model substance in pharmacokinetic research" *Acta Psychiatr Scand* 78 (Suppl 345) (1988) 81-84

Gubser R, Di Francesco C, Bickel MH: "Uptake of lipophilic model compounds into the isolated perfused rat epididymal adipose tissue" *J Pharmacol Exp Ther* 237 (1986) 967-971

Hagenmaier H: "Polychlorierte Dibenzodioxine und polychlorierte Dibenzofurane – Bestandsaufnahme und Handlungsbedarf" *VDI Berichte Nr.745* (1989) 939-978

Hapgood J, Cuthill S, Denis M, Poellinger L, Gustafsson LA: "Specific protein-DNA-interactions at a xenobiotic-responsive element: copurification of dioxin receptor and DNA binding activity" *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 60-64

Hermann DJ, Krol TF, Dukes GE, Hussey EK, Danis M, Han YH, Powell JR, Hak LJ: "Comparison of verapamil, diltiazem and labetalol on the bioavailability and metabolism of imipramine" *J Clin Pharmacol* 32 (1992) 176-183

Holsapple MP, Snyder MK, Wood SC, Morris DL: "A review of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced changes in immunocompetence: 1991 update" *Toxicology* 69 (1991) 219-255

Huff JE, Salmon AG, Hooper NK, Zeise L: "Long-term carcinogenesis studies on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and hexachlorodibenzo-p-dioxins" *Cell Biol Toxicol* 7 (1991) 67-94

Johnson ES: "Important aspects of the evidence for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin carcinogenicity in man" *Environ Health Perspect* 99 (1993) 383-390

Keppler D, Arias IM: "Introduction: Transport across the hepatocyte canalicular membrane" *FASEB J* 11 (1997) 15-18

Kayajanian GM: "Dioxin is a systemic promoter blocker, II" *Ecotoxicol Environ Safety* 42 (1999) 103-109

Körner W, Golor G, Schulz T, Wiesmüller T, Hagenmaier H, Neubert D: "Tissue concentrations and induction of a hepatic monooxygenase in male Wistar rats after repeated doses of defined polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran (PCDDs and PCDFs) mixtures" *Arch Toxicol* 75 (2002) 653-664

Krüger N, Helge H, Neubert D: "Bedeutung von PCDDs/ PCDFs ("Dioxinen") in der Pädiatrie" *Monatsschr Kinderheilk* 139 (1991) 434-441

Krüger R, Hölzl G, Kuss HJ, Schefold L: "Comparison of the metabolism of the three antidepressants amitriptyline, imipramine and chlorimipramine in vitro in rat liver microsomes" *Psychopharmacology* 88 (1986) 505-513

Lakshmanan MR, Campbell BS, Chirtel SJ, Ekarohita N, Ezekiel M: "Studies on the mechanism of absorption and distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat" *J Pharmacol Exp Ther* 239 (1986) 673-677

LaKind, JS, Berlin CM, Naiman DQ: "Infant exposure to chemicals in breast milk in the United States: what we need to learn from a breast milk monitoring program" *Environ Health Perspect* 109 (2001) 75-88

Landi MT, Consonni D, Patterson DG, Needham LL, Lucier G, Brambilla P, Cazzaniga MA, Mocarelli P, Pesatori AC, Bertazzi PA, Caporaso NE: "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin plasma levels in Seveso 20 years after the accident" *Environ Health Perspect* 106 (1998) 273-277

Lemoine A, Gautier JC, Azoulay D, Kiffel L, Belloc C, Guengerich FP, Maurel P, Beaune P, Leroux JP: "Major pathway of imipramine metabolism is catalyzed by cytochromes P450 1A2 and P450 3A4 in human liver" *Mol Pharmacol* 43 (1993) 827-832

Leung HW, Paustenbach DJ, Murray FJ, Andersen ME: "A physiological **pharmacokinetic** description of the tissue distribution and enzyme-inducing properties of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat" *Toxicol Appl Pharmacol* 103 (1990) 399-410

Liem AK, Fürst P, Rappe C: "Exposure of populations to dioxins and related compounds" *Food Addit Contam* 17 (2000) 241-259

Lucier GW, Portier CJ, Gallo MA: "Receptor mechanisms and dose response models for the effects of dioxins" *Environ Health Perspect* 101 (1993) 36-44

Morinobu S, Tanaka T, Kawakatsu S, Totsuka S, Koyama E, Chiba K, Ishizaki T, Kubota T: "Effects of genetic defects in the CYP2C19 gene on the N-demethylation of imipramine, and clinical outcome of imipramine therapy" *Psychiatry Clin Neurosci* 51 (1997) 253-257

Moser GA, McLachlan MS: "A non-absorbable dietary fat substitute enhances elimination of persistent lipophilic contaminants in humans" *Chemosphere* 39 (1999) 1513-1521

Mukerjee D: "Health impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins: A critical review" *J Air Waste Manage Ass* 48 (1998) 157-165

Neubert R, Maskow L, Webb J, Jacob-Müller U, Nogueira AC, Delgado I, Helge H, Neubert D: "Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzo-furans and the human immune system. 1. Blood cell receptors in volunteers with moderately increased body burdens" *Life Sci* 53 (1993) 1995-2006

Ni PF, Guyon F, Caude M, Rosset R: "Automatic determination of clomipramine, imipramine and their demethylated metabolites in plasma by high performance liquid chromatography" *J Liquid Chromatogr* 11 (1988) 1087-1106

Patandin S, Lanting CI, Mulder PGH, Boersma ER, Sauer PJJ, Weisglas-Kuperus N: "Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age" *J Pediatr* 134 (1999) 33-41

Paustenbach DJ, Wenning RJ, Lau V, Harrington NW, Rennix DK, Parsons AH: "Recent developments on the hazards posed by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in soil: implications for setting risk-based cleanup levels at residential and industrial sites" *J Toxicol Environ Health* 36 (1992) 103-149

Pirkle JS, Wolfe WH, Patterson DG, Needham LL, Michalek JE, Miner JC, Peterson MR, Phillips DL: "Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Vietnam veterans of Operation Ranch Hand" *J Toxicol Environ Health* 27 (1989) 165-171

Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA, Poland A: "Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine" *Cancer Res* 40 (1980) 3616-3620

Portier C, Tritscher A, Kohn M, Sewall C, Clark G, Edler L, Hoel D, Lucier G: "Ligand/receptor binding for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Implications for risk assessment" *Fundam Appl Toxicol* 20 (1993) 48-56

Richter E, Forth W, Zwicklenpflug W: "Untersuchungen zur chronischen Wirkung einer langfristigen Belastung mit TCDD im Spurenbereich" *Materialien* 63, ed.: Bayer. Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen München (1989)

Richter E, Hunder G, Forth W: "Inhibition of intestinal glucose absorption in rats treated with 2,3,7,8-TCDD" *Vet Hum Toxicol* 34 (1992) 123-126

Rosenberg R: "Drug treatment of panic disorder" *Pharmacol Toxicol* 72 (1993) 344-353

Rouer E, Lemoine A, Cresteil T, Rouet P, Leroux JP: "Effects of genetic or chemically induced diabetes on imipramine metabolism" *Drug Metab Dispos* 15 (1987) 524-528

Rozman K: "A critical view of the mechanism(s) of toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin. Implications for human safety assessment" *Derm Beruf Umwelt* 37 (1989) 81-92

Safe S, Astroff B, Harris M, Zacharewski T, Dickerson R, Romkes M, Biegel L: "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds as antioestrogens: Characterization and mechanism of action" *Pharmacol Toxicol* 69 (1991) 400-409

Sallee FR, Pollock BG: "Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine" *Clin Pharmacokinet* 18 (1990) 346-364

Skjelbo E, Brosen K: "Inhibitors of imipramine metabolism by human liver microsomes" *Br J Clin Pharmacol* 34 (1992) 256-261

Somogyi A, Beck H: "Nurturing and breast-feeding: exposure to chemicals in breast milk" *Environ Health Perspect* 101 (Suppl 2) (1993) 45-52

Steenland K; Deddens J; Piacitelli L: "Risk assessment for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) based on an epidemiologic study" *Am J Epidemiol* 154 (2001) 451-458

Stegmann R, Bickel MH: "Dominant role for tissue binding in the first pass extraction of imipramine by the perfused rat liver" *Xenobiotica* 7 (1977) 737-746

Su P, Coutts RT, Baker GB, Daneshtalab M: "Analysis of imipramine and three metabolites produced by isozyme CYP 2D6 expressed in a human cell line" *Xenobiotica* 23 (1993) 1289-1298

Swanson JR, Jones GR, Krasselt W, Denmark LN, Ratti F: "Death of two subjects due to imipramine and desipramine metabolite accumulation during chronic therapy: a review of the literature and possible mechanisms" *J Forensic Sci* 42 (1997) 335-339

Swartz CE: "Used Math" Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs (1973), 95-115

Travis CC, Hattemer-Frey HA: "Human exposure to dioxin" *Sci Total Environ* 104 (1991) 97-127

Ullmann U, Lehnfeld R, Bliesath H, Birkel M, Gebbing H, Grave M, Wolf H: "Relative bioavailability of imipramine (Tofranil) coated tablets in healthy volunteers" *Int J Clin Pharmacol Ther* 39 (2001) 271-276

Umbreit TH, Hesse EJ, Gallo MA: "Comparative toxicity of TCDD contaminated soil from Times Beach, Missouri, and Newark, Jersey" *Chemosphere* 15 (1986) 2121-2124

Vanden-Heuvel JP, Lucier G: "Environmental toxicity of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans" *Environ Health Perspect* 100 (1993)

van Dongen,-Remie R, Rensema, JW, van Wunnik GHJ: "Manual of microsurgery on the laboratory rat" Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1990

von Bahr C, Birgersson C, Morgan ET, Eriksson Ö, Göransson M, Spina E, Woodhouse K: "Oxidation of tricyclic antidepressant drugs, debrisoquine and 7-ethoxyresorufin, by human liver preparations" *Xenobiotica* 16 (1986) 391-400

von Bahr C, Spina E, Birgersson C, Ericsson Ö, Göransson M, Henthorn T, Sjöqvist F: "Inhibition of desmethylimipramine 2-hydroxylation by drugs in human liver microsomes" *Biochem Pharmacol* 34 (1985) 2501-2505

Walker NJ, Portier CJ, Lax SF, Crofts FG, Li Y, Lucier GW, Sutter TR: "Characterization of the dose-response of CYP1B1, CYP1A1, and CYP1A2 in the liver of female Sprague-Dawley rats following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin" *Toxicol Appl Pharmacol* 154 (1999) 279-286

Wang JS, Wang W, Xie HG, Huang SL, Zhou HH: "Effect of troleandomycin on the pharmacokinetics of imipramine in Chinese: the role of CYP3A" *Br J Clin Pharmacol* 44 (1997) 195-198

White TE, Gasiewicz TA: "The human estrogen receptor structural gene contains a gene sequence that binds activated mouse and human Ah receptors: a possible mechanism of estrogen receptor regulation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin" *Biochem Biophys Res Commun* 193 (1993) 956-962

Workman EA, Short DD: "Atypical antidepressants versus imipramine in the treatment of major depression: a meta-analysis" *J Clin Psychiatr* 54 (1993) 5-12

Wurthmann C, Klieser E: "Möglichkeiten der Therapie von Angststörungen des DSM-III-R" *Fortschr Neurol Psychiatr* 60 (1992) 91-103

Zwickenpflug W, Richter E: "A steam distillation extraction procedure for the analysis of TCDD in biological samples" *Chemosphere* 17 (1988) 647-650

7 ANHANG

7.1 Abbildungen

<i>Abbildung 1:</i> Struktur von 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	Seite 1
<i>Abbildung 2:</i> Strukturen einiger persistenter Organochlorverbindungen	Seite 1
<i>Abbildung 3:</i> Hauptstoffwechselwege von Imipramin	Seite 4
<i>Abbildung 4:</i> Carotis-Katheter	Seite 10
<i>Abbildung 5:</i> Duodenalkatheter	Seite 11
<i>Abbildung 6:</i> Schematische Darstellung der Kanülierung der Arteria Carotis	Seite 12
<i>Abbildung 7:</i> Schematische Darstellung des Verlaufes des A. carotis-Katheters in der Ratte und postoperative Versuchsanordnung	Seite 13
<i>Abbildung 8:</i> Erstellung einer Resorufin-Eichgeraden	Seite 20
<i>Abbildung 9:</i> HPLC-Chromatogramm mit Auftrennung von Imipramin und seinen Metaboliten	Seite 23
<i>Abbildung 10:</i> Konzentrationen von Imipramin im Plasma von Ratten nach intraduodener Applikation (Versuch 1)	Seite 25
<i>Abbildung 11:</i> Konzentrationen von Desipramin im Plasma von Ratten nach intraduodener Applikation (Versuch 1)	Seite 26
<i>Abbildung 12:</i> Konzentration von Imipramin und Desipramin im Plasma von nüchtern gehaltenen Ratten nach Applikation von Imipramin (Versuch 2a)	Seite 27
<i>Abbildung 13:</i> Konzentration von Imipramin und Desipramin im Plasma von gefütterten Ratten nach Applikation von Imipramin (Versuch 2b)	Seite 28
<i>Abbildung 14:</i> Konzentration von Imipramin und Desipramin im Plasma von Ratten. Intrajejunale Imipramin-Applikation über implantierten Katheter (Versuch 3)	Seite 29

- Abbildung 15:* Auswirkung einer TCDD-Vorbehandlung auf den Ethoxyresorufin-Umsatz durch Lebermikrosomen der Ratte Seite 31
- Abbildung 16:* Induktion des Imipramin-Stoffwechsels durch TCDD-Vorbehandlung: Seite 32
- Abbildung 17:* Vergleich des Demethylierungsquotienten (DMQ) von Imipramin zu Desipramin (Versuch 1, 2a, 2b und 3) Seite 40
- Abbildung 18:* Vergleich der Summe der Plasmakonzentrationen von Imipramin und Desipramin nach Imipramingabe in den Kontroll- und Versuchsgruppen der Versuche 1, 2a, 2b und 3 Seite 42

7.2 Tabellen

Tabelle 1: intraduodenale Applikation von Imipramin *in vivo* durch einen implantierten Katheter nach TCDD- oder Öl-Vorbehandlung (Versuch 1)

Kontrollgruppe: Imipraminkonzentration [ng/ml Plasma]										
	Zeitpunkt der Blutentnahme [min]									AUC
	5	10	30	60	90	120	180	240	300	
Ratte 1	119		567,0	405,0	410,0	378,0	230,0	-	-	65740
Ratte 2	67	366,0	525,0	343,0	388,0	267,0	173,0	-	-	57170
Ratte 3	133	289,0	508,0	407,0	341,0	310,0	383,0	286,0	222,0	100200
Ratte 4	173	245,0	325,0	251,0	225,0	239,0	190,0	190,0	173,0	65080
Ratte 5		165,0	792,0	655,0	419,0	448,0	325,0	385,0	229,0	124100
Ratte 6	176	1242,0	1173,0	1045,0	1057,0	1242,0	864,0	585,0	559,0	268400
MW	133,6	461,4	648,3	517,7	473,3	480,7	360,8	361,5	295,8	113400
± SD	44,7	442,4	297,3	291,0	294,7	380,6	259,4	168,9	177,3	80100
Kontrollgruppe: Desipramin [ng/ml Plasma]										
Ratte 1	92,0	-	716,0	769,0	852,0	834,0	630,0	-	-	126100
Ratte 2	14,0	235,0	935,0	729,0	1140,0	924,0	768,0	-	-	147100
Ratte 3	-	99,0	503,0	592,0	600,0	556,0	756,0	546,0	473,0	167200
Ratte 4	-	56,0	138,0	250,0	253,0	431,0	333,0	393,0	385,0	93890
Ratte 5	-	108,0	1408,0	2082,0	1586,0	1617,0	1353,0	1498,0	1266,0	428700
Ratte 6	-	354,0	915,0	1317,0	1238,0	1051,0	1581,0	1302,0	1244,0	362400
MW	53,0	170,4	769,2	956,5	944,8	902,2	903,5	934,8	842,0	220900
± SD	55,2	122,4	431,0	650,5	477,8	419,5	469,3	546,7	478,3	139000
Verumgruppe: Imipraminkonzentration [ng/ml Plasma]										
Ratte 1	-	1140,0	1447,0	1442,0	858,0	766,0	822,0	428,0	376,0	243300
Ratte 2	-	2726,0	3986,0	3891,0	5728,0	3965,0	3487,0	3342,0	2382,0	1089000
Ratte 3	-	738,0	2292,0	1085,0	1010,0	879,0	520,0	425,0	373,0	238700
Ratte 4	917,0	1903,0	2799,0	1708,0	1888,0	1173,0	881,0	1559,0	940,0	433600
Ratte 5	-	1045,0	336,0	839,0	719,0	518,0	459,0	421,0	403,0	159000
MW	917,0	1510,4	2174,0	1793,0	2040,6	1460,2	1233,8	1235,0	894,8	432720
± SD		803,5	1376,6	1219,0	2111,1	1419,9	1272,9	1276,2	835,6	380510
Verumgruppe: Desipraminkonzentration [ng/ml Plasma]										
Ratte 1	-	435,0	1761,0	2425,0	2140,0	2312,0	2732,0	2336,0	2393,0	667400
Ratte 2	683,0	1675,0	2470,0	2522,0	4289,0	3457,0	3552,0	3667,0	3263,0	977000
Ratte 3	-	310,0	3183,0	2280,0	2459,0	2293,0	1884,0	1689,0	1584,0	591500
Ratte 4	-	576,0	2440,0	2573,0	2645,0	2358,0	1749,0	1968,0	1473,0	599500
Ratte 5	-	457,0	1368,0	1709,0	1616,0	1557,0	1428,0	1625,0	1267,0	432100
MW	683,0	690,6	2244,4	2301,8	2629,8	2395,4	2269,0	2257,0	1996,0	653500
± SD		558,3	702,1	349,7	1006,2	679,8	864,1	836,6	827,3	200400

Tabelle 2: Intraduodenale Applikation von Imipramin in vivo durch einen implantierten Katheter. Signifikanzen zwischen Kontroll- und Verumgruppe nach U-Test (Versuch 1)

Signifikanz nach U-Test (Mann-Whitney)			
Versuch 1			
Zeit [min]	N	p	Signifikanz
Imipramin: Kontrollgruppe/Verumgruppe			
5	2	-	ns
10	5	0,04	*
30	6	-	ns
60	6	-	ns
90	6	0,028	*
120	6	0,044	*
180	6	0,028	*
240	4	-	ns
300	4	-	ns
Desipramin: Kontrollgruppe/Verumgruppe			
5	2	-	ns
10	6	0,016	*
30	6	0,01	**
60	6	0,01	**
90	6	0,006	**
120	6	0,001	**
180	6	0,001	**
240	6	0,014	*
300	6	0,014	*

Tabelle 3: Intraduodenale Applikation von TCDD/Öl und Imipramin durch einen implantierten Katheter: Vergleich der Demethylierungsquotienten [DMQ] mit Standardabweichung [SD] der Kontroll- und Verumgruppen (Versuch 1)

Zeit [min]	DMQ Kontrollen	± SD	DMQ Verum	± SD
0	-	-	-	-
5	0,46	0,38		-
10	0,41	0,19	0,41	0,11
30	1,10	0,52	1,54	1,32
60	1,72	0,74	1,51	0,55
90	2,02	0,99	1,76	0,72
120	2,16	1,01	2,18	0,85
180	2,66	1,14	2,47	1,02
240	2,38	0,87	2,96	1,79
300	2,86	1,58	3,15	1,95

Tabelle 4: Intragastrale Applikation von TCDD/Öl und Imipramin, nüchternes Kollektiv (Versuch 2a)

Kontrollgruppe, Imipramin [ng/ml Plasma]				AUC ₍₀₋₂₄₀₎	DMQ = DMI/IMI		
	Zeitpunkt der Blutentnahme [min]				Zeitpunkt der Blutentnahme		
	60	120	240		60	120	240
Ratte 1	458	432	350	87360	1,04	0,92	0,86
Ratte 2	150	120	114	26640	1,40	1,32	2,30
Ratte 3	172	96	122	26280	1,57	1,99	1,78
Ratte 4	243	148	136	36060	1,53	2,20	2,07
Ratte 5	144	96	92	18480	1,43	1,99	1,93
MW ± SD	233 ± 132	178 ± 143	163 ± 106	38960 ± 27760	1,39 ± 0,21	1,68 ± 0,54	1,79 ± 0,55
SD % MW	56,4%	80,4%	65,0%	71,2%	15,2	32,1	31,0
Kontrollgruppe, Desipramin [ng/ml Plasma]							
Ratte 1	502	420	318	87000			
Ratte 2	222	168	278	45120			
Ratte 3	286	202	230	49140			
Ratte 4	393	344	298	66660			
Ratte 5	218	202	188	42540			
MW ± SD	324 ± 122	267 ± 109	262 ± 53	58090 ± 18700			
SD % MW	37,6%	40,83%	20,2%	32,2%			
Verumgruppe, Imipramin [ng/ml Plasma]							
Ratte 1	254	236	128	44160	1,30	1,45	2,60
Ratte 2	330	224	94	45600	1,19	1,50	2,43
Ratte 3	231	162	176	39000	1,64	2,20	2,05
Ratte 4	360	236	180	53640	0,63	1,36	1,68
Ratte 5	158	238	164	40740	1,33	1,29	1,72
MW ± SD	267 ± 81	219 ± 32	148 ± 37	44630 ± 5683	1,22 ± 0,37	1,56 ± 0,37	2,10 ± 0,41
SD % MW	30,2%	14,8%	24,7%	12,7%	30,1	23,5	19,7
Verumgruppe, Desipramin [ng/ml]							
Ratte 1	350	362	352	74700			
Ratte 2	416	356	242	71520			
Ratte 3	402	378	382	81060			
Ratte 4	242	340	321	64380			
Ratte 5	222	326	298	60540			
MW ± SD	326 ± 90	352,4 ± 20	319 ± 54	70440 ± 8167			
SD %MW	27,5%	5,7%	16,8%	11,6%			

Tabelle 5: Intragastrale Applikation von TCDD/Öl und Imipramin, gefüttertes Kollektiv (Versuch 2b)

Kontrollgruppe, Imipramin [ng/ml Plasma]					DMQ = DMI/IMI			
Zeit [h]	1	2	4	24	1	2	4	24
Ratte 1	168	-	-	-	1,70	-	-	-
Ratte 2	69	78	90	31	4,72	3,29	2,71	3,11
Ratte 3	64	97	23	37	3,7	2,59	5,17	3,70
Ratte 4	81	68	45	72	2,31	2,44	3,80	1,59
Ratte 5	122	114	135	34	3,71	4,28	2,97	6,92
Ratte 6	107	82	94	23	2,04	2,22	2,76	9,45
MW ± SD	102 ± 39	88 ± 18	77 ± 44	39 ± 19	3,03 ± 1,19	2,97±0,83	3,48±1,04	4,95±3,18
SD % MW	38,7%	20,5%	56,8%	48,2%	39,2	28,1	29,9	64,1
Kontrollgruppe, Desipramin [ng/ml Plasma]								
Ratte 1	302	-	-	-				
Ratte 2	345	272	258	102				
Ratte 3	251	266	126	145				
Ratte 4	198	176	181	121				
Ratte 5	479	516	425	249				
Ratte 6	231	193	275	230				
MW ± SD	301 ± 107	285 ± 136	253 ± 113	169 ± 66				
SD % MW	33,7%	47,9%	44,8%	39,0%				
Verumgruppe, Imipramin [ng/ml Plasma]					DMQ = DMI/IMI			
Ratte 1	177	114	58	36	1,92	2,51	3,50	3,07
Ratte 2	123	97	108	31	3,03	2,73	2,24	4,11
Ratte 3	179	108	66	25	2,56	3,18	4,85	4,57
Ratte 4	93	71	95	34	2,52	3,21	2,79	7,36
Ratte 5	109	96	27	28	1,76	2,10	8,57	5,7
MW ± SD	136 ± 40	97 ± 17	71 ± 32	31 ± 4	2,36±0,52	2,74±0,47	4,39±2,53	4,96±1,64
SD % MW	29,1%	17,1%	45,1%	14,3%	21,9	17,1	57,7	33,0
Verumgruppe, Desipramin [ng/ml]								
Ratte 1	360	303	215	117				
Ratte 2	394	280	256	135				
Ratte 3	486	364	339	121				
Ratte 4	248	241	281	265				
Ratte 5	203	213	245	169				
MW ± SD	338 ± 114	280 ± 58	267 ± 47	161 ± 61				
SD % MW	33,6%	20,8%	17,4%	38,0%				

Tabelle 6: Intragastrale Applikation von TCDD bzw. Öl und Imipramin *in vivo* im gefütterten Kollektiv. Vergleich der AUC für Imipramin und Desipramin (Versuch 2b).

Area under curve (AUC₀₋₁₄₄₀)				
Vergleich der Flächen unter den Kurven von Imipramin und Desipramin Kontroll-/Verumgruppe				
Versuchstiere	Imipramin Kontrollen	Imipramin Verum	Desipramin Kontrollen	Desipramin Verum
Ratte 1	-	80760	-	261000
Ratte 2	89160	102300	276700	298800
Ratte 3	49950	79020	209200	358300
Ratte 4	83880	95070	219800	381000
Ratte 5	127100	49800	505100	294500
Ratte 6	80640	-	350700	-
Mittelwert	87950	81390	312300	318700
± SD	± 27380	± 20180	± 121600	± 49400
SD in % des MW	31,1%	24,8%	38,9%	15,5%

Table 7: Intrajejuna Applikation von Imipramin durch einen implantierten Katheter (Versuch 3). Die DMI-Konzentration (nur nach 60 min) und der Demethylierungsquotient (DMQ) sind in den TCDD-behandelten Ratten signifikant erhöht (U-Test nach Mann-Whitney: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

Kontrollgruppe, Imipramin [ng/ml Plasma]				AUC ₍₀₋₁₂₀₎	DMQ = DMI/IMI		
Zeitpunkt der Blutentnahme [min]			Zeitpunkt der				
	30	60	120		30	60	120
Ratte 1	1801	2246	2974	244300	0,35	0,30	0,20
Ratte 2	2524	3332	3682	336100	0,37	0,24	0,21
Ratte 3	3729	6459	5921	580200	0,47	0,18	0,24
Ratte 4	3493	6459	3677	362300	0,30	0,13	0,16
Ratte 5	1076	1353	2157	157900	0,30	0,35	0,23
Mittelwerte	2525	3332	3682	336200	0,36	0,24	0,21
± SD	1119	1929	1400	158500	0,07	0,09	0,03
Kontrollgruppe, Desipramin [ng/ml Plasma]							
Ratte 1	658	713	620	70430			
Ratte 2	991	835	815	91760			
Ratte 3	1848	1212	1489	154700			
Ratte 4	1120	918	639	94080			
Ratte 5	340	497	514	47990			
Mittelwert	991	835	815	91790			
± SD	567	264	392	39800			
Verumgruppe, Imipramin [ng/ml Plasma]							
Ratte 1	2733	4026	3504	368300	0,52	0,38	0,23
Ratte 2	2341	2509	2710	264400	0,45	0,47	0,26
Ratte 3	3002	4243	3920	398600	0,47	0,34	0,27
Ratte 4	3178	4176	3876	399500	0,63	0,53	0,34
Ratte 5	2971	3264	3378	337400	0,54	0,42	0,26
Mittelwert	2845	3645	3478	353600	0,52*	0,43**	0,27**
± SD	323	745	488	56050	0,07	0,07	0,04
Verumgruppe, Desipramin [ng/ml Plasma]							
Ratte 1	1494	1603	867	143000			
Ratte 2	1109	1251	749	112000			
Ratte 3	1487	1543	1125	147800			
Ratte 4	2122	2343	1413	211500			
Ratte 5	1701	1438	913	143100			
Mittelwert	1583	1636**	1013	151500			
± SD	370	417	262	36400			

Tabelle 8: Varianzanalyse der Plasmakonzentrationen 1 Stunde nach Imipraminapplikation (Summe aus IMI und DMI) in den Versuchen 1, 2a, 2b und 3:

Gruppe	MW±SD	Signifikanzen der Varianzanalyse						
		Kontrolle 1	Kontrolle 2a	Kontrolle 2b	Kontrolle 3	Verum 1	Verum 2a	Verum 2b
Kontrolle 1	1474±873	----						
Kontrolle 2a	558±250	n.s.	----	----	----	----	----	----
Kontrolle 2b	403±119	n.s.	n.s.	----	----	----	----	----
Kontrolle 3	4805±2616	p<0,001	p<0,001	p<0,001	----	----	----	----
Verum 1	4095±1448	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.	----	----	----
Verum 2a	593±133	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,001	p<0,001	----	----
Verum 2b	474±147	n.s.	n.s.	n.s.	p<0,001	p<0,001	n.s.	----
Verum 3	5279±1067	p<0,001	p<0,001	p<0,001	n.s.	n.s.	p<0,001	p<0,001

Tabelle 9: Varianzanalyse der Demethylierungsquotienten (DMQ) 1 Stunde nach Imipraminapplikation in den Versuchen 1, 2a, 2b und 3:

Gruppe	MW±SD	Signifikanzen der Varianzanalyse						
		Kontrolle 1	Kontrolle 2a	Kontrolle 2b	Kontrolle 3	Verum 1	Verum 2a	Verum 2b
Kontrolle 1	1,72±0,74	----						
Kontrolle 2a	1,39±0,21	n.s.	----	----	----	----	----	----
Kontrolle 2b	3,03±1,19	p<0,001	p<0,001	----	----	----	----	----
Kontrolle 3	0,24±0,09	p<0,001	p<0,01	p<0,001	----	----	----	----
Verum 1	1,51±0,55	n.s.	n.s.	p<0,001	p<0,01	----	----	----
Verum 2a	1,22±0,37	n.s.	n.s.	p<0,001	p<0,05	n.s.	----	----
Verum 2b	2,36±0,52	n.s.	p<0,05	n.s.	p<0,001	p<0,05	p<0,01	----
Verum 3	0,43±0,07	p<0,01	p<0,01	p<0,001	n.s.	p<0,01	p<0,05	p<0,001

Tabelle 10: Eichgerade für Resorufin für 530 nm Anregung und 580 nm Emission

Eichgerade Resorufin bei 530 nm Anregung			
Stammlösung Resorufin [µl/5 ml]	Resorufin [µg/l]	Resorufin [nmol/l]	Emission 530 nm Anregung
10	4,70	22,18	0,07
20	9,42	44,36	0,14
40	18,82	88,71	0,26
50	23,52	110,89	0,34
100	47,00	221,59	0,66
200	94,08	443,56	1,38
300	141,12	665,34	2,15
500	235,20	1108,91	3,20

Die Eichgerade, in der die Konzentration an Resorufin [nmol/l] gegen die Emission aufgetragen ist, besitzt eine Steigung von $0,00291 \pm 0,000556$.

Tabelle 11: Mikrosomeninkubation: Ethoxyresorufin-Deethylase-Induktion durch TCDD (Versuch 4a)

Umsätze Ethoxyresorufin					
Fluoreszenzphotometrie bei 530 nm Anregung					
Kontrollgruppe					
Rattenleber	Transmission nach 2 min Inkubation	Transmission Sofortstopp	Transmission Differenz	Resorufin Gesamtumsatz [nmol/l]	Resorufin Umsatz [pmol/min/mg]
1	0,548	0,495	0,053	18,21	3,38
2	0,540	0,477	0,063	21,65	4,02
3	0,393	0,243	0,150	51,55	9,58
4	0,456	0,279	0,177	60,82	11,30
5	0,495	0,285	0,210	72,16	13,41
6	0,483	0,267	0,216	74,22	13,80
Mittelwert	0,488	0,341	0,145	49,768	9,248
± SD	0,057	0,113	0,071	19,89	4,17
Verumgruppe					
1	1,003	0,555	0,448	153,95	28,62
2	1,110	0,582	0,528	181,44	33,72
3	0,657	0,279	0,378	129,90	24,14
4	0,687	0,249	0,438	150,51	27,98
5	0,655	0,231	0,424	145,70	27,68
6	0,625	0,243	0,382	131,27	27,66
Mittelwert	0,790	0,356	0,433	148,795	28,300
± SD	0,210	0,165	0,547	13,17	2,82

Tabelle 12: Mikrosomeninkubation: Ethoxyresorufin-Deethylase-Induktion durch TCDD Signifikanz zwischen Kontroll- und Verumgruppe nach U-Test (Versuch 4a)

Signifikanz nach U-Test (Mann-Whitney)			
Induktion der Ethoxyresorufin-Deethylase			
KO/VER	N	p	Signifikanz
EROD	6	0,0039	p<0,05

Tabelle 13: Mikrosomeninkubation: Induktion des Imipraminstoffwechsels durch TCDD (Versuch 4b).

Mikrosomeninkubation mit Imipramin							
Umsatz und Bildung sind in ng Hmg⁻¹ Protein angegeben							
Kontrollgruppe							
Ratten	Lebergewicht [g]	Protein [mg]	IMI [ng] Sofortstop	IMI [ng] 60 min	IMI [ng] Umsatz	DMI [ng] Bildung	10 OH IMI [ng] Bildung
1	12,0	2,86	1137	1001	-46	82	11
2	13,5	2,71	1405	1157	-248	122	33
3	11,2	2,55	1164	1111	-53	17	30
4	9,4	2,86	1399	1101	-298	38	4
5	11,7	2,61	1225	1075	-150	20	2
6	10,4	2,53	1334	1130	-204	72	7
MW	11,3	2,69	1277,33	1111	-166,50	58,50	14,34
± SD	1,4	0,15	117,97	29	102,97	40,97	13,59
Verumgruppe							
1	1,4	2,81	1316	1033	-283	147	23
2	10,9	2,76	952	770	-182	76	54
3	9,9	2,59	903	704	-199	122	18
4	9,5	2,74	1230	1067	-163	98	20
5	11,2	2,66	1283	1024	-259	78	32
6	10,1	2,57	905	636	-269	161	64
MW	10,7	2,69	1098,17	872	-225,83	113,68	37,08
± SD	1,20	0,10	197,87	190	50,65	35,66	17,94

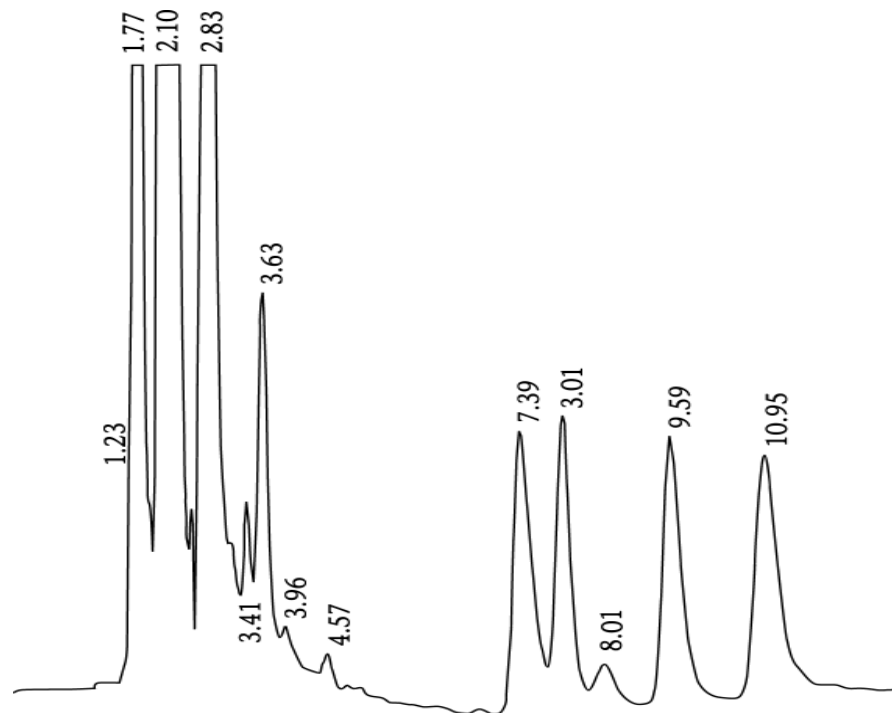
Tabelle 14: Mikrosomeninkubation: Induktion des Imipraminstoffwechsels durch TCDD: Signifikanz zwischen Kontroll- und Verumgruppe nach U-Test (Versuch 4b)

Signifikanz nach U-Test (Mann-Whitney)			
KO/VER	N	p	Signifikanz
Imipramin	6	0,16833	ns
Desipramin	6	0,02240	<0,05
10-OH-Imipramin	6	0,03908	<0,05

Tabelle 15: Mikrosomeninkubationen: Körpergewichte der Versuchstiere (Versuch 4)

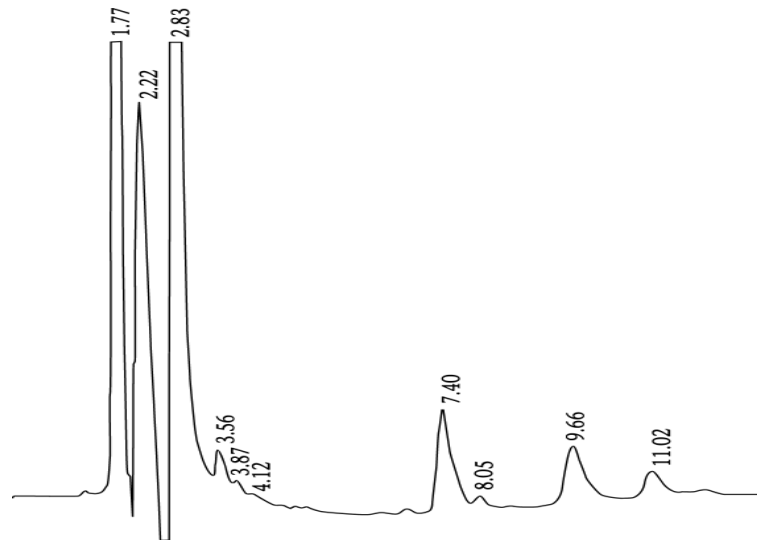
Ratte	Versuchsbeginn [g]	Versuchsende [g]
Kontrollgruppe		
1	290	318
2	324	366
3	250	260
4	230	241
5	250	276
6	239	255
Mittelwert	263,8	286
± SD	35,9	47,3
Verumgruppe		
1	310	334
2	276	296
3	230	241
4	228	242
5	240	256
6	230	246
Mittelwert	252,3	269,2
± SD	33,5	37,9

7.3 Chromatogramme



Chromatogramm 1: HPLC-Chromatogramm mit Auftrennung der extrahierten Mischung von Imipramin und seiner Metaboliten. 200 ng/Substanz werden als externer Standard gemischt und nach der in Punkt 2.7.1.1 beschriebenen Methode extrahiert. Je 85 µl der Probe wird im Probenblock aufgetragen und auf einer 25 cm C18-reversed phase HPLC-Säule unter den in Punkt 2.7.1.2 beschriebenen Bedingungen getrennt. Der Nachweis erfolgt im UV-Spektralphotometer bei 254 nm, wobei nach dem Ende der Messung das Chromatogramm mit den Retentionszeiten in Minuten sowie den Flächeninhalten der Peaks automatisch ausgedruckt werden.

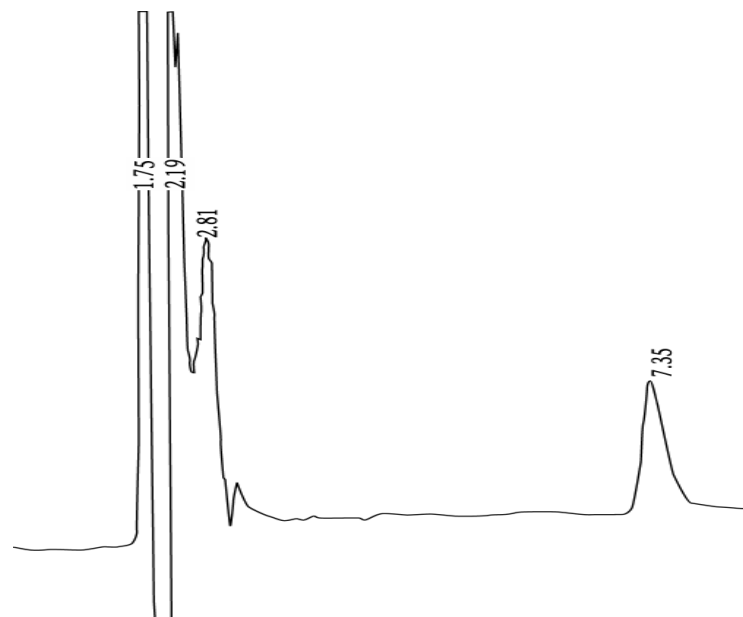
Die Peaks bis 2,83 min zeigen die Lösungsmittel beziehungsweise den Eluenten. Die Trennung von Imipramin, der Metaboliten und Doxepin erfolgt in der Reihenfolge: Doxepin (Interner Standard 7,39), Didesipramin (8,01), Desipramin (9,59), Imipramin (10,95); 10-OH-Desipramin (3,63) und 10-OH-Imipramin (3,41) konnten mit dieser Methode nicht quantitativ getrennt werden.



Chromatogramm 2: HPLC-Chromatogramm mit Analyse einer extrahierten Verum-Probe aus Versuch 3 (Bedingungen siehe Chromatogramm 1)

Als interner Standard wird Doxepin zugesetzt, das in einer Konzentration von 20 $\mu\text{l/ml}$ (50 $\text{ng}/\mu\text{l}$) in NaHCO_3 -Puffer, pH 10,5 gelöst ist (200 ng/Probe). Das Verhältnis zwischen dem eingesetzten internen Standard in μg pro Probe und der in der anschließenden HPLC Analyse gefundenen Menge in μg ergibt die Wiederfindungsrate und eliminiert rechnerisch die Extraktionsverluste.

Ausgewertet werden die Flächen von Doxepin (Retentionszeit 7,40 min), Imipramin (9,66) und Desipramin (10,02). Die Peaks bis 2,83 min zeigen die Lösungsmittel beziehungsweise den Eluenten.



Chromatogramm 3: HPLC-Chromatogramm einer Plasmaleerprobe versetzt mit dem internen Standard Doxepin (Bedingungen siehe Chromatogramm 1)

Der Zusatz von Doxepin (Elution bei 7,35 min) erfolgte wie bei Chromatogramm 2 beschrieben.

7.4 Danksagung

Gerne möchte ich an dieser Stelle dem em. Vorstand des Instituts, Herrn Professor Dr. W. Forth für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Vom ganzem Herzen möchte ich mich vor allem bei Herrn Professor Dr. Elmar Richter, meinem Betreuer bedanken. Immer und zu jeder Zeit stand er mir stets mit seinem Rat, seinem Wissen und seiner Tatkraft bereit.

Auch Herrn Dr. Kuss vom Institut für Neurochirurgie der Ludwig Maximilians-Universität möchte ich für seine Unterstützung ausdrücklich danken, ebenso wie den zahlreichen Mitarbeitern beider Institute, die mir bei der Durchführung meiner Arbeiten behilflich waren.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, denen ich hiermit meine Dissertation widmen möchte. Vielen Dank für Ihr Verständnis und für Ihre Liebe.

7.5 Lebenslauf

Jürgen Christian Auernhammer

4. Juli 1960: geboren in Coburg, als Sohn von Horst Auernhammer, Apotheker und Hannelore Auernhammer, geb. Raedlein, Einzelhandelskauffrau
- 1966-1970: Grundschule Sonnefeld / Bayern
- 1970-1980: Besuch des naturwissenschaftlich- mathematischen Gymnasium Ernestinum, Coburg / Bayern
- 1980-1981: Studium der Chemie, Diplom, an der Julius Maximilians-Universität Würzburg und der Friedrich Alexander-Universität Erlangen
- 1981-1986: Studium der Pharmazie an der Julius Maximilians-Universität Würzburg, Abschluß mit dem 3. Staatsexamen 1987 (Note 1,5)
- 1985-1986: Ausbildung zum Reform- Fachverkäufer und Reformhaus- Depositeur Neuforn Fachakademie Oberursel
- 1985-1987: Praktisches Jahr für Pharmazie, angestellter Apotheker Kloster Apotheke, Sonnefeld / Bayern
- 1986-1991: Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität München, 2. Staatsexamen Dez. 1991
- 1987-2002: Durchführung der Promotion am Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig Maximilians-Universität München, Betreuer Prof. Dr.vet. Elmar Richter
- 1992-1993: Praktisches Jahr für Humanmedizin Dermatologie, Universitätshautklinik der LMU München; Innere Medizin und Chirurgie, Klinikum Coburg, Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg
- Okt. 1994: 3. Staatsexamen Medizin in Würzburg (Note 2)
- Jun. 1998: Approbation als Arzt AIP in den Fachrichtungen Chirurgie und Allgemeinmedizin
- 1990-1995: Leitung der Apotheke im Reichsgraf, Coburg / Bayern
- 1996-2003: Leitung der Markt-Apotheke, Nossen / Sachsen
- 1998-2003: Aufbaustudium "Praktischen Betriebswirt der Pharmazie" Wirtschaftsakademie Deutsche Apotheker