

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren *in vitro* und *in vivo* mittels LC-MS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Phillip Krüger
aus Kiel

Frankfurt 2008

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe –
Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Professor Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Professor Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz

2. Gutachter: Professor Dr. Oliver Werz

eingereicht am: 29.08.2008

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.12.2008

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Allgemeine Einleitung zu Weihrauch	3
2.1.1	Einführung	3
2.1.2	Inhaltsstoffe des Weihrauchs	4
2.1.3	Pharmakologische Wirkmechanismen von Weihrauch und Boswelliasäuren	6
2.1.4	Klinische Studien zu Weihrauch	10
2.1.5	Bioverfügbarkeitsuntersuchungen mit Weihrauch	14
2.2	Allgemeine Einflussfaktoren auf die Bioverfügbarkeit	16
2.2.1	Einleitung	16
2.2.2	Löslichkeit von Arzneistoffen	17
2.2.3	Absorption und Permeation	17
2.2.4	Metabolismus	23
2.2.5	Interaktionsrelevante Transportsysteme in der Leber	23
2.3	LC-MS in der Bioanalytik	23
2.3.1	Einleitung	23
2.3.2	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	23
2.3.3	Massenspektrometrie	23
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Analytik	23
3.1.1	Referenzsubstanzen und hergestellte Lösungen	23
3.1.2	Analytische Methoden	23
3.1.3	Statistische und mathematische Methoden	23
3.2	Bioanalytische Untersuchungen zur Auswirkung der Löslichkeit von Weihrauchpräparaten auf die <i>in vivo</i>-Konzentrationen von KBA und AKBA	23
3.2.1	Substanzen und untersuchte Tiere	23
3.2.2	Humane Plasma- und Tumorproben	23
3.2.3	Bestimmung der Löslichkeit	23
3.2.4	Tierversuch	23
3.2.5	Probenaufarbeitung	23
3.3	Metabolismusuntersuchungen mit Lebermikrosomen	23
3.3.1	Substanzen und Lebermikrosomen	23
3.3.2	Quantitativer Assay mit RLM und HLM	23
3.3.3	Qualitativer Assay mit RLM	23
3.3.4	Festphasenextraktion und Analytik	23

3.4	Metabolismusuntersuchungen mit Hepatozyten	23
3.4.1	Substanzen und Pufferlösungen	23
3.4.2	Isolierung der Hepatozyten aus Rattenleber	23
3.4.3	Assay mit Rattenhepatozyten	23
3.4.4	Analytik	23
3.5	<i>In vivo</i>-Untersuchungen zum Metabolismus	23
3.5.1	Substanzen und untersuchte Tiere	23
3.5.2	Tierversuch	23
3.5.3	Probenaufarbeitung	23
3.6	Permeationsuntersuchungen mit Caco-2-Zellen	23
3.6.1	Substanzen und Pufferlösungen	23
3.6.2	Vorbereitung der Caco-2-Zellmonolayer	23
3.6.3	Durchführung der Permeationsuntersuchungen	23
3.7	Untersuchungen zur Interaktion von KBA und AKBA mit MRP2 und OATP1B3	23
3.7.1	Substanzen und Pufferlösungen	23
3.7.2	Untersuchung der Interaktion von KBA und AKBA mit MRP2	23
3.7.3	Untersuchung der Interaktion von KBA und AKBA mit OATP1B3	23
3.8	Chemikalien, Materialien und Laborgeräte	23
4	ERGEBNISSE	23
4.1	Auswirkung einer verbesserten Löslichkeit von Weihrauchpräparaten auf die <i>in vivo</i>-Konzentrationen von KBA und AKBA	23
4.1.1	KBA- und AKBA-Konzentrationen im Plasma und Hirn von Patienten mit Glioblastom	23
4.1.2	Löslichkeit von KBA und AKBA im Extrakt und in einer nanoskaligen <i>Boswellia serrata</i> Formulierung	23
4.1.3	Bioanalytik zur Bestimmung von KBA und AKBA in Rattenplasma, -hirn und -leber	23
4.1.4	Probenaufarbeitung	23
4.1.5	Validierung der analytischen Methode zur Bestimmung von KBA und AKBA aus Lebergewebe	23
4.1.6	Revalidierung der Methode zur Bestimmung von KBA und AKBA aus Plasma und Hirngewebe	23
4.1.7	Pharmakokinetische Studie mit Ratten	23
4.2	Metabolismusuntersuchungen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	23
4.2.1	Metabolische Stabilität von KBA und AKBA <i>in vitro</i>	23
4.2.2	Entwicklung einer massenspektrometrischen Methode zur Identifizierung von Metaboliten der Boswelliasäuren	23
4.2.3	Identifizierung der Metabolite von Boswelliasäuren <i>in vitro</i>	23
4.2.4	Identifizierung der Metabolite von Boswelliasäuren <i>in vivo</i>	23
4.2.5	Deacetylierung von AKBA zu KBA	23
4.3	Permeationsuntersuchungen <i>in vitro</i>	23

4.3.1	Transportversuche im Caco-2-Modell	23
4.4	Interaktionen von KBA und AKBA mit MRP2 und OATP1B3	23
4.4.1	Interaktionen von KBA und AKBA mit MRP2	23
4.4.2	Interaktionen von KBA und AKBA mit OATP1B3	23
5	DISKUSSION	23
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	128
7	LITERATURVERZEICHNIS	132
	DANKSAGUNG	143
	PUBLIKATIONEN	145
	LEBENS LAUF	146
	ANHANG	147

Abkürzungen

ABC	ATP (Adenosintriphosphat)-binding-cassette
A α BA	Acetyl- α -boswelliasäure
α Ba	α -Boswelliasäure
A β BA	Acetyl- β -boswelliasäure
β Ba	β -Boswelliasäure
AKBA	Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure
AMG	Arzneimittelgesetz
amu	Atomic mass unit (alter Begriff)
API	Atmospheric pressure ionisation
APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation
APPI	Atmospheric pressure photo ionisation
ASI	Asiatische Säure
AUC	Area under the curve
Å	Ångström
BGB	Bürgerliches Gesetzbuch
B.c.E.	<i>Boswellia carterii</i> Extrakt
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
B.s.E.	<i>Boswellia serrata</i> Extrakt
BSP	Bromosulfophthalein
Caco-2	Carcinoma coli-2
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CID	Collision induced dissociation
c _{max}	Größte Konzentration einer Konzentrations-Zeit-Messreihe
CMF	5-Chloromethylfluorescein
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein-diacetate
COX	Cyclooxygenase
cps	Counts per second
CV	Coefficient of variation
CYP	Cytochrom-P450
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMPK	Drug metabolism and pharmacokinetics
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMA	European Medicines Agency
EMS	Enhanced Q3 single mass spectrometry
EPI	Enhanced product ions
ESI	Electrospray ionisation
FDA	Food and Drug Administration
FT-ICR	Fourier-Transformations-Ionen-Cyclotron-Resonanz

FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GSMF	Glutathion-Methylfluorescein
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK	Human embryonic kidney (cells)
HLE	Humane Leukozytenelastase
HLM	Humanlebermikrosomen
HPLC	High performance liquid chromatography
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
IDA	Information dependent acquisition
IE	Internationale Einheit
IKK	I κ B α -Kinase-Komplex
i.p.	Intraperitoneal
IS	Interner Standard
KBA	11-Keto- β -boswelliasäure
KG	Körpergewicht
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LADME	Liberation, absorption, distribution, metabolism, excretion
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LD ₅₀	Median lethal dose
LIT	Linear ion trap
LLOQ	Lower limit of quantification (untere Quantifizierungsgrenze)
5-LO	5-Lipoxygenase
12-LO	12-Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MI	Multiple ion monitoring
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MRM	Multiple reaction monitoring
MRP	Multidrug resistance-related protein
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
NL	Neutral loss
NRS	NADPH-Regenerierungssystem
OATP	Organic anion transporting polypeptide
PAF	Platelet activating factor
PAMPA	Parallel artificial membrane permeability assay
<i>P</i> _{app}	Apparenter Permeationskoeffizient

PBCEC	Porcine brain capillary endothelial cells
Pgp	P-Glycoprotein
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
PIS	Product ion scan
PMNL	Polymorphe nukleare Leukozyten
PrecIS	Precursor ion scan
QC	Qualitätskontrollprobe
r	Regressionskoeffizient
RH	Rattenhepatozyten
RLM	Rattenlebermikrosomen
RP	Reversed phase
RT	Raumtemperatur
QqQ	Triple-Quadrupol
QTOF	Quadrupol-Time of flight
QTrap	Quadrupol-Linear ion trap
SD	Standard deviation
SEDDS	Self emulsifying drug delivery system
SIM	Selected ion monitoring
SULT	Sulfotransferase
TACE	TNF- α -converting enzyme
TEER	Transepithelial electrical resistance
THF	Tetrahydrofuran
t_{\max}	Zeit zum Erreichen der maximalen Konzentration in der Konzentrations-Zeit-Messreihe
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TOF	Time of flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Unified atomic mass unit
UDPGA	Uridin-5'-diphospho-Glucuronsäure
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
Upm	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units per millilitre
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLB	Vinblastin-resistente Lymphblastomzellen
ZL	Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker

1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Der Einsatz pflanzlicher Zubereitungen bei zahlreichen Beschwerden und Krankheiten ist seit vielen Jahrhunderten weit verbreitet. Der Glaube, dass pflanzliche Arzneimittel im Gegensatz zu synthetisch hergestellten Wirkstoffen sicherer sind, hat besonders in den letzten Jahren zu einer großen Beliebtheit von Phytopharmaka geführt.

Indischer Weihrauch (*Boswellia serrata*) ist ein traditionelles pflanzliches Arzneimittel, welches in der indischen ayurvedischen Medizin zur Behandlung diverser entzündlicher Erkrankungen angewendet wird. Es ist eines der wenigen traditionell angewandten pflanzlichen Arzneimittel, bei denen die für die pharmakologische Wirksamkeit verantwortlichen Inhaltsstoffe bekannt sind.

Es handelt sich dabei um lipophile pentazyklische Triterpensäuren, die Boswelliasäuren, deren antiinflammatorische Aktivität durch die Hemmung der 5-Lipoxygenase (5-LO), der humanen Leukozytenelastase und des NFκB-Signalwegs bedingt ist. Die beiden ketylierten Boswelliasäuren Acetyl-11-keto-β-Boswelliasäure (AKBA) und 11-Keto-β-Boswelliasäure (KBA) zeigen *in vitro* die stärkste Hemmung der 5-LO mit IC₅₀-Werten von 1,5 μM und 2,8 μM. Darüber hinaus konnte bei Boswelliasäuren eine antitumorale Wirkung durch Induktion von Apoptose und Hemmung der Topoisomerase nachgewiesen werden.

Die Wirksamkeit von Weihrauchpräparaten war in diversen klinischen Studien mit Morbus Crohn- und Colitis Ulcerosa-Patienten mit der von Sulfasalazin und Mesalazin vergleichbar. Im Rahmen einer Nutzen-Risiko-Analyse war der Weihrauchextrakt der Standardmedikation sogar überlegen. Auch erste klinische Studien bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Asthma bronchiale zeigten vielversprechende Ergebnisse.

Mit der Verleihung des Orphan Drug Status für die Behandlung des peritumoralen Hirnödems durch die EMEA 2002 nahm die Bedeutung des *Boswellia serrata* Extrakts enorm zu.

Einige pharmakokinetische Studien mit Weihrauchpräparaten wurden im Vorfeld bereits durchgeführt. Hierbei wurden selbst nach einer einmaligen oralen Einnahme von relativ hohen Dosierungen nur geringe Plasmakonzentrationen an KBA bestimmt. Diese betragen nach der Einnahme von 1600 mg *Boswellia serrata* Extrakt 1,6 μM. Auch im Steady-state wurden geringe Plasmakonzentrationen von 0,3 μM KBA und 0,1 μM AKBA nach der Einnahme von *Boswellia serrata* Extrakt detektiert.

In Ratten, welche 240 mg *Boswellia serrata* Extrakt pro kg Körpergewicht erhielten, wurden Plasmaspiegel von nur 0,4 μM KBA und 0,2 μM AKBA gemessen. Im Hirn der Ratten wurden 99 ng KBA und 95 ng AKBA pro g Hirn detektiert.

In allen pharmakokinetischen Untersuchungen wurden im Vergleich zu den *in vitro* bestimmten wirksamen Konzentrationen viel geringere Plasmaspiegel nachgewiesen.

Kenntnisse über die Faktoren, die die Bioverfügbarkeit beeinflussen, können erheblich dazu beitragen pharmazeutische Formulierungen zu verbessern. So wird die Bioverfügbarkeit im Wesentlichen von drei Faktoren beeinflusst: Löslichkeit, Metabolismus und Permeabilität. Ziel der Arbeit war es daher, den Einfluss der einzelnen Faktoren auf die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren zu untersuchen.

Vor diesem Hintergrund widmet sich der erste Teil der Arbeit der Auswirkung einer verbesserten Löslichkeit von Boswelliaextrakt auf die Plasma-, Leber- und Hirnkonzentration von KBA und AKBA. Hierzu soll eine bestehende analytische Methode, die es ermöglicht sehr geringe Mengen von KBA und AKBA in relevanten Biomatrices zu quantifizieren, optimiert werden.

Im Fokus des zweiten Teils der Arbeit stehen Untersuchungen zur metabolischen Stabilität von KBA und AKBA in Rattenlebermikrosomen (RLM), Humanlebermikrosomen (HLM) und Rattenhepatozyten (RH) sowie die Identifizierung der Metabolite von Boswelliasäuren in RLM, RH und in Rattenplasma, -leber und -hirn. Hierfür muss eine analytische Methode entwickelt werden, die es erlaubt Boswelliasäuren und deren Metabolite in verschiedenen Biomatrices zu identifizieren und zu verifizieren. Des Weiteren soll überprüft werden, ob die niedrigen Plasmaspiegel von AKBA aus einer Deacetylierung zu KBA resultieren.

Im dritten Teil steht der Einfluss der Permeabilität auf die Bioverfügbarkeit von KBA und AKBA im Mittelpunkt der Untersuchungen. Durch den Einsatz des gut charakterisierten Caco-2-Zellmodells soll die *in vivo*-Absorption der beiden Boswelliasäuren abgeschätzt werden. Es soll weiterhin geklärt werden, ob es sich bei KBA und AKBA um Pgp-Substrate handelt. Von Interesse ist außerdem, ob KBA und AKBA in einer nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung besser durch Caco-2-Zellmonolayer permeieren.

Darüber hinaus soll im Rahmen zweier zusätzlicher Interaktionsstudien untersucht werden, ob KBA und AKBA mit dem membranständigen Multidrug Resistance-related Protein 2 (MRP2) und dem Organic Anion Transporting Polypeptid 1B3 (OATP1B3) interagieren und somit Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen zu erwarten sind.

2 Einleitung

2.1 Allgemeine Einleitung zu Weihrauch

2.1.1 Einführung

Weihrauch spielte bereits im Altertum eine wichtige Rolle bei der Götterverehrung sowie als Räuchermittel für kirchliche und meditative Zwecke. In Ägypten galt der Weihrauch nicht nur als Zeichen für die Offenbarung einer Gottheit sondern auch als deren Verkörperung. Dies zeigt sich auch in der ägyptischen Bezeichnung, die mit „Gottesduft“ oder auch „der Stoff, der göttlich macht“ übersetzt wird¹.

Weihrauch hatte jedoch nicht nur sakrale Bedeutung. Er war schon vor Jahrhunderten wegen seiner positiven Effekte bei der Behandlung von diversen entzündlichen Erkrankungen bekannt².

Neben dem arabischen wurde auch der indische Weihrauch bereits sehr früh erwähnt. In der traditionellen indischen Medizin (Ayurveda) hatte Weihrauch, als Pulver oder Salbe zubereitet, bei der Behandlung von Wunden und Geschwüren eine große Bedeutung³. Des Weiteren wurde indischer Weihrauch bei Erkrankungen des Nervensystems, des Gastrointestinaltrakts, der Atemwege, der Haut sowie in der Frauenheilkunde eingesetzt⁴.

Auch heute erfreuen sich Extrakte des indischen Weihrauchs (*Boswellia serrata*) noch großer Beliebtheit bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen wie Arthritis, rheumatischen Beschwerden oder Gicht.

In Europa wurde man ebenfalls auf diese Arzneipflanze aufmerksam und begann in den späten 80er Jahren mit der Erforschung der Wirkungsmechanismen von indischem Weihrauch. Damals galt die von Ammon *et al.* gezeigte Leukotriensynthese-Hemmung durch *Boswellia serrata* Extrakt als bis dahin wichtigster Wirkungsmechanismus⁵. Heute werden allerdings mehrere Mechanismen diskutiert.

Bereits im Ergänzungsbuch zum Deutschen Arzneibuch 6 (DAB 6, 1953) wurde Weihrauchharz der Stammpflanze *Boswellia carterii* Birdwood monographiert. Die pharmazeutische Qualität der Droge wurde aber erst 2005 durch die Aufnahme der Monographie „Indischer Weihrauch“ in den Deutschen Arzneimittel-Codex (DAC) für Deutschland und ab September 2006 durch die Aufnahme der Monographie „Indian Frankincense“ in das Europäische Arzneibuch 5, Ergänzungsband 7 (Ph. Eur. 5.7) für Europa definiert.

Für Phytopharmaka gelten nach dem Arzneimittelgesetz dieselben Anforderungen bezüglich Wirksamkeit, Unbedenklichkeit und pharmazeutischer Qualität (AMG, §1) wie für synthetische Arzneimittel.

Die bisher durchgeführten klinischen Studien konnten zwar zum Teil erfolgreich die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von Weihrauch zeigen, die Anforderungen, die das

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) als Zulassungsbehörde heute an klinische Studien stellt, erfüllten sie jedoch nicht.

Obwohl Weihrauchpräparate als Nahrungsergänzungsmittel in beachtlicher Menge vertrieben werden, kam es bisher in Deutschland aus Mangel an „validen“ klinischen Studien nicht zu einer Zulassung als Arzneimittel. Lediglich in Indien und in einem Kanton der Schweiz sind Tabletten aus *Boswellia serrata* Extrakt unter den Handelsnamen Sallaki™, bzw. H15™-Ayurmedica für die Behandlung chronischer Polyarthritiden zugelassen⁶. Es ist jedoch möglich, dieses Präparat über einen Einzelimport nach § 73 (3) des Arzneimittelgesetzes (AMG) als Arzneimittel in geringen Mengen nach Deutschland einzuführen.

Neben Studien zur Anwendung von indischem Weihrauch bei entzündlichen Erkrankungen wurden Untersuchungen zur Wirksamkeit bei peritumoralen Hirnödemen durchgeführt. In präklinischen Studien zeigte sich eine signifikante Reduktion des Ödemvolumens und im Tierversuch wurde bei Gliom-implantierten Ratten eine Reduktion des Tumolvolumens festgestellt^{7,8}. Die Bedeutung von *Boswellia serrata* Extrakt als pflanzliches Heilmittel wurde im Dezember 2002 besonders hervorgehoben, als sich die Europäische Zulassungsbehörde („European Medicines Agency“, EMA) aufgrund dieser Erkenntnisse veranlasst sah, *Boswellia serrata* Extrakt den Orphan Drug Status für die Behandlung des peritumoralen Hirnödems zu verleihen⁹.

2.1.2 Inhaltsstoffe des Weihrauchs

Der Weihrauchbaum gehört zu der Familie der Balsamgewächse (Burseraceae). Die Stammpflanze des indischen Weihrauchs ist *Boswellia serrata*, welche primär in Indien verbreitet ist. Somalia, Eritrea und Äthiopien beheimaten den afrikanischen Weihrauch mit den Stammpflanzen *Boswellia carterii* und *Boswellia frereana*. Der arabische Weihrauchbaum *Boswellia sacra* kommt hauptsächlich in Südarabien vor².

Durch Einschneiden der Rinde von Stamm und kräftigen Ästen dieser Weihrauchbäume tritt ein Milchsaft hervor, welcher an der Luft zu einem Gummiharz erhärtet. Es wird zwischen dem arabischen Harz (Olibanum) und dem indischen Harz (Salai-Guggal) unterschieden. Das Harz ist ein hochkomplexes Gemisch aus ätherischem Öl (5-9 %), Harzsäuren (15-16 %), etherunlöslichen (25-30 %) und etherlöslichen (45-55 %) Bestandteilen. In dem ätherischen Öl wurden zahlreiche Verbindungen, zum Beispiel mehrere Mono-, Di- und Sesquiterpene identifiziert. Die etherunlösliche Fraktion enthält neutrale und saure Polysaccharide, in der etherlöslichen Fraktion konnten höhere Terpene identifiziert werden. Zu diesen Substanzen zählen auch die pentazyklischen Triterpensäuren, die Boswelliasäuren, welche 50 % der etherlöslichen Fraktion ausmachen und von denen bisher 14 genuin vorkommende identifiziert wurden¹⁰. Abb. 2.1 zeigt die Strukturformeln der wichtigsten Boswelliasäuren, welche sich in den Ursan-Typ (β -Boswelliasäuren) und den Oleanan-Typ (α -Boswelliasäuren) unterteilen lassen.

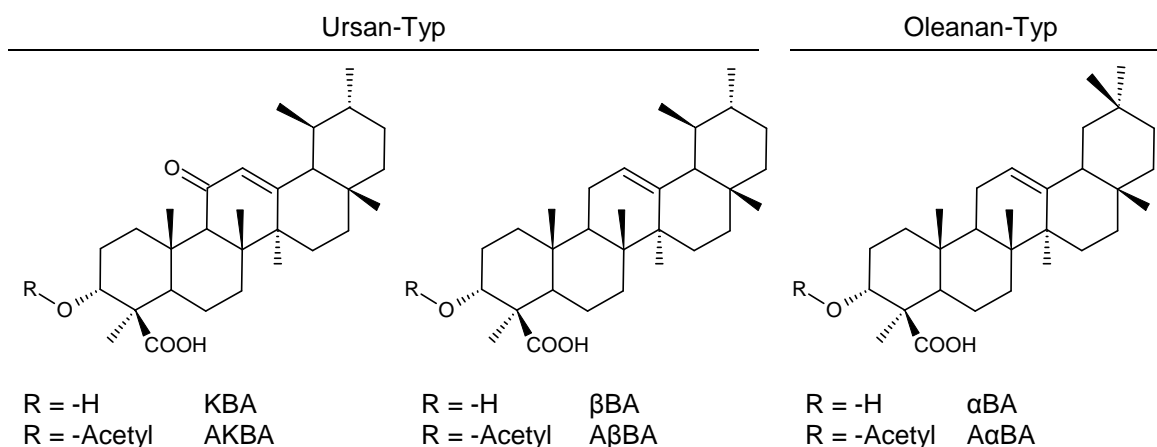


Abb. 2.1: Strukturformeln der Boswelliasäuren

11-Keto-β-boswelliasäure (KBA) und 3-Acetyl-11-keto-β-boswelliasäure (AKBA) gelten als die wirksamkeitsbestimmenden Substanzen des Weihrauchs. Daher fordern die aktuellen Monographien des DAC und des Ph. Eur. 5.7 für diese beiden Substanzen einen Mindestgehalt von 1,0 %.

Die Zusammensetzung der Boswelliasäuren in verschiedenen Weihrauchpräparaten variiert stark und kann natürlichen Schwankungen unterliegen. Wesentliche Unterscheidungsmerkmale von afrikanischem und indischem Weihrauchextrakt sind jedoch die Konzentrationen von KBA und AKBA. Simmet *et al.* wiesen in indischen Weihrauchextrakten 3,0 % KBA und 2,2 % AKBA¹, bzw. 4,7 % KBA und 2,9 % AKBA² nach. Ein afrikanischer Weihrauchextrakt enthielt 0,5 % KBA und 3,3 % AKBA^{3 11}.

¹ Mittelwert aus 5 Chargen indischen Weihrauchextrakts (H15™-Ayurmedica, Pöcking)

² Mittelwert aus 4 Chargen indischen Weihrauchextrakts (Dr. Eichele, Koblenz)

³ Mittelwert aus 2 Chargen afrikanischen Weihrauchextrakts (Dr. Fernando, Kraichtal-Gochsheim)

2.1.3 Pharmakologische Wirkmechanismen von Weihrauch und Boswelliasäuren

2.1.3.1 Antiinflammatorische Wirkung

Obwohl Weihrauch bereits früh zur Behandlung diverser entzündlicher Erkrankungen eingesetzt wurde, stellten die 1986 von Singh und Atal publizierte Untersuchungen mit indischem Weihrauchextrakt die ersten pharmakologischen Ansätze zu einer wissenschaftlichen Analyse der Wirkung von Weihrauchextrakten dar. Es wurden antiödematöse und antiarthritische Wirkungen im Tiermodell gezeigt. Analgetische, antipyretische und diuretische Eigenschaften konnten nicht festgestellt werden, weshalb ein Kortison- oder Prostaglandin-abhängiger Wirkmechanismus zunächst ausgeschlossen wurde^{10,12}.

Einige Jahre später waren es dann Ammon *et al.*, die die Arachidonsäurekaskade als Angriffspunkt für den Weihrauchextrakt wieder ins Spiel brachten. Sie stellten fest, dass ein *Boswellia serrata* Extrakt die von der 5-Lipoxygenase (5-LO) katalysierte Bildung von Leukotrien B₄ in polymorphen nuklearen Leukozyten (PMNL) hemmt⁵. In darauf folgenden Untersuchungen mit isolierten Boswelliasäuren konnten diese als wirksame Inhaltsstoffe des Extrakts identifiziert werden, wobei sich die Keto-Boswelliasäuren KBA mit IC₅₀-Werten von 2,8 bis 15 µM und AKBA mit IC₅₀-Werten von 1,5 bis 8 µM je nach experimenteller Anordnung als die potentesten erwiesen¹³⁻¹⁵. Die Boswelliasäuren wurden dementsprechend als spezifische, nicht redoxaktive, direkte Hemmsubstanzen der 5-LO eingeordnet¹³. Durch den Einsatz von Photoaffinitätslabeling wurde dann eine Calcium-regulierte allosterische Bindungsstelle an der 5-LO für AKBA gefunden¹⁶. Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen mit Boswelliasäuren und strukturverwandten pentazyklischen Triterpenen ergaben, dass ein Substrat für diese Bindungsstelle ein 5-Ring-System, eine Ketofunktion am C-11-Atom und eine hydrophile Gruppe am C-4-Atom aufweisen muss¹⁵. Zur Hemmung der 5-LO werden in Zellhomogenaten höhere Konzentrationen benötigt als in intakten Zellen. Diese Tatsache spricht dafür, dass neben der direkten Hemmung weitere Mechanismen bei der Inhibition des Enzyms involviert sind (Tab. 2.1). Die Ergebnisse der darauf folgenden Untersuchungen zu zellulären antiinflammatorischen Signalwegen deuteten eher auf eine proinflammatorische Wirkung der Boswelliasäuren, besonders der β-Boswelliasäuren, hin. Ebenso stimulierten die Keto-β-boswelliasäuren mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) bei einer Konzentration von 30 µM und mobilisierten intrazelluläres Ca²⁺ in einer Konzentration von 10 µM in humanen PMNL. In Thrombozyten zeigte β-Boswelliasäure dieselbe Wirkung in einer Konzentration von 10 µM^{17,18}. In humanen Monozyten (Mono Mac 6) wiederum erwies sich AKBA als Hemmstoff proinflammatorischer Stimuli. Die Mobilisierung intrazellulären Calciums wurde von AKBA konzentrationsabhängig von 1-30 µM inhibiert und die Aktivierung der MAPK gehemmt¹⁹.

Außerdem wurden bei den Boswelliasäuren Interaktionen mit der 12-Lipoxygenase (12-LO) in Thrombozyten nachgewiesen²⁰.

Die genannten Studien zeigen, dass es bisher noch nicht gelungen ist, den genauen Mechanismus der zellulären 5-LO-Inhibition durch Boswelliasäuren aufzuklären.

Tab. 2.1: IC_{50} -Werte zur Hemmung der 5-LO durch AKBA in Abhängigkeit des experimentellen Aufbaus²¹

IC_{50} (μ M)	Modell
1,5	Intakte PMNL
8	PMNL Zellhomogenat
16	Isolierte humane 5-LO
50	Cytosolische Fraktion von HL-60 und Mono Mac 6 Zellen

Neben der 5-LO-Signalkaskade wird der NF κ B-Signalweg als Angriffspunkt für die antientzündliche Wirkung von Boswelliasäuren diskutiert. NF κ B spielt beim Entstehen und Fortschreiten von chronisch-entzündlichen Erkrankungen eine entscheidende Rolle, weil hierdurch diverse an Entzündungsprozessen beteiligte Gene reguliert werden²². Acetyl- α -Boswelliasäure (A α BA) und AKBA hemmen in humanen Monozyten die LPS-induzierte Expression von TNF- α durch direkte Inhibition des I κ B α -Kinase-Komplexes (IKK) bei Konzentrationen von 10 μ M (A α BA) bzw. 3 μ M (AKBA)²³, wodurch eine Aktivierung von NF κ B nicht mehr möglich ist.

In einer weiteren Arbeit wurde der Einfluss eines *Boswellia serrata* Extrakts auf die Expression von TNF- α abhängigen Genen in humanen microvasculären Endothelzellen untersucht. Mittels eines Genom-Screens konnte gezeigt werden, dass dieser Extrakt TNF- α induzierte Signalwege, welche zu Entzündungen und Apoptose führen können, beeinflusst. Der *Boswellia serrata* Extrakt unterdrückte die TNF- α induzierte Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1, welche an Entzündungsprozessen beteiligt sind²⁴.

Auch die humane Leukozytenelastase (HLE), die bei inflammatorischen Vorgängen vermehrt freigesetzt wird und zum Abbau des Strukturproteins Elastin führt, wurde als Angriffspunkt für Boswelliasäuren diskutiert. So hemmen Boswelliasäuren die aufgereinigte HLE, wobei AKBA mit einem IC_{50} -Wert von 15 μ M am potentesten war²⁵.

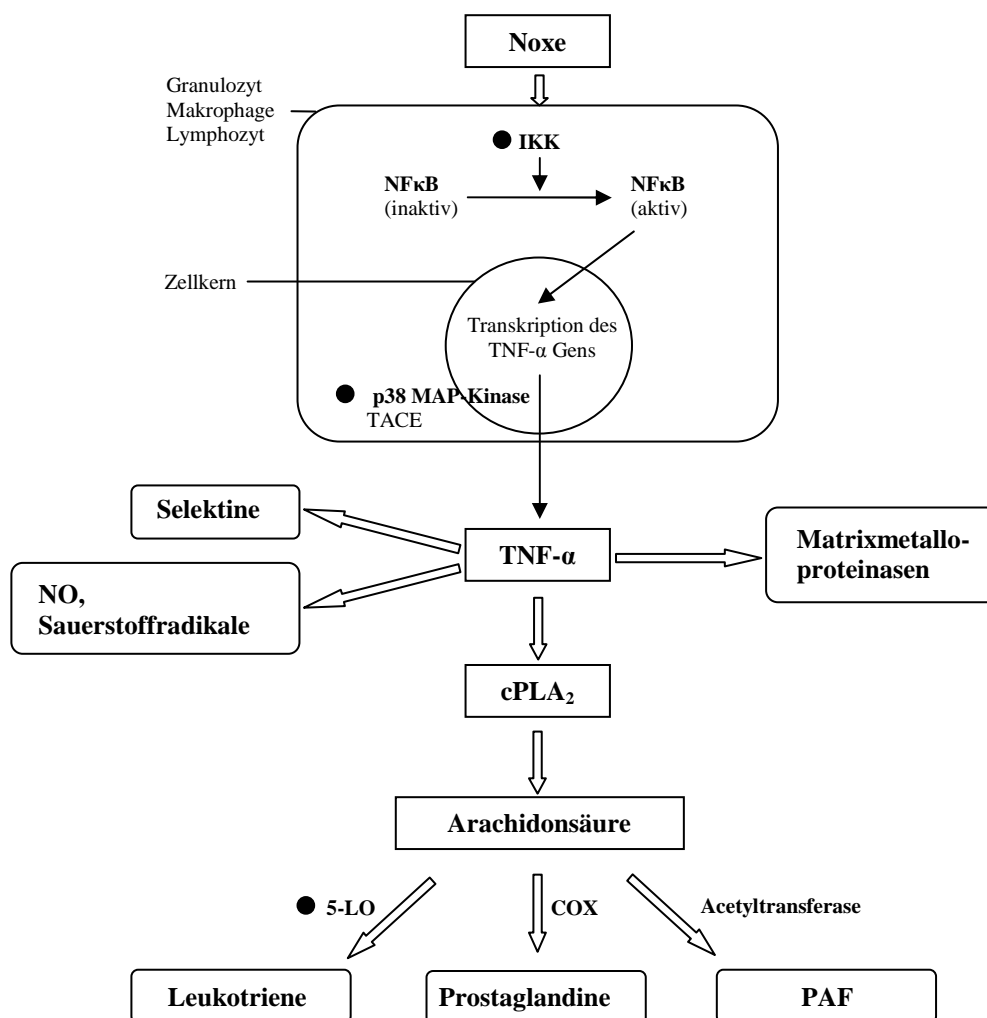


Abb. 2.2: Vereinfachte schematische Darstellung der Entzündungskaskade. NFκB liegt im Zytoplasma durch Bindung an ein Inhibitorprotein in inaktiver Form vor. Durch einen Reiz (Noxe) wird IKK phosphoryliert und sorgt durch Degradierung des Inhibitorproteins für die Aktivierung von NFκB, welches im Zellkern u.a. für die Transkription des TNF-α-Gens verantwortlich ist. Die p38 MAP-Kinase translatiert die TNF-α-mRNA in das ProTNF-α-Protein. Das TNF-α-Converting Enzyme (TACE) spaltet von diesem eine Proteinuntereinheit ab, wodurch dann TNF-α aus der Zelle sezerniert werden kann. Durch TNF-α kommt es zur Expression von membrangebundenen Glycoproteinen (Selektinen), Freisetzung von Sauerstoffradikalen und NO sowie zur Bildung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs). TNF-α aktiviert außerdem die cytosolische Phospholipase A₂, welche dann die Arachidonsäure aus Membranphospholipiden freisetzt. Aus der Arachidonsäure werden in Abhängigkeit von der Enzymsausstattung der jeweiligen Zelle Leukotriene (durch 5-Lipoxygenase, 5-LO), Prostaglandine (durch Cyclooxygenasen, COX) oder der Plättchen-Aktivierende Faktor (PAF, durch eine Acetyltransferase) gebildet. Mögliche Eingriffsorte von Weihrauchzubereitungen sind gekennzeichnet (•).

2.1.3.2 Antitumorale Wirkung

Jing *et al.* zeigten 1992 erstmals, dass ein von *Boswellia carterii* isoliertes Gemisch aus gleichen Teilen A α BA und A β BA (BC-4) humane Leukämiezellen (HL-60) im Wachstum hemmen kann²⁶. Auch einzelnen Boswelliasäuren wurden antiproliferative Effekte in HL-60 Zellen nachgewiesen (IC₅₀: 0,6 bis 7,1 μ M), wobei AKBA die stärkste Inhibition auf das Zellwachstum zeigte²⁷⁻²⁹.

Daraufhin wurde der Einfluss von Boswelliasäuren auf Zelldifferenzierung und -tod untersucht. Boswelliasäuren induzieren die Apoptose in humanen Gliomzelllinien (LN-18, LN-229, LN-308, T98G)³⁰, humanen Leukämiezellen (HL-60, K 562, U937, MOLT-4, THP-1, CCRF-CRM, NB4, SKNO-1, ML-1)^{27,31-33}, humanen Hepatomzellen (HepG2)³⁴, Kolonkarzinomzellen (HT-29)^{35,36}, Prostatakarzinomzellen (PC-3)³⁷ und humanen Fibrosarkomzellen (HT-1080)³⁸. Für die antitumorale Wirkung von Boswelliasäuren scheinen aber höhere Konzentrationen notwendig zu sein als für die antiinflammatorische Wirkung. So zeigten isolierte Boswelliasäuren erst bei Konzentrationen von 10-40 μ M apoptotische Effekte, wobei sich AKBA als die am stärksten wirksame Boswelliasäure erwies. Eine Studie mit *Boswellia serrata* Gummiharz zeigte jedoch, dass dieser wiederum potenter als isolierte Boswelliasäuren war³¹.

Untersuchungen ergaben, dass die durch Boswelliasäuren induzierte Apoptose über die Aktivierung des Caspase-8 Weges vermittelt wird³³⁻³⁵. Eine weitere Arbeit beschrieb die direkte Hemmung von IKK durch Boswelliasäuren, wodurch die Bildung des antiapoptotischen Transkriptionsfaktors NF κ B unterdrückt wird³⁷.

Im Gegensatz zu Corticosteroiden, welche in Verdacht stehen die Wirksamkeit von Chemotherapeutika negativ zu beeinflussen³⁹, konnten Glaser *et al.* zeigen, dass deren zytostatische Wirkung von Boswelliasäuren nicht beeinträchtigt wird³⁰. Für die begleitende Therapie maligner Gliome mit Weihrauchpräparaten kann das von Vorteil sein.

Es wird angenommen, dass Apoptose durch die Inhibition der Topoisomerase ausgelöst werden kann⁴⁰. AKBA inhibierte die Topoisomerase-I aus Kalbsthymus und BC-4 zeigte inhibierende Aktivität bei aus Mäusen isolierter Topoisomerase-II^{27,38}. Diversen pentazyklischen Triterpenen konnte eine direkte Bindung an die Topoisomerase-I und -IIa nachgewiesen werden. Die acetylierten Boswelliasäuren zeigten sich dabei am potentesten mit IC₅₀-Werten von 30-50 μ M für AKBA und 13-30 μ M für A β BA. A α BA war mit IC₅₀-Werten von 1-3 μ M die am stärksten wirksame Substanz^{21,41}. Ob die Topoisomerase-Inhibition durch Boswelliasäuren bei der Apoptose physiologisch relevant ist, muss jedoch noch *in vivo* nachgewiesen werden.

2.1.4 Klinische Studien zu Weihrauch

2.1.4.1 Chronisch-entzündliche Erkrankungen

Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthritits) gehört zu den häufigsten entzündlichen Erkrankungen der Gelenke. Betroffen sind insbesondere Hand-, Finger-, Fuß-, Zeh-, Knie-, Schulter- und Hüftgelenke. In Deutschland wird die Zahl der Erkrankungen auf 800.000 geschätzt, wobei Frauen etwa dreimal häufiger betroffen sind als Männer. Die Krankheit wird den Autoimmunkrankheiten zugeordnet, obwohl die Ursache bislang ungeklärt ist. Neben der Rheuma-Chirurgie, welche die schwersten Gelenkveränderungen operativ behandelt, stellt die medikamentöse Behandlung den wichtigsten Teil der Therapie dar. Methotrexat gilt als Standardmedikament und wird alleine oder in Kombination mit Sulfasalazin oder Leflunomid eingesetzt. Neuere Therapeutika sind die Biologika Infliximab, Adalimumab, Etanercept und Anakinra, die proinflammatorische Zytokine blockieren sollen. Der monoklonale Antikörper Rituximab ist ein weiterer gegen B-Zellen gerichteter Therapieansatz. Bei akuten Schüben werden zusätzlich nicht-steroidale Antirheumatika und Glukokortikoide eingesetzt⁴².

Von 1985 bis 1990 wurden mehrere klinische Studien unterschiedlichen Designs mit 375 Patienten an 11 Zentren in Indien und Deutschland durchgeführt, um die Wirksamkeit eines *Boswellia serrata* Extrakts (H15⁴) bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis zu untersuchen. Es konnte eine signifikante Abnahme ($p < 0,05$) der Gelenkschwellung und der Schmerzen gegenüber einem Placebo gezeigt werden, akute Schmerzen konnten jedoch nicht erfolgreich behandelt werden⁴³.

Keine signifikante Verbesserung klinisch relevanter Parameter zeigte eine multizentrische, kontrollierte Studie mit 37 Patienten mit chronischer Polyarthritits, die hohe Dosen *Boswellia serrata* Extrakt (H15) erhielten⁴⁴.

An 30 Patienten mit Osteoarthritis in den Knien wurde die Wirksamkeit eines *Boswellia serrata* Extrakts (Wokvel^{TM5}) in einer randomisierten, doppelt verblindeten, kontrollierten Crossoverstudie gegen ein Placebo überprüft. Die im Jahre 2003 veröffentlichten Ergebnisse zeigten eine signifikante ($p < 0,001$) Verbesserung der Schmerzen, einen Rückgang der Schwellung sowie eine Verbesserung der Beweglichkeit des Gelenks. Radiologisch konnten jedoch keine Veränderungen festgestellt werden⁴⁵.

⁴ 1 Tablette enthält 400 mg *Boswellia serrata* Extrakt

⁵ 1 Kapsel enthält 333 mg *Boswellia serrata* Extrakt

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

In den letzten 20 Jahren hat die Prävalenz der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) in Deutschland stetig zugenommen. Die Zahl der Erkrankungen liegt in Deutschland bei mehr als 300.000⁴⁶. Unter CED versteht man rezidivierende oder kontinuierlich entzündliche Erkrankungen des Darms, deren bekannteste Vertreter Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa sind. Anders als bei Morbus Crohn, wo alle Abschnitte des Gastrointestinaltrakts betroffen sein können, ist die Entzündung bei der Colitis Ulcerosa auf die Darmschleimhaut beschränkt. Sie breitet sich kontinuierlich aus, wogegen Morbus Crohn diskontinuierlich und segmental auftritt. Die Ursache der Erkrankung ist weitgehend unbekannt. Ähnlich wie bei Morbus Crohn nimmt man bei der Colitis Ulcerosa eine krankhaft gesteigerte Immunreaktion gegen die Darmflora an.

Bei der medikamentösen Therapie werden vor allem die 5-Aminosalicylsäure-Verbindungen Mesalazin und Sulfasalazin, welche die Produktion proinflammatorischer Prostaglandine und Leukotriene zu hemmen scheinen, eingesetzt. Als Zusatztherapie werden Glukokortikoide verwendet. Auch die Immunsuppressiva Azathioprin und 6-Mercaptopurin kommen häufig zum Einsatz. Neuere Studien belegen auch die Wirksamkeit der TNF- α -Inhibitoren Infliximab und Adalimumab, die mit einem Immunsuppressivum kombiniert werden. Bei den genannten Therapeutika treten häufig unerwünschte Arzneimittelwirkungen auf. Der Einsatz komplementärer Therapeutika wie Weihrauch ist daher sehr gefragt⁴⁶.

Von 1995 bis 1996 wurde in Indien eine offene, verumkontrollierte Studie mit 42 Patienten mit Colitis Ulcerosa durchgeführt. Eine Gruppe von 34 Patienten erhielt dreimal täglich 350 mg *Boswellia serrata* Extrakt. Die Kontrollgruppe wurde mit dreimal täglich 1 g Sulfasalazin behandelt. Auch wenn in dieser Studie die Überlegenheit von *Boswellia serrata* Extrakt gegenüber Sulfasalazin statistisch nicht belegt werden konnte, so zeigte sich doch, dass Weihrauch eine vergleichbare Wirksamkeit aufweist. Bei über 80 % der mit Weihrauch behandelten Patienten zeigte sich ein Rückgang der klinischen Symptome⁴⁷.

In einer ähnlich ausgelegten, offenen, nicht randomisierten Studie wurde die Wirksamkeit von Weihrauch bei chronischer Colitis untersucht. Von den 20 Patienten, die dreimal täglich 300 mg *Boswellia serrata* Extrakt erhielten, trat bei 18 Patienten eine Verbesserung der klinischen Symptome auf. Bei 6 von 10 Patienten der Verumgruppe (dreimal täglich 1 g Sulfasalazin) konnten ähnliche Verbesserungen beobachtet werden⁴⁸.

In einer randomisierten, doppelt-verblindeten, verumkontrollierten Studie mit 102 Morbus Crohn Patienten konnte unter Good Clinical Practice Bedingungen gezeigt werden, dass *Boswellia serrata* Extrakt der Standardtherapie (Mesalazin) nicht unterlegen ist. Im Rahmen der Nutzen-Risiko-Bewertung war der Weihrauchextrakt aufgrund seiner besseren Verträglichkeit Mesalazin sogar überlegen⁴⁹.

Weiterhin zeigte sich *Boswellia serrata* Extrakt, der über 6 Wochen dreimal täglich zu 400 mg eingenommen wurde, in einer placebokontrollierten Studie mit 26 Patienten mit

kollagener Colitis als klinisch effektiv. Bei über 60 % trat eine Verbesserung der klinischen Symptome ein⁵⁰.

Asthma bronchiale

In Deutschland sind etwa 5 % der Erwachsenen und bis zu 10 % der Kinder von Asthma bronchiale, einer Verengung und chronischen Entzündung der Atemwege, betroffen. Zur Therapie werden bisher hauptsächlich β_2 -Sympathomimetika als Bronchodilatoren und Glukokortikoide als Antiphlogistika eingesetzt. Weitere Ansätze sind die Hemmung der Cysteinyl-Leukotrien-Rezeptoren durch Montelukast oder die spezifische Inhibition der 5-LO durch Zileuton.

Da auch Boswelliasäuren durch die Hemmung der 5-LO in die Entzündungskaskade eingreifen, wurde deren Wirksamkeit in einer doppelt-verblindeten, placebo-kontrollierten Studie überprüft. Eine Gruppe von 40 Patienten erhielt über 6 Wochen dreimal täglich 300 mg *Boswellia serrata* Extrakt. Weitere 40 Patienten erhielten ein Placebo. Die Verumgruppe zeigte ein gegenüber einem Placebo signifikant erhöhtes, forciertes expiratorisches Volumen und verbesserte Peak-flow-Raten. Ebenso war die Anzahl der akuten Asthma-Anfälle erniedrigt⁵¹.

2.1.4.2 Glioblastom und peritumorales Hirnödem

In Deutschland erkranken jedes Jahr 4000-5000 Menschen an einem Glioblastoma multiforme, welches fast 30 % der hirneigenen Tumore ausmacht⁵². Hirntumore und die sie häufig begleitenden perifokalen Ödeme führen durch ihren schnell steigenden Platzbedarf zu erhöhtem intrakraniellen Druck und zu zahlreichen neurologischen Störungen. Trotz chirurgischer Eingriffe, Strahlen- und Chemotherapie, liegt die Überlebenszeit beim Glioblastoma multiforme bei nur etwa einem Jahr^{7,53}.

Diverse Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* zeigten eine Korrelation zwischen der erhöhten Leukotriensynthese im Tumorgewebe von Glioblastom-Patienten und der Ausdehnung des Hirnödems⁵⁴⁻⁵⁶. Daraufhin wurde geprüft, ob *Boswellia serrata* Extrakt (H15TM-Ayurmedica), welcher die 5-LO hemmt, bei der Behandlung von Glioblastom-Patienten wirksam ist und in der palliativen Krebstherapie eingesetzt werden kann. Bisher werden hauptsächlich Glukokortikoide zur medikamentösen Behandlung des peritumoralen Hirnödems eingesetzt. Diese weisen jedoch ein hohes Nebenwirkungspotential auf und stehen im Verdacht, mit Chemotherapeutika zu interferieren³⁹.

Eine prospektive, kontrollierte Studie an 29 Patienten mit malignen Gliomen untersuchte die Wirkung eines *Boswellia serrata* Extrakts (H15TM-Ayurmedica) auf das perifokale Ödem. In der Gruppe, die dreimal täglich 1200 mg H15TM-Ayurmedica über 7 Tage erhielt, kam es zu einer signifikanten Reduktion des Ödemvolumens und zu einer Verbesserung der klinischen Symptome. Ein antiproliferativer Effekt konnte jedoch nicht gezeigt werden⁷.

Ferner konnten ähnliche Ergebnisse an 12 Patienten mit Astrozytomen gezeigt werden⁵⁷.

In einer weiteren Studie mit 19 Kindern mit intrakraniellen Tumoren wurde durch Gabe von H15[®] in einer Dosierung von 126 mg/kg Körpergewicht pro Tag eine Ödemreduktion erreicht. Eine Reduktion des Tumolvolumens konnte jedoch auch hier nicht festgestellt werden⁵⁸.

Wie aus den oben genannten klinischen Studien ersichtlich konnten zum Teil ermutigende Ergebnisse zur Demonstration der Wirksamkeit von Weihrauchzubereitungen bei rheumatoider Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Asthma und dem peritumoralen Hirnödem erzielt werden. Allerdings sollten weitere Studien mit größeren Patientenzahlen durchgeführt werden, um genauere Aussagen über die Wirksamkeit von Weihrauch treffen zu können.

2.1.4.3 Toxikologie und unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Weihrauch hat sich in verschiedensten Anwendungen über die Jahrtausende als sicher erwiesen. Erste toxikologische Untersuchungen mit einem ethanolischen Weihrauchextrakt beschrieben die mittlere letale Dosis (LD₅₀) bei Ratten und Mäusen mit größer als 2 g pro kg Körpergewicht¹². Ein Trockenextrakt wurde von Ratten und Rhesusaffen in Dosen, die die Höchstdosis für den Menschen um ein Mehrfaches überstiegen, gut vertragen. Es konnte keine akute und chronische Toxizität festgestellt werden. Dieser Extrakt zeigte im Ames-Test, Chromosomenaberrations- und im Zelltransformationstest kein genotoxisches oder tumorigenes Potential¹⁰.

In den bereits beschriebenen klinischen Studien wurden Weihrauchzubereitungen im Allgemeinen gut vertragen. Es kam hauptsächlich zu milden gastrointestinalen Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Völlegefühl, Magenschmerzen, Sodbrennen, Anorexie, Hyperazidität und Schmerzen im Brustbein.

In einem Fall bildete sich nach topischer Anwendung einer Creme, die u.a. *Boswellia serrata* Extrakt enthielt, eine allergische Kontaktdermatitis aus⁵⁹.

Außerdem wurden Hinweise auf Hepatotoxizität eines Weihrauchextrakts in HepG2-Zellen und in Mäusen gefunden⁶⁰.

2.1.5 Bioverfügbarkeitsuntersuchungen mit Weihrauch

Zur Dosisfindung ist die Kenntnis über die Bioverfügbarkeit (2.2.1) von Boswelliasäuren, den wirksamkeitsbestimmenden Komponenten von Weihrauchextrakten, unerlässlich.

Jeong *et al.* bestimmten die orale Bioverfügbarkeit von Oleanolsäure, die mit den Boswelliasäuren strukturverwandt ist. Die orale Bioverfügbarkeit betrug 0,7 %. Schlechte Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt und ein hepatischer First-pass-Metabolismus wurden für die geringe Bioverfügbarkeit verantwortlich gemacht⁶¹.

Auch für Boswelliasäuren konnte nur eine geringe Bioverfügbarkeit bestimmt werden. Eine erste Plasmaspiegelmessung von KBA an einem Probanden zeigte eine Stunde nach der Gabe von 1600 mg eines *Boswellia serrata* Extrakts eine maximale Plasmakonzentration von etwa 800 ng/ml. AKBA war mit der eingesetzten Methode nicht bestimmbar⁶².

In einer unveröffentlichten Studie mit 6 Probanden, die Boswellinextrakt^{®6} in einer Einmaldosis von 1600 mg einnahmen, wurden maximale Plasmaspiegel von 1000 ng/ml KBA und 260 ng/ml AKBA gemessen.

In Indien wurde der Plasmaspiegel von 12 männlichen Probanden, die jeweils eine Kapsel Wokvel^{™7} erhielten, über 14 Stunden bestimmt. Die maximale Plasmakonzentration von KBA lag bei 1281 ng/ml, AKBA konnte dagegen im Plasma nicht nachgewiesen werden⁶³.

Inwieweit die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren von der Nahrungsaufnahme abhängig ist, wurde in einer offenen Crossover-Studie mit 12 männlichen Probanden untersucht. Jeder Proband nahm 3 Kapseln BSE-018⁸ per Einmaldosis ein, wobei 10 h vor und 4 h nach der Einnahme keine Nahrung eingenommen und nur Wasser getrunken werden durfte. Die gleiche Dosis BSE-018 wurde nach einer Auswaschphase von 7 Tagen mit einer fettreichen Mahlzeit eingenommen. Die Bestimmung der Plasmaspiegel über 60 h hinweg ergab, dass die Bioverfügbarkeit von KBA und AKBA durch die Einnahme mit einer fettreichen Mahlzeit erheblich gesteigert werden konnte⁶⁴ (Tab. 2.2).

Die Steady-state-Plasmakonzentrationen eines Hirntumorpatienten, der 4*786 mg eines *Boswellia serrata* Extrakts über 10 Tage hinweg erhielt, wurden trotz dieser hohen Dosierung mit nur 160 ng/ml für KBA und 51 ng/ml für AKBA bestimmt⁶⁵.

In Wistar-Ratten wurden nach einmaliger oraler Verabreichung von H15[™]-Ayurmedica⁹ Tabletten in einer Dosierung von 240 mg/kg Körpergewicht maximale Plasmaspiegel von 256 ng/ml und 114 ng/ml für KBA, bzw. AKBA detektiert.

⁶ der Extrakt enthält 5,1 % KBA und 6,8 % AKBA (R.P. Scherer GmbH & Co. KG, Deutschland)

⁷ eine Kapsel enthält 333 mg *Boswellia serrata* Extrakt (Pharmanza, Indien)

⁸ eine Kapsel enthält 262 mg *Boswellia serrata* Extrakt (CPM Contract Pharma, Deutschland)

⁹ eine Tablette enthält 400 mg *Boswellia serrata* Extrakt (Gufic, Indien)

Erstmalig konnten auch im Hirn der Tiere KBA und AKBA in Konzentrationen von 99 bzw. 95 ng pro g Hirngewebe bestimmt werden⁶⁶. In Tab. 2.2 sind die Ergebnisse der oben erwähnten Bioverfügbarkeitsstudien detailliert dargestellt.

Tab. 2.2: Ergebnisse der bisherigen Bioverfügbarkeitsstudien mit *Boswellia serrata* Extrakt

Dosierung des <i>Boswellia serrata</i> Extrakts	KBA			AKBA		
	c_{\max}	t_{\max}	$AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$	c_{\max}	t_{\max}	$AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$
	(ng/ml)	(h)	(ng*h/ml)	(ng/ml)	(h)	(ng*h/ml)
<i>Human</i>						
1600 mg ⁶²	800	1	-	-	-	-
1600 mg	1000 [#]	-	-	260 [#]	-	-
333 mg ⁶³	1281	4,5	12872	n.d.	n.d.	n.d.
3*262 mg ⁶⁴ (fastend)	84	3,5	1661	6 ⁺	2,0 ⁺	154 ⁺
3*262 mg ⁶⁴ (fettreich)	227	4	3037	29 ⁺	3,0 ⁺	749 ⁺
4*786 ⁶⁵ (Steady-state)	160	-	-	51	-	-

<i>Ratte</i>						
240 mg/kg KG ⁶⁶	256	3	-	114	3	
n.d.	nicht detektierbar					
#	nicht veröffentlicht					
+	Methode für diesen Konzentrationsbereich nicht validiert					

Auffällig war bei allen Studien, dass AKBA in deutlich niedrigeren Konzentrationen detektiert wurde als KBA, obwohl die getesteten Extrakte diese beiden Boswelliasäuren in vergleichbaren Konzentrationen enthielten.

2.2 Allgemeine Einflussfaktoren auf die Bioverfügbarkeit

2.2.1 Einleitung

Ein Arzneistoff muss in hinreichender Konzentration und über einen gewissen Zeitraum am Wirkort vorliegen, um eine gewünschte Wirkung im Körper erzielen zu können. Das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der der therapeutisch wirksame Bestandteil aus der pharmazeutischen Formulierung am Wirkort verfügbar ist, bezeichnet man als Bioverfügbarkeit. Abb. 2.3 gibt einen Überblick über Prozesse, die die Wirksamkeit eines Arzneistoffs beeinflussen können.

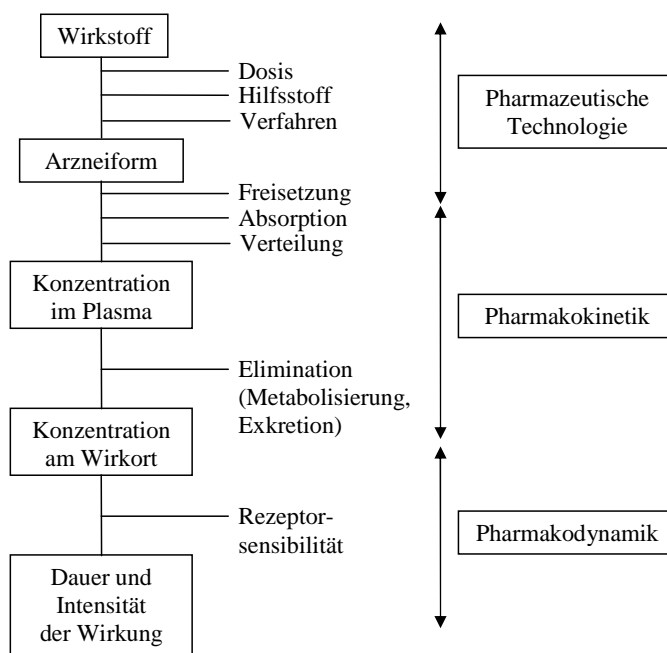


Abb. 2.3: Prozesse, welche die Wirksamkeit von Arzneistoffen beeinflussen können⁶⁷

Die Bioverfügbarkeit beeinflussende Faktoren werden durch das LADME-Modell beschrieben. Die Freisetzung aus der Arzneiform (Liberation) wird unterteilt in den Zerfall der Arzneiform (Disintegration) und die Auflösung des Arzneistoffs in der am Resorptionsort vorliegenden Flüssigkeit (Dissolution). Bei der darauf folgenden Aufnahme des freigesetzten Arzneistoffs aus dem Gastrointestinaltrakt in den systemischen Blutkreislauf muss die Zellmembran durchdrungen werden (Absorption). Sobald der Arzneistoff im Blutkreislauf zirkuliert, beginnt seine Verteilung, der sogenannte Stofftransport, zwischen den verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben (Distribution). Umwandlungs- und Abbauprozesse, denen der Arzneistoff im Körper unterliegt, werden als Metabolismus oder Biotransformation bezeichnet. Man unterscheidet dabei zwischen Phase-I- und Phase-II-Reaktionen, die der Hydrophilisierung dienen. Ziel dieser Prozesse ist eine Verbesserung der Ausscheidung des Arzneistoffes aus dem Organismus. Hauptorte der Metabolisierung sind die Leber,

das Blut, der Darm und die Schleimhäute. Die Ausscheidung (Exkretion) eines Arzneistoffes und seiner Metabolite erfolgt zum größten Teil über die Nieren im Urin und über die Gallenflüssigkeit in den Dünndarm mit den Faeces^{67,68}.

Im Folgenden wird auf den Einfluss der Löslichkeit, der Absorption und der Metabolisierung auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen eingegangen.

2.2.2 Löslichkeit von Arzneistoffen

Die Löslichkeit von Arzneistoffen ist bei deren Entwicklung von großer Bedeutung. So wird der Löslichkeit bereits in der frühen Phase der Entwicklung erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt. Spätestens für die ersten klinischen Studien sind verlässliche Daten zur Löslichkeit einer Prüfsubstanz unerlässlich, um den Dosierungsbereich festlegen zu können^{69,70}. Um pharmakologisch aktiv zu sein, muss ein Molekül eine gewisse Löslichkeit in physiologischen Flüssigkeiten aufweisen, damit es aus seiner Zubereitung freigesetzt werden kann. Die Löslichkeit, bzw. Freisetzung aus der Arzneiform, steht in direktem Zusammenhang mit der Bioverfügbarkeit. Bei schlecht löslichen Substanzen ist auch mit einer geringen Bioverfügbarkeit zu rechnen. Ein besonderes Problem stellt die sehr begrenzte Löslichkeit von pflanzlichen Extrakten und Triterpenen in wässrigen Medien dar⁷¹⁻⁷³. Es ist daher ein Bestreben die Löslichkeit zu erhöhen, um eine verbesserte Bioverfügbarkeit zu erlangen.

Eine Verbesserung der Löslichkeit kann durch Optimierung der physikochemischen Eigenschaften des Stoffes oder Veränderung der Formulierung erreicht werden^{69,74}. Es ist bekannt, dass die Arzneistoff-Absorption mit abnehmender Partikelgröße steigt^{75,76}. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass liposomale Formulierungen effektive Transportsysteme für oral verabreichte Arzneistoffe sein können, werden diese im Gastrointestinaltrakt leicht zerstört, weshalb weiterhin alternative Formulierungen entwickelt werden⁷⁷.

Eine vielversprechende Methode zur Verbesserung der Löslichkeit stellt die Formulierung nanoskaliger Partikel dar. Bei dieser Methode handelt es sich um die Umwandlung von hydrophoben Komplexen in wasserlösliche Aggregate durch den Einsatz von Detergentien. Schwer lösliche Arzneistoffe oder Extrakte werden mittels dieser Technik in nanoskalige Partikel überführt und dadurch sowohl wasser- als auch fettlöslich. Die hydrophile Hülle der Partikel, die den lipophilen Extrakt umschließt, erleichtert dabei die Passage des Arzneistoffes durch die Epithelzellschicht. Aus Geheimhaltungsgründen kann jedoch in dieser Arbeit nicht näher auf die nanoskalige Formulierung eingegangen werden.

2.2.3 Absorption und Permeation

2.2.3.1 Epithelzellschicht

Unter Absorption versteht man die Aufnahme eines Stoffes von einer Körperoberfläche (z. B. Haut, Schleimhäute, Magen-Darm-Trakt) oder aus einem Gewebe (z. B.

Muskelgewebe) in die Blutbahn oder das Lymphgewebe. Die meisten Arzneistoffe werden, da es für den Patienten am angenehmsten ist (Compliance), peroral verabreicht. So muss der Arzneistoff auf dem Weg in den Blutkreislauf durch die Membran des Gastrointestinaltrakts diffundieren, welche bedingt durch ihre Phospholipid-Doppelschicht eine Lipidbarriere darstellt. In die Membran reichen nach dem Fluid-Mosaik-Modell Proteinmoleküle, die die Funktion von Transportern wahrnehmen können⁷⁸. Aufgrund seiner großen Oberfläche stellt der Dünndarm für Arzneistoffe den Hauptabsorptionsort im Gastrointestinaltrakt dar (Abb. 2.4).

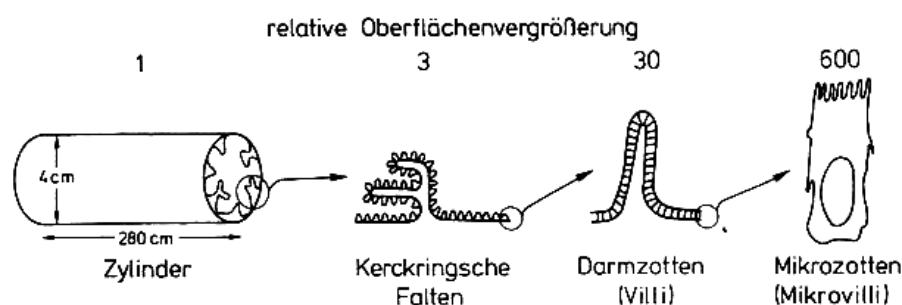


Abb. 2.4: Vergrößerung der Dünndarmoberfläche durch spezielle morphologische Strukturen⁷⁹

Um die Phospholipid-Doppelschicht passieren zu können, muss ein Arzneistoff einerseits ausreichend lipophile Eigenschaften besitzen, andererseits sind aber auch hydrophile Eigenschaften notwendig, da nur in Lösung befindliche Arzneistoffe absorbiert werden können. Es gibt verschiedene Wege, auf denen Stoffe die Barriere der Epithelzellschicht des Dünndarms überwinden können⁸⁰.

2.2.3.2 Absorptionsmechanismen

Arzneistoffe können die Membranen des Gastrointestinaltrakts durch die Zellen hindurch (transzellulär) oder zwischen den Zellen hindurch (parazellulär) passieren (Abb. 2.5).

Der parazelluläre Absorptionsweg durch die Tight-junctions ist bei intaktem Epithel für Arzneistoffe von untergeordneter Bedeutung, da die Tight-junctions nur 0,1 % der Oberfläche des Darmepithels ausmachen⁸¹.

Der für viele Arzneistoffe wichtigste Transportweg ist der transzelluläre Transport, welcher wiederum in aktiven und passiven Transport unterteilt werden kann.

Bei dem transzellulären passiven Transport erfolgt die Verteilung zwischen apikaler und basolateraler Seite der Zellmembran ohne Energieaufwand entlang eines Konzentrationsgradienten. Voraussetzung für den passiven Transport ist, dass der Arzneistoff gelöst vorliegt und eine ausreichende Lipophilie besitzt.

Unter aktivem Transport versteht man den Transport gegen ein Konzentrationsgefälle mit Hilfe von Transportproteinen (Carriern) unter Energieverbrauch. Der Transport lässt sich sättigen und ist hemmbar.

Erfolgt der Transport in Richtung eines Konzentrationsgefälles mit Hilfe eines Transporters unter Energieverbrauch, spricht man von erleichterter Diffusion.

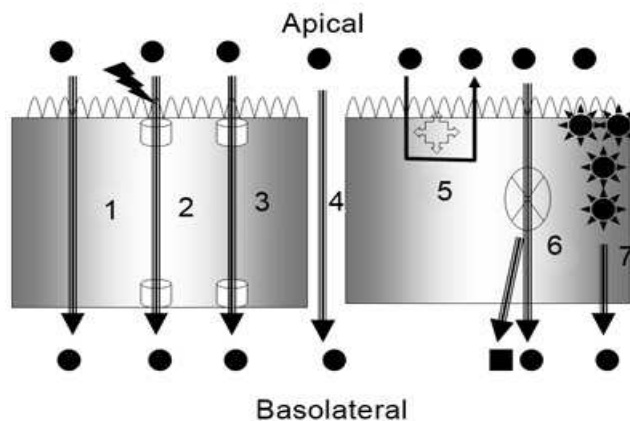


Abb. 2.5: *Intestinale Transportmechanismen*⁸²: 1 transzellulärer passiver Transport, 2 transzellulärer aktiver Transport, 3 erleichterte Diffusion, 4 parazellulärer passiver Transport, 5 transzellulärer passiver Transport unter Einfluss von polarisierten Efflux-Mechanismen, 6 intestinaler First-pass-Metabolismus, gefolgt von der Absorption von Vorläufer und Metabolit, 7 rezeptorvermittelte Endocytose

Eine Vielzahl von Substanzen weist trotz ausreichender Lipophilie nur eine geringe Permeabilität durch die Membran des Gastrointestinaltrakts auf. Die Arzneistoffe gelangen zwar in die Endothelzellen hinein, agieren aber als Substrate membranständiger aktiver Transportproteine, die die Wirkstoffe unter Energieverbrauch zurück in das Darmlumen transportieren. Somit gelangt nur ein kleiner Teil der Arzneistoffmenge zur basolateralen Seite der Epithelzellschicht, was zu einer schlechten Bioverfügbarkeit führt. Wichtige Transportproteine, die im Dünndarm vorkommen sind u.a. ABC-Transportproteine (ATP-binding-cassette) wie die Efflux-Pumpen P-Glykoprotein (Pgp) und das Multidrug Resistance-related Protein (MRP)⁸³.

Die intestinale Absorption kann außerdem durch Monoxygenasen der Cytochrom-P450-Familie (CYP) wie z.B. die Isoform CYP3A4 beeinflusst werden. CYP3A4 wird in Enterocyten exprimiert und ist das im menschlichen Darm am häufigsten auftretende CYP-Isoenzym. Damit stellt es eine metabolische Barriere zur Wirkstoffabsorption dar, welche zwar im Vergleich zur hepatischen Metabolisierung durch CYP gering ist, die Absorption jedoch limitieren kann⁸⁴.

Bei der rezeptorvermittelten Endocytose werden Makromoleküle aktiv durch Einstülpungen der Membran aufgenommen. Für Arzneistoffe ist dieser Resorptionsweg aber von untergeordneter Bedeutung.

2.2.3.3 *In vitro* Modelle zur Untersuchung der Permeation von Arzneistoffen durch Biomembranen

Unter der Permeation von (Arznei-)Stoffen versteht man deren Transport durch das menschliche intestinale Epithel. Diese wird maßgeblich durch den Widerstand charakterisiert, der dem intestinalen Wirkstofftransport entgegensteht.

Die FDA weist darauf hin, dass die Permeabilität außer durch aufwändige *in vivo*-Methoden, wie intestinale Perfusion im Menschen oder in Tieren, auch *in vitro* z.B. mit Hilfe von Zellkulturen untersucht werden kann⁸⁵. Es wurden diverse *in vitro*-Modelle entwickelt, die zum Ziel haben, die physiologischen Verhältnisse nachzuahmen. Mit zunehmender Genauigkeit der eingesetzten Methode nimmt generell auch deren Komplexität zu⁸⁶.

Neben Modellen mit isoliertem Gewebe, wie z. B. der Ussing-Kammer, kommen auch isolierte Enterozyten und Membranvesikel zum Einsatz^{80,87,88}. Der Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) wurde 1998 eingeführt und hat sich seitdem als leistungsfähiges System für Permeabilitätsuntersuchungen mit hohem Durchsatz etabliert⁸⁹. Caco-2- (Carcinoma coli-2) oder MDCK- (Madin-Darby canine kidney) Zelllinien sind jedoch die in den letzten Jahren am häufigsten eingesetzten und am besten charakterisierten Modelle zur Untersuchung von Transportvorgängen von Arzneistoffen durch die intestinalen Enterozyten⁸². Das in dieser Arbeit genutzte Caco-2-Zellmodell wird im Folgenden genauer beschrieben.

Das Caco-2-Zellmodell

Die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 wurde aus einem primären Kolonrektaladenokarzinom kultiviert, welches 1974 einem 72-jährigen Patienten entnommen wurde⁹⁰.

Diese Zelllinie hat diverse vorteilhafte Eigenschaften, welche es zu einem der meistgenutzten und am besten charakterisierten Absorptionsmodelle der vergangenen 20 Jahre gemacht hat⁹¹. So sind Caco-2-Zellen relativ einfach zu kultivieren und haften sehr gut an Oberflächen, z.B. auf dem Kunststoffmaterial von Zellkulturflaschen oder auch auf Filtermaterialien. Für Absorptionsversuche werden die Zellen auf einer Filtermembran ausgesät. Nach einigen Tagen bilden sie eine zusammenhängende Schicht aus. Danach tritt die Polarisierung der Zellen ein, d.h. die Zellen nehmen die für Epithelzellen charakteristische säulenförmige Struktur an. Es bildet sich eine Bürstensaummembran aus und Transportproteine werden exprimiert^{92,93}. Ungefähr drei Wochen nach dem Aussäen ist die Polarisierung abgeschlossen und die Zellen können für Resorptionsversuche verwendet werden.

Kolonepithelzellen stellen, durch eine sehr starke Ausbildung von Tight-junctions, eine etwas dichtere Barriere dar als das Dünndarmepithel und spiegeln deshalb nicht eindeutig die physiologischen Verhältnisse wider. Vergleichende Ermittlungen der Permeationskoeffizienten zeigten aber eine ausreichende Korrelation der *in vivo*- mit

den *in vitro*-Ergebnissen. Arzneistoffe, die passiv transzellulär transportiert werden, zeigten sogar eine gute Korrelation^{91,94-97}.

Caco-2-Zellen können im Laufe der Kultivierung ihre morphologischen und funktionellen Eigenschaften (z.B. Expression von Transportproteinen) verändern. Diese Heterogenität der Zelllinie kann dazu führen, dass Ergebnisse, die in verschiedenen Laboratorien erzielt werden, nicht immer miteinander vergleichbar sind und unterschiedliche Permeabilitätswerte für denselben Arzneistoff gefunden werden⁹⁸. Da es bisher keine standardisierte Laborvorschrift gibt, können weitere Faktoren die Einheitlichkeit der Ergebnisse beeinflussen. Diese sind vor allem die Kultivierungsbedingungen, Aussaatdichte, Passagennummer, das Alter der Monolayer, die Phase der Differenzierung, Art der Filtermembran, der Transportpuffer und dessen pH-Wert, die Temperatur, die Agitationsgeschwindigkeit und die Art der Probennahme⁹⁹.

Bedacht werden muss weiterhin, dass Caco-2-Zellen das im Darm in großen Mengen vorkommende CYP3A4 nur in geringer Menge exprimieren. Die Induktion der Expression höherer CYP3A4-Level durch Zugabe von z.B. Vitamin D₃ ist zwar beschrieben worden, Untersuchungen zum intestinalen Metabolismus von Substanzen bleiben dennoch problematisch¹⁰⁰.

Trotz der genannten kritischen Punkte ist die Verwendung des Caco-2-Modells aufgrund seiner Kosten- und Zeiteffektivität besonders in der industriellen Entwicklung weit verbreitet. Der apparative Aufwand ist geringer als bei Untersuchungen an isoliertem Gewebe, weshalb eine höhere Anzahl Untersuchungen durchgeführt und somit Zeit und Kosten gespart werden können. Für die Untersuchungen sind außerdem kleine Volumina ausreichend und somit auch kleine Arzneistoffmengen, was besonders im Frühstadium der Arzneistoffentwicklung wichtig ist, da hier nur sehr geringe Arzneistoffmengen zur Verfügung stehen¹⁰¹. Abb. 2.6 zeigt einen typischen Versuchsaufbau zur Bestimmung der Arzneistoffpermeabilität anhand von Transportversuchen durch Caco-2-Zellmonolayer.

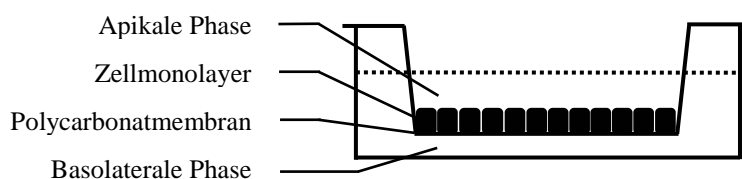


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Caco-2-Modells

Der Arzneistoff wird in gelöster Form in das Donorkompartiment gegeben (apikal oder basolateral) und die Veränderung der Arzneistoffkonzentration im Akzeptorkompartiment (basolateral oder apikal) über die Zeit gemessen. Aus der kumulativen Arzneistoffkonzentration im Akzeptorkompartiment kann der apparente Permeationskoeffizient P_{app} als Kenngröße für die Resorption bestimmt werden⁹¹.

Dazu wird die kumulative Arzneistoffkonzentration über die Zeit aufgetragen und aus der Steigung der durch lineare Regression erhaltenen Geraden die Permeation durch den Zellmonolayer dc/dt bestimmt. Der apparente Permeationskoeffizient wird dann nach folgender Gleichung berechnet:

$$P_{app} = \frac{dc \times V}{dt \times A \times C_0} \quad (2.1)$$

dc/dt = Substanzfluss durch den Monolayer ($\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{s})$)

V = Volumen der Akzeptorkammer (ml)

A = Oberfläche der Monolayer (cm^2)

C_0 = Ausgangskonzentration im Donorkompartiment ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Die Kenntnis des apparenten Permeationskoeffizienten ermöglicht es Aussagen darüber zu treffen, ob für den untersuchten Arzneistoff mit einer guten, mittleren oder schlechten intestinalen Absorption zu rechnen ist (Tab. 2.3)⁹⁷.

Tab. 2.3: Beurteilung der Absorption von Substanzen nach Yee⁹⁷

P_{app} (cm/s)	$< 1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$ - 10^{-5}	$> 10^{-5}$
Erwartete <i>in vivo</i> -Absorption	schlecht (0-20 %)	mittel (20-70 %)	gut (70-100 %)

2.2.4 Metabolismus

2.2.4.1 Definition und Bedeutung

Als Metabolismus oder auch Biotransformation wird die Umwandlung eines Stoffes mittels Enzymsystemen in einem Organismus bezeichnet. Dieser Prozess hat zum Ziel, lipophile Substanzen in hydrophilere, leichter eliminierbare Substanzen zu überführen¹⁰². Diese Substanzen können beim physiologischen Stoffwechsel anfallen (z.B. Gallenfarbstoffe, Steroidhormone) oder Fremdstoffe (Xenobiotika) sein, die dem Organismus mit der Nahrung zugeführt werden (z.B. Arzneistoffe, Konservierungsmittel).

Die Metabolisierung von Arzneistoffen erfolgt größtenteils in der Leber aber auch in anderen Organen wie z.B. in der Darmwand des Magen-Darm-Trakts. Die Reaktionen der Biotransformation werden in Phase-I- und Phase-II-Reaktionen unterteilt¹⁰³.

Phase-I-Reaktionen sind oxidative, reduktive oder auch hydrolytische Umwandlungen des Wirkstoffs, wie Hydroxylierung oder O-, N- und S-Desalkylierung, N-Oxidation, Dehalogenierung, Desaminierung oder Epoxidierung. Eines der wichtigsten Phase-I-Enzymsysteme ist das im Kapitel 2.2.4.2 beschriebene Cytochrom-P450, welches zahlreiche Stoffe metabolisiert.

Phase-II-Reaktionen sind Konjugationsreaktionen, bei denen die Stoffe mit wasserlöslichen Molekülen wie Glucuronsäure, Schwefelsäure, Glutathion oder Aminosäuren verbunden und dann über die Niere oder über die Galle ausgeschieden werden (Tab. 2.4). Oftmals wird erst durch Phase-I-Reaktionen die Voraussetzung für Phase-II-Reaktionen geschaffen. Wenn die entsprechenden hydrophilen Gruppen bereits vorhanden sind, können die Konjugationen aber auch direkt ablaufen.

Tab. 2.4: Beispiele häufig auftretender metabolischer Reaktionen und der dafür verantwortlichen Enzyme¹⁰⁴

Phase-I-Reaktionen			Phase-II-Reaktionen
Oxidationen	Reduktionen	Hydrolysen	Konjugationen
P450 Monooxygenasen	Reduzierende Dehalogenierung	Epoxid-hydrolasen	Glutathion-transferasen
Flavinhaltige Monooxygenasen	Nitroreduktasen	Esterasen	UDP-Glucuronyl-transferasen
Alkoholdehydrogenasen	Azoreduktasen	Amidasen	Sulfotransferasen
Aldehyddehydrogenasen			Acetyltransferasen

Unter Phase-III-Reaktionen versteht man sowohl den Export der Fremdstoffkonjugate mit Hilfe von Transportproteinen oder Efflux-Pumpen aus der Zelle als auch den finalen

Export aus dem Organismus, z.B. die Exkretion über die Niere, die Galle oder die Atemluft und die intestinale Sekretion¹⁰⁵.

In der Regel resultieren aus den Phase-I- und Phase-II-Reaktionen hydrophilere Metabolite, die rasch ausgeschieden werden. Dadurch erfolgt im Allgemeinen eine Entgiftung oder ein Wirkungsverlust des Arzneistoffes. Neben solchen Entgiftungsreaktionen können aber auch Aktivierungen von Stoffen stattfinden. Die Bildung karzinogener, cytotoxischer oder mutagener Metabolite wird als Giftung bezeichnet¹⁰⁶. Solche Giftungs- oder Aktivierungsreaktionen können aber genutzt werden. Pharmakologisch unwirksame oder kaum wirksame Arzneistoffe (Prodrugs) werden nach Biotransformation im Organismus zu therapeutisch wirksamen Metaboliten umgesetzt.

Von einem First-pass-Effekt spricht man, wenn der Arzneistoff nach Aufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt über die Pfortader in die Leber gelangt und dort bereits vor dem Eintritt in die systemische Zirkulation zu einem großen Teil metabolisiert wird⁶⁸.

Für die Arzneistofftherapie kann sich neben dem First-pass-Effekt auch die Induzierbarkeit von Enzymen negativ auswirken. Bestimmte Substanzen können die Expression eines Enzyms beeinflussen und somit den verstärkten Abbau eines Pharmakons bewirken. Auch der umgekehrte Fall ist denkbar. Eine Enzymhemmung kann zu toxischen *in vivo*-Konzentrationen von Arzneistoffen führen, besonders wenn diese nur eine geringe therapeutische Breite aufweisen⁶⁸.

2.2.4.2 Cytochrom-P450

Die Cytochrom-P450-Proteine (CYPs) sind eine den Häm-Proteinen angehörende Familie mischfunktioneller Enzyme, welche im Komplex mit Kohlenmonoxid bei 450 nm eine charakteristische Absorptionsbande aufweisen. Sie sind vor allem in der Leber und der Nebennierenrinde aber auch im Magen-Darm-Trakt lokalisiert.

CYP spielt eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Steroidhormonen und Prostaglandinen sowie bei der Fremdstoffmetabolisierung. Es katalysiert diverse Reaktionen wie Epoxidierungen, Desaminierungen sowie O-, N- und S-Desalkylierungen. Am häufigsten wird es jedoch mit aliphatischen und aromatischen Hydroxylierungsreaktionen in Verbindung gebracht.

Bei einer solchen Hydroxylierungsreaktion wird ein Sauerstoffäquivalent auf ein Molekül übertragen. CYP-abhängige Oxidationsreaktionen sind auf die Beteiligung von NADPH, einem Flavoenzym (NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase) und anderen Komponenten angewiesen, die die Elektronen zur Reduktion des Fe^{3+} zum Fe^{2+} im CYP liefern. Die reduzierte Form bindet molekularen Sauerstoff. Nach erneuter Reduktion durch Aufnahme eines weiteren Elektrons wird das Sauerstoffmolekül unter Protonenaufnahme und Wasserabspaltung gespalten. Das entstehende reaktive Zwischenprodukt ist in der Lage, das Substrat durch Einschub des Sauerstoffatoms in eine C-H- oder X-H-Bindung zu hydroxylieren. Gleichzeitig regeneriert sich der

Fe^{3+} -Komplex, der katalytische Zyklus ist durchlaufen und kann erneut stattfinden¹⁰⁷. In Abb. 2.7 ist der katalytische Zyklus schematisch dargestellt.

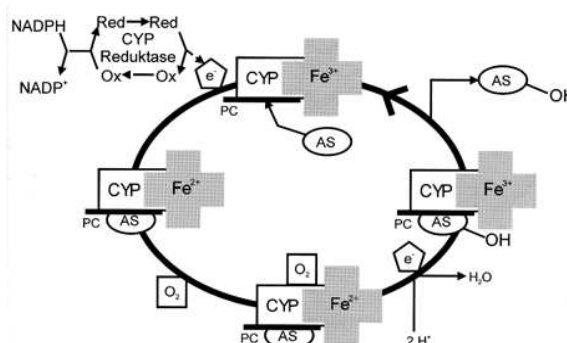


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der Hydroxylierung durch CYP⁶⁸

Es existieren 18 CYP-Familien und 43 Unterfamilien, welche unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. Die Enzymaktivität von CYP ist durch zahlreiche Substanzen induzierbar und inhibierbar. Die Konkurrenz endogener und exogener Substrate um das gleiche Enzym ist die Ursache zahlreicher unerwünschter Wirkungen von Arzneistoffen und vielen Arzneimittelinteraktionen¹⁰⁸. In Tab. 2.5 und Tab. 2.6 sind Beispiele für Arzneistoffe genannt, welche mit CYP interagieren.

Auch die Relevanz genetischer Polymorphismen ist für Arzneimittelinteraktionen nicht zu unterschätzen. Die fünf Isoenzyme CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 sind für die Metabolisierung von über 90 % der gebräuchlichsten Arzneistoffe verantwortlich. Genetische Variationen sind besonders bei CYP2D6 häufig, d.h. die Aktivität dieses Enzyms kann von Mensch zu Mensch große Unterschiede aufweisen. Schlechte Metabolisierer („poor metabolizers“) müssen häufiger mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen rechnen, bei ultraschnellen Metabolisierern („ultra-rapid metabolizers“) ist die Wirksamkeit von Arzneistoffen häufig herabgesetzt¹⁰⁸.

Tab. 2.5: Prominente Beispiele von CYP-Induktoren^{67,109}

Induktor	Cytochrom-P450 (betroffene Isoformen)	Beispiele für klinisch relevante Interaktionen
Rifampicin	2B6, 2C9, 2C19, 3A4, 3A5, 3A7	Glibenclamid, orale Kontrazeptiva
Phenytoin	3A4, 3A5, 3A7	Disopyramid, Cyclosporin, Corticosteroide
Johanniskraut	3A4, 3A5, 3A7	Antikoagulantien vom Cumarintyp, Cyclosporin, Indinavir, orale Kontrazeptiva

Tab. 2.6: Prominente Beispiele von CYP-Inhibitoren^{67,110}

Inhibitor	Cytochrom-P450 (betroffene Isoformen)	Beispiele für klinisch relevante Interaktionen
Amiodaron	1A2, 2C9, 2D6, 3A4, 3A5, 3A7	Orale Antikoagulantien, Phenytoin, Digoxin, Cyclosporin
Indinavir	3A4, 3A5, 3A7	Itraconazol, Sildenafil
Itraconazol	3A4, 3A5, 3A7	Simvastatin, Chinidin, Triazolam
Grapefruitsaft	3A4, 3A5, 3A7	Cyclosporin, Calciumantagonisten vom 1,4- dihydropyridin-Typ, HMG CoA Reduktase- Inhibitoren

2.2.4.3 Testsysteme zur Untersuchung des *in vitro*-Metabolismus von Arzneistoffen

Die Untersuchung des Metabolismus ist aufgrund zahlreicher Variablen wie unterschiedliche Substratspezifität sowie Induzierbarkeit oder Inhibierbarkeit von Enzymen, speziesbedingten Unterschieden in der Enzymausstattung, gewebe-spezifischer Genexpression und genetischen Polymorphismen sehr komplex. Es ist daher unerlässlich einige hinsichtlich der *in vivo*-Situation vereinfachende Modelle in einleitenden Untersuchungen zum Metabolismus von Arzneistoffen anzuwenden.

Die für die Untersuchungen zur Verfügung stehenden Testsysteme reichen von isolierten Enzymen bis hin zu Leberschnitten und perfundierten Organen¹¹¹. Jedes dieser Systeme hat sowohl Vor- als auch Nachteile, die bei der Auswahl eines oder mehrerer Systeme für die jeweilige Untersuchung beachtet werden müssen. Die heute am häufigsten eingesetzten experimentellen Modelle sind in Tab. 2.7 dargestellt. Im Folgenden werden Lebermikrosomen und Hepatozyten, die in dieser Arbeit eingesetzten Modelle, genauer beschrieben.

Lebermikrosomen

Bei Lebermikrosomen handelt es sich um niedermolekulare Partikel des glatten Endoplasmatischen Retikulums, die bei der fraktionierten Zentrifugation von Leberzellhomogenat gewonnen werden. Die mikrosomale Fraktion der Leber ist mit der vollen Anzahl an CYP ausgestattet. Durch den Einsatz relevanter Cofaktoren und Reaktionskomponenten können unterschiedliche Metabolisierungsreaktionen untersucht werden. Reaktionsansätze mit NADPH als Cofaktor führen in Lebermikrosomen zu CYP-katalysierten Reaktionen. Der Zusatz von Uridin-5'-diphospho-Glucuronsäure (UDPGA) führt zu Reaktionen, die durch UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs) katalysiert werden.

Mikrosomen sind relativ einfach zu handhaben und der Versuchsaufbau ist unkompliziert. Ein weiterer Vorteil ist deren quasi unlimitierte Verfügbarkeit und die

Möglichkeit, die Mikrosomen (bei -80°C) für relativ lange Zeit lagern zu können, ohne dass es zu einem wesentlichen Verlust enzymatischer Aktivität kommt. Auch das Problem der verzögerten Reaktionsgeschwindigkeit (Latenz), welches darin begründet liegt, dass viele mikrosomale Enzyme im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind und die Substrate erst durch Diffusion oder spezielle Transportsysteme dorthin gelangen müssen, hat man in den Griff bekommen. Durch Zusatz von Detergenzien oder des antibiotischen Peptids Alamethicin werden Poren in der Membran gebildet. Dadurch wird die Diffusion der Substrate zum Enzym erleichtert¹¹². Eine wesentliche Einschränkung dieses Modells ist jedoch, dass nicht alle Arzneistoffmetabolisierenden Enzyme vorkommen und die Ergebnisse aus Untersuchungen mit Lebermikrosomen somit nur einen Teil des Stoffwechselweges *in vivo* reflektieren^{111,113,114}.

Hepatozyten

Untersuchungen des Arzneistoffmetabolismus mit Hepatozyten zählen zu den Modellen, welche die *in vivo*-Situation am besten widerspiegeln. Hepatozyten nehmen etwa 80 % des Leber Volumens ein und sind aufgrund ihrer Enzymausstattung metabolisch stark aktiv. Sie enthalten ein umfassendes Spektrum an Phase-I- und II-Enzymen. Es ist daher möglich den gesamten Stoffwechselweg durch Inkubation von Arzneistoffen mit isolierten Hepatozyten zu erfassen. Auch die Induktion einzelner Enzyme kann mit diesem Modell untersucht werden¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Humanhepatozyten waren in der Vergangenheit selten verfügbares Material. Erst seitdem Leber, die nicht mehr für die Transplantation verwendbar ist, der Forschung zugänglich gemacht wird, können größere Mengen an Humanhepatozyten isoliert werden¹¹⁷. Die Isolierung von Human- und Rattenhepatozyten erfolgt nach Collagenase-Perfusion aus dem ganzen Organ¹¹⁹. Frisch isoliertes Material verliert jedoch innerhalb weniger Stunden an enzymatischer Aktivität. So musste vor jedem Versuchsansatz eine aufwendige Isolierung durchgeführt werden. Erste Versuche zur Kryokonservierung von Hepatozyten waren nicht zufriedenstellend. Der Einsatz von kontrollierten Einfrierprogrammen und geeigneter Kryokonservierungs-Reagenzien wie Dimethylsulfoxid jedoch führte zu Fortschritten hinsichtlich der Lebensfähigkeit und der Enzymaktivität. So ist es heute möglich Hepatozyten in flüssigem Stickstoff über Jahre hinweg zu lagern, ohne dass Lebensfähigkeit und Enzymaktivität wesentlich beeinflusst werden^{117,120}. Dennoch wurden im Rahmen dieser Arbeit frisch isolierte Hepatozyten eingesetzt, da sie nach wie vor am besten die Situation *in vivo* wiedergeben.

Die zeitlich auf wenige Stunden begrenzte Enzymaktivität frisch isolierter oder kryokonservierter Hepatozyten im Versuchsansatz bleibt aber ein limitierender Faktor bei der Untersuchung der Arzneistoffmetabolisierung.

Tab. 2.7: Vergleich verschiedener Testsysteme zur Untersuchung des Arzneistoffmetabolismus *in vitro*¹⁰⁴

	Vorteile	Einschränkungen
cDNA-exprimierte Enzyme (CYP)	-Einfaches System -Definierte Enzymaktivität -Untersuchung der Affinität zu einzelnen Enzymen	-Untersuchung nur einzelner Enzyme
Lebermikrosomen	-Unbegrenzte Verfügbarkeit -Leichte Präparation -Einfaches Testsystem	-Keine zelluläre Organisation -Enzymausstattung begrenzt
Hepatozyten	-Komplette Enzymausstattung -Untersuchungen zur Enzyminduktion möglich	-Relativ aufwendige Isolierung -Schneller Verlust der enzymatischen Aktivität
Leberschnitte	-Komplette Enzymausstattung -Untersuchungen zur Enzyminduktion möglich -Zelluläre Organisation	-Aufwendige Isolierung -Schneller Verlust der enzymatischen Aktivität
Immortalisierte Zelllinien	-Unlimitierte Verfügbarkeit	-Expression der meisten Enzyme niedrig oder nicht vorhanden

In der Arzneistoffentwicklung hat die metabolische Stabilität eines Arzneistoffkandidaten einen großen Einfluss auf seine Zukunft. Wenn ein Kandidat in Lebermikrosomen schnell und umfassend metabolisiert wird, ist seine orale Bioverfügbarkeit *in vivo* mit hoher Wahrscheinlichkeit sehr gering. Typische Versuche zur metabolischen Stabilität messen die Abnahme der Konzentration der Testsubstanz über die Zeit, d.h. die Menge an nicht durch die jeweiligen Enzyme metabolisiertem Substrat. Der Einsatz von Lebermikrosomen verschiedener Spezies bei der Bestimmung der metabolischen Stabilität kann hierbei wertvolle Informationen für die Auswahl eines geeigneten Tiermodells für pharmakokinetische Untersuchungen liefern¹²¹.

Neben der metabolischen Stabilität sind die Identifizierung der Metabolite und die Aufklärung der Stoffwechselwege von Arzneistoffkandidaten von großem Interesse. Neben den bereits genannten *in vitro*-Testsystemen kommen dabei häufig analytische Methoden wie LC-MS (Kapitel 2.3) zum Einsatz^{122,123}.

Auch wenn durch Einsatz von „State-of-the-art-Methoden“ zur Aufklärung des *in vitro*-Metabolismus bereits im frühen Stadium der Arzneistoffentwicklung viele hilfreiche Anhaltspunkte und wichtige Erkenntnisse gewonnen werden können, so ersetzen diese Untersuchungen nicht die nötigen toxikologischen Studien *in vivo*, auf deren Basis klinische Studien gestaltet werden können.

2.2.5 Interaktionsrelevante Transportsysteme in der Leber

Transportproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Absorption, Verteilung und Elimination zahlreicher Arzneistoffe. Im Folgenden wird kurz auf die Rolle des Multidrug Resistance-related Protein 2 und des Organic Anion Transport Polypeptide 1B3 bei Arzneimittelinteraktionen eingegangen.

2.2.5.1 Multidrug Resistance-related Protein 2 (MRP2)

MRP2 gehört zur Gruppe der Multidrug Resistance-related Proteine, welche zu der Familie der ABC-Transporter zählen. Obwohl MRP2 auch in den Tubuluszellen der Niere und in den Enterozyten vorkommt, so ist es doch hauptsächlich in den Hepatozyten lokalisiert, wo es für die biliäre Exkretion zahlreicher endogener organischer Anionen verantwortlich ist und so zum Schutz des Organismus beiträgt. Der Transport von Substraten geschieht unter Verbrauch von ATP. MRP2 ist außerdem in der Lage eine Vielzahl von glucuronidierten oder Sulfat-konjugierten Stoffen (z.B. sulfatierte Gallensalze) zu transportieren. Auch Xenobiotika wie Methotrexat, Pravastatin und Vinblastin zählen zu den Substraten von MRP2^{124,125}.

Daher spielt MRP2 als Efflux-Pumpe eine entscheidende Rolle bei pharmakokinetischen Fragestellungen. So können bei der medikamentösen Kombinationstherapie Wechselwirkungen auftreten, wenn mehrere Pharmaka, wie z.B. Cisplatin als Substrat und Cyclosporin als Inhibitor, mit MRP2 interagieren. Die Ausscheidung von Cisplatin kann dadurch verzögert werden, was wiederum zu toxischen Plasmaspiegeln führen kann¹²⁶.

Förster *et al.* entwickelten und validierten ein Testsystem, mit welchem Interaktionen von Arzneistoffen mit MRP2 schnell untersucht werden können¹²⁷. Das Prinzip basiert darauf, dass 5-Chloromethylfluorescein-diacetate (CMFDA) aufgrund seiner Lipophilie leicht durch Zellmembranen permeieren kann. In MDCK-Zellen, die MRP2 überexprimieren, wird es von Esterasen gespalten, wobei sich als hydrophiles, fluoreszierendes Zwischenprodukt 5-Chloromethylfluorescein (CMF) bildet. CMF reagiert dann in einem zweiten Schritt mit intrazellulären Thiol-Gruppen zu dem sehr hydrophilen Glutathion-Methylfluorescein (GSMF). Dieses ist ein Substrat von MRP2 und wird aktiv aus der Zelle transportiert. Inhibierende Effekte von Testsubstanzen, die zusammen mit CMFDA dem Testsystem zugegeben werden, resultieren in einer erhöhten intrazellulären Fluoreszenz. Als Positivkontrolle kann MK571 als potenter Inhibitor von MRP2 verwendet werden.

2.2.5.2 Organic Anion Transport Polypeptide 1B3 (OATP1B3)

OATP1B3 ist ein Vertreter der Familie der Organic Anion Transport Polypeptides (OATPs), welche innerhalb der Solute-Carrier-Familie (SLC) eine Gruppe Natrium-unabhängiger Aufnahmetransporter für amphipatische organische Anionen bilden¹²⁸.

OATP1B3 ist hauptsächlich in der Leber lokalisiert und spielt daher bei der Elimination von Substanzen eine wichtige Rolle. Es transportiert neben Bromosulphophthalein (BSP) und Steroidhormon-Konjugaten auch Herzglykoside und diverse anionische Peptide¹²⁹. Mittels eines Fluoreszenz-basierten Testsystems¹³⁰ können mögliche Interaktionen von Testsubstanzen mit OATP1B3 untersucht werden. Hierbei werden HEK-Zellen (Human Embryonic Kidney Cells) mit der Testsubstanz und dem fluoreszierenden Fluo-3 inkubiert, welches ein Substrat von OATP1B3 ist. Interagiert die Testsubstanz mit OATP1B3, so hat das eine verminderte Aufnahme von Fluo-3 in die Zellen und damit eine verminderte Fluoreszenz zur Folge. Als Positivkontrolle kann der OATP1B3-Inhibitor BSP verwendet werden.

Da Boswelliaextrakt im Rahmen der Selbstmedikation häufig in Kombination mit anderen Arzneimitteln eingenommen wird und bereits Interaktionen mit Pgp nachgewiesen wurden¹³¹, bot es sich an, auch mögliche Wechselwirkungen mit MRP2 und OATP1B3 mittels oben genannter Testsysteme zu untersuchen.

2.3 LC-MS in der Bioanalytik

2.3.1 Einleitung

In der Arzneistoffentwicklung herrscht der Trend vor, Metabolismus- und Pharmakokinetik-Studien (DMPK) von der späten Entwicklungsphase in die frühe Phase der Arzneistofffindung zu verschieben. Es gilt, möglichst früh Informationen über die Absorption, die Verteilung, den Metabolismus und die Ausscheidung von Kandidaten zu bekommen, um Substanzen mit unvorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften und folglich geringer Aussicht auf weitere Entwicklung früh zu erkennen und somit Zeit und Kosten einzusparen¹³².

Die in Kapitel 2.2 erwähnten Methoden bieten die Möglichkeit pharmakokinetische Eigenschaften mit relativ geringem Aufwand *in vitro* zu untersuchen. Bei der analytischen Auswertung dieser Testsysteme sowie bei der Untersuchung von klinischen *in vivo*-Proben im späteren Entwicklungsprozess eines Arzneistoffes hat sich der Einsatz von LC-MS (Liquid chromatography-mass spectrometry) als ein leistungsfähiges analytisches Verfahren bewährt¹³³. Es handelt sich dabei um die Kopplung der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einem Massenspektrometer (MS). Abb. 2.8 zeigt den Aufbau eines LC-MS-Systems.

Ein LC-MS-System zeichnet sich durch diverse vorteilhafte Eigenschaften aus. So sind aufgrund der hohen Empfindlichkeit von LC-MS-Systemen nur geringe Probenmengen nötig. Die hohe Selektivität ermöglicht zudem häufig eine vereinfachte Probenaufarbeitung, wodurch Zeit gespart werden kann. Das Spektrum an analysierbaren Substanzen durch LC-MS ist umfassend. Etwa 80 % aller bekannten organischen Verbindungen können ohne vorherige Derivatisierung analytisch erfasst werden¹³⁴. In den folgenden Kapiteln sollen die wesentlichen Elemente eines LC-MS-Systems genauer beschrieben werden.

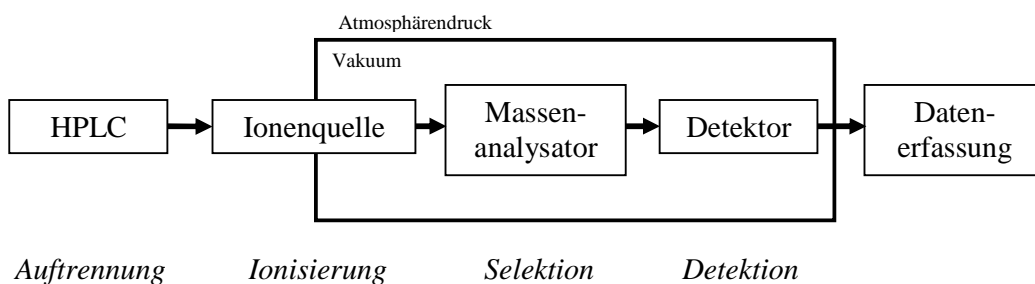


Abb. 2.8: Schematischer Aufbau eines LC-MS-Systems

2.3.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein chromatographisches Verfahren, bei dem die zu untersuchenden Substanzen in einem flüssigen Fließmittel (mobile Phase) mit hohem Druck durch eine Trennsäule (stationäre Phase) gepumpt werden. Unterschiedliche Wechselwirkungen verschiedener Substanzen mit der stationären Phase führen zu unterschiedlichen Verweildauern in dieser, wodurch es zur chromatographischen Auftrennung kommt.

In der heute überwiegend angewendeten Umkehrphasen-Chromatographie besteht die stationäre Phase aus Kieselgel, dessen polare Silanolgruppen mit Alkyldimethylchlorosilanen substituiert wurden, um die Polarität herabzusetzen. Bei den am häufigsten eingesetzten Octadecylsilan-Phasen sind die Silanolgruppen mit C-18-Körpern substituiert (Reversed phase-18, RP-18). Neben der Polarität der stationären Phase stellen die Porengröße (70-300 Å) und der Teilchendurchmesser (2-10 µm) weitere Einflussfaktoren dar.

Für LC-MS verwendete mobile Phasen und Puffer sollten gut verdampfbar sein. Diese können sich sonst an Oberflächen der Ionenquelle ablagern und die Ionisierung beeinflussen oder die Einlassöffnung verstopfen. In der Regel werden Mischungen aus Wasser und Methanol oder Acetonitril als Fließmittel und Ammoniumacetat und -formiat als Puffer verwendet.

2.3.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Methode, bei der Moleküle ionisiert und im Folgenden nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt und detektiert werden. Mittels MS können Informationen zur Masse und Struktur von Molekülen gewonnen werden. Ein Massenspektrometer kann in mehrere Bereiche aufgeteilt werden. Nach dem Einbringen einer Probe muss diese ionisiert werden (Ionenquelle). Die ionisierte Probe wird daraufhin nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt (Massenanalysator) und die Ionen von einem Sekundärelektronenvervielfacher detektiert. Das ermittelte Massenspektrum ist eine graphische Darstellung der detektierten Ionen pro Zeiteinheit (cps) gegen das Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z).

2.3.3.1 Ionisierungsverfahren bei Atmosphärendruck

Bei der Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer müssen die gelösten Moleküle zu Ionen in der Gasphase transferiert werden. Die großen Mengen an Fließmittel, welche beseitigt werden mussten ohne das Vakuum im Massenspektrometer zu beeinflussen, stellten zunächst eine große Herausforderung dar. Heute haben sich dafür Methoden durchgesetzt, welche den Analyten bei Atmosphärendruck ionisieren (API)¹³⁵. Neben schonender Verdampfung des Fließmittels wird bei der API ein großer Bereich an Flussraten der mobilen Phase toleriert. Sie ist für die Ionisierung von sowohl teilweise flüchtigen als auch nicht flüchtigen Substanzen geeignet. Die unter anderem in

der Bioanalytik routinemäßig eingesetzten Verfahren der Elektrospray-Ionisierung (ESI) und der Chemischen Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) werden im folgenden Kapitel vorgestellt.

Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Das Prinzip des Elektrosprays beschreibt die Dispersion einer Flüssigkeit in viele kleine geladene Tröpfchen mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes¹³⁶. Bei Flussraten über 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ wird das Versprühen der flüssigen Probe durch einen beheizbaren Stickstoffstrom unterstützt, wodurch dann Flussraten von bis zu 1 ml/min toleriert werden können. In Abhängigkeit der angelegten Spannung entstehen positiv oder negativ geladene Tröpfchen, die durch Verdampfen des Fließmittels weiter verkleinert werden und aus denen dann Ionen freigesetzt werden (Abb. 2.9). Auf die näheren thermodynamischen Prozesse und physikalischen Grundlagen der Elektrospray-Ionisierung soll hier nicht eingegangen werden. Die hier beschriebene ESI stellt ein derzeit gängiges und gut verstandenes Modell dar. In der Literatur werden jedoch weitere theoretische Beschreibungen angesprochen und diskutiert¹³⁷.

ESI ist vor allem für polare, ionische Analyte geeignet, kann jedoch für eine Vielzahl von Verbindungen genutzt werden. Es scheint keine Limitierung in der Größe der Moleküle zu geben, die durch ESI ionisierbar sind. Es gilt aber zu beachten, dass die Ionenausbeute durch Puffer beeinflusst werden kann. So kann die Quantifizierung von Proben mit hohem Salzgehalt ($> 1 \text{ mM}$) problematisch sein. Auch Matrixeffekte führen bei der ESI häufiger zu Signalsuppressionseffekten als bei der APCI, da die Ionisierung des Analyten aufgrund von Konkurrenzreaktionen unterdrückt werden kann¹³⁸.

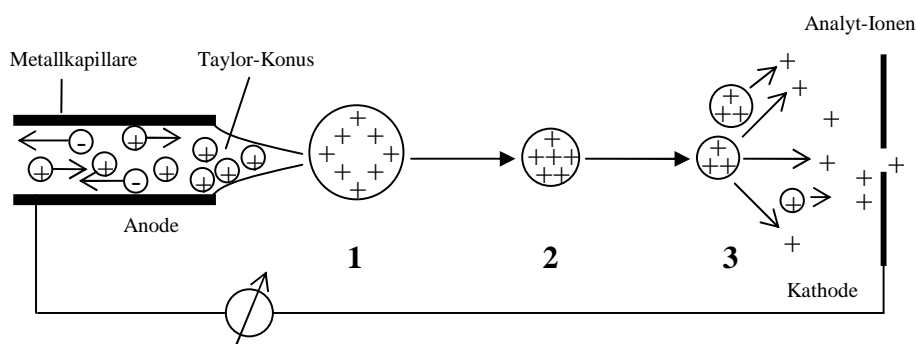


Abb. 2.9: Schematische Darstellung der Bildung positiv geladener Ionen mittels ESI in drei Stufen¹³⁹:
 1 Bildung geladener Lösungsmitteltröpfchen am Ende der Kapillare, 2 Reduzierung der Größe der Lösungsmitteltröpfchen bis zum Überschreiten des Raleigh-Limits, 3 Bildung freier Ionen in der Gasphase nach Coulomb-Explosionen

Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI)

Im Gegensatz zur ESI findet die Ionisierung bei der APCI nicht zwingend in der flüssigen Phase sondern in der Gasphase durch chemische Ionisierung statt. Der Analyt wird dabei samt Fließmittel, unterstützt durch ein Zerstäubergas, in eine auf bis zu 550° C erhitzte Quarzkapillare gesprüht. Dies führt zu einer schnellen Verdampfung des Fließmittels. Um die thermische Zersetzung des Analyten an der Kapillarwand zu verhindern, wird diese von innen mit einem Hilfsgas umspült. Auf diese Weise in die Gasphase überführte Analyten gelangen im Gasstrom zu einer Corona-Entladungsnadel („Corona discharge needle“). Wenn an diese eine hohe Spannung angelegt wird, entstehen durch elektrische Entladung Elektronen, welche auf die im Überschuss vorliegenden Moleküle des Stickstoffgasstromes und des Fließmittels treffen. Anschließend kommt es zur Ionisierung durch einen Protonentransfer zwischen den ionisierten Fließmittelmolekülen und dem Analyten. Voraussetzung für diesen Transfer ist, dass der Analyt [M] eine höhere Protonenaffinität als das Fließmittel [F] hat¹⁴⁰:



Im negativen Ionisierungsmodus werden an der Corona-Entladungsnadel durch Elektronen Superoxidationen $[O_2^-]$ erzeugt, welche Protonen von stärkeren Säuren aufnehmen und so negativ geladene Analyt-Ionen erzeugen.

Abb. 2.10 zeigt das Prinzip der Bildung positiver Ionen durch APCI.

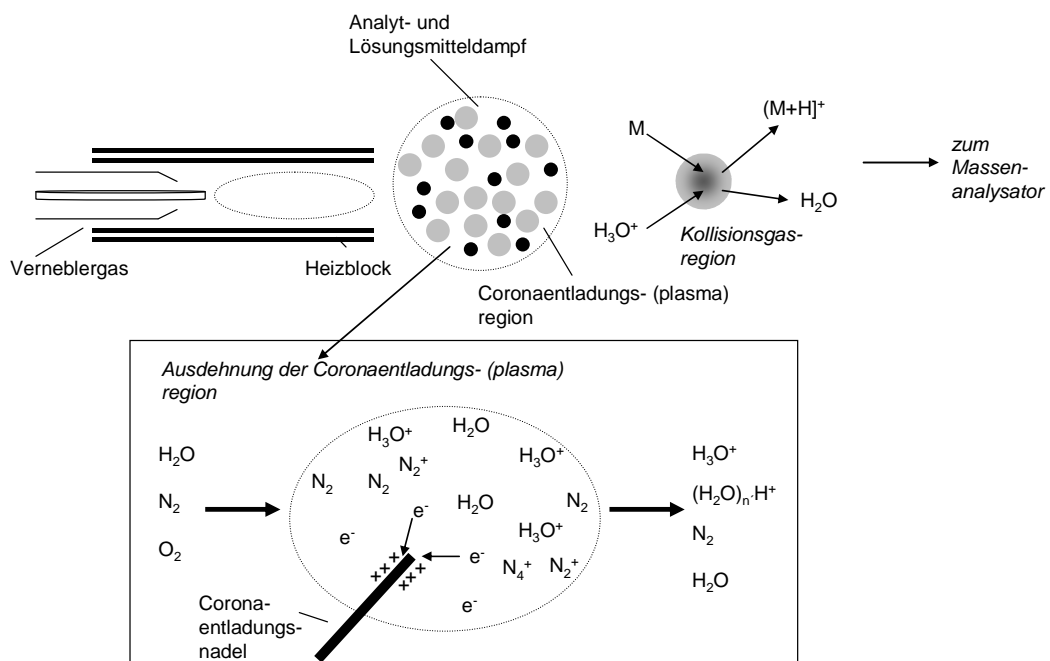


Abb. 2.10: Bildung positiver Ionen mittels APCI^{139,141}

Auch die APCI ist ein schonendes Ionisierungsverfahren. Allerdings sollten die Analyten aufgrund der im Vergleich zur ESI höheren thermischen Belastung eine gewisse Thermostabilität aufweisen. Weiterhin reagiert die APCI weniger empfindlich auf Matrixbelastungen. Dagegen ist eine Flussrate von mindestens 0,2 ml/min notwendig, die aber auf bis zu 2 ml/min gesteigert werden kann. Unpolare Substanzen können mit der APCI meist besser ionisiert werden als mit der ESI. Limitierungen ergeben sich aber beim Molekulargewicht von Verbindungen. Da im Gegensatz zur ESI bevorzugt einfach geladene Ionen erzeugt werden, ist die APCI hauptsächlich für Verbindungen von bis zu 1500 u geeignet^{136,138}.

2.3.3.2 Massenanalytoren

Nach der Beschleunigung der Ionen aus der Ionenquelle durch ein schwaches elektrisches Feld werden diese durch ein Potentialgefälle weiter beschleunigt, durch eine Eintrittsöffnung des Massenanalytators geleitet und durch elektrostatische Felder fokussiert. Die Geschwindigkeit der Ionen hängt von ihrer Masse, ihrer Ladung und der Beschleunigungsspannung ab. Zur Trennung von Ionen unterschiedlicher Massen kommen verschiedene Prinzipien zum Einsatz, von denen hier nur die gängigsten angesprochen werden.

Die vom Konzept her einfachsten Massenanalytoren sind die Flugzeitanalytoren („Time of flight“, TOF). Sie nutzen die Tatsache, dass die Geschwindigkeit von Ionen gleicher Ladung massenabhängig ist, wenn diese mit der gleichen Energie beschleunigt werden. TOF-Analytoren arbeiten gepulst und werden häufig mit der ebenfalls gepulsten Matrix-unterstützten-Laser-Desorptions-Ionisierung (MALDI) gekoppelt¹³⁸.

Ein weiterer Massenanalytoren ist die Ionenfalle („Ion-trap“) (Abb. 2.11), von der mehrere Varianten existieren. Die Ionen werden in einem dreidimensionalen Raum durch elektrische Felder, die von einer Ringelektrode erzeugt werden, auf berechenbaren stabilen Bahnen gehalten. Durch Veränderung der Spannungen werden Ionen einer bestimmten Masse destabilisiert und gezwungen die Ionenfalle zu verlassen, wodurch sie detektiert werden können. Es ist möglich Ionen einer bestimmten Masse in der Falle zu isolieren und durch resonante Anregung und der damit verbundenen Erhöhung derer Geschwindigkeit eine Fragmentierung durch ein Kollisionsgas zu erreichen. Die gebildeten Fragment-Ionen können dann wiederum stabilisiert, isoliert und erneut fragmentiert werden. Dieser Vorgang kann theoretisch n-fach (MS^n) wiederholt werden, wodurch höhere Zerfallsspektren zustande kommen. Der limitierende Faktor ist dabei die Menge der in der Falle befindlichen Ionen. Dreidimensionale Ionenfallen haben durch ihr einfaches Design und den moderaten Preis einen festen Platz in der Routineanalytik eingenommen. Die Auflösung von Ionenfallen ist mit der von Quadrupol-Massenanalytoren vergleichbar (1 u). Gleiches gilt für die Massengenauigkeit (0,1 u) und den Massenbereich (50-2000 u). Vorteile der Ionenfalle sind die hohe Empfindlichkeit beim Messen eines Massenbereichs (Scan). Ionenfallen arbeiten gepulst, da immer nur eine bestimmte Anzahl an Ionen in dem

dreidimensionalen Raum gehalten werden kann. Bei der Quantifizierung entstehen dadurch häufiger Probleme als bei kontinuierlich arbeitenden Massenanalysatoren^{136,138}.

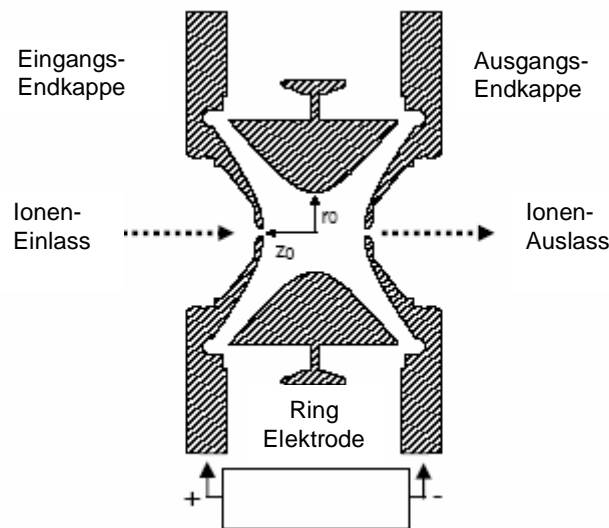


Abb. 2.11: Schematischer Aufbau einer dreidimensionalen Ionenfalle

Bei der linearen Ionenfalle werden die Ionen nicht in einem dreidimensionalen sondern in einem zweidimensionalen Quadrupolfeld gehalten. Ein zusätzliches Randfeld wird angelegt, um die Ionen in der Falle zu halten. Die Speicherkapazität der Ionenfalle und damit auch die Nachweisempfindlichkeit kann dadurch erhöht werden.

Die Robustheit und einfache Handhabung im Dauerbetrieb haben den Quadrupol zu dem wohl am weitest verbreiteten Massenanalysator werden lassen. Dieser besteht aus vier parallel angeordneten Stäben zwischen denen jeweils eine Wechsel- und eine Gleichspannung anliegen. Gegenüberliegende Stäbe haben dabei die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung. Durch die Variation der Wechsel- und Gleichspannung wird erreicht, dass nur Ionen mit einem bestimmten Masse-Ladungs-Verhältnis den Quadrupol passieren können. Die übrigen Ionen werden auf ihrer Bahn destabilisiert und an den Quadrupol-Stäben entladen. Durch Variation der elektrischen Felder können Ionen mit unterschiedlichen Massen nacheinander auf stabile Flugbahnen gebracht und detektiert werden (Abb. 2.12).

Quadrupol-Massenanalysatoren können ähnlich wie Ionenfallen für einen Massenbereich von 50 bis 2000 u eingesetzt werden. Beim Messen eines Massenbereichs sind sie den Ionenfallen unterlegen, das Messen einer einzelnen Masse jedoch erfolgt mit höherer Empfindlichkeit. Quadrupol-Massenanalysatoren können kontinuierlich messen, wodurch mehr Datenpunkte als bei den diskontinuierlich messenden Ionenfallen generiert werden, was bei der Quantifizierung von Vorteil ist.

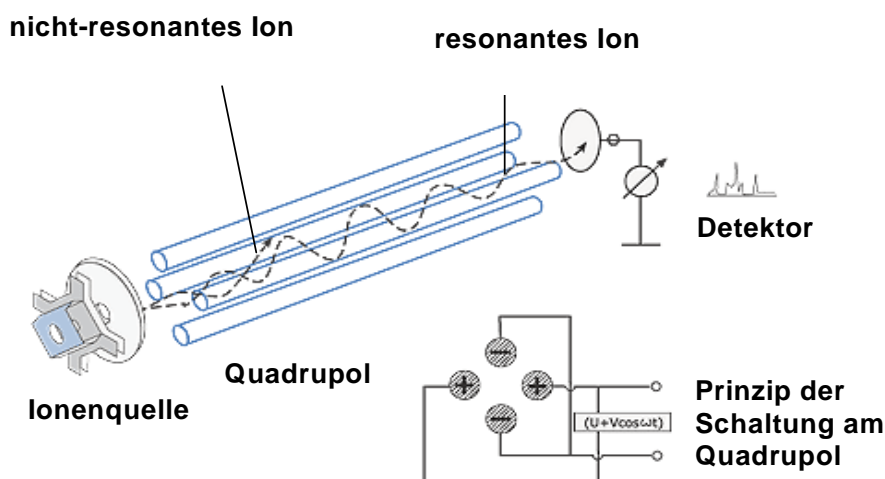


Abb. 2.12: Arbeitsprinzip eines Quadrupols¹⁴²

In modernen Geräten werden häufig mehrere Analysatoren miteinander gekoppelt angewandt. Weit verbreitete Kopplungen sind die eines Quadrupols mit einem Flugzeitanalysator (QTOF), mehrerer Quadrupole miteinander (Triple-Quadrupol, QqQ) sowie eines Quadrupols mit einer linearen Ionenfalle (QTrap). Die lineare Ionenfalle der QTrap kann auch als Quadrupol fungieren, weswegen QTraps auch als QqQ eingesetzt werden.

Durch die Kopplung mehrerer Quadrupol-Massenanalysatoren können neben der Massenaufklärung auch Strukturinformationen gewonnen werden. Beim Produkt-Ionen-Scan wird im ersten Quadrupol (Q1) die Masse eines Ions herausgefiltert. Bevor das Molekül in den zweiten Quadrupol (Q3) gelangt, passiert es eine Kollisionszelle (q2), in die ein Kollisionsgas eingeleitet werden kann. Das primär gebildete Ion zerfällt nach einer Kollision mit dem inerten Gas (Argon oder Stickstoff) in ein oder mehrere Fragmente (Produkt-Ionen), welche im zweiten Quadrupol (Q3) erneut gefiltert werden können. Diese Art der Fragmentierung wird Kollisions-induzierte-Dissoziation (CID) genannt. CID kann zum Verlust eines Neutralteilchens führen, aber auch die Bildung von Radikalen ist möglich. Welches Produkt-Ion in welchem Ausmaß entsteht, hängt maßgeblich von der Kollisionsenergie ab. Diese kann durch die Beschleunigung der Ionen in die Kollisionszelle und die Teilchendichte des Kollisionsgases beeinflusst werden. Beim Neutralverlust-Scan wird eine fest eingestellte Massendifferenz (Abspaltung eines Neutralteilchens im q2) zwischen Q1 und Q3 registriert. Beim Vorläufer-Ionen-Scan wird im Q3 ein festgelegtes, durch CID im q2 entstandenes, Produkt-Ion beobachtet. Wenn dies entsteht, wird auf die entsprechende Vorläufer-Masse geschlossen. Bei der Quantifizierung wird aufgrund seiner Selektivität häufig der MRM („Multiple reaction monitoring“)-Modus gewählt. Im Q1 selektierte Ionen einer bestimmten Masse werden im q2 fragmentiert und ein oder mehrere bestimmte

Fragmente im Q3 wiederum selektiert. In Abb. 2.13 ist eine Übersicht über die MS/MS-Modi dargestellt.

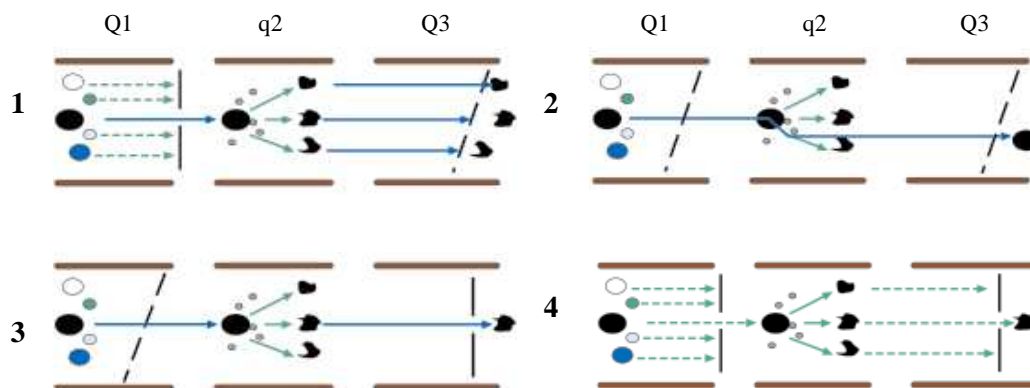


Abb. 2.13: MS/MS-Modi eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers¹⁴³, 1 Produkt-Ionen-Scan, 2 Neutralverlust-Scan, 3 Vorläufer-Ionen-Scan, 4 MRM

Bei einer QTrap sind die Messmodi des Triple-Quadrupols um einige Varianten erweitert. So kann der Q3 als lineare Ionenfalle mit hoher Scan-Sensitivität und -Geschwindigkeit oder hoher Auflösung genutzt werden. Wenn der Q3 bei einem Produkt-Ionen-Scan als lineare Ionenfalle im Scan-Modus fungiert, kann dessen erhöhte Speicherkapazität für Ionen zu einer besseren Empfindlichkeit bei der Detektion von Produkt-Ionen führen.

3 Material und Methoden

3.1 Analytik

Im Folgenden werden in der Analytik verwendete Referenzsubstanzen, hergestellte Lösungen sowie in der Arbeit angewandte analytische und mathematische Methoden aufgeführt.

3.1.1 Referenzsubstanzen und hergestellte Lösungen

3.1.1.1 Referenzsubstanzen

<u>Standards (Reinheit > 99 %, HPLC)</u>	Phytoplant, Deutschland
KBA	11-Keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 0212301, 06080202)
AKBA	3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 0212201, 06080402)
β BA	β -Boswelliasäure (Ch. B.: 0503502)
A β BA	3-Acetyl- β -boswelliasäure (Ch. B.: 0408202)
α BA	α -Boswelliasäure (Ch. B.: 0408102)
A α BA	3-Acetyl- α -boswelliasäure (Ch. B.: 0301701)

<u>Interner Standard</u>	Aldrich, USA
ASI	Asiatische Säure (Ch.B.: 13603AO)

Stamm- und Arbeitslösungen

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden bekannte Mengen von etwa 10 mg des jeweiligen Standards und des internen Standards eingewogen und mit Methanol auf ein Volumen von 10,0 ml gebracht. Die Arbeitslösungen für die Kalibrierfunktion und die Qualitätskontrollproben wurden aus den Stammlösungen von KBA (Ch. B.: 0212301) und AKBA (Ch. B.: 0212201) durch Verdünnen mit Methanol gewonnen. Die Kalibrierfunktion aus Plasma, Leber und Hirn wurde in den Konzentrationen 1500, 1200, 1000, 750, 500, 100, 50, 10, 5 ng/40 μ l hergestellt. Die Konzentrationen der Arbeitslösungen für die Qualitätskontrollproben aus Plasma und Leber betragen 1300, 800 und 15 ng/40 μ l und die aus Hirn 800, 400 und 15 ng/40 μ l. Die Asiatische Säure wurde in einer Konzentration von 5 μ g/25 μ l Methanol angewendet. Eine methanolische Lösung von jeweils 5 μ g/ml KBA, AKBA und Asiatischer Säure wurde zur Überprüfung der Systemeignung der LC-MS-Messgeräte hergestellt. Die Stamm- und Arbeitslösungen wurden bei einer Temperatur von -20° C gelagert.

3.1.1.2 Kalibrierstandard-, Qualitätskontroll- und Analysenproben

Citratplasma	Blutspendedienst Frankfurt, Deutschland
Schweineleber	Metzgerei Friedrich Schreiber, Deutschland
Schweinehirn	Metzgerei Friedrich Schreiber, Deutschland

Herstellung des Tris-Puffers (5 mM, pH 7,4)

Es wurden 605,7 mg Tris-Base eingewogen, in ein 2 l Becherglas mit Magnetrührer überführt, mit bidestilliertem Wasser auf ca. 900 ml aufgefüllt und gelöst. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 7,4 wurde die Lösung mit bidestilliertem Wasser auf 1 l gebracht.

Herstellung der Schweinelebersuspension

Frische Schweineleber wurde mit Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) gespült, wobei das Gewebe kühl gehalten werden musste. 1,0 g-1,2 g Leber wurden mit der entsprechenden Menge Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) versetzt, so dass 1 ml Puffer 100 mg Lebermatrix enthielt. Die Homogenisierung erfolgte in einer Potter-Apparatur bei 1100 Umdrehungen pro Minute (Upm). Die erhaltene Suspension wurde in 15 ml Falcon Röhrchen überführt und bei -20° C gelagert.

Herstellung der Schweinehirnsuspension

Frisches Schweinehirn wurde von der äußeren Hirnhaut und den Blutgefäßen mit einer Pinzette befreit und mit Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) gespült. Es wurde darauf geachtet, dass das Hirn während des gesamten Bearbeitungszeitraums kühl gehalten wurde. 1,0 g-1,3 g Hirnmaterial wurden mit der entsprechenden Menge Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) versetzt, so dass 100 mg Hirnmatrix auf 1 ml Puffer kommen. Die Homogenisierung erfolgte in einer Potter-Apparatur bei 1100 Upm. Die erhaltene Suspension wurde in 15 ml Falcon Röhrchen überführt und bei -20° C gelagert.

Kalibrierstandards

Vor jeder Probenaufarbeitung wurden 1 ml Plasma, 1 ml Schweinehirn- oder Schweinelebersuspension mit 40 µl der entsprechenden Arbeitslösung (KBA und AKBA) und 25 µl Arbeitslösung mit internem Standard (Asiatische Säure) für die Kalibrierfunktion dotiert.

Qualitätskontrollproben

Zur Herstellung der Qualitätskontrollproben für Plasma, Schweinehirnsuspension und Schweinelebersuspension wurden 125 ml der jeweiligen Matrix mit 5 ml der entsprechenden Arbeitslösung für Qualitätskontrollproben versetzt und 5 min kräftig gerührt. Aus diesem Vorrat wurden Aliquote von 1040 µl entnommen, in Braunglas Schraubdeckel-Probengläser überführt und bis zur Extraktion bei -20° C gelagert.

Analysenproben

Alle zu untersuchenden Proben wurden bei -20° C gelagert. Zur Untersuchung wurden die Proben im Wasserbad bei 25° C aufgetaut und homogenisiert. Zur Extraktion wurde je 1 ml entnommen.

3.1.2 Analytische Methoden

3.1.2.1 Quantitative LC-MS-Methode

Chromatographische Bedingungen (PE Series 200)

Mobile Phase:	Methanol : Wasser : Eisessig (80:10:4, v/v/v)
Säule:	Hypersil BDS C-18, 5 µm, 150*4,0 mm
Temperatur:	40° C
Flussrate:	1 ml/min
Injektionsvolumen:	50 µl
Chromatographiedauer:	7 min
Autosamplertemperatur:	10° C

Massenspektrometrische Bedingungen (API 300)Ionenquellenabhängige Parameter

Ionisierung	APCI		
Polarität	Positiv		
Messmodus	MRM		
Massenübergänge	KBA:	471,3 → 95,2	
	AKBA:	513,3 → 95,3	
	ASI:	489,3 → 205,1	
Temperatur	425° C		
Stromstärke an der Corona	3,0 µA		

Substanzabhängige Parameter

	<u>KBA</u>	<u>AKBA</u>	<u>ASI</u>
Declustering Potential	36,0	31,0	1,0
Focusing Potential	170,0	170,0	110,0
Entrance Potential (V)	12,0	9,5	6,0
Collision cell entrance Potential (V)	20,0	20,0	18,0
Collision Energie (V)	47,0	51,0	25,0
Collision cells exit Potential (V)	6,0	6,0	10,0

Quantifizierung

Der Gehalt der Analyseproben wurde mittels gewichteter Regression der Kalibrierfunktion berechnet. Der Wichtungsfaktor $1/x^2$ erwies sich dabei als am besten geeignet.

Akzeptanzkriterien eines Analysenlaufs

Für die Auswertung eines Laufs mussten mindestens 5 von 7 (Läufe mit Hirngewebe) bzw. 6 von 9 (Läufe mit Plasma bzw. Lebergewebe) der zurückgerechneten Ergebnisse der Kalibrierfunktion innerhalb von $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ an der unteren Quantifizierungsgrenze, „Lower limit of quantification“, LLOQ) des nominalen Konzentrationswerts liegen. Aus der Kalibrierfunktion ausgeschlossene Werte durften das Wichtungsmo- dell der Regressionsberechnung nicht verändern. Gefordert war weiterhin ein Korrelationskoeffizient von größer als 0,985. Von den innerhalb eines Laufs verteilten Qualitätskontrollproben sollten mindestens zwei Drittel auswertbar sein und nicht um mehr als 15 % von ihrer nominalen Konzentration abweichen. Innerhalb eines Konzentrationsniveaus dürfen nicht mehr als die Hälfte der Qualitätskontrollproben außerhalb von $\pm 15\%$ der nominellen Konzentration liegen.

3.1.2.2 Qualitative LC-MS-Methode 1

Chromatographische Bedingungen (Agilent 1100)

Mobile Phase:	A: Wasser : Methanol (99:1, v/v)
	B: Methanol : Wasser (99:1, v/v)
Säule:	Ultracarb ODS (30), 5 μm , 3.2*30 mm
Temperatur:	RT
Flussrate:	0,6 ml/min
Injektionsvolumen:	10 μl
Chromatographiedauer:	22 min
Autosamplertemperatur:	10° C

Gradienten: KBA, AKBA			αBA , βBA , $\text{A}\alpha\text{BA}$, $\text{A}\beta\text{BA}$		
t (min)	A (%)	B (%)	t (min)	A (%)	B (%)
0→12	50→0	50→100	0→10	50→0	50→100
12→16	0	100	10→16	0	100
16→17	0→50	100→50	16→17	0→50	100→50
17→22	50	50	17→22	50	50

Massenspektrometrische Bedingungen (QTrap 4000)Ionenquellenabhängige Parameter

Ionisierung	APCI
Polarität	Negativ
Temperatur	450° C
Stromstärke an der Corona	-3,0 µA
Interface heater	an

Substanzabhängige Parameter

	<u>KBA</u>	<u>AKBA</u>	<u>αBA</u>	<u>βBA</u>	<u>AαBA</u>	<u>AβBA</u>
Declustering Potential (V)	-120	-85	-170	-170	-65	-65
Entrance Potential (V)	-10	-10	-10	-10	-10	-10
Kollisionsenergie (V)	-55	-20	-50	-50	-20	-20

3.1.2.3 Qualitative LC-MS-Methode 2

Chromatographische Bedingungen (PE Series 200)

Mobile Phase:	A: Wasser : Methanol (99:1, v/v)
	B: Methanol : Wasser (99:1, v/v)
Säule:	Hypersil BDS C-18, 5 µm, 150*4,0 mm
Temperatur:	RT
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Chromatographiedauer:	20 min
Autosamplertemperatur:	10° C

Gradient:

t (min)	A (%)	B (%)
0→5	30→0	70→100
5→10	0	100
10→11	0→30	100→70
11→20	30	70

Massenspektrometrische Bedingungen (API 300)Ionenquellenabhängige Parameter

Ionisierung	APCI
Polarität	Negativ
Temperatur	425° C
Stromstärke an der Corona	-3,0 µA

Substanzabhängige Parameter

	<u>KBA</u>	<u>AKBA</u>
Declustering Potential	-41,0	-1,0
Focusing Potential	-180,0	-120,0
Entrance Potential (V)	-6,0	-3,0

3.1.2.4 HPLC-UV-Methode 1 (Bestimmung von KBA und AKBA in diversen Zubereitungen in Anlehnung an die Monographie „Indischer Weihrauch“ Ph.Eur. 5.7)

Chromatographische Bedingungen (PE Series 200)

Mobile Phase:	A: Wasser : Phosphorsäure (99,9:0,1, v/v)
	B: Acetonitril : Phosphorsäure (99,9:0,1, v/v)
Säule:	Nucleodur Sphinx C-18, 5 µm, 250*4,0 mm
Temperatur:	RT
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Chromatographiedauer:	45 min
Detektionswellenlänge:	250 nm
Autosamplertemperatur:	10° C
Gradient:	

t (min)	A (%)	B (%)
0 → 12,5	20 → 6	80 → 94
12,5 → 13,5	6 → 0	94 → 100
13,5 → 28	0	100
28 → 30	0 → 20	100 → 80
30 → 45	20	80

3.1.2.5 HPLC-UV-Methode 2 (Bestimmung der Konzentration von KBA und AKBA in diversen Medien und Lösungen)

Chromatographische Bedingungen (PE Series 200)

Mobile Phase:	A: Wasser : Phosphorsäure (99,9:0,1, v/v)
	B: Acetonitril : Phosphorsäure (99,9:0,1, v/v)
Zusammensetzung:	A : B (20:80, v/v)
Säule:	Nucleodur Sphinx C-18, 5 µm, 250*4,0 mm
Temperatur:	40° C
Flussrate:	1,0 ml/min
Injektionsvolumen:	50 µl
Chromatographiedauer:	9 min
Detektionswellenlänge:	250 nm
Autosamplertemperatur:	RT

3.1.2.6 HPLC-UV-Methode 3 (Bestimmung von 7-Ethoxycoumarin, 7-Hydroxycoumarin und 7-Hydroxycoumarinsulfat in Hepatozyten)

Chromatographische Bedingungen (PE Series 200)

Mobile Phase: A: Wasser : Methanol : Trifluoressigsäure
(99:1:0,1, v/v/v)
B: Methanol : Wasser : Trifluoressigsäure
(99:1:0,1, v/v/v)

Säule: Nucleodur Sphinx C-18, 5 µm, 250*4,0 mm

Temperatur: 45° C

Flussrate: 1,0 ml/min

Injektionsvolumen: 50 µl

Chromatographiedauer: 25 min

Detektionswellenlänge: 320 nm

Autosamplertemperatur: 10° C

Gradient:

t (min)	A (%)	B (%)
0→10	80→35	20→65
10→14	35	65
14→15	35→80	65→20
15→25	80	20

3.1.2.7 HPLC-UV-Methode 4 (Bestimmung von Propranolol aus Caco-2-Zellen)

Chromatographische Bedingungen (PE Series 200)

Mobile Phase: A: Natriumdihydrogenphosphatlösung
(0,1 M, pH 3)
B: Methanol

Zusammensetzung: A : B (40:60, v/v)

Säule: Purospher C-18e, 5µm, 125*4,0 mm

Temperatur: RT

Flussrate: 0,8 ml/min

Injektionsvolumen: 20 µl

Chromatographiedauer: 6 min

Detektionswellenlänge: 230 nm

Autosamplertemperatur: 10° C

3.1.3 Statistische und mathematische Methoden

Standardabweichung s

$$s = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x_i)}{n-1}} \quad (3.1)$$

\bar{x} : Mittelwert
 x_i : Einzelwert
 n : Größe der Stichprobe

Variationskoeffizient CV (%)

$$CV = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad (3.2)$$

s : Standardabweichung
 x : Mittelwert

Relative Wiederfindung R_{rel}

$$R_{rel} = \frac{\bar{x}_{extr.}}{x_{ref}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

\bar{x}_{extr} mittlere Wiederfindung aus Matrix
 (Dotiert vor Extraktion)
 x_{ref} Wiederfindung aus Matrix
 (Dotiert nach Extraktion)

Richtigkeit d_{rel} (bias)

$$d_{rel} = \frac{|x_{soll} - \bar{x}|}{x_{soll}} \cdot 100 \quad (3.4)$$

\bar{x}_{soll} Sollwert (nominal)
 \bar{x} Mittelwert

Korrelationskoeffizient r

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{\frac{1}{2}}} \quad (3.5)$$

x_i Einzelwert Variable 1
 \bar{x} Mittelwert Variable 1
 y_i Einzelwert Variable 2
 \bar{y} Mittelwert Variable 2

t-Test

Statistische Vergleiche von Mittelwerten wurden mittels unpaarigen zweiseitigen t-Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 95 % festgelegt. Zur Auswertung wurde die Software „GraphPad Prism“ version 4.00 für Windows eingesetzt.

3.2 Bioanalytische Untersuchungen zur Auswirkung der Löslichkeit von Weihrauchpräparaten auf die *in vivo*-Konzentrationen von KBA und AKBA

Im Folgenden werden die Substanzen und die angewandten Methoden aufgeführt, die bei der Durchführung der Tierversuche zu den Kinetikuntersuchungen und darauf folgender Probenaufarbeitung genutzt wurden.

3.2.1 Substanzen und untersuchte Tiere

3.2.1.1 Referenzsubstanzen (siehe 3.1.1.1)

3.2.1.2 Prüfsubstanzen

Boswellia serrata Extrakt N.N.

Nanoskalige *Boswellia serrata* Formulierung
(enthält 10 % *Boswellia serrata* Extrakt) N.N.

3.2.1.3 Untersuchte Tiere

Albino Wistar-Ratten, weiblich

(Gewicht 105 g-153 g) Charles river laboratories,
Großbritannien

3.2.2 Humane Plasma- und Tumorproben

Plasma- und Tumorproben von 27 Glioblastom-Patienten (2 Tumorproben) wurden von der Neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Giessen und Marburg GmbH zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden unter Einhaltung der Kühlkette von Giessen nach Eschborn versendet. Nach Eingang im Zentrallabor Deutscher Apotheker (ZL) wurden die Tumorproben in Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) homogenisiert (1 ml Puffer enthält 100 mg Tumorgewebe) und bis zur Aufarbeitung bei -20° C gelagert.

3.2.3 Bestimmung der Löslichkeit

Für den Bezugswert (100 % Löslichkeit) wurden KBA, AKBA und die Prüfsubstanzen zu 10 µg/ml in Methanol gelöst.

Löslichkeit von KBA und AKBA als Reinsubstanzen

Es wurden 250 µl der Stammlösungen (3.1.1.1) von KBA und AKBA unter Stickstoffstrom bei 40° C zur Trockene eingengt und in 500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen.

Die Lösungen wurden mit Krebs-Ringer-Puffer pH 7,4 (KRB) auf ein Volumen von 25 ml gebracht, so dass der DMSO-Gehalt einer Konzentration von 2 % entsprach. Die Lösungen wurden anschließend in 50 ml Erlenmeyerkolben bei 120 Upm und 37° C im Wasserbad eine Stunde lang geschüttelt, in Falcon-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur und 8000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Probengläser überführt und der Gehalt von KBA und AKBA mittels HPLC-UV-Methode 2 (3.1.2.5) bestimmt.

Löslichkeit von KBA und AKBA aus dem Extrakt und der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung

530,5 mg des *Boswellia serrata* Extrakts wurden mit 20 ml Methanol versetzt, 10 min lang im Ultraschallbad behandelt und für 30 min bei 120 Upm geschüttelt. Von dieser Suspension wurde ein Aliquot abgenommen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 2000 g zentrifugiert. Mit 250 µl des Überstandes wurde verfahren wie unter „Löslichkeit von KBA und AKBA als Reinsubstanzen“ beschrieben.

66,3 mg der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung wurden im Wasserbad auf 37° C erwärmt und in 20 ml 37° C warmen KRB mit 2 % DMSO durch Rühren eingearbeitet. Sobald die Formulierung gelöst war, wurde mit KRB (2 % DMSO) zu 25 ml ergänzt. Der Gehalt von KBA und AKBA wurde mittels HPLC-UV-Methode 2 (3.1.2.5) bestimmt.

3.2.4 Tierversuch

Alle Tierexperimente erfolgten in Konformität mit den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes (Deutsches Tierschutzgesetz, BGBl 1998, Part I, No.30, S.1105 ff.).

Weibliche Albino Ratten wurden unter Standardbedingungen an der Universität Frankfurt gehalten. Sie erhielten Standardtierfutter und Wasser zur freien Verfügung.

Es wurden zwei wässrige Agarosegelsuspensionen 0,2 % (w/v) mit jeweils einer der Prüfsubstanzen (*Boswellia serrata* Extrakt, nanoskalige *Boswellia serrata* Formulierung) hergestellt. Als Placebo wurde eine wässrige Agarosegelsuspension 0,2 % (w/v) verwendet. Den 5 Tieren der Kontrollgruppe wurden 0,5 ml der Placebosuspension via Schlundsonde verabreicht. Es wurden 2 Verumgruppen von jeweils 15 Tieren gebildet. Via Schlundsonde wurde jeweils eine Gruppe mit einer der zwei Prüfsubstanzen in einer Einmaldosis von 240 mg/kg Körpergewicht gefüttert, wobei ein maximales Volumen von 0,6 ml nicht überschritten wurde. 2, 4 und 6 h nach oraler Gabe wurden jeweils 5 Tiere jeder Verumgruppe mittels Guillotine getötet. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden nach 2,5 h dekapitiert.

Das Hirn wurde entnommen, mit Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) gewaschen und von der äußeren Hirnhaut und den Blutgefäßen befreit. Nach dem Wiegen (1,00 g-1,28 g) wurde das gesamte Gehirn in Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) in der Potter-Apparatur

homogenisiert (1 ml Puffer enthält 100 mg Gehirn). Die Hirnsuspensionen wurden bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Die Leber wurde entnommen und mit Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) gewaschen. 1,00 g-1,20 g Leber wurden abgewogen und im Folgenden wurde wie mit den Hirnsuspensionen verfahren. Die restliche Leber wurde ebenfalls bei -20°C gelagert. Das bei der Dekapitation gewonnene Blut wurde in Röhrchen, welche zur Vermeidung der Koagulation 0,03 ml Heparin (50 IE/ml) enthielten, aufgefangen und für 10 min (2000 g , 4°C) zentrifugiert. Die aus dem Überstand erhaltene Plasmafraktion wurde abgenommen und bei -20°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

3.2.5 Probenaufarbeitung

Die Analysenproben, die Qualitätskontrollproben sowie die jeweiligen Matrices zur Erstellung der Kalibriergeraden und der Blank-Proben (Plasma, Schweineleber-, bzw. Schweinehirnsuspension) wurden vor der Analyse im Wasserbad bei 20°C aufgetaut. Für die Kalibrierfunktion wurden 1 ml Aliquote der jeweiligen Matrices mit der entsprechenden Arbeitslösung dotiert. Die 1 ml Aliquote der Blind- und Analysenproben wurden mit $40\ \mu\text{l}$ Methanol versetzt, die Doppelblindproben mit $65\ \mu\text{l}$ Methanol. Kalibrierstandards, Qualitätskontrollproben, Analysenproben sowie die Blindproben wurden mit $25\ \mu\text{l}$ der Arbeitslösung des internen Standards versetzt. Nach dreiminütigem Schütteln bei 1000 Upm wurden die Proben 15 min lang auf mit $0,8\text{ g}$ Extrelut[®] NT gefüllte Glassäulen geladen. Die Analyte wurden anschließend mit 8 ml Extraktionsmittel (THF: n-Hexan: Ethylacetat: 2-Propanol; 160:160:160:15, v/v/v/v) eluiert, die aufgefangenen Lösungen unter Stickstoffstrom bei 40°C eingeengt und in $150\ \mu\text{l}$ Methanol aufgenommen. Nach Schütteln (3 min bei 1000-2000 Upm) und Behandeln der Proben im Ultraschallbad für 10 s konnten die Proben für 10 min (4°C und 2000 g) zentrifugiert werden. Der Überstand wurde mittels quantitativer LC-MS-Methode (3.1.2.1) analysiert.

3.3 Metabolismusuntersuchungen mit Lebermikrosomen

Im Folgenden werden die Substanzen, Lebermikrosomen und die angewandten Methoden aufgeführt, welche für die *in vitro*-Untersuchungen mit Lebermikrosomen und der darauf folgenden Probenaufarbeitung genutzt wurden. Um die Lebensfähigkeit der Lebermikrosomen nicht negativ zu beeinflussen, wurde bei allen durchgeführten Versuchen darauf geachtet, dass der Anteil an organischem Lösungsmittel in den Ansätzen 2 % nicht überstieg.

3.3.1 Substanzen und Lebermikrosomen

3.3.1.1 Referenzsubstanzen (siehe 3.1.1.1)

3.3.1.2	Prüfsubstanzen	Phytoflan, Deutschland
KBA	11-Keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 0212301)	
AKBA	3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 0212201)	
β BA	β -Boswelliasäure (Ch. B.: 0503502)	
A β BA	3-Acetyl- β -boswelliasäure (Ch. B.: 0408202)	
α BA	α -Boswelliasäure (Ch. B.: 0408102)	
A α BA	3-Acetyl- α -boswelliasäure (Ch. B.: 0301701)	

Arbeitslösungen

Jeweils 125 μ l der Stammlösungen (3.1.1.1) wurden mit einem Methanol-Wasser-Gemisch (50:50, v/v) zu 500 μ l verdünnt, so dass die resultierenden Arbeitslösungen eine Konzentration von 250 μ g/ml aufwiesen.

3.3.1.3 Lebermikrosomen und Cofaktoren

HLM, Mischprobe von mehr als 25 Spendern (Ch. B.: H161)	BD Biosciences, USA
RLM, Mischprobe von männlichen Sprague Dawley Ratten (Ch. B.: 045K0563)	Sigma, USA
NADPH-Regenerierungssystem-Lösung A (Ch. B.: 75632)	BD Biosciences, USA
NADPH-Regenerierungssystem-Lösung B (Ch. B.: 73002)	BD Biosciences, USA
UGT-Reaktionsgemisch-Lösung A (Ch. B.: 64196)	BD Biosciences, USA

UGT-Reaktionsgemisch-Lösung B
(Ch. B.: 56380)

BD Biosciences, USA

Herstellung der KH_2PO_4 -Pufferlösung 50 mM, pH 7,4

141,44 mg KH_2PO_4 und 562,32 mg Na_2HPO_4 wurden eingewogen, mit 90 ml bidestilliertem Wasser versetzt und gelöst. Nach Einstellen des pH-Werts auf pH 7,4 wurde mit bidestilliertem Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt.

3.3.2 Quantitativer Assay mit RLM und HLM

3.3.2.1 Metabolische Stabilität von KBA und AKBA, Phase-I-Reaktionen

Die bei -70°C gelagerten RLM und HLM wurden im Wasserbad bei 20°C aufgetaut. In einem Eppendorf Reaktionsgefäß wurden 217,5 μl KH_2PO_4 -Pufferlösung (50 mM, pH 7,4), 12,5 μl RLM bzw. HLM, 12,5 μl NADPH-Regenerierungssystem (NRS)-Lösung A und 2,5 μl NRS-Lösung B zusammen pipettiert, gemischt und im Wasserbad bei 37°C für 5 min vorinkubiert. Nachfolgend wurden 5 μl der Arbeitslösungen von KBA bzw. AKBA (3.3.1.2) zu den Inkubationsansätzen gegeben. Es wurde kurz gemischt und für 120 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die finalen Konzentrationen im Inkubationsansatz waren:

Prüfsubstanz	5 $\mu\text{g/ml}$
RLM bzw. HLM	1 mg/ml
<u>NRS-Lsg A:</u>	
MgCl_2	3,3 mM
NADP	1,3 mM
Glucose-6-phosphat	3,3 mM
<u>NRS-Lsg B:</u>	
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	0,4 U/ml

Kontrollinkubationen enthielten keine der NRS-Lösungen. Es wurde stattdessen eine höhere Menge an KH_2PO_4 -Pufferlösung, 232,5 μl , pipettiert. Nach je 15, 30, 60 und 120 min wurden von jedem Inkubationsansatz 50 μl abgenommen und mit 50 μl einer eiskalten Lösung Asiatischer Säure in Methanol (10 $\mu\text{g/ml}$) versetzt, um die Reaktion zu stoppen (die Kontrollinkubationen wurden nach 120 min gestoppt), anschließend gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und schließlich weitere 15 min bei 8000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand war direkt der Analytik zugänglich.

3.3.2.2 Metabolische Stabilität von KBA und AKBA, Phase-II-Glucuronidierung

Die bei -70°C gelagerten RLM und HLM wurden im Wasserbad bei 20°C aufgetaut. In einem Eppendorf Reaktionsgefäß wurden 162,5 μl bidestilliertes Wasser, 12,5 μl RLM

bzw. HLM, 20 µl UGT Reaktionsgemisch (UGT)-Lösung A und 50 µl UGT-Lösung B zusammen pipettiert, gemischt und im Wasserbad bei 37° C für 5 min vorinkubiert. Nachfolgend wurden 5 µl der Arbeitslösungen von KBA bzw. AKBA (3.3.1.2) zu den Inkubationsansätzen gegeben. Es wurde kurz gemischt und für 120 min im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Die finalen Konzentrationen im Inkubationsansatz waren:

Prüfsubstanz	5 µg/ml
RLM bzw. HLM	1 mg/ml
<u>UGT-Lsg A:</u>	
Uridin 5'-Diphospho- Glucuronsäure	2 mM
<u>UGT-Lsg B:</u>	
MgCl ₂	8 mM
Tris-HCl	50 mM
Alamethicin	25 µg/ml

Kontrollinkubationen enthielten keine der UGT-Lösungen. Es wurde stattdessen eine größere Menge an bidestilliertem Wasser, 232,5 µl, pipettiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 250 µl einer eiskalten Lösung Asiatischer Säure in Methanol (10 µg/ml) gestoppt, anschließend gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und schließlich weitere 15 min bei 8000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand war direkt der Analytik zugänglich.

3.3.3 Qualitativer Assay mit RLM

Die bei -70° C gelagerten RLM wurden im Wasserbad bei 20° C aufgetaut. In einem Eppendorf Reaktionsgefäß wurden 217,5 µl KH₂PO₄-Pufferlösung (50 mM, pH 7,4), 12,5 µl RLM, 12,5 µl NRS-Lösung A und 2,5 µl NRS-Lösung B zusammen pipettiert, gemischt und im Wasserbad bei 37° C für 5 min vorinkubiert. Nachfolgend wurden je 5 µl der sechs Arbeitslösungen (3.3.1.2) zu den Inkubationsansätzen gegeben, so dass jeder Ansatz eine der sechs Boswelliasäure-Prüfsubstanzen enthielt. Es wurde kurz gemischt und für 60 min im Wasserbad bei 37° C inkubiert. Die finalen Konzentrationen im Inkubationsansatz beliefen sich auf:

Prüfsubstanz	5 µg/ml
RLM	1 mg/ml
<u>NRS-Lsg A:</u>	
MgCl ₂	3,3 mM
NADP	1,3 mM
Glucose-6-phosphat	3,3 mM
<u>NRS-Lsg B:</u>	
Glucose-6-phosphat- dehydrogenase	0,4 U/ml

Kontrollinkubationen enthielten keine der NRS-Lösungen. Es wurde stattdessen eine höhere Menge an KH_2PO_4 -Pufferlösung, 232,5 μl , pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μl eiskaltem Methanol gestoppt, dann gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 8000 g und 4° C. Der Überstand wurde mittels Festphasenextraktion aufgereinigt.

3.3.4 Festphasenextraktion und Analytik

Zur Aufreinigung der zuvor gewonnenen Proben (3.3.3) wurden zunächst Oasis[®] HLB 1cc 10 mg Festphasenextraktionssäulen mit 1 ml Methanol und 2 ml bidestilliertem Wasser äquilibriert. Anschließend wurden zu je 400 μl der Probelösungen 600 μl bidestilliertes Wasser gegeben, so dass der Methanolgehalt 20 % betrug. Die Proben wurden auf die Säulen gegeben und mit 1 ml bidestilliertem Wasser gewaschen und schließlich mit 1 ml Methanol eluiert. Die aufgefangene Lösung wurde unter Stickstoffstrom bei 40° C zur Trockene eingeengt und in 400 μl eines Methanol-Wasser-Gemisches (50:50, v/v) aufgenommen, für 3 min bei 1000-2000 Upm geschüttelt und für 10 Sekunden im Ultraschallbad behandelt. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation (4° C und 2000 g) war der Überstand der Analytik zugänglich.

Die Bestimmung der KBA- und AKBA-Konzentrationen in den quantitativen Untersuchungen wurde mittels quantitativer LC-MS-Methode (3.1.2.1) durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Asiatischen Säure als Internem Standard (IS) und Bezug der KBA- bzw. AKBA-IS-Ratio der jeweiligen Zeitpunkte (15, 30, 60, 120 min) auf die KBA- bzw. AKBA-IS-Ratio zum Ausgangszeitpunkt (t-Null).

Für die Suche nach Metaboliten und deren Verifizierung im qualitativen Assay wurden die qualitativen LC-MS-Methoden 1 und 2 (3.1.2.2) angewandt.

3.4 Metabolismusuntersuchungen mit Hepatozyten

Im Folgenden werden die Substanzen, Lösungen und die Methoden aufgeführt, die bei der Isolierung der Hepatozyten sowie bei der Durchführung der Untersuchungen zur metabolischen Stabilität und anschließender Analytik angewandt wurden. Um die Lebensfähigkeit der Hepatozyten nicht negativ zu beeinflussen, wurde bei allen durchgeführten Assays darauf geachtet, dass der Anteil an organischem Lösungsmittel in den Ansätzen 0,9 % nicht überstieg.

3.4.1 Substanzen und Pufferlösungen

3.4.1.1 Referenzsubstanzen (siehe 3.1.1.1)

Standards für die Positivkontrolle

7-Ethoxycoumarin (Ch. B.: 126K3746)	Sigma, USA
7-Hydroxycoumarin (Ch. B.: 376-80B)	Supelco, USA
7-Hydroxycoumarin-Sulfat (Ch. B.: 116K3252)	Sigma, USA

3.4.1.2 Prüfsubstanzen

KBA	11-Keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 06080202)	Phytoplan, Deutschland
AKBA	3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 06080402)	

7-Ethoxycoumarin (Ch. B.: 126K3746)	Sigma, USA
-------------------------------------	------------

Prüflösungen

500 μ l der Stammlösungen (3.1.1.1) von KBA und AKBA wurden im Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft, in 90 μ l Methanol gelöst und mit 4910 μ l Krebs-Henseleit-Puffer (KHB) verdünnt. Die resultierenden Prüflösungen hatten Konzentrationen von 100 μ g/ml und einen Methanolanteil von 1,8 %.

Lösung für den Reaktionsstopp

1,25 ml Stammlösung (3.1.1.1) der Asiatischen Säure wurden mit Methanol zu 50 ml verdünnt. Die resultierende Lösung hatte eine Konzentration von 25 μ g/ml.

Lösung für die Positivkontrolle

Zur Herstellung einer Stammlösung wurden 19 mg 7-Ethoxycoumarin in Methanol gelöst und zu 5,0 ml verdünnt. 100 μ l dieser Stammlösung wurden mit KHB auf ein

Volumen von 10,0 ml gebracht. Die resultierende Lösung hatte eine Konzentration von 38 µg/ml und einen Methanolanteil von 1,0 %.

Herstellung des KHB pH 7,4 (incl. Fructose und Glycin)

D-Glucose	2,0 g
Magnesiumsulfat (wasserfrei)	0,141 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,16 g
Kaliumchlorid	0,35 g
Natriumchlorid	6,9 g
Calciumchlorid-dihydrat	0,373 g
Natriumhydrogencarbonat	2,1 g
Fructose	1,8 g
Glycin	0,225 g
Wasser	ad 1000 ml

Der pH Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Herstellung der Perfusionslösung (Tyrode-Lösung)

Stammlösung I (Natriumchlorid, 200 g/l; Kaliumchlorid, 5 g/l; Magnesiumchlorid-hexahydrat, 5,34 g/l)	40 ml
Stammlösung II (Natriumhydrogencarbonat, 50 g/l)	20 ml
Stammlösung III (Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, 6,55 g/l)	10 ml
Glucose-monohydrat	1,0 g
Wasser	ad 1000 ml

Der pH Wert sollte bei einer Temperatur von 37° C und Carbogenbegasung (O₂ 95 %, CO₂ 5 %) bei 7,4 liegen.

3.4.2 Isolierung der Hepatozyten aus Rattenleber

Die Isolierung der Hepatozyten wurde am Institut für Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt mittels Collagenase-Perfusion in Anlehnung an die Methode zur „Isolierung von Leber-Parenchymzellen der Ratte“ nach Berry *et al.* durchgeführt¹¹⁹.

Eine männliche Wistar-Ratte wurde mit Nembutal anästhesiert (100 mg/kg KG, i.p.) und das Abdomen geöffnet. Die Portalvene wurde kanüliert und eine Ligation der Vena cava inferior auf dem Niveau der renalen Venen vorgenommen. Die Perfusion der Leber erfolgte mit einer Perfusionslösung ohne Enzyme unter Zuhilfenahme einer Perfusionspumpe (Flussrate: ca. 2 ml/min). Die ersten 50 ml wurden verworfen. Sobald Zelltrümmer und Blutreste aus der Leber gespült waren, wurden 0,05 % Collagenase und 0,1 % Hyaluronidase zu der Perfusionslösung gegeben und die Perfusion fortgesetzt. Nach ca. 15 min trat Flüssigkeit durch die Leberoberfläche und sammelte sich im Bauchraum. Nach ca. 40 bis 45 min hatte sich die Farbe und Konsistenz der

Leber verändert, sie wurde heller und weicher. Der thoraxiale Bereich der Vena cava inferior wurde darauf hin durchtrennt, die Perfusion beendet und die Leber vorsichtig in eine mit Perfusionslösung (mit Enzymen) gefüllte Petrischale auf Eis gelegt. Die Leber wurde anschließend zerkleinert und die Suspension durch ein Nylonnetz filtriert. Das Filtrat wurde in Falcon-Röhrchen überführt und bei 50 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischer Perfusionslösung (ohne Enzyme) bei 4° C suspendiert. Der Anteil an lebenden Zellen wurde mittels Trypan-Blau-Färbung und anschließender Auszählung in einer Neubauerkammer bestimmt.

3.4.3 Assay mit Rattenhepatozyten

3.4.3.1 Metabolische Stabilität von KBA und AKBA

Die frisch isolierten Hepatozyten (3.4.2) wurden bei 100 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in KHB pH 7,4 (incl. Fructose und Glycin) bei 4° C resuspendiert, so dass eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml gegeben war. 100 µl dieser Zellsuspension wurden in 24-well Platten pipettiert und im Brutschrank bei 37° C und 95 % Luft / 5 % CO₂ vorinkubiert. Nach Ablauf von 15 min wurden 100 µl KBA- bzw. AKBA-Prüflösung (3.4.1.2), welche zuvor auf 37° C erwärmt worden war, zu der Hepatozytensuspension gegeben und für 15, 30, 60 und 120 min im Brutschrank inkubiert. Die finalen Konzentrationen im Inkubationsansatz waren:

Prüfsubstanz	50 µg/ml
Hepatozyten	$0,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml

Zu jedem Prüfzeitpunkt wurde eine 24-well Platte dem Brutschrank entnommen und die Reaktion mit 200 µl gekühlter Lösung für den Reaktionsstopp (3.4.1.2) versetzt.

Zur Simulation eines Reaktionsabbruchs zum Zeitpunkt Null wurden zunächst 200 µl kalte Lösung für den Reaktionsstopp vorgelegt und anschließend 100 µl Hepatozytensuspension und weitere 100 µl der Prüflösung zugeführt. Die gestoppten Reaktionsansätze wurden schließlich alle in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und über Nacht bei -20° C gelagert. Danach wurde für 10 min bei 4° C und 8000 g zentrifugiert. Der Überstand konnte direkt für die Analytik verwendet werden.

3.4.3.2 Metabolisches Profil von KBA und AKBA

Die nach 60 min Inkubationszeit gestoppten Reaktionen von KBA und AKBA wurden zusätzlich mittels qualitativer LC-MS-Methode 2 (3.1.2.3) untersucht.

3.4.3.3 Negativkontrolle

Um eine eventuelle nicht-enzymatische Degradierung der Prüfsubstanzen ausschließen zu können, wurden die Prüfsubstanzen für 120 min mit KHB im Brutschrank bei 37° C und 95 % Luft / 5 % CO₂ inkubiert und die Konzentrationen mit denen von frisch hergestellter Prüfsubstanz in KHB verglichen.

3.4.3.4 Positivkontrolle

Um die Aktivität der CYP-Enzyme und der Sulfotransferasen (SULT) in den RH über den Inkubationszeitraum beurteilen zu können, wurde deren Fähigkeit 7-Ethoxycoumarin zu 7-Hydroxycoumarin und zu 7-Hydroxycoumarin-Sulfat zu metabolisieren beurteilt. Aktivität über den gesamten Inkubationszeitraum ist dann gewährleistet, wenn die Konzentration an 7-Hydroxycoumarin und 7-Hydroxycoumarin-Sulfat über die Zeit ansteigt. Hierzu wurden 100 µl der Hepatozytensuspension mit 100 µl der Lösung für die Positivkontrolle (3.4.1.2) im Brutschrank inkubiert. Zu jedem Prüfzeitpunkt (0, 15, 30, 60 und 120 min) wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl gekühltem Methanol gestoppt und dann analog zu den Stabilitätsuntersuchungen (3.4.3.1) verfahren.

3.4.4 Analytik

KBA- und AKBA-Konzentrationen im Assay zur Bestimmung derer metabolischen Stabilität sowie in der Negativkontrolle wurden mittels quantitativer LC-MS-Methode (3.1.2.1) ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Asiatischen Säure als Internem Standard (IS) und Bezug der KBA- bzw. AKBA-IS Ratio der jeweiligen Zeitpunkte (15, 30, 60, 120 min) auf die KBA- bzw. AKBA-IS Ratio zum Ausgangszeitpunkt (t-Null). Die Bestimmung der Konzentrationen von 7-Ethoxycoumarin, 7-Hydroxycoumarin und 7-Hydroxycoumarin-Sulfat für die Positivkontrolle erfolgte mittels HPLC-UV-Methode 3 (3.1.2.6). Für die Erstellung des metabolischen Profils von KBA und AKBA in RH wurde die qualitative LC-MS-Methode 2 (3.1.2.3) verwendet.

3.5 *In vivo*-Untersuchungen zum Metabolismus

Im Folgenden werden die Substanzen und die angewandten Methoden aufgeführt, die bei der Durchführung der Tierversuche zu den Metabolismusuntersuchungen und darauf folgender Probenaufarbeitung genutzt wurden.

3.5.1 Substanzen und untersuchte Tiere

3.5.1.1 Referenzsubstanzen (siehe 3.1.1.1)

3.5.1.2 Prüfsubstanzen Phytoplan, Deutschland

KBA 11-Keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 06080202)

AKBA 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 06080402)

3.5.1.3 Untersuchte Tiere

Albino Wistar-Ratten, weiblich

(Gewicht 108 g-170 g)

Charles River Laboratorien,
Großbritannien

3.5.2 Tierversuch

Alle Tierexperimente erfolgten in Konformität mit den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes (Deutsches Tierschutzgesetz, BGBl 1998, Part I, No.30, S.1105 ff.).

Weibliche Albino Ratten wurden unter Standardbedingungen an der Universität Frankfurt gehalten. Sie erhielten Standardtierfutter und Wasser zur freien Verfügung.

Es wurden zwei wässrige Agarosegelsuspensionen 0,2 % (w/v) mit KBA- bzw. AKBA-Prüfsubstanz hergestellt. Als Placebo wurde eine wässrige Agarosegelsuspension 0,2 % (w/v) verwendet. Den 6 Tieren der Kontrollgruppe wurden 0,3 ml der Placebosuspension via Schlundsonde verabreicht. Es wurden 2 Verumgruppen von jeweils 6 Tieren gebildet. Via Schlundsonde wurde einer Gruppe KBA-Suspension und einer Gruppe AKBA-Suspension in einer Einzeldosis von 12,5 mg/kg Körpergewicht verabreicht, wobei ein maximales Volumen von 0,43 ml nicht überschritten wurde. 2 h nach oraler Gabe wurden die Tiere mittels Guillotine getötet.

Das Hirn wurde entnommen, mit Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) gewaschen und von der äußeren Hirnhaut und den Blutgefäßen befreit. Nach dem Wiegen (1,18 g-1,35 g) wurde das gesamte Gehirn in Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) in der Potter-Apparatur bei 1100 Upm homogenisiert (1 ml Puffer enthält 100 mg Gehirn). Die Hirnsuspensionen wurden bis zur Aufarbeitung bei -20° C gelagert.

Die Leber wurde entnommen und mit Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) gewaschen. 1,00 g-1,10 g Leber wurden abgewogen und in Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4) in der Potter-Apparatur bei 1100 Upm homogenisiert (1 ml Puffer enthält 100 mg Leber). Die Lebersuspensionen wurden bis zur Aufarbeitung bei -20° C gelagert. Die restliche Leber wurde ebenfalls bei -20° C gelagert.

Das bei der Dekapitation gewonnene Blut wurde in Röhrchen, welche zur Vermeidung der Koagulation 0,03 ml Heparin (50 IE/ml) enthielten, aufgefangen und für 10 min (2000 g, 4° C) zentrifugiert. Die aus dem Überstand erhaltene Plasmafraktion wurde abgenommen und bei -20° C bis zur Aufarbeitung gelagert.

3.5.3 Probenaufarbeitung

Die Analysenproben wurden vor der Analyse im Wasserbad bei 20° C aufgetaut. Es wurden 6 ml der Hirn- und Leberproben und 1 ml der Plasmaproben durch Schütteln bei 1000 Upm für 1 Minute homogenisiert. Etwa 0,8 g Extrelut[®] NT wurden in NT1 Glassäulen gefüllt und mit den Plasmaproben für 15 min beladen. Die Analyte wurden schließlich mit 6 ml Extraktionsmittel (THF: n-Hexan: Ethylacetat: 2-Propanol; 160:160:160:15, v/v/v/v) eluiert, die aufgefangenen Lösungen unter Stickstoffstrom bei 40° C eingengt und in 150 µl Methanol aufgenommen. Hirn- und Plasmaproben wurden fraktioniert, auf mit etwa 5 g Extrelut[®] NT gefüllte NT3 Glassäulen gegeben (3 ml pro Säule) und für 15 min beladen. Die Analyte wurden dann mit 15 ml Extraktionsmittel (THF: n-Hexan: Ethylacetat: 2-Propanol; 160:160:160:15 v/v/v/v) pro Säule eluiert. Die Eluate der auf zwei Fraktionen aufgeteilten Proben wurden jeweils wieder vereint, unter Stickstoffstrom bei 40° C zur Trockene eingengt und in 150 µl Methanol aufgenommen. Nach Schütteln (3 min bei 1000-2000 Upm) und Behandlung der Proben im Ultraschallbad für 10 s wurden die Proben für 15 min in ein Eiswasserbad gestellt, bevor sie für 10 min (4° C und 2000 g) zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde mittels qualitativer LC-MS-Methode 1 (3.1.2.2) analysiert.

3.6 Permeationsuntersuchungen mit Caco-2-Zellen

Die für die Transportversuche verwendeten Substanzen, Lösungen, Puffer sowie die dafür angewandten Methoden sind im Folgenden aufgeführt. Für die Kultivierung der Zellen wurden sterile Medien und Zusätze verwendet. Falls erforderlich wurden Materialien durch Autoklavieren ($t = 20 \text{ min}$; $T = 121^\circ \text{ C}$; $p = 2 \text{ bar}$) sterilisiert und aseptische Arbeitsschritte unter einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt.

3.6.1 Substanzen und Pufferlösungen

3.6.1.1 Referenzsubstanzen (siehe 3.1.1.1)

3.6.1.2 Prüfsubstanzen Phytoplan, Deutschland

KBA 11-Keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 06080202)

AKBA 3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 06080402)

Boswellia serrata Extrakt N.N.

Nanoskalige *Boswellia serrata* Formulierung

(enthält 10 % *Boswellia serrata* Extrakt) N.N.

Untersuchungslösung der Reinsubstanzen

In Anlehnung an 3.2.3 „Löslichkeit von KBA und AKBA als Reinsubstanzen“ wurden Lösungen von KBA und AKBA in einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ hergestellt. Für die Hemmung des P-Glycoproteins (Pgp) wurde Verapamil in KRB gelöst ($50 \mu\text{M}$) und diese Lösung zum Verdünnen verwendet.

Untersuchungslösung aus dem Extrakt und der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung

In Anlehnung an 3.2.3 „Löslichkeit von KBA und AKBA aus dem Extrakt und der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung“ wurden Lösungen aus dem Extrakt und der nanoskaligen Formulierung hergestellt, die KBA in einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ und AKBA in einer Konzentration von $9,5 \mu\text{g/ml}$ enthielten. Für die Hemmung des Pgp wurde Verapamil in KRB gelöst ($50 \mu\text{M}$) und diese Lösung zum Verdünnen verwendet.

Herstellung des KRB, pH 7,4

NaCl	8,3 g
KCl	0,224 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,343 g
HEPES	2,4 g

D-Glucose, wasserfrei	0,72 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,244 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,207 g
Wasser	ad 1000 ml

Der pH Wert wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

3.6.2 Vorbereitung der Caco-2-Zellmonolayer

Die Vorbereitung und Durchführung der Transportversuche fand am Institut für Pharmazeutische Technologie und Pharmakologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg statt.

3.6.2.1 Kultivierung

Die Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff entnommen und auf 37° C erwärmt. Die Zellsuspension wurde in eine Kulturflasche überführt, die 430 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 50 ml fötales Kälberserum (FKS), 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml) und 5 ml nicht essentielle Aminosäuren enthielt. Nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37° C, in einer Atmosphäre von 10 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchte, erfolgte der erste Medienwechsel, welcher danach dreimal wöchentlich ausgeführt wurde. Das Wachstum der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Sobald sich ein einheitlicher Zellmonolayer bildete (Konfluenz), wurde die Zelldifferenzierung einsetzen. Um dies zu verhindern, sollten die Zellen passagiert (subkultiviert) werden.

3.6.2.2 Coaten

Die Transwell[®] Platten wurden mit 5 µg Kollagen pro cm² über Nacht gecoatet.

3.6.2.3 Passagieren

Das Kulturmedium wurde komplett abgesaugt und die Zellen mit ca. 15 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) gewaschen. Anschließend wurden ca. 3 ml TrypLE[™] Express (Trypsinersatz) zu den Zellen gegeben und diese in den Brutschrank gestellt. Nach etwa 15 Minuten begannen die Zellen sich voneinander und dem Untergrund zu lösen. Die Flasche wurde vorsichtig geschwenkt, der Inhalt durch Spülen mit 15 ml Kulturmedium in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Mithilfe einer Neubauerkammer wurde unter dem Mikroskop die Zelldichte bestimmt und die Zellen dann für die Permeationsversuche mit einer Dichte von $6,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² auf frisch gecoatete Transwell[®] Platten mit einer Polycarbonatfilteroberfläche von 1 cm² und einer Porenweite von 0,4 µm ausgesät. Die

Zellen wurden über einen Zeitraum von mindestens 3 Wochen kultiviert. In diesem Zeitraum entwickeln die Zellen einen Monolayer und differenzieren sich vollständig aus. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte in dieser Zeit dreimal wöchentlich. Die Untersuchungen sollten mit 21-28 Tage alten Zellen durchgeführt werden.

3.6.2.4 Untersuchung der Integrität des Zellmonolayers

Vor und nach der Durchführung der Transportuntersuchungen musste die Dichtigkeit des Zellmonolayers überprüft werden. Dazu wurde der transepitheliale Widerstand (TEER) des Monolayers unter Berücksichtigung des Filterwiderstandes mit Hilfe eines epithelialen Voltohmmeters direkt nach dem Mediumwechsel bestimmt. Filterkammern mit Werten von weniger als $300 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ wurden nicht für die Untersuchungen verwendet.

3.6.3 Durchführung der Permeationsuntersuchungen

3.6.3.1 Untersuchung der Permeabilität von KBA und AKBA

Zunächst wurde das Kulturmedium aus den Transwell[®] Platten abgesaugt und KRB in die Kompartimente gegeben, leicht geschwenkt und der Puffer wieder abgesaugt. Anschließend wurden in das basolaterale Kompartiment 1,5 ml und in das apikale Kompartiment 0,5 ml auf 37° C temperierter KRB gegeben und 30 min auf einem Schüttler (120 Upm) im Brutschrank bei 37° C , in einer Atmosphäre von 10 % CO_2 bei 90 % relativer Luftfeuchte, äquilibriert. In diesem Zeitraum (aber nicht vor Ablauf von 15 min) wurden die TEER-Werte der Zellmonolayer bestimmt. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit wurden die Lösungen auf beiden Seiten der Membran entfernt. Für die Versuche, in denen der Stofftransport von der apikalen zur basolateralen Seite untersucht werden sollte, wurden 0,5 ml der jeweiligen Untersuchungslösung in das apikale Kompartiment gegeben. In das basolaterale Kompartiment (Akzeptor) wurden 1,5 ml temperierter KRB gegeben und für 60 Minuten auf einem Schüttler (120 Upm) im Brutschrank bei 37° C , in einer Atmosphäre von 10 % CO_2 bei 90 % relativer Luftfeuchte, inkubiert. Zur Untersuchung des Stofftransports von basolateraler zu apikaler Seite wurden 1,5 ml der vortemperierten Untersuchungslösung in das basolaterale Kompartiment (Donor) gegeben. Für die Transportversuche mit Pgp-Inhibitor (Verapamil) wurde dem Transportpuffer (KRB) $50 \mu\text{M}$ Verapamil zugeführt. Ferner wurde wie zuvor beschrieben verfahren. Transporte von apikaler zu basolateraler Seite ohne Pgp-Inhibitor wurden außerdem bei 4° C durchgeführt. Hierfür wurde für 60 min auf dem Schüttler im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Transportzeit von 60 min wurden die Lösungen apikal und basolateral zur Analyse entnommen und durch KRB ersetzt, bevor erneut der TEER-Wert bestimmt wurde.

3.6.3.2 Bestimmung der apparenten Permeationskoeffizienten von KBA und AKBA

Die Transporte wurden bei 37° C von der apikalen zu der basolateralen Seite mit und ohne Pgp-Inhibitor (Verapamil 50 µM) durchgeführt. Nach den Inkubationszeiten von 30, 60 und 90 min im Brutschrank wurden die Filtereinsätze aus den Transwell®-Platten entnommen und in mit frischem KRB befüllte 12-well-Platten umgesetzt. Die Lösungen der basolateralen Kompartimente wurden zum jeweiligen Prüfzeitpunkt zur Bestimmung des apparenten Permeationskoeffizienten (P_{app}) zur Analyse entnommen. Nach 90 min wurden zusätzlich die Lösungen der apikalen Kompartimente entnommen und analysiert. Nach Beendigung der Transportversuche wurden die Zellen mit KRB gewaschen und der TEER-Wert bestimmt.

3.6.3.3 Bestimmung der Verteilung von KBA und AKBA im Caco-2-Modell

Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration der Prüfsubstanzen wurde nachfolgend zu 3.6.3.2 noch zweimal mit KRB gewaschen und die Caco-2-Zellen durch Zugabe von 500 µl Methanol lysiert. Die Zelltrümmer wurden samt Methanol in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 5 min lang abwechselnd im Ultraschallbad behandelt und mittels Vortex-Mischer homogenisiert. Nach Zentrifugieren für 10 min bei 8000 g wurde der klare Überstand analysiert.

3.6.3.4 Adsorption an der Polycarbonat-Filtermembran

Es galt auszuschließen, dass die Prüfsubstanzen an dem Polycarbonatfilter adsorbieren. Hierzu wurden 0,5 ml der in KRB gelösten Prüfsubstanzen auf die apikale Seite von Transwell®-Platten ohne Zellmonolayer gegeben. In das basolaterale Kompartiment wurden 1,5 ml KRB pipettiert. Nach einer Inkubation von 90 min im Brutschrank bei 37° C wurden die Konzentrationen der apikalen und der basolateralen Seite bestimmt.

3.6.3.5 Positivkontrolle

Die Permeabilität von Propranolol wurde in einer Konzentration von 148 µg/ml von apikaler zu basolateraler Seite bei 37° C untersucht. Nach Inkubationszeiten von 30, 60 und 90 min im Brutschrank erfolgte die Probennahme wie bei den Prüfsubstanzen durch Umsetzen der Filtereinsätze in mit frischem KRB befüllte Platten. Die permeierte Menge an Propranolol wurde auf der basolateralen Seite nach 30, 60 und 90 min bestimmt.

3.6.3.6 Analytik

Alle abgenommenen Proben wurden 1 zu 1 mit Methanol versetzt und gemischt. Zu den lysierten Zellen wurde in gleichem Verhältnis KRB gegeben und gemischt. Die erhaltenen Lösungen waren direkt der quantitativen LC-MS-Analytik (3.1.2.1)

zugänglich. Die Proben der Positivkontrolle wurden direkt mittels HPLC-UV-Methode 4 (3.1.2.7) quantifiziert.

3.7 Untersuchungen zur Interaktion von KBA und AKBA mit MRP2 und OATP1B3

Die Durchführung der folgenden Untersuchungen fand am Institut für Pharmazeutische Technologie und Pharmakologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg statt.

Die für die Interaktionsstudien verwendeten Substanzen, Lösungen sowie die dafür angewandten Methoden sind im Folgenden aufgeführt. Für die Kultivierung der Zellen wurden sterile Medien und Zusätze verwendet. Falls erforderlich wurden Materialien durch Autoklavieren ($t = 20 \text{ min}$; $T = 121^\circ \text{ C}$; $p = 2 \text{ bar}$) sterilisiert und aseptische Arbeitsschritte unter einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt.

3.7.1 Substanzen und Pufferlösungen

3.7.1.1 Prüfsubstanzen	Phytoflan, Deutschland
KBA	11-Keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 06080202)
AKBA	3-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (Ch. B.: 06080402)
<i>Boswellia serrata</i> Extrakt	N.N.

Untersuchungslösung der Reinsubstanzen

KBA und AKBA wurden in DMSO gelöst und mit KRB (für die MRP2-Versuche) bzw. Aufnahme-Puffer (für die OATP1B3-Versuche) zu Konzentrationen von 1, 3 und 10 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt.

Untersuchungslösung aus dem Extrakt

Der Extrakt wurde in DMSO gelöst und mit KRB (für die MRP2-Versuche) bzw. Aufnahme-Puffer (für die OATP1B3-Versuche) zu Konzentrationen von 1, 3 und 10 $\mu\text{g/ml}$ KBA und 0,95, 2,85 und 9,5 $\mu\text{g/ml}$ AKBA verdünnt.

Alle resultierenden Lösungen enthielten 1 % DMSO. Durch Kontrollexperimente konnte gezeigt werden, dass bei dieser Konzentration keine Beeinflussung des Testsystems zu erwarten war.

3.7.2 Untersuchung der Interaktion von KBA und AKBA mit MRP2

Die MDCKII-MRP2 Zellen wurden in 96-well-Platten kultiviert und vor den Transportexperimenten zweimal mit 37° C warmem KRB gewaschen.

Die Zellen wurden dann mit 1 μM CMFDA in Ab- und Anwesenheit der Testlösungen für 90 min auf einem Schüttler (50 Upm) im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten auf Eis gelagert und das Medium aus dem apikalen Kompartiment entnommen. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem KRB wurden die Zellen durch die Zugabe von 200 μl Triton X-100 (1 % in KRB) lysiert und darauf folgend 30 min geschüttelt.

Die anschließende Quantifizierung erfolgte mit einem Fluoreszenz-Plattenleser bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 516 nm.

3.7.3 Untersuchung der Interaktion von KBA und AKBA mit OATP1B3

HEK293 Zellen wurden in Minimal Essential Medium (MEM), welchem 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 0,8 mM L-Glutamin und 400 $\mu\text{g/ml}$ G418 (Geneticin) zugesetzt wurde, bei 37° C, 10 % CO_2 und 85 % relativer Luftfeuchte kultiviert.

Für die Aufnahmeversuche wurden die Zellen in mit Poly-D-Lysin gecoatete 96-well-Platten in einer Dichte von $8 \cdot 10^4$ Zellen/well ausgesät. Die Expression von OATP1B3 wurde durch eine 24-stündige Inkubation mit 10 mM Natriumbutyrat verstärkt. Vor den Aufnahmeexperimenten wurden die Zellen mit 200 μl Aufnahme-Puffer (142 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 1,5 mM CaCl_2 , 5 mM Glucose und 12,5 mM HEPES, pH 7,4) gewaschen und mit diesem für eine Stunde inkubiert. Durch Zugabe von 2 μM Fluo-3 und der jeweiligen Testsubstanz in Aufnahme-Puffer wurde die Reaktion gestartet und nach einer Stunde durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem Aufnahme-Puffer beendet. Die Zellen wurden daraufhin mit 1 mM CaCl_2 -Lösung, die 0,05 % Natriumdodecylsulfat (SDS) enthielt, lysiert und bei 37° C und 100 Upm für 30 min geschüttelt.

Die Quantifizierung der Aufnahme von Fluo-3 in die Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenz-Plattenleser bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm.

3.8 Chemikalien, Materialien und Laborgeräte

Chemikalien für die Analytik

Acetonitril, p.a.	Merck, Deutschland
Dimethylsulfoxid, p.a.	Merck, Deutschland
Essigsäure 100 %, p.a.	Merck, Deutschland
Ethanol 96 %	Merck, Deutschland
Ethylacetat, p.a.	Merck, Deutschland
n-Hexan, p.a.	Sigma Aldrich, USA
Methanol p.a.	Merck, Deutschland
Milli-Q Wasser	Millipore, USA
Natriumhydroxid-Lösung 27 %	Merck, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Deutschland
2-Propanol, p.a.	Merck, Deutschland
Salzsäure 1 M	Riedel de Haen; Deutschland
THF, p.a.	Acros, Deutschland
Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich, USA
Wasser, bidestilliert	ZL, Deutschland

Chemikalien und Lösungen für Puffer-, Kultur- und Transportmedien

Calciumchlorid-dihydrat	Sigma, USA
Collagenase	Roche, Schweiz
D-Glucose	Sigma, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom, Deutschland
Fructose	Sigma, USA
Glucosemonohydrat	Sigma, USA
Glycin	Sigma, USA
Hank's balanced salt solution	Biochrom, Deutschland
Hyaluronidase	Roche, Schweiz
Kaliumchlorid	Sigma, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat	Sigma, USA
Krebs-Henseleit-Puffer	Sigma, USA
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Sigma, USA
Natriumchlorid	Sigma, USA
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, USA
Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	Sigma, USA
Tris für Molekularbiologie	Applichem, Deutschland

HPLC-Säulen

Hypersil BDS C-18, 5 µm, 150*4,0 mm	MZ-Analysentechnik, Deutschland
Hypersil BDS C-18, 5 µm, 150*4,0 mm	Thermo, Deutschland
Nucleodur Sphinx RP-18, 5µm, 250*4 mm	Macherey Nagel, Deutschland
Purospher C-18e, 5µm, 125*4,0 mm	Merck, Deutschland
Ultracarb ODS (30), 5 µm, 30*3,2 mm	Phenomenex, USA

Flüssig-Flüssig-Extraktionssäulen

Extrelut [®] -NT1, 1 ml Säule	Merck, Deutschland
Extrelut [®] -NT3, 3 ml Säule	Merck, Deutschland
Extrelut [®] NT Füllmaterial	Merck, Deutschland
Sterican [®] Gr.14, 0,6 x 30 mm	Braun, Deutschland

Festphasen-Extraktionssäulen

Oasis [®] HLB 1cc 10 mg	Waters, Irland
Manifold	Macherey Nagel, Deutschland

Sonstige Materialien

Bördelkappen	Macherey Nagel, Deutschland
Braunglas Schraubdeckel Probengläser	Agilent, USA
Einmalskalpell, Cutifix [®]	Braun, Deutschland
Falcon Gefäße 15 ml	Greiner-Bio-One, Deutschland
Mikroeinsätze Standard 5 x 30 mm	Macherey Nagel, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Deutschland
Ritips [®]	Ritter, Deutschland
Schraubdeckelgläser	Merck, Deutschland
Weißglas Probengläser N11-1	Macherey Nagel, Deutschland
Zentrifugengläser 10 ml	Hannes und König, Deutschland
Transwell [®] -Platten	Corning, Niederlande
Well-Platten	Corning, Niederlande

Laborgeräte

Analysenwaage CP224S-0CE	Sartorius, Deutschland
Autosampler Agilent 1100	Agilent, USA
Autosampler Series 200	Perkin Elmer, USA
Degaser Series 200	Perkin Elmer USA
Degaser Agilent 1100	Agilent, USA
Eppendorf-Multipette	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf-Pipette	Eppendorf, Deutschland

HPLC-Pumpe Series 200	Perkin Elmer, USA
HPLC-Pumpe Agilent 1100	Agilent, USA
Infusionspumpe	Harvard, USA
Ionenquelle Heated Nebulizer	MDS Sciex, Kanada
Ionenquelle Turbo V	MDS Sciex, Kanada
Potter S	B. Braun, Deutschland
Probenkonzentrator DB 3D	Techne, Deutschland
Massenspektrometer API 300	MDS Sciex, Kanada
Massenspektrometer QTRAP 4000	MDS Sciex, Kanada
Säulenofen Jetstream 2	Jasco, Japan
Säulenofen Mistral	Spark, Holland
Schüttelgerät VF2	Janke und Kunkel, Deutschland
Schüttelgerät VX2	Janke und Kunkel, Deutschland
Stickstoff-Generator	Whatman, Großbritannien
Ultraschallbad Sonorex TK 52	Bandelin, Deutschland
UV/VIS Detektor 785A	Perkin Elmer, USA
Zentrifuge Rotina 48 R	Hettich, Deutschland
Zentrifuge Microfuge R	Beckmann, Deutschland

Software

Analyst 1.4.1	Applied Biosystems, USA
GraphPad Prism Version 4.00	GraphPad Software, USA
MS Office 2003	Microsoft, USA
Reference Manager Version 10	ISI Research Soft, USA

4 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der Löslichkeit, des Metabolismus und der Permeabilität auf die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren aufgeführt.

4.1 Auswirkung einer verbesserten Löslichkeit von Weihrauchpräparaten auf die *in vivo*-Konzentrationen von KBA und AKBA

4.1.1 KBA- und AKBA-Konzentrationen im Plasma und Hirn von Patienten mit Glioblastom

Im Jahre 2002 erhielt *Boswellia serrata* Extrakt von der EMEA den Orphan Drug Status zur Behandlung des peritumoralen Hirnödems und wird seitdem im Rahmen der adjuvanten Krebstherapie eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 27 Patienten bei denen ein Glioblastom diagnostiziert wurde untersucht. Auch wenn über die Compliance keine Informationen vorlagen, nahmen laut Protokoll alle Patienten Weihrauchpräparate (Indischen- oder Afrikanischen Weihrauch) über einen längeren Zeitraum regelmäßig ein, weshalb die gemessenen Konzentrationen als Steady-state-Plasmaspiegel anzusehen sind.

Mittels in Kapitel 4.1.4 beschriebener Probenaufarbeitung und anschließender LC-MS-Analytik konnte KBA in 24 von 27 Patienten oberhalb des LLOQ detektiert werden. Es wurden Konzentrationen von 6,1 bis 790,0 ng/ml gemessen. AKBA wurde in 15 Fällen nachgewiesen. Hier wurden Konzentrationen von 5,1 bis 233,4 ng/ml bestimmt. Bei acht Patienten waren die Plasmaspiegel unterhalb des LLOQ, bei vier Patienten konnte AKBA nicht nachgewiesen werden. Die Dosierung der Weihrauchpräparate schwankte erheblich, die Normdosierung von 3-4 x 1000-2000 mg Extrakt wurde jedoch von einem Großteil der Patienten eingehalten.

Da die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke in Tumorgewebe beeinträchtigt sein kann, lag es auf der Hand zu überprüfen, ob dies zu erhöhten Konzentrationen von KBA und AKBA im Hirn führt¹⁴⁴. Es liegen bisher nur Daten aus einer Studie mit gesunden Wistar-Ratten von Reising *et al.* vor, in der KBA und AKBA erstmals im Hirn von gesunden Wistar-Ratten nachgewiesen wurden⁶⁶. Für diese Arbeit standen Tumorgewebeprobe von zwei Patienten zur Verfügung, welche wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben extrahiert und analysiert wurden. Es konnten aber weder KBA noch AKBA im Tumorgewebe oberhalb des LLOQ nachgewiesen werden.

Tab. 4.1 zeigt die KBA- und AKBA-Konzentration im Plasma und im Hirn in steigender KBA-Konzentration von 27 Patienten mit Glioblastom.

Tab. 4.1: Plasma- und Hirnspiegel von Patienten mit Glioblastom. Die Patienten haben Präparate mit *Boswellia serrata* Extrakt (B.s.E.) oder *Boswellia carterii* Extrakt (B.c.E.) eingenommen

Patient (ID-Nr.)	Extrakt (Präparat)	Dosierung/Tag (Angaben laut Patienten)	Plasma	
			KBA (ng/ml)	AKBA (ng/ml)
7	B.s.E. (Vita Well)	3 x 2000 mg	n.d.	n.d.
14	B.s.E. (Bioxera)	2 x 1200 mg	n.d.	n.d.
15	B.s.E. (H15)	3 x 1200 mg	n.d.	10,8
16	B.s.E. (H15)	3 x 1200 mg	6,1	n.d.
18	B.s.E. (H15)	3 x 1200 mg	7,7	11,3
19	B.s.E. (AKBAmax)	2 x 2 Teelöffel	11,1	< LLOQ
17	B.s.E. (H15)	4 x 1200 mg	16,9	< LLOQ
22	B.c.E. (boscarì)	3 x 2000 mg	17,7	< LLOQ
9	k.A.	k.A.	18,4	< LLOQ
6	B.s.E. (H15)	4 x 1600 mg	18,4	5,1
13	B.s.E. (H15)	k.A.	22,8	< LLOQ
26	B.s.E. (H15)	3 x 400 mg	30,1	< LLOQ
4	B.s.E. (H15)	3 x 1200 mg	34,8	11,3
27	B.s.E. (AKBAmax)	2 x 3 Tabl.*	35,4	< LLOQ
1	B.s.E.	4 x 1600 mg	49,1	11,4
10	B.c.E. (Lebonat)	3 x 3000 mg	71,9	8,0
12	k.A.	k.A.	76,3	< LLOQ
25	B.s.E. (H15)	4 x 1400 mg	80,1	10,2
11	B.s.E. (H15)	3 x 1600 mg	108,4	16,3
8	B.c.E. (boscarì)	3 x 1600 mg	116,0	n.d.
5	B.s.E. (Eichele)	4 x 1600 mg	136,0	16,4
3	B.s.E. (H15)	4 x 1600 mg	144,1	12,4
24	B.s.E. (H15)	3 x 1050 mg	152,0	10,6
2	B.s.E.	4 x 1600 mg	270,2	11,9
21	B.s.E. (AKBAmax)	6 x 1 Esslöffel	331,8	24,3
23	B.s.E. (AKBAmax)	3 x 1 Teelöffel	489,1	82,2
20	B.s.E. (AKBAmax)	3-4 x 12 Tabl.*	790,0	233,4
			Hirn	
			(ng/g)	(ng/g)
24	B.s.E. (H15)	3 x 1050 mg	< LLOQ	< LLOQ
25	B.s.E. (H15)	4 x 1400 mg	< LLOQ	n.d.
k.A.	keine Angaben			
n.d.	nicht detektierbar			
*	Gehalt unbekannt			

Angesichts dieser sehr niedrigen KBA- und AKBA-Konzentrationen im Plasma und Hirn trotz mehrmaliger Einnahme von hohen Extrakt dosierungen wurde überprüft, inwiefern eine verbesserte Löslichkeit zu einer höheren Bioverfügbarkeit beitragen kann.

4.1.2 Löslichkeit von KBA und AKBA im Extrakt und in einer nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung

Die Löslichkeit in wässrigen Medien ist einer der Hauptindikatoren für die Löslichkeit in der Intestinalflüssigkeit⁶⁹. Deshalb wurde die Löslichkeit von KBA und AKBA, den wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen in *Boswellia serrata* Extrakt, auch im Hinblick auf noch folgende Untersuchungen in KRB untersucht, welches ein gängiges Medium für *in vitro*-Untersuchungen mit Zellsystemen darstellt. Zur Lösungsvermittlung wurden 2 % DMSO zugesetzt. In dieser Konzentration ist bei den meisten Zellsystemen keine Beeinflussung der Ergebnisse oder der Lebensfähigkeit von Zellen zu erwarten.

Untersucht wurde die Löslichkeit der Reinsubstanzen (Reinheit > 99 %), die eines handelsüblichen *Boswellia serrata* Extrakts, der 3,77 % KBA und 3,57 % AKBA, bestimmt mit HPLC-UV (3.1.2.4), enthielt und die einer nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung, bestehend aus 10 % des *Boswellia serrata* Extrakts, der in nanoskalige Partikel überführt wurde.

Die Löslichkeit von KBA und AKBA in Methanol wird im Ph. Eur. 6.0 mit 1 g Substanz in 1 bis 10 ml Lösungsmittel angegeben und kann somit als „gut löslich“ betrachtet werden. Da für die *in vitro*-Versuche im Rahmen dieser Arbeit eine Prüfkonzentration von 10 µg/ml gewählt wurde, konnte die Löslichkeit in Methanol als 100 % gesetzt werden und diente bei der Auswertung der Ergebnisse als Bezugswert.

Von den eingesetzten 10 µg lösten sich in 1 ml KRB 8,4 µg KBA- und 8,1 µg AKBA-Reinsubstanz. Die Löslichkeit von KBA und AKBA im Extrakt lag bei 3,3 µg/ml und 2,7 µg/ml. Die nanoskalige Formulierung zeigte für beide Boswelliasäuren eine Löslichkeit von 100 %. In Abb. 4.1 sind die Ergebnisse der Löslichkeitsuntersuchungen dargestellt.

Im Rahmen der folgenden Tierstudie wurde geprüft, ob die verbesserte Löslichkeit von KBA und AKBA in Form einer nanoskaligen Formulierung im Vergleich zum unbehandelten Extrakt zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit führt. Im Vorfeld müssen die hierbei verwendeten bioanalytischen Methoden validiert werden.

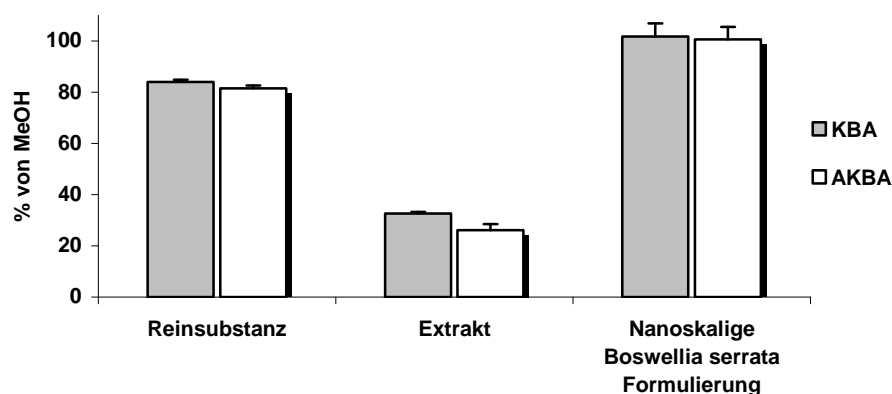


Abb. 4.1: Löslichkeit von KBA und AKBA (Löslichkeit in Methanol entspricht 100 %) in KRB mit Zusatz von 2 % DMSO. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Einzelwerte ($n=6$) an

4.1.3 Bioanalytik zur Bestimmung von KBA und AKBA in Rattenplasma, -hirn und -leber

Zu Beginn dieser Arbeit standen zur Bestimmung von KBA und AKBA aus biologischen Matrices bereits diverse analytische Methoden zur Verfügung^{62,63,65,145}. Eine 2005 entwickelte Methode zur Bestimmung von KBA und AKBA aus Plasma und Hirn mittels LC-MS⁶⁶ erwies sich mit einem LLOQ von 5 ng/ml als die leistungsfähigste. Basierend auf dieser Methode wurde wie in Abb. 4.2 dargestellt der neue MRM-Übergang m/z 513,3 \rightarrow 95,3 für AKBA festgelegt, welcher deutlich höhere Signalintensitätswerte und ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis lieferte. Der MRM-Übergang m/z 471,3 \rightarrow 95,2 für KBA wurde nicht verändert.

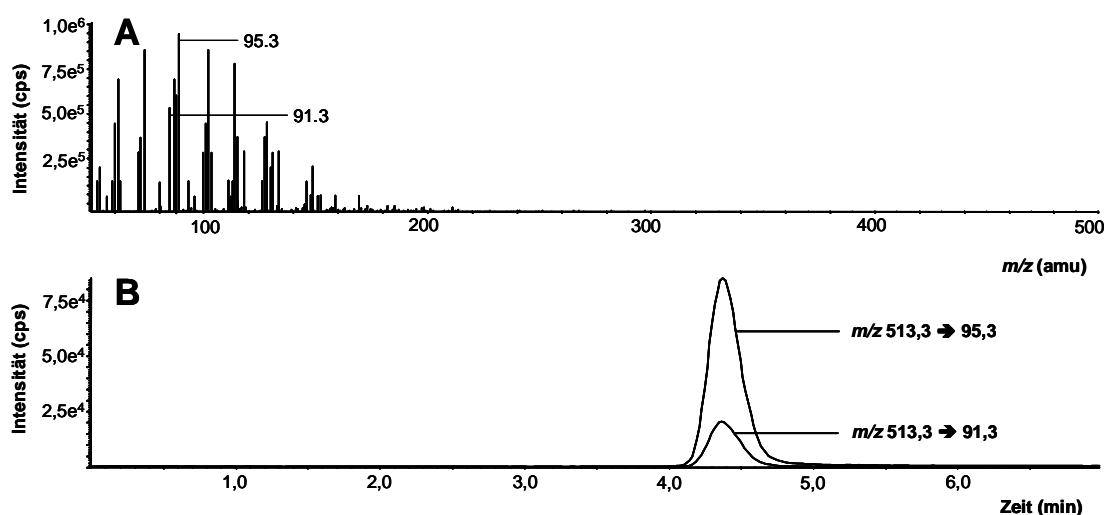


Abb. 4.2: **A** Produkt-Ionen-Spektrum von AKBA im positiven Ionisierungsmodus; **B** Chromatogramme von AKBA (Konz.: 5 µg/ml) mit zwei unterschiedlichen MRM-Übergängen

4.1.4 Probenaufarbeitung

Biologische Matrices sind komplexe Gemische mit vielen Bestandteilen, die die Analytik beeinträchtigen können. Es ist daher ratsam diese in einem der Analytik vorgeschalteten Extraktionsschritt abzutrennen. Auf die Entwicklung einer neuen Extraktionsmethode wurde verzichtet, da in der Literatur bereits ein praktikables Verfahren beschrieben war⁶⁵. Es handelt sich dabei um eine sorbengestützte Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Kieselgur (Extrelut[®]) und anschließender Festphasenextraktion mit Graphitsäule. Bei der sorbengestützten Flüssig-Flüssig-Extraktion wird die wässrige Probe auf die Kieselgurmatrix aufgebracht und dann mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Reising *et al.* haben gezeigt, dass diese Extraktionsmethode nach geringfügiger Modifikation für die anschließende LC-MS-Analytik geeignet ist. Aufgrund erhöhter Selektivität gegenüber der HPLC-UV-Analytik kann auf eine Aufreinigung mit Graphitsäule bei der LC-MS-Analytik im MRM-Modus verzichtet werden⁶⁶ (Abb. 4.3).

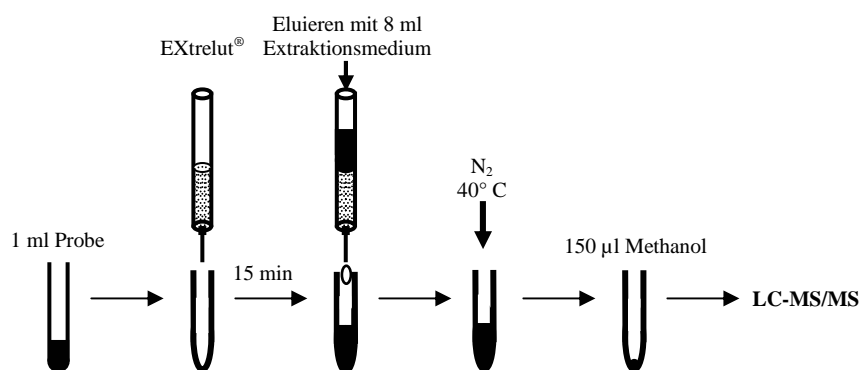


Abb. 4.3: Schema der sorbengestützten Flüssig-Flüssig-Extraktion von KBA und AKBA aus Plasma, Hirn- und Lebersuspension nach Reising *et al.*⁶⁶

4.1.5 Validierung der analytischen Methode zur Bestimmung von KBA und AKBA aus Lebergewebe

Vor erstmaliger Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zur quantitativen Bestimmung von KBA und AKBA aus Lebergewebe erfolgte eine Vorstudienvalidierung in Anlehnung an die FDA-Richtlinien für bioanalytische Methodenvvalidierung¹⁴⁶. Die Validierung dient dem formellen und dokumentierten Nachweis, dass eine analytische Methode für ihren Einsatzzweck geeignet ist und die an sie gestellten Anforderungen erfüllt.

Es wurden die Parameter Spezifität, Linearität, LLOQ sowie die intra- und interday-Richtigkeit und Präzision geprüft. Zusätzlich wurde die Stabilität von KBA und AKBA in Leberhomogenat und in den aufgearbeiteten Lösungen untersucht und die Wiederfindung aus dem Lebergewebe bestimmt. Als Matrix wurde, um die Zahl der Versuchstiere zu reduzieren, Schweineleber verwendet. Die Übertragbarkeit der Methode von Schweinelebergewebe auf Rattenlebergewebe wurde durch Vergleichen

der Kalibriergeraden beider Spezies verifiziert. Zusätzlich wurden die Qualitätskontrollproben aus Rattenlebergewebe mittels Kalibriergeraden aus Schweinelebergewebe ausgewertet.

4.1.5.1 Spezifität

Die Spezifität einer analytischen Methode beschreibt deren Fähigkeit den Analyt in Anwesenheit weiterer Komponenten von diesen zu differenzieren und quantifizieren. Hierfür wurden Doppelblindproben (native Matrix) von sechs wirkstofffreien Leberproben unterschiedlicher Herkunft analysiert. Es konnten keine signifikanten Interferenzen in den Chromatogrammen von KBA, AKBA und internem Standard (Asiatische Säure) detektiert werden. Die Methode wurde somit als spezifisch angesehen.

4.1.5.2 Linearität

Innerhalb eines festgelegten Messbereiches muss für eine Methode Linearität, Präzision und Richtigkeit bewiesen werden. Der Messbereich für die Leberproben wurde analog zu dem der Plasmaproben von 5 ng/ml bis 1500 ng/ml festgelegt, da in der Leber mit dem Plasma vergleichbare Analytkonzentrationen zu erwarten sind, wie die Untersuchung einzelner Leberproben ergab. Die Linearität wurde durch Erstellen von Kalibriergeraden an fünf Tagen untersucht. Die Anpassung der Geradengleichung $y = a + bx$ erfolgte mittels gewichteter Regression mit dem Wichtungsfaktor $1/x^2$.

Folgende Akzeptanzkriterien für die Linearität gelten als international anerkannt¹⁴⁶:

- $\pm 15 \%$ Abweichung der Kalibrierstandards vom nominellen Wert, am LLOQ $\pm 20 \%$
- Mindestens vier von sechs Kalibrierstandards müssen innerhalb der oben genannten Grenzen liegen, kleinster und größter Kalibrierstandard dürfen nicht außerhalb liegen
- Ausschluss eines Kalibrierpunkts darf das statistische Modell nicht verändern
- Korrelationskoeffizient $\geq 0,985$

Diese Kriterien wurden bei der Bestimmung von KBA und AKBA aus Lebergewebe erfüllt. Tab. 4.2 gibt die Werte zur Linearität im Einzelnen wieder. Eine repräsentative Kalibrierfunktion von KBA und AKBA ist in Abb. 4.4 dargestellt.

Tab. 4.2: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Linearität von KBA und AKBA aus Lebergewebe

nominal (ng/ml)	KBA			AKBA		
	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)
5	5,0	2,6	-0,9	5,1	3,5	2,6
10	10,2	5,0	2,0	9,5	7,3	-4,8
50	50,7	3,4	1,4	50,7	2,3	1,4
100	95,9	5,3	-4,1	92,3	4,0	-7,7
500	496,3	3,5	-0,7	486,3	3,9	-2,7
750	741,5	5,0	-1,1	724,4	4,3	-3,4
1000	1031,4	6,9	3,1	1073,4	7,9	7,3
1200	1205,3	2,9	0,4	1237,9	4,9	3,2
1500	1499,1	5,4	-0,1	1561,8	4,8	4,1
r_{\min}	0,9979			0,9954		
r_{\max}	0,9992			0,9993		
r_{mittel}	0,9986			0,9972		

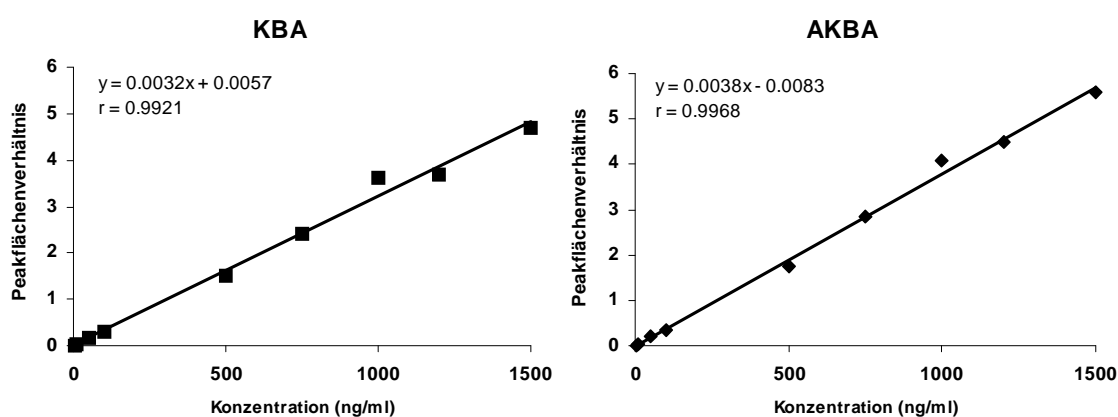


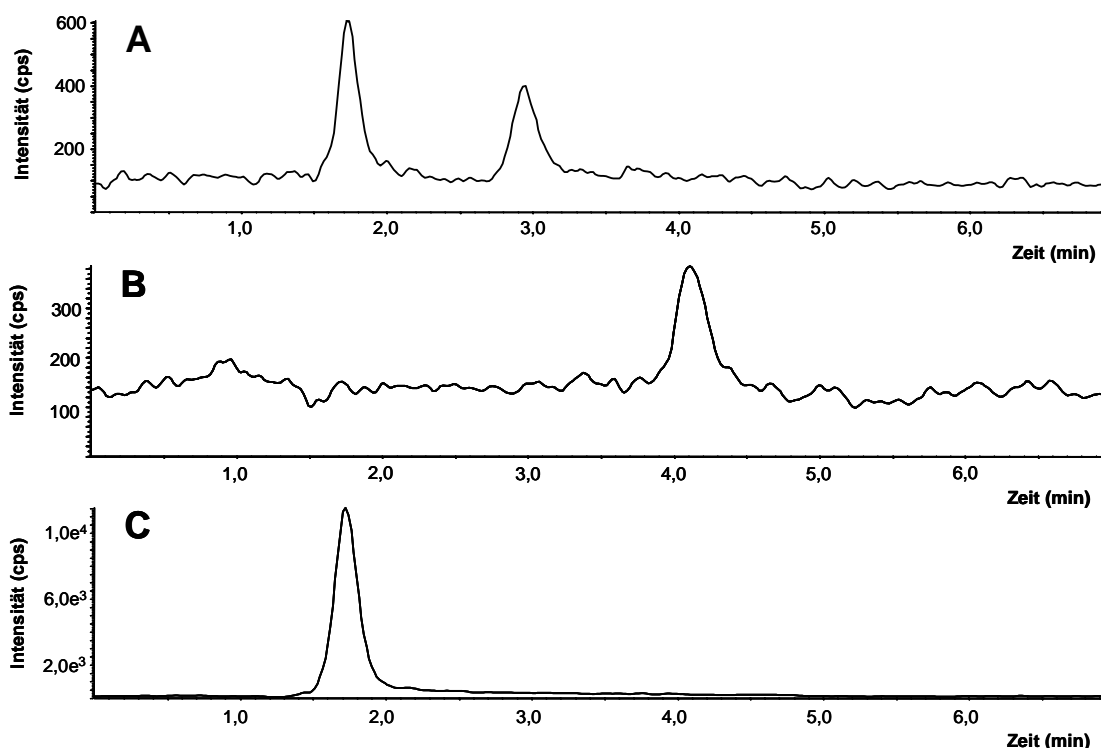
Abb. 4.4: Repräsentative Kalibrierfunktion von KBA und AKBA aus Lebergewebe

4.1.5.3 Untere Quantifizierungsgrenze (LLOQ)

Der LLOQ-Wert einer bioanalytischen Methode beschreibt die kleinste Konzentration, die mit einer Präzision von 20 % und einer Richtigkeit von 80-120 % bestimmt werden kann. Er wurde durch die Messung von fünf unabhängig voneinander aufgearbeiteten Proben mit einer Konzentration von je 5 ng/ml bestimmt. Die in Tab. 4.3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Anforderungen der FDA-Richtlinie erfüllt wurden. LC-MS/MS-Chromatogramme von KBA und AKBA am LLOQ sowie ein Chromatogramm des internen Standards sind in Abb. 4.5 gezeigt.

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Daten zur Bestimmung des LLOQ aus Lebergewebe mit $n = 5$

nominal (ng/ml)	KBA			AKBA		
	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)
5	4,9	3,9	-2,1	5,5	6,7	9,9

Abb. 4.5: LC-MS/MS-Chromatogramme aus Lebergewebe am LLOQ, A MRM: m/z 471,3 \rightarrow 95,2 Asiatische Säure ($t=1,7$ min) und KBA ($t=2,9$ min) B MRM: m/z 513,3 \rightarrow 95,3 AKBA ($t=4,1$ min) C MRM: m/z 489,3 \rightarrow 205,1 Asiatische Säure ($t=1,7$ min)

4.1.5.4 Intra- und interday-Präzision und Richtigkeit

Die Richtigkeit erlaubt es, eine Aussage über die Abweichung eines ermittelten Werts vom nominalen Wert zu treffen (systematischer Fehler), und wird über die Ergebnisabweichung (Bias) ausgedrückt. Die Präzision ist die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert; ausgedrückt als Standardabweichung (zufälliger Fehler)^{146,147}.

Die FDA-Richtlinie fordert die Bestimmung der Präzision und Richtigkeit innerhalb eines Tages (intraday) und über mehrere Tage hinweg (interday). Die intraday-Präzision und -Richtigkeit wurde durch die Analyse von fünf Qualitätskontrollproben (QC-Proben), jeweils im tiefen, mittleren und hohen Kalibrierbereich, untersucht. Die Konzentrationen der QC-Proben im niedrigen Kalibrierbereich sollten um den Faktor drei über dem LLOQ, die höchste QC-Probe im oberen Drittel des Messbereiches und

eine weitere QC-Probe zwischen diesen beiden Konzentrationen liegen. Für die Bestimmung der interday-Präzision und Richtigkeit wurden aus den Ergebnissen der QC-Proben an drei verschiedenen Tagen der Variationskoeffizient (CV) und der Bias berechnet.

Für die intra- und interday-Präzision darf der Variationskoeffizient nicht größer als 15 % sein, die Richtigkeit darf eine Abweichung von ± 15 % vom nominellen Wert aufweisen. Tab. 4.4 zeigt, dass KBA und AKBA mit ausreichender Präzision und Richtigkeit aus Lebergewebe bestimmt werden konnte.

Tab. 4.4: Intra- und interday-Präzision und Richtigkeit in Lebergewebe

Intraday-Präzision und Richtigkeit (n=5)						
nominal (ng/ml)	\bar{x} (ng/ml)	KBA		AKBA		
		CV (%)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)
15	14,9	5,1	-0,6	15,3	5,4	2,3
800	812,2	8,7	1,5	787,8	11,6	-1,5
1300	1286,5	6,4	-1,0	1286,0	2,6	-1,1

Interday-Präzision und Richtigkeit (d=3)						
nominal (ng/ml)	\bar{x} (ng/ml)	KBA		AKBA		
		CV (%)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)
15	15,1	1,2	0,8	15,8	2,4	5,2
800	783,0	6,0	-2,1	769,5	4,9	-3,8
1300	1278,0	5,3	-1,7	1281,3	5,4	-1,4

4.1.5.5 Relative Wiederfindung

Die relative Wiederfindung berücksichtigt störende Signalsuppressionseffekte, welche durch Lebermatrix hervorgerufen werden. Hierzu wurden QC-Proben der drei Konzentrationsbereiche (jeweils $n = 5$) mit Blindproben verglichen, die nach der Aufarbeitung mit KBA und AKBA in den entsprechenden Konzentrationen dotiert wurden. Die mittlere relative Wiederfindung von KBA und AKBA aus Lebergewebe war mit der von Reising bestimmten relativen Wiederfindung aus Plasma und Hirn vergleichbar (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Relative Wiederfindung von KBA und AKBA aus Plasma, Hirn- und Lebergewebe

	Plasma ¹⁴¹		Hirn ¹⁴¹		Leber	
	KBA (%)	AKBA (%)	KBA (%)	AKBA (%)	KBA (%)	AKBA (%)
QC-T	50,9	62,5	57,7	62,9	58,5	55,1
QC-M	57,8	49,6	66,5	59,2	53,0	50,8
QC-H	62,3	51,0	63,0	51,5	68,1	64,4

4.1.5.6 Stabilität

Die Stabilität von KBA und AKBA in Lebergewebe wurde bei Raumtemperatur nach 24 h sowie nach drei Einfrier- und Auftauzyklen untersucht. Außerdem wurde die Stabilität über einen Zeitraum von fünf Monaten bei -20° C überprüft. Die Stabilität aufgearbeiteter Proben wurde nach Lagerung für 24 h bei 10° C im Autosampler bestimmt. Alle Stabilitätsdaten wurden mittels QC-Proben der drei Konzentrationsbereiche in Dreifachbestimmung ermittelt. Ein Toleranzbereich von ± 15 % wird im Allgemeinen als akzeptabel erachtet. Die Tab. 4.6 gibt die Stabilitätsdaten für KBA und AKBA detailliert wieder und zeigt für beide Analyte eine hinreichende Stabilität in Lebergewebe.

Tab. 4.6: Stabilitätsdaten von KBA und AKBA in Lebergewebe

	nominal (ng/ml)	KBA			AKBA		
		\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)
Kurzzeitstabilität bei Raum- temperatur (24 h) n = 3	15	15,9	2,6	6,1	16,6	2,3	10,8
	800	825,1	4,2	3,1	869,1	5,0	8,6
	1300	1379,7	2,5	6,1	1423,5	5,8	9,5
Stabilität im Auto- sampler bei 10 °C (24 h) n = 5	15	14,9	4,1	-0,9	14,2	4,3	-5,5
	800	716,5	2,2	-10,4	722,9	2,4	-9,6
	1300	1271,1	6,0	-2,2	1307,5	8,1	0,6
Langzeitstabilität bei -20° C (5 Monate) n = 3	15	15,9	2,9	5,8	16,3	5,6	8,7
	800	825,3	4,6	3,2	879,7	1,5	10,0
	1300	1364,6	4,2	5,0	1460,3	2,3	12,3
Stabilität nach dem Einfrieren/Auftauen (n = 3)							
Stabilität nach einmaligem Einfrieren/Auftauen	15	15,3	2,0	2,1	16,6	3,9	10,5
	800	840,4	7,9	5,1	841,3	8,9	5,2
	1300	1277,9	4,1	-1,7	1265,8	3,8	-2,6
Stabilität nach dreimaligem Einfrieren/Auftauen	15	16,1	8,4	7,3	16,4	6,6	9,1
	800	751,5	5,1	-6,1	768,5	7,3	-3,9
	1300	1410,5	3,5	8,5	1446,9	4,2	11,3

4.1.5.7 Speziesvergleich

Da die Methodvalidierung mit Schweineleber erfolgte, in folgenden Versuchen jedoch Ratten untersucht wurden, wurde die Übertragbarkeit der Methode geprüft. An drei unterschiedlichen Tagen wurden Kalibriergeraden aus Schweine- und Rattenlebergewebe erstellt und Steigung und Y-Achsenabschnitt miteinander verglichen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Repräsentative Kalibrierfunktionen sind in Abb. 4.6 wiedergegeben.

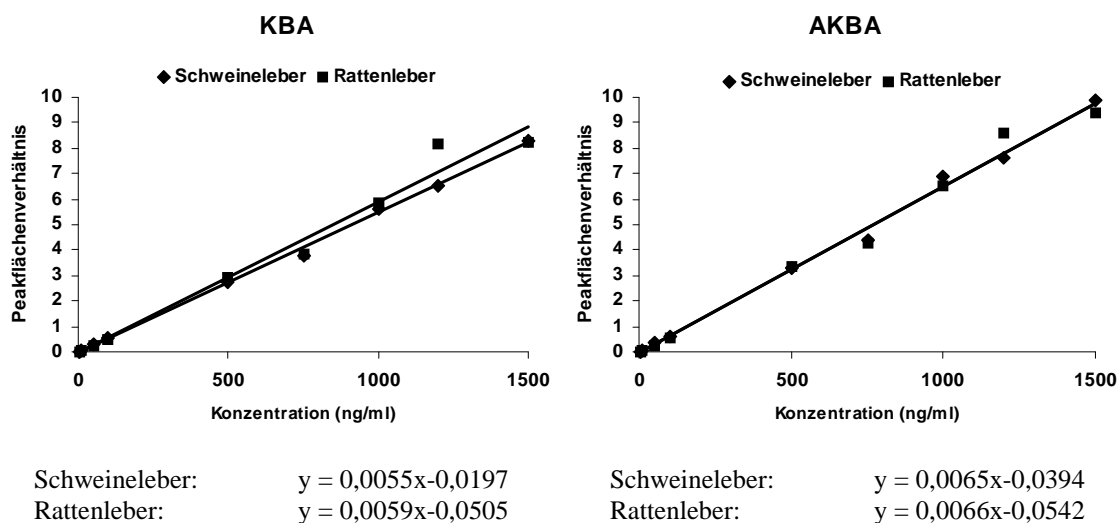


Abb. 4.6: Repräsentative Kalibrierfunktionen von KBA und AKBA aus Schweinelebergewebe und Rattenlebergewebe

Zur Bestätigung der Vergleichbarkeit der Kalibrierfunktionen wurden an drei unterschiedlichen Tagen mittels Rattenleber hergestellte QC-Proben der drei Konzentrationsbereiche mit einer mittels Schweineleber erstellten Kalibrierfunktion ausgewertet. Es galten die Vorgaben der Präzision und Richtigkeit (Tab. 4.7).

Tab. 4.7: QC-Proben aus Rattenlebergewebe, welche mit einer Kalibrierfunktion aus Schweinelebergewebe ausgewertet wurden

		Interday (d=3)				
		KBA		AKBA		
nominal (ng/ml)	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)
15	15,5	4,6	3,4	15,2	3,3	1,1
800	778,4	1,0	-2,7	759,2	8,8	-5,1
1300	1281,4	3,6	-1,4	1244,5	5,6	-4,3

Es konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode KBA und AKBA aus Rattenlebergewebe mittels Kalibriergerade aus Schweinelebergewebe valide zu quantifizieren sind.

4.1.6 Revalidierung der Methode zur Bestimmung von KBA und AKBA aus Plasma und Hirngewebe

Die erwähnte analytische Methode⁶⁶ zur Bestimmung von KBA und AKBA aus Plasma und Hirngewebe war bereits validiert worden. Eine für den veränderten MRM-Übergang von AKBA im Umfang gekürzte Validierung (Revalidierung) wurde daher in diesen Fällen als ausreichend erachtet (Tab. 4.8 und Tab. 4.9).

Tab. 4.8: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Linearität von KBA und AKBA in Plasma und Hirngewebe

nominal (ng/ml)	Plasma				Hirn			
	KBA		AKBA		KBA		AKBA	
	\bar{x} (ng/ml)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	Bias (%)
5	5,0	-0,9	5,0	0,7	5,0	0,3	5,3	6,4
10	10,1	0,9	10,0	-0,1	10,1	1,3	8,7	-12,7
50	53,9	7,8	50,0	0,0	46,3	-7,5	50,0	0,0
100	94,6	-5,4	85,6	-14,4	92,7	-7,3	97,0	-3,0
500	497,0	-0,6	458,5	-8,3	553,0	10,6	561,5	12,3
750	770,3	2,7	785,3	4,7	764,3	1,9	756,8	0,9
1000	1009,0	0,9	1061,0	6,1	1007,0	0,7	961,0	-3,9
1200	1204,8	0,4	1258,8	4,9	-	-	-	-
1500	1414,5	-5,7	1596,0	6,4	-	-	-	-
r	0,9990		0,9970		0,9976		0,9961	

Tab. 4.9: Präzision und Richtigkeit in Plasma und Hirngewebe

nominal (ng/ml)	Plasma intraday (n=5)					
	KBA			AKBA		
	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)	\bar{x} (ng/ml)	CV (%)	Bias (%)
15	15,1	7,1	0,7	16,5	5,9	10,0
800	803,2	6,6	0,4	827,2	4,8	3,4
1300	1228,0	5,6	-5,5	1268,0	2,0	-2,5
Hirn intraday (n=5)						
15	14,4	6,2	-4,3	14,1	7,9	-5,8
400	403,0	4,7	0,7	405,6	11,1	1,4
800	764,8	3,5	-4,4	750,2	5,8	-6,2

4.1.7 Pharmakokinetische Studie mit Ratten

In einer pharmakokinetischen Studie mit Ratten wurde untersucht, ob eine Verbesserung der Löslichkeit von *Boswellia serrata* Extrakt zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit führen kann. Hierfür wurden die KBA- und AKBA-Konzentrationen im Plasma, der Leber und dem Hirn von Ratten nach Gabe zwei verschiedener Formulierungen über acht Stunden untersucht. Wistar-Ratten wurde *Boswellia serrata* Extrakt oder die nanoskalige *Boswellia serrata* Formulierung in einer Einmalgabe oral per Schlundsonde verabreicht. Der Extrakt wurde in Analogie zu bereits durchgeführten Studien⁶⁶ mit 240 mg/kg Körpergewicht dosiert. In dieser Konzentration konnte eine signifikante Reduktion des Ödem- und Tumorumfangs sowie eine verlängerte Überlebenszeit bei Gliom-implantierten Ratten gezeigt werden⁸. Die verabreichte nanoskalige Formulierung enthielt den *Boswellia serrata* Extrakt zu 10 % und wurde demzufolge in einer Dosis von 2,4 g/kg Körpergewicht verabreicht. Die Untersuchungen wurden mit 35 gesunden Wistar-Ratten durchgeführt, von denen 15 Tiere mit dem Extrakt gefüttert wurden, 15 Tiere die nanoskalige Formulierung erhielten und 5 Tiere als Kontrollgruppe ein Placebo (Agarosesuspension) bekamen. Die Plasma-, Leber- und Hirnkonzentrationen von KBA und AKBA wurden bei jeweils fünf Tieren der Verumgruppen nach zwei, vier und acht Stunden bestimmt (Abb. 4.7).

Im Plasma, der Leber und dem Hirn der Tiere der Kontrollgruppe wurden nach zweieinhalb Stunden weder KBA noch AKBA nachgewiesen.

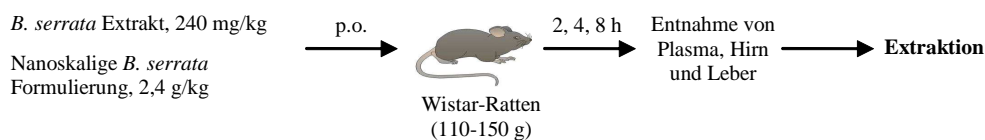


Abb. 4.7: Schema der Bioverfügbarkeitsstudie mit Wistar-Ratten

Im Plasma der mit *Boswellia serrata* Extrakt gefütterten Tiere wurden KBA-Konzentrationen von 7,0 bis 91,4 ng/ml gemessen, bei zwei Tieren lag die Konzentration unterhalb des LLOQ, AKBA konnte in Konzentrationen von 14,6 bis 191,0 ng/ml nachgewiesen werden. Die KBA-Konzentration der mit der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung gefütterten Tiere reichte von 21,8 bis 118,1 ng/ml und für AKBA von 43,6 bis 241,1 ng/ml. In Tab. 4.10 sind die Plasmakonzentrationen im Einzelnen aufgeführt. Abb. 4.8 zeigt den Verlauf der KBA- und AKBA-Konzentrationen über die Zeit. Die Extrakt-Gruppe erreicht einen maximalen Plasmaspiegel (\bar{x} aus $n = 5$) von 48,4 ng/ml KBA und 133,2 ng/ml AKBA nach zwei Stunden. Die Gruppe, die die nanoskalige Formulierung bekam, erreicht nach zwei Stunden einen durchschnittlichen Plasmaspiegel von 49,9 ng/ml KBA und 152,3 ng/ml AKBA. Danach fallen die Wirkstoffspiegel beider Gruppen wieder ab. Nach vier Stunden steigen die Spiegel der Gruppe, die die nanoskalige Formulierung bekam aber

erneut leicht an, um nach acht Stunden einen Plasmaspiegel von 67,1 ng/ml KBA und 156,8 ng/ml AKBA zu erreichen.

Tab. 4.10: Konzentration von KBA und AKBA im Plasma von Wistar-Ratten nach einmaliger oraler Gabe von *Boswellia serrata* als Extrakt (Dosierung 240 mg/kg Körpergewicht) oder nanoskaliger Formulierung (Dosierung 2,4 g/kg Körpergewicht)

t (h)	Ratte	<i>B. serrata</i> Extrakt		Nanoskalige <i>B. serrata</i> Formulierung	
		KBA (ng/ml)	AKBA (ng/ml)	KBA (ng/ml)	AKBA (ng/ml)
2	2a	37,3	119,0	28,2	43,6
	2b	45,0	176,9	74,3	241,1
	2c	91,4	191,0	27,8	84,1
	2d	13,9	25,2	65,1	166,0
	2e	54,6	154,2	54,2	227,0
4	4a	24,8	71,0	56,8	144,3
	4b	61,7	93,5	31,3	124,0
	4c	20,7	43,0	24,9	94,3
	4d	22,4	79,2	32,5	161,0
	4e	47,2	90,5	21,8	82,6
8	8a	< LLOQ	48,4	59,1	224,5
	8b	< LLOQ	14,6	31,5	75,8
	8c	7,0	22,3	118,1	165,0
	8d	17,2	55,0	72,7	148,9
	8e	31,6	69,7	54,3	169,7

In der Leber der mit *Boswellia serrata* Extrakt gefütterten Tiere wurden KBA-Konzentrationen von 72,3 bis 475,0 ng/g Lebergewebe gemessen. Bei zwei Tieren lag die Konzentration unterhalb des LLOQ. AKBA wurde in Konzentrationen von 71,8 bis 924,8 ng/g Lebergewebe detektiert. Die KBA-Konzentration der mit nanoskaliger *Boswellia serrata* Formulierung gefütterten Tiere reichte von 210,4 bis 638,0 ng/g Lebergewebe, wobei der Wert eines der Tiere unterhalb des LLOQ lag. AKBA wurde in dieser Gruppe in Konzentrationen von 186,3 bis 1220,0 ng/g Leber detektiert. Tab. 4.11 zeigt die Konzentrationen von KBA und AKBA in Lebergewebe detailliert. Die Leberspiegelkurven sind in Abb. 4.8 dargestellt. Die Extrakt-Gruppe erreicht Konzentrationen von 280,2 ng KBA/g Lebergewebe nach vier Stunden und 626,4 ng/g AKBA nach zwei Stunden (\bar{x} aus $n = 5$). In der Gruppe, die die nanoskalige Formulierung bekam, wurden Konzentrationen von 468,3 ng/g KBA und 845,7 ng/g AKBA nach acht Stunden detektiert (\bar{x} aus $n = 5$). Der Verlauf der Kurven ist mit den Plasmaspiegelkurven vergleichbar.

Tab. 4.11: Konzentration von KBA und AKBA in der Leber von Wistar-Ratten nach einmaliger oraler Gabe von *Boswellia serrata* als Extrakt (Dosierung 240 mg/kg Körpergewicht) oder nanoskaliger Formulierung (Dosierung 2,4 g/kg Körpergewicht)

t (h)	Ratte	<i>B. serrata</i> Extrakt		Nanoskalige <i>B. serrata</i> Formulierung	
		KBA (ng/g Gewebe)	AKBA (ng/g Gewebe)	KBA (ng/g Gewebe)	AKBA (ng/g Gewebe)
2	2a	188,5	578,8	226,7	264,8
	2b	269,3	924,8	638,0	1150,0
	2c	371,8	896,1	263,1	489,3
	2d	92,2	71,8	394,2	584,5
	2e	399,0	658,7	335,6	1040,6
4	4a	178,6	331,1	382,5	877,7
	4b	475,0	511,0	251,5	704,9
	4c	437,9	619,4	210,4	566,0
	4d	175,0	380,8	301,9	688,5
	4e	134,6	212,5	< LLOQ	186,3
8	8a	< LLOQ	377,1	303,7	1035,5
	8b	< LLOQ	129,8	303,9	569,9
	8c	72,3	216,8	567,6	661,8
	8d	153,3	275,7	615,9	741,1
	8e	230,1	465,0	550,5	1220,0

Im Hirn der mit *Boswellia serrata* Extrakt gefütterten Tiere konnten in nur vier von fünfzehn Tieren KBA-Konzentrationen oberhalb des LLOQ gemessen werden (56,4 bis 86,9 ng/g Hirn), AKBA wurde in Konzentrationen von 90,3 bis 335,5 ng/g Hirn nachgewiesen. Die mit nanoskaliger *Boswellia serrata* Formulierung gefütterten Tiere wiesen KBA-Hirnspiegel auf, die in sieben von fünfzehn Fällen oberhalb der LLOQ lagen (58,8 bis 150,8 ng/g Hirn), AKBA konnte in Konzentrationen von 159,7 bis 438,1 ng/g Hirn nachgewiesen werden. In Tab. 4.12 sind die Konzentrationen von KBA und AKBA in Hirngewebe detailliert aufgeführt.

Die Konzentrations-Zeit-Kurven für KBA und AKBA sind in Abb. 4.8 dargestellt.

Tab. 4.12: Konzentration von KBA und AKBA im Hirn von Wistar-Ratten nach einfacher oraler Gabe von *Boswellia serrata* als Extrakt (Dosierung 240 mg/kg Körpergewicht) oder nanoskaliger Formulierung (Dosierung 2,4 g/kg Körpergewicht)

t	Ratte	<i>B. serrata</i> Extrakt		Nanoskalige <i>B. serrata</i> Formulierung	
		KBA (ng/g Gewebe)	AKBA (ng/g Gewebe)	KBA (ng/g Gewebe)	AKBA (ng/g Gewebe)
2	2a	< LLOQ	188,8	< LLOQ	159,7
	2b	56,4	335,5	< LLOQ	249,6
	2c	< LLOQ	201,8	< LLOQ	200,0
	2d	< LLOQ	90,3	< LLOQ	239,8
	2e	61,8	246,4	63,7	348,3
4	4a	< LLOQ	220,7	72,3	306,6
	4b	86,9	300,9	< LLOQ	291,3
	4c	< LLOQ	144,4	< LLOQ	277,0
	4d	< LLOQ	215,2	< LLOQ	400,0
	4e	66,0	255,1	150,8	374,2
8	8a	< LLOQ	264,0	58,8	358,9
	8b	< LLOQ	98,3	< LLOQ	232,2
	8c	< LLOQ	121,0	67,2	213,3
	8d	< LLOQ	167,3	65,5	266,1
	8e	< LLOQ	201,7	73,1	438,1

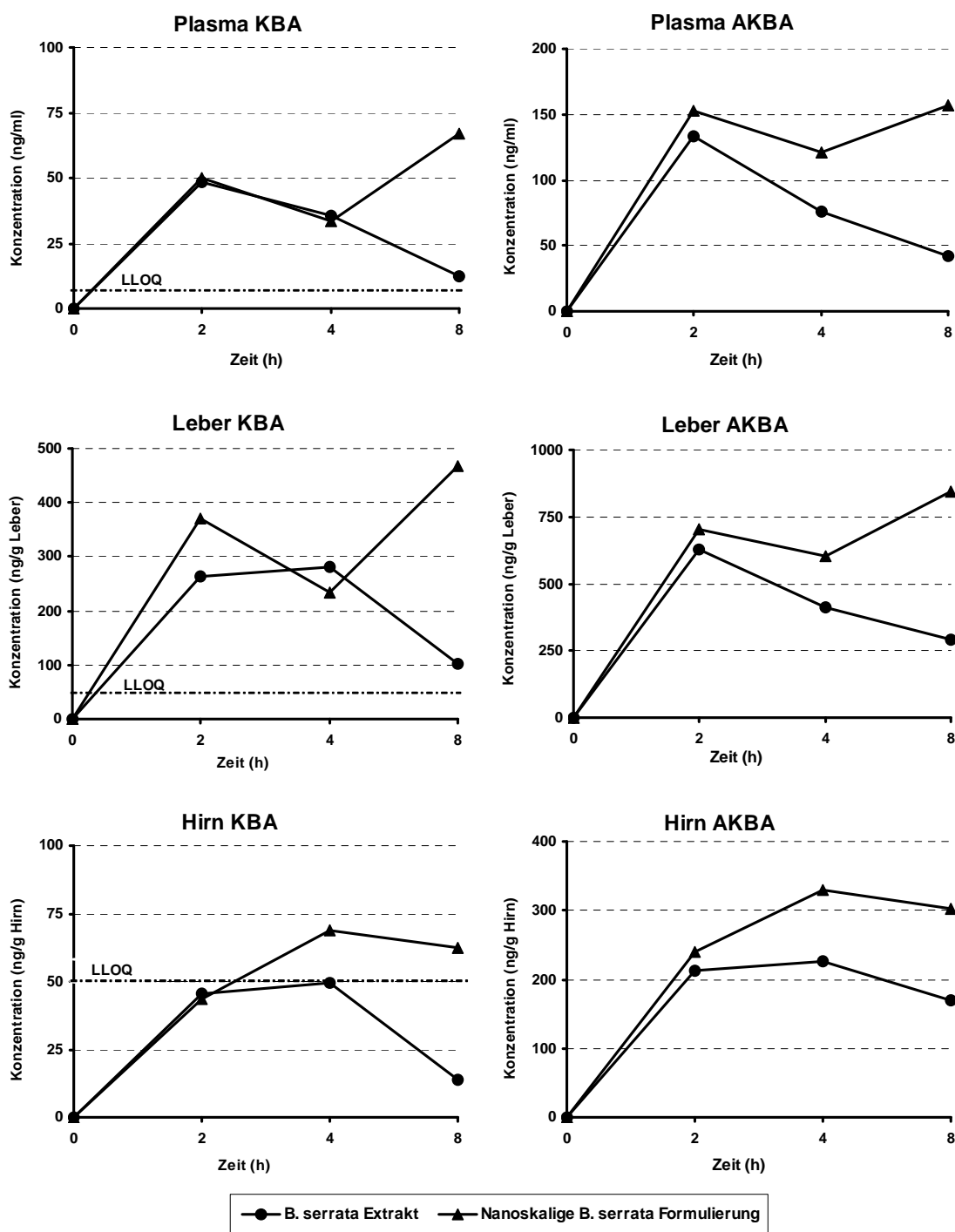


Abb. 4.8: Konzentration von KBA und AKBA in Plasma, Leber und Hirn von Wistar-Ratten nach einmaliger oraler Gabe von *Boswellia serrata* Extrakt (Dosierung 240 mg/kg Körpergewicht) oder nanoskaliger *Boswellia serrata* Formulierung (Dosierung 2,4 g/kg Körpergewicht)

4.2 Metabolismusuntersuchungen *in vitro* und *in vivo*

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen zum Metabolismus von Boswelliasäuren aufgeführt. Aus den Resultaten sollen erste Hinweise gewonnen werden, inwieweit der Metabolismus der Boswelliasäuren Einfluss auf deren Bioverfügbarkeit hat.

4.2.1 Metabolische Stabilität von KBA und AKBA *in vitro*

Um bewerten zu können, welchen Anteil die hepatische Metabolisierung der beiden am stärksten wirksamen Boswelliasäuren, KBA und AKBA, an deren geringen Bioverfügbarkeit hat, wurde die metabolische Stabilität in RLM, HLM und Hepatozyten untersucht.

4.2.1.1 Metabolische Stabilität in Ratten- und Humanlebermikrosomen

KBA und AKBA wurden in Dreifachbestimmung mit RLM und HLM inkubiert und die Abnahme der Ausgangskonzentration über die Zeit analysiert. In Abb. 4.9 ist die Durchführung der Inkubation mit RLM und HLM schematisch dargestellt.

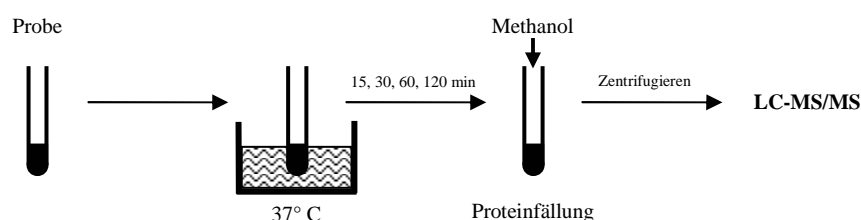


Abb. 4.9: Schema der Inkubation von KBA und AKBA mit RLM und HLM zur Bestimmung der metabolischen Stabilität

KBA unterlag sowohl in RLM als auch in HLM einem ausgeprägten Phase-I-Metabolismus. In RLM wurden bereits nach 15 min mehr als 80 % der Ausgangskonzentration metabolisiert und weniger als 1 % waren nach zwei Stunden Inkubation noch detektierbar. In HLM wurden nach 15 min bereits 60 % metabolisiert, nach zwei Stunden waren nur noch knapp 10 % der Ausgangskonzentration im Inkubationsansatz übrig. AKBA hingegen erwies sich als weniger empfindlich für Phase-I-Metabolisierungen. In RLM und HLM konnten am Ende der Inkubationszeit noch über 80 % der eingesetzten Konzentration detektiert werden (Abb. 4.10).

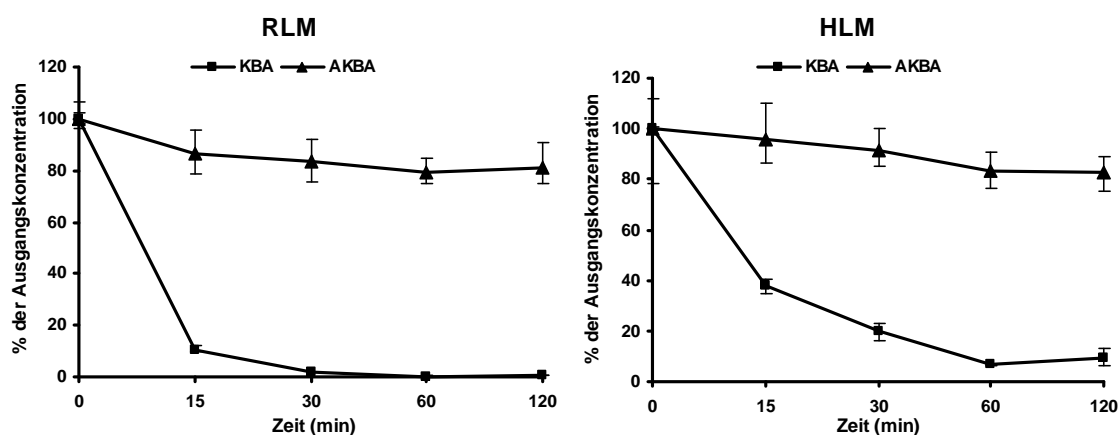


Abb. 4.10: Metabolische Phase-I-Stabilität von KBA (■) und AKBA (▲) in RLM und HLM. Die Fehlerbalken zeigen die Abweichungen der Einzelwerte ($n=3$) vom Mittelwert.

In einem weiteren Experiment sollte mit Hilfe von RLM und HLM untersucht werden, ob KBA und AKBA Phase-II-Glucuronidierungsreaktionen unterliegen und welchen Einfluss diese auf die metabolische Stabilität haben. Durch Einsatz von UDP-Glucuronsäure anstelle von NADPH als Cofaktor wurden Phase-II-Glucuronidierungsreaktionen katalysiert. Weder in RLM noch in HLM konnte nach einer Inkubationszeit von 60 min für KBA und AKBA eine Abnahme der Ausgangskonzentration festgestellt werden. Auch über ein Screening nach Metaboliten konnten keine KBA- oder AKBA-Glucuronide (4.2.3.1) identifiziert werden.

4.2.1.2 Metabolische Stabilität in Rattenhepatozyten (RH)

Die in dieser Arbeit verwendeten Hepatozyten wurden aus einer männlichen Wistar-Ratte frisch isoliert und wiesen eine Lebensfähigkeit von mehr als 85 % auf. Die RH wurden mit KBA und AKBA in Sechsfachbestimmung inkubiert und die Abnahme der Konzentration über die Zeit untersucht (Abb. 4.11). Die Aktivität der CYP-Enzyme und der Sulfotransferasen (SULT) wurde über deren Fähigkeit, 7-Ethoxycoumarin zu 7-Hydroxycoumarin und 7-Hydroxycoumarin-Sulfat zu metabolisieren in zwei Ansätzen beurteilt. Die SULT wurden als Testgröße gewählt, weil diese in der Ratte eine höhere Aktivität als die UDP-Glucuronyltransferasen aufweisen.

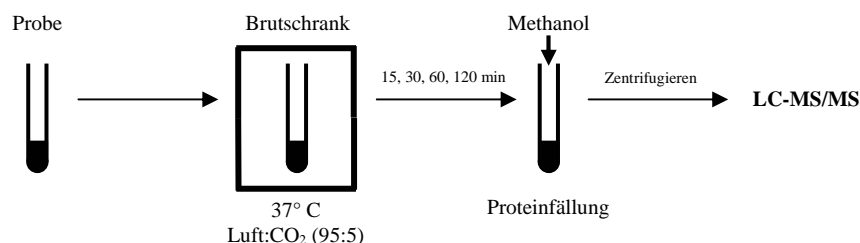


Abb. 4.11: Schema der Inkubation von KBA und AKBA mit RH zur Bestimmung der metabolischen Stabilität

Die metabolische Stabilität von KBA und AKBA in RH verhält sich ähnlich wie in RLM und HLM. Abb. 4.12 zeigt, dass KBA nach 30 min bereits zu über 80 % metabolisiert worden war und nach zwei Stunden weniger als 10 % der Ausgangskonzentration übrig waren. AKBA erscheint auch in RH metabolisch stabiler als KBA, so können mehr als 80 % der Anfangskonzentration nach zwei Stunden noch nachgewiesen werden.

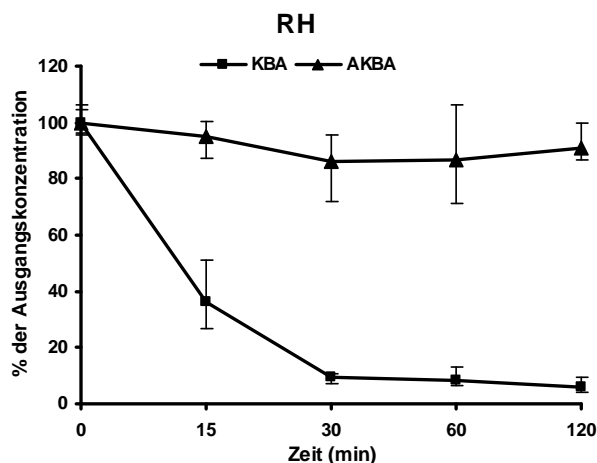


Abb. 4.12: Metabolische Stabilität von KBA (■) und AKBA (▲) in RH. Die Fehlerbalken zeigen die Abweichungen der Einzelwerte (n=6) vom Mittelwert.

Zur Identifizierung der gebildeten Metabolite wurde eine geeignete massenspektrometrische Methode entwickelt

4.2.2 Entwicklung einer massenspektrometrischen Methode zur Identifizierung von Metaboliten der Boswelliasäuren

In dieser Arbeit wurde für die Entwicklung und spätere Anwendung der Methode zur Identifizierung von Metaboliten der Boswelliasäuren eine QTrap genutzt. Das Vereinen der Vorteile zweier Massenanalysatoren erlaubt die Identifizierung und Charakterisierung von Metaboliten in einer einzigen Messung^{122,123}. Abb. 4.13 zeigt den schematischen Aufbau des genutzten analytischen Systems.

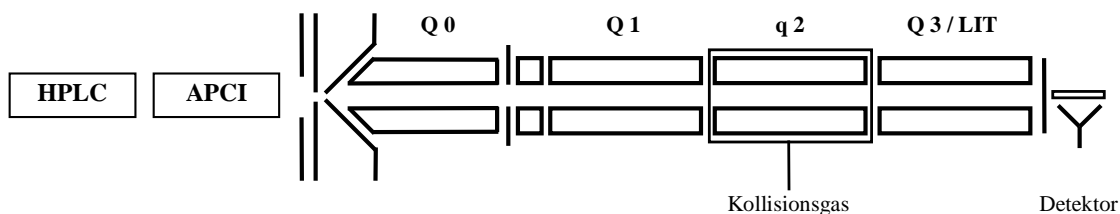


Abb. 4.13: Schematische Darstellung einer QTrap mit vorgeschalteter HPLC und APCI-Quelle

In dieser Arbeit wurde der Metabolismus von sechs Boswelliasäuren untersucht. Die bereits zur Verfügung stehende LC-MS-Methode von Reising *et al.* detektiert KBA und AKBA durch Ionisierung mittels APCI im positiven Modus⁶⁶. Um das massenspektrometrische Verhalten von sechs Boswelliasäuren (KBA, AKBA, α -Boswelliasäure (α BA), Acetyl- α -Boswelliasäure (A α BA), β -Boswelliasäure (β BA), Acetyl- β -Boswelliasäure (A β BA)) erfassen zu können, wurden die Analyte in einem Methanol-Wasser-Gemisch (50:50, v/v) gelöst und über eine Pumpe direkt in die mit einer APCI-Quelle ausgestatteten QTrap infundiert. Die Boswelliasäuren ohne Ketofunktion zeigten im positiven Modus eine nur sehr geringe Signalintensität der $[M+H]^+$ -Ionen. Im negativen Modus hingegen war diese bei allen sechs Boswelliasäuren ausreichend hoch. Vor diesem Hintergrund wurde für die folgenden Untersuchungen der negative Ionisierungsmodus gewählt. In Tab. 4.13 sind die für die Identifizierung der Metabolite detektierten $[M-H]^-$ -Ionen der Boswelliasäuren dargestellt.

Tab. 4.13: $[M-H]^-$ -Ionen der Boswelliasäuren

	KBA	AKBA	αBA	AαBA	βBA	AβBA
	(m/z)	(m/z)	(m/z)	(m/z)	(m/z)	(m/z)
$[M-H]^-$	469,2	511,3	455,3	497,3	455,3	497,3

Um eine ausreichende Ionenausbeute der Analyte zu erlangen wurden die substanzspezifischen Parameter für jede der sechs Boswelliasäuren optimiert. Die acetylierten Boswelliasäuren benötigten hierbei niedrigere Spannungen an der Eintrittsöffnung zum Q0 (Orifice) als die Boswelliasäuren ohne Acetyl-Gruppe. Die optimale Spannung am Fokussierungsring war jedoch bei allen sechs gleich. Auch die Energie, mit der die Boswelliasäuren in die Kollisionszelle (q2) beschleunigt werden mussten, um eine optimale Produkt-Ionen-Ausbeute zu erlangen, war bei den Boswelliasäuren mit Acetyl-Gruppe geringer als bei den nicht acetylierten Boswelliasäuren. Die optimierten Spannungseinstellungen sind unter 3.1.2.2 aufgeführt.

Zur Identifizierung von Metaboliten wurde nach einzelnen Massen („Multiple Ion Monitoring“, MI) der vermuteten, durch oxidative Reaktionen der Cytochrom-P450-Enzyme gebildeten Metabolite gescreent. Die lineare Ionenfalle der QTrap wurde für die Suche nach weiteren Metaboliten genutzt. Sie ermöglicht das Scannen eines Massenbereichs mit hoher Sensitivität („Enhanced Q3 Single MS“, EMS). Die identifizierten Metabolite wurden durch Aufnahme von MS/MS-Spektren verifiziert. Die im Produkt-Ionen-Modus („Enhanced Product Ions“, EPI) detektierten Produkt-Ionen wiesen ein für die Metabolite und für die Boswelliasäuren charakteristisches Fragmentierungsverhalten auf. Durch Kenntnis der aus Boswelliasäuren und deren Metabolite entstandenen Fragmente konnten außerdem weitere „unvoreingenommene“ Scans nach weiteren Metaboliten im Vorläufer-Ionen-Modus („Precursor Ion Scan“, PrecIS) durchgeführt werden. Dadurch konnten alle Metabolite, welche ein bestimmtes,

gemeinsames Fragment bilden, in einer Messung detektiert werden. Nach Phase-II-Metaboliten wie Glucuroniden, Sulfaten oder Aminosäure-Konjugaten wurde außer im MI- und EMS-Modus auch im Neutralverlust-Modus („Neutral Loss“, NL) gescreent. Dadurch können alle Phase-II-Metabolite, die durch Kollisions-induzierte-Dissoziation (CID) im q2 z.B. Glucuronsäure oder verschiedene Aminosäuren verlieren, detektiert werden. Eine besonders hilfreiche Funktion der QTrap ist die „Information dependent acquisition“ (IDA). Mit dieser Methode können verschiedene Modi miteinander kombiniert werden. Zur Identifizierung von Metaboliten wurde ein EMS-Scan durchgeführt. Die Software hat daraufhin eine vorher bestimmte Anzahl der höchsten Peaks herausgefiltert und für diese mittels EPI Daten über Produkt-Ionen aufgenommen (EMS-IDA-EPI), wodurch Metabolite innerhalb einer Messung identifiziert und verifiziert werden konnten. Durch die Anwendung von IDA konnte außerdem Probenmaterial gespart werden. Tab. 4.14 zeigt eine Übersicht der angewandten Modi.

Tab. 4.14: Angewandte Modi zur Identifizierung und Verifizierung von Metaboliten mittels LC-MS

Modus	Arbeitsweise der Massenanalysatoren	Anwendung
Single/ Multiple Ion Monitoring (SIM/ MI)	Im Q1 werden ein oder mehrere Vorläufer-Ionen herausgefiltert, im q2 und Q3 sind nur Hilfsspannungen zur Durchleitung angelegt	Identifizierung erwarteter Metabolite
Enhanced Q3 Single MS (EMS)	Im Q1 und q2 sind nur Hilfsspannungen zur Durchleitung angelegt. Q3 operiert als lineare Ionenfalle, in der Ionen gesammelt und dann gescannt werden	Identifizierung sonstiger Metabolite
Product Ion Scan (PIS)	Festgelegtes Vorläufer-Ion wird im Q1 herausgefiltert, im q2 mittels CID dissoziiert und die entstandenen Produkt-Ionen im Q3 gescannt	Verifizierung der identifizierten Metabolite
Enhanced Product Ion Scan (EPI)	Analog PIS, Q3 fungiert jedoch als lineare Ionenfalle, es resultiert eine erhöhte Sensitivität gegenüber PIS	Verifizierung der identifizierten Metabolite
Precursor Ion Scan (PrecIS)	Im Q3 wird ein festgelegtes, durch CID im q2 entstandenes, Produkt-Ion beobachtet. Wenn dies entsteht, wird auf die entsprechenden Vorläufer-Massen geschlossen	Unvoreingenommene Detektion von Metaboliten
Neutral Loss Scan (NL)	Registrierung einer fest eingestellten Massendifferenz (Abspaltung eines Neutralteilchens im q2) zwischen Q1 und Q3	Identifizierung von Phase II Metaboliten
Information Dependent Acquisition (IDA)	Verschiedene Scan Methoden können spezifisch miteinander kombiniert werden, um mit einer Injektion möglichst viele Daten zu sammeln	EMS-IDA-EPI NL-IDA-EPI PrecIS-IDA-EPI

Die in der Literatur für Boswelliasäuren beschriebenen HPLC-Methoden sind Umkehrphasen-Systeme mit RP-18 Trennsäulen^{62,63,65,66,148}. Für die LC-MS-Methode zur Identifizierung und Verifizierung von Metaboliten der Boswelliasäuren erwies sich eine RP-18-Trennsäule mit 30 mm Säulenlänge, 3,2 mm Durchmesser und einer Korngröße von 5 µm als geeignet. Die mobile Phase setzte sich aus Methanol und Wasser zusammen. Auf Zusatz von Säure musste verzichtet werden, weil die Ionenausbeute der schwach sauren Boswelliasäuren bei niedrigen pH-Werten im negativen Ionisierungsmodus geringer ist und dadurch kleinere Signale resultierten. Um eine hinreichende chromatographische Auftrennung der jeweiligen Boswelliasäure und ihrer Metabolite zu erlangen, wurden zwei Gradientenprogramme entwickelt (3.1.2.2). Die Elution beginnt mit einer polaren Mischung aus Methanol und Wasser (50:50, v/v), welche in einem linearen Gradienten in kurzer Zeit zu 100 % Methanol wechselt. Polare Metabolite werden dadurch vor, unpolare Metabolite nach der jeweiligen Boswelliasäure eluiert. Eine Flussgeschwindigkeit von 0,6 ml/min erwies sich in Kombination mit der relativ kurzen Trennsäule als geeignet. Mit diesem chromatographischen System konnten die Boswelliasäuren von ihren Metaboliten ausreichend abgetrennt werden, so dass eine eindeutige Identifizierung möglich war. Die Analysenzeit lag mit 22 min für eine Gradienten-Elution in einem vertretbaren Rahmen.

4.2.3 Identifizierung der Metabolite von Boswelliasäuren *in vitro*

4.2.3.1 Identifizierung der Metabolite von sechs Boswelliasäuren in RLM

KBA, AKBA, αBA, AαBA, βBA und AβBA wurden in Doppelbestimmung mit RLM nach dem in Abb. 4.14 dargestellten Schema inkubiert. Durch Zugabe des NRS wurden Phase-I-Metabolisierungsreaktionen katalysiert. Die Untersuchungen zur metabolischen Stabilität haben gezeigt, dass 60 min für die Bildung von Metaboliten ausreichend sind.

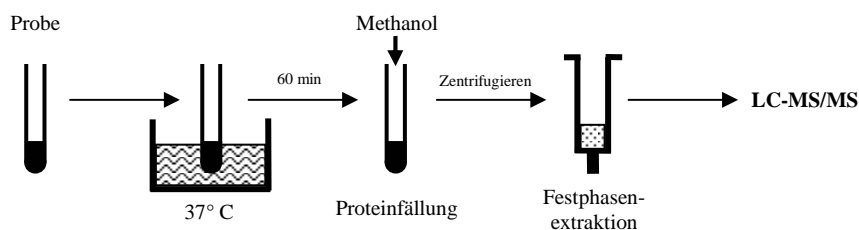


Abb. 4.14: Schema der Inkubation von Boswelliasäuren mit RLM zur Identifizierung der Metabolite

Für KBA (Abb. 4.15 A) konnten Metabolite mit den Massenverschiebungen von +16, +32 und +14 u zu KBA detektiert werden. Auf der Massenspur m/z 485,3 (entsprechend +16 u Massenverschiebung) konnten drei Metabolite detektiert werden (Abb. 4.15 B). Da diese vor KBA eluierten, handelt es sich wahrscheinlich um monohydroxylierte KBA-Derivate, welche hydrophiler als KBA sind. Diese Vermutung wird durch den

Vergleich der MS/MS-Spektren von KBA und diesen Metaboliten gestärkt. Während das MS/MS-Spektrum von KBA Fragmente mit m/z 376,4, 391,3, 407,3 und 451,3 (Abb. 4.15 E) zeigte, erzeugten die drei monohydroxylierten Derivate dieselben Fragmente mit m/z 392,2, 407,2, 423,2 und 467,3 (Abb. 4.15 F) mit der charakteristischen Massenverschiebung von +16 u, was stark auf eine zusätzliche Hydroxyl-Gruppe hindeutet. Auf der Massenspur m/z 501,2 (entsprechend +32 u) konnten diverse Metabolite bei $t = 2,4$ bis $7,8$ min detektiert werden, die im MS/MS-Spektrum Produkt-Ionen mit einer charakteristischen Massenverschiebung von +32 u im Vergleich zu denen von KBA bei m/z 408,2, 423,1 und 439,3 ergaben (Abb. 4.15 C, G). Diese Ergebnisse deuten auf zwei zusätzliche Hydroxyl-Gruppen hin. Weiterhin wurden zwei Signale bei $t = 5,4$ und $8,0$ min mit einem $[M-H]^-$ -Ion mit m/z 483,2 detektiert (Abb. 4.15 D), was einer Verschiebung der Masse von +14 u entspricht. Wie auch schon zuvor zeigt sich im MS/MS-Spektrum wieder die charakteristische Verschiebung der Fragmentmassen um +14 u zu den KBA-Fragmenten mit m/z 390,2, 405,2 und 421,3 (Abb. 4.15 H), woraus zu schließen ist, dass diese Produkte aus KBA gebildet wurden. Die Peaks bei $10,9$, $11,1$ und $12,7$ min stammen nicht von KBA, weil sie auch in der Kontrolle sichtbar waren und nicht das für KBA charakteristische Fragmentierungsmuster zeigten.

Wie bereits erwähnt (4.2.1.1) wurde der Versuchsansatz zur Bestimmung der metabolischen Stabilität bei Phase-II-Glucuronidierungsreaktionen auch auf die Anwesenheit von Glucuronsäure-Konjugaten untersucht. Durch NL-Scans (NL176) wurde nach Glucuronsäure-Konjugaten von KBA oder deren Metaboliten gesucht. Außerdem erfolgten PrecIS-Scans basierend auf den KBA-Fragmenten mit m/z 391, 407, 423 und 421. Weder von KBA noch von KBA-Metaboliten konnten Konjugate mit Glucuronsäure detektiert werden.

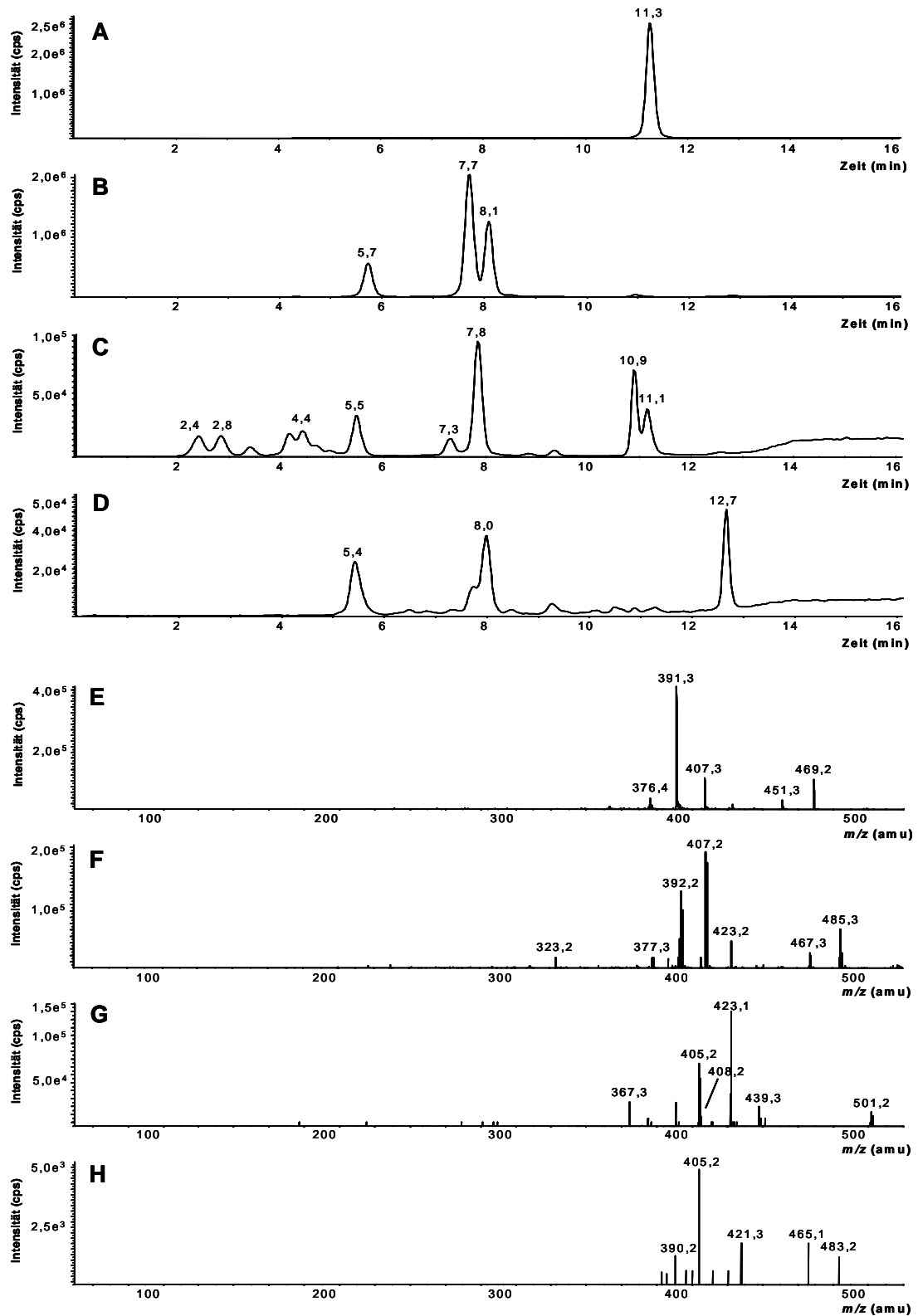


Abb. 4.15: SIM-Chromatogramme und Produkt-Ionen-Spektren von KBA (A, E) und den entsprechenden Metaboliten mit Massenverschiebungen von +16 u (B, F), +32 u (C, G) und +14 u (D, H) *in vitro* im negativen Ionisierungsmodus

Die Untersuchungen zur metabolischen Stabilität in RLM und RH haben gezeigt, dass die metabolische Umwandlungsrate von AKBA geringer ist als die von KBA. Folglich wurden für AKBA in RLM (Abb. 4.16 A) auch nur Metabolite mit einer Massenverschiebung von +16 u detektiert. Die Massenspur m/z 527,3 zeigte drei monohydroxylierte AKBA-Derivate bei $t = 7,7, 8,2$ und $9,4$ min (Abb. 4.16 B). Wie bei KBA wurde die Zuordnung der Metabolite zu AKBA durch MS/MS-Daten bestätigt. Die MS/MS-Spektren von AKBA (Abb. 4.16 C) und deren Metaboliten (Abb. 4.16 D) zeigten beide als charakteristisches Fragment das abgespaltene Acetat-Ion bei m/z 59,0, was stark darauf hindeutet, dass diese Metabolite aus AKBA gebildet wurden. Die Peaks bei 11,2 und 13,6 min stammen nicht von AKBA, weil sie auch in der Kontrolle sichtbar waren und nicht das für AKBA charakteristische Fragment zeigten.

Auch für AKBA wurde die inkubierte Lösung zur Bestimmung der metabolischen Stabilität bei Phase-II-Glucuronidierungsreaktionen (4.2.1.1) auf die Anwesenheit von Glucuronsäure-Konjugaten untersucht. Die Analytik erfolgte wie für KBA durch NL-Scans (NL176) und PrecIS-Scans (basierend auf dem m/z 59-Fragment). Weder von AKBA noch von AKBA-Metaboliten konnten Konjugate mit Glucuronsäure detektiert werden.

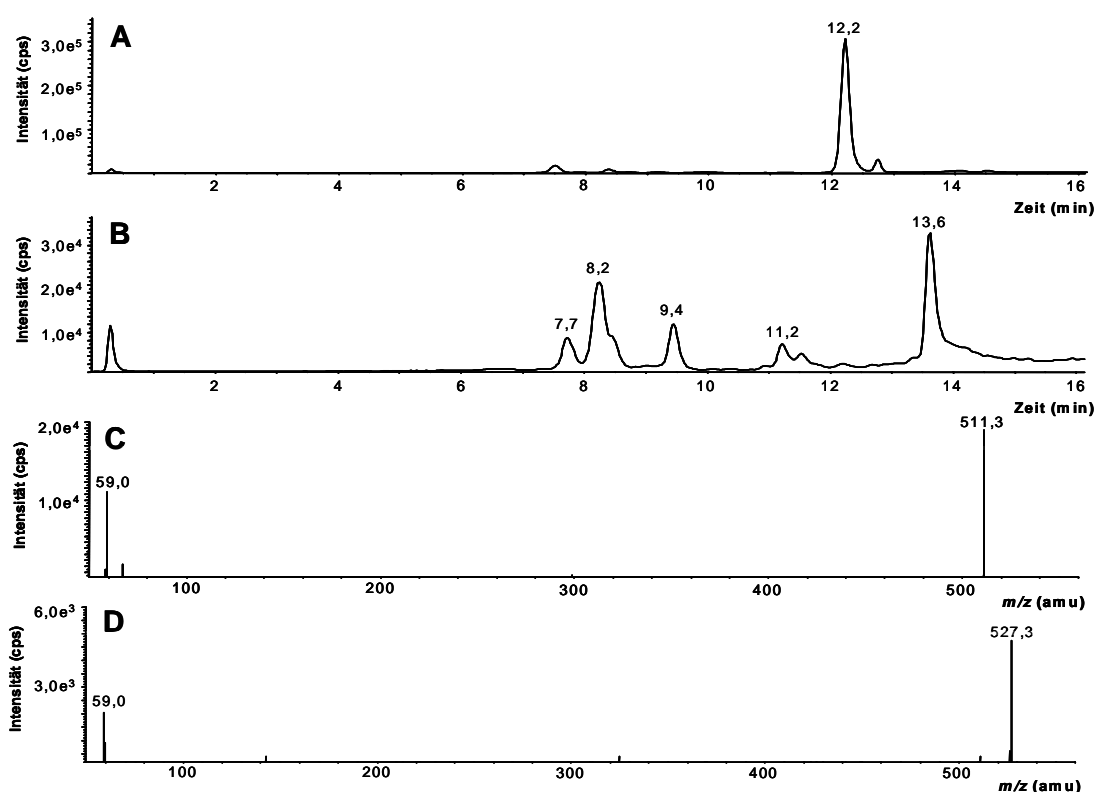


Abb. 4.16: SIM-Chromatogramme und Produkt-Ionen-Spektren von AKBA (A, C) und des entsprechenden Metaboliten mit der Massenverschiebung von +16 u (B, D) *in vitro* im negativen Ionisierungsmodus

Die Inkubation von α BA (Abb. 4.17 A) mit RLM führte zur Bildung diverser Metabolite mit Massenverschiebungen von +16 und +32 u. Auf der Massenspur m/z 471,3 wurden drei Metabolite detektiert (Abb. 4.17 B). Da diese vor α BA eluieren, handelt es sich wahrscheinlich um monohydroxylierte α BA-Derivate, welche hydrophiler als α BA sind. Bei Vergleich der MS/MS-Spektren sind die Fragmente von α BA bei m/z 361,3, 393,3, 409,3 und 437,3 (Abb. 4.17 D) um +16 u verschoben (Abb. 4.17 E), was wiederum auf eine zusätzliche Hydroxyl-Gruppe hindeutet. Weiterhin wurden bei m/z 487,3 (entsprechend +32 u Massenverschiebung) drei dihydroxylierte Metabolite detektiert (Abb. 4.17 C), welche die charakteristischen um +32 u verschobenen Fragmentierungsschemas von α BA zeigten (Abb. 4.17 F).

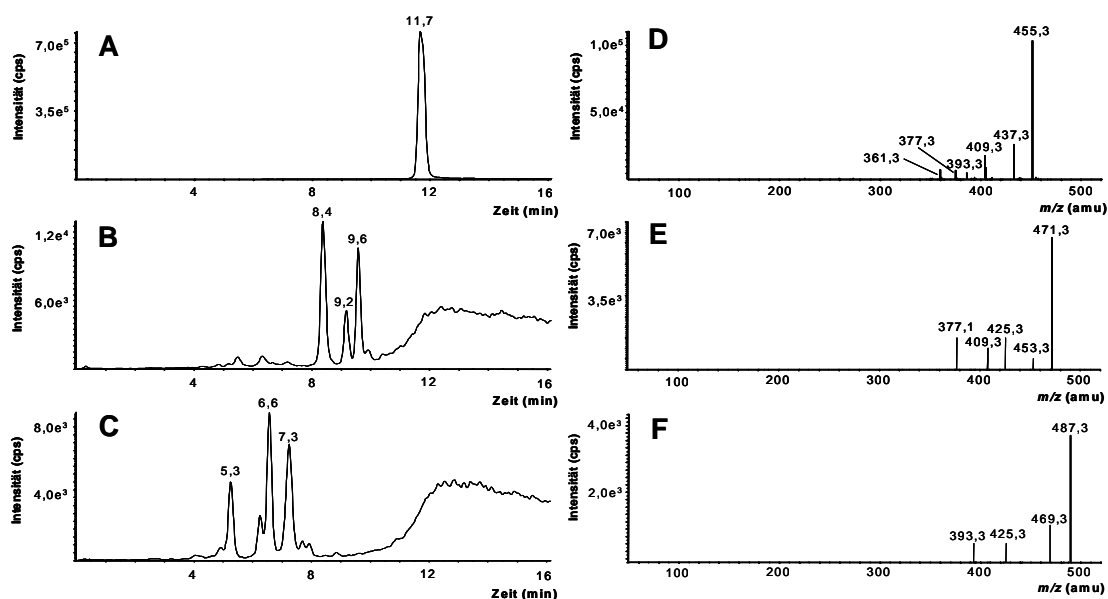


Abb. 4.17: SIM-Chromatogramme und Produkt-Ionen-Spektren von α BA (A, D) und den entsprechenden Metaboliten mit Massenverschiebungen von +16 u (B, E) und +32 u (C, F) *in vitro* im negativen Ionisierungsmodus

Abb. 4.18 A, B und C zeigen die SIM-Chromatogramme von β BA, der monohydroxylierten β BA-Derivate und der dihydroxylierten β BA-Derivate, die analog der α BA-Derivate gebildet wurden. Die MS/MS-Spektren (Abb. 4.18 E, F und G) zeigten die bekannten für die Metabolite verschobenen Fragmentierungsmuster. Zusätzlich wurde auf der Massenspur m/z 503,2 (entsprechend + 48 u Massenverschiebung) ein weiterer Metabolit bei $t = 4,5$ min detektiert (Abb. 4.18 D), der zwei für β BA charakteristische Fragmente zeigte, welche um + 48 u verschoben waren und somit auf ein trihydroxyliertes Derivat von β BA hindeuteten (Abb. 4.18 H). Der Peak bei 0,3 min stammt nicht von β BA, weil er auch in der Kontrolle sichtbar war und nicht das für β BA charakteristische Fragmentierungsmuster zeigte.

Weder für $A\alpha$ BA noch für $A\beta$ BA konnten durch Inkubation mit RLM Metabolite detektiert werden.

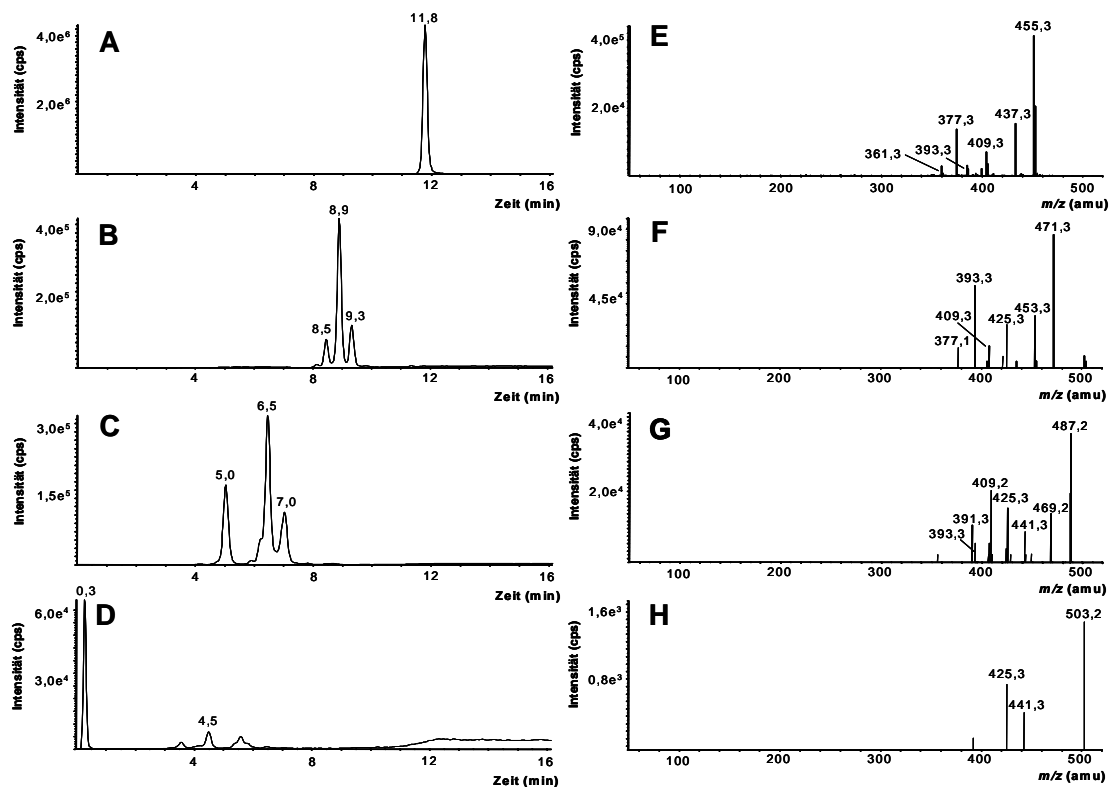


Abb. 4.18: SIM-Chromatogramme und Produkt-Ionen-Spektren von β BA (A, E) und den entsprechenden Metaboliten mit Massenverschiebungen von +16 u (B, F), +32 u (C, G) und +48 u (D, H) *in vitro* im negativen Ionisierungsmodus

Da in keiner der Kontrollinkubationen die oben genannten Metabolite detektierbar waren, wird angenommen, dass die identifizierten und verifizierten Boswelliasäure-Derivate (Tab. 4.15) durch enzymatische Metabolisierungsreaktionen entstanden sind.

4.2.3.2 Identifizierung der Metabolite von KBA und AKBA in Rattenhepatozyten

Für diese Untersuchungen stand die QTrap nicht zur Verfügung. Es wurde daher ein QqQ für die Analytik genutzt. EMS-Scans wurden statt mit der linearen Ionenfalle mit dem Q1 durchgeführt. Der EPI-Modus der QTrap wurde durch den PIS-Modus des QqQ-Instruments ersetzt. IDA war nicht möglich, alle übrigen Scan-Modi konnten unverändert durchgeführt werden. Da bei diesem Instrument mit geringerer Sensitivität als bei der QTrap zu rechnen war, wurden die Inkubationen mit höheren KBA- und AKBA-Konzentrationen durchgeführt. Ausgewertet wurden die Analysenansätze der metabolischen Stabilität von KBA und AKBA in RH nach 60 min Inkubation (4.2.1.2). Nach dieser Zeit war der Großteil der eingesetzten KBA- und AKBA-Konzentration von den Hepatozyten metabolisiert.

Für KBA konnten drei monohydroxylierte ($t = 5,6, 7,7$ und $7,9$ min), drei dihydroxylierte ($t = 2,5, 4,4$ und $7,8$ min) und ein trihydroxylierter Metabolit ($t = 2,0$ min) detektiert werden. Die MS/MS-Spektren zeigten das für KBA-Metabolite schon in den RLM detektierte Fragmentierungsmuster und dessen Verschiebungen.

Mittels NL-Scans (NL176, NL80, NL129, NL75, NL57) wurde nach Glucuronsäure-, Sulfat-, Glutathion- und Glycin-Konjugaten gesucht. Außerdem erfolgten Vorläufer-Ionen-Scans basierend auf den KBA-Fragmenten m/z 391, 407, 423 und 421. Es konnten jedoch keine Phase-II-Metabolite von KBA identifiziert werden.

AKBA wurde in den RH nur zu einem monohydroxylierten Derivat ($t = 8,1$ min) metabolisiert, was durch Auswertung der MS/MS-Spektren in Analogie zu den RLM bestätigt werden konnte. Die Suche nach Phase-II-Metaboliten von AKBA erfolgte wie bei KBA. Die Vorläufer-Ionen-Scans erfolgten auf Basis des m/z 59-Fragments. Tab. 4.15 gibt einen Überblick über alle identifizierten und verifizierten Metabolite der sechs Boswelliasäuren *in vitro*.

Die oben genannten Metabolite wurden in keiner der Kontrollinkubationen detektiert.

Tab. 4.15: Übersicht über die identifizierten und verifizierten Metabolite von sechs Boswelliasäuren *in vitro*

	Vorläufer-Substanz	Metabolite			
		Mono-hydroxyliert	Di-hydroxyliert	Tri-hydroxyliert	Hydroxyliert + Dehydriert
<u>Rattenlebermikrosomen</u>					
KBA	+	+	+	-	+
AKBA	+	+	-	-	-
α BA	+	+	+	-	-
β BA	+	+	+	+	-
A α BA	+	-	-	-	-
A β BA	+	-	-	-	-
<u>Rattenhepatozyten</u>					
KBA	+	+	+	+	-
AKBA	+	+	-	-	-

4.2.4 Identifizierung der Metabolite von Boswelliasäuren *in vivo*

4.2.4.1 Probenaufarbeitung und analytische Methode

Die Probenaufarbeitung erfolgte mittels der bereits in Kapitel 4.1.4 beschriebenen sorbensgestützten Flüssig-Flüssig-Extraktion von KBA und AKBA aus biologischen Matrices. Es wurde jedoch die sechsfache Probenmenge zur Extraktion eingesetzt, wodurch eine Aufkonzentrierung der Probe erreicht und zahlreiche Metabolite detektiert werden konnten. Die Identifizierung der Metabolite erfolgte mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten, in Kapitel 4.2.2 beschriebenen LC-MS-Methode.

4.2.4.2 Tierstudie

Im Rahmen einer Tierstudie (Abb. 4.19) wurden die in Ratten aus KBA und AKBA gebildeten Metabolite identifiziert, verifiziert und das metabolische Profil mit dem der *in vitro*-Versuche verglichen. Die gewählte Dosis von 12,5 mg KBA oder AKBA pro kg Körpergewicht entspricht einer Dosis von 240 mg Extrakt pro kg Körpergewicht, welche in bisherigen Studien verwendet wurde. Die Versuchsdauer wurde auf Basis der Erkenntnisse zur metabolischen Stabilität *in vitro* sowie der *in vivo*-Studie mit Wistar-Ratten von Reising festgelegt¹⁴¹.

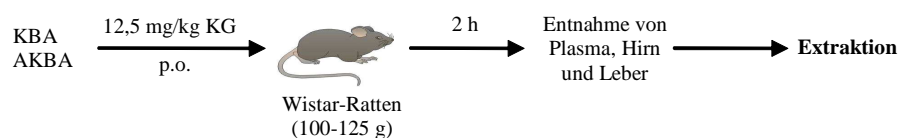


Abb. 4.19: Schematischer Überblick zum Studiendesign der Metabolismusuntersuchungen mit Wistar-Ratten

4.2.4.3 Identifizierung der Metabolite von KBA und AKBA *in vivo*

Nach der oralen Gabe von KBA wurden diverse Metabolite in der Leber identifiziert (Abb. 4.20 A). Neben drei monohydroxylierten ($t = 5,7, 7,7$ und $8,0$ min; Abb. 4.20 B) wurden vier dihydroxylierte KBA-Derivate ($t = 2,8, 3,4, 4,4$ und $7,8$ min; Abb. 4.20 C) und ein trihydroxylierter Metabolit ($t = 1,8$ min; Abb. 4.20 D) detektiert. Die MS/MS-Spektren der Metabolite korrelierten sehr gut mit denen von KBA und die Fragmentierungsmuster wiesen die für KBA charakteristischen Massenverschiebungen auf (Abb. 4.20 E-H). Phase-II-Metabolite von KBA konnten im Lebergewebe nicht entdeckt werden. Die Peaks bei $6,0, 9,1, 10,8, 11,0, 13,6, 13,9$ und $14,0$ min können KBA nicht zugeordnet werden, weil sie auch in der Kontrolle sichtbar waren und nicht das für KBA charakteristische Fragmentierungsmuster zeigten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Leber eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von KBA spielt.

In der AKBA-Gruppe konnte AKBA zwar in der Leber der Ratten detektiert werden, doch gab es keine Hinweise auf Metabolite.

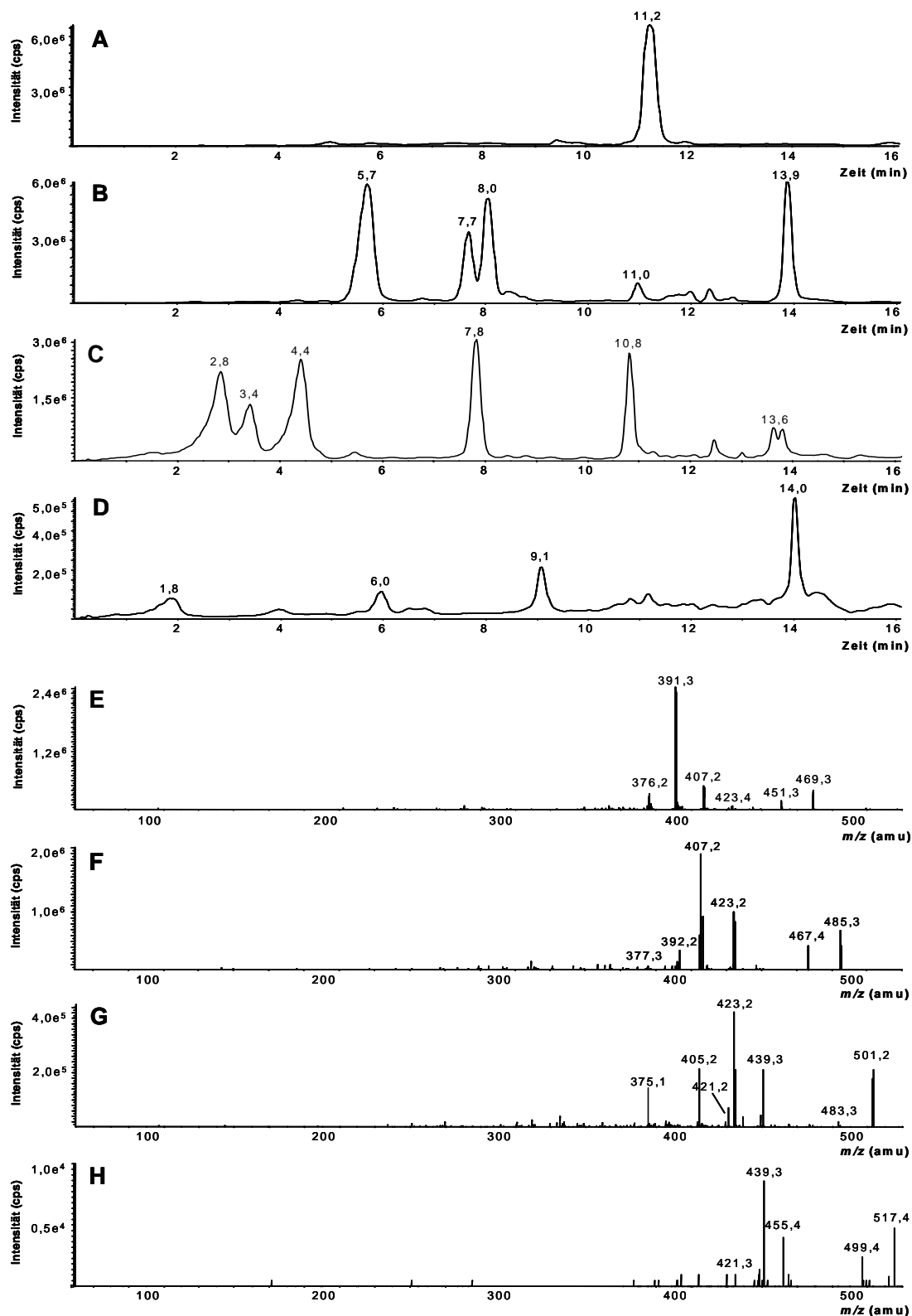


Abb. 4.20: SIM-Chromatogramme und Produkt-Ionen-Spektren von KBA (A, E) und deren Metabolite mit Massenverschiebungen von +16 u (B, F), +32 u (C, G) und +48 u (D, H) in Rattenleber im negativen Ionisierungsmodus

Im Plasma der Tiere, die mit KBA gefüttert wurden, konnten zwei monohydroxylierte ($t = 5,7$ und $8,1$ min) und ein dihydroxylierter Metabolit ($t = 7,8$ min) erfasst werden. Ihre MS/MS-Spektren zeigten die charakteristischen Massenverschiebungen von KBA, was die Zuordnung dieser Metabolite zu KBA unterstreicht. Phase-II-Metabolite von KBA konnten im Plasma nicht entdeckt werden.

In der Gruppe, die mit AKBA gefüttert wurde, konnte zwar AKBA im Plasma der Ratten detektiert werden jedoch keinerlei AKBA-Metabolite.

Während KBA im Hirn der Ratten, die KBA erhielten, nachgewiesen werden konnte, wurden keine Metabolite von KBA detektiert. Im Hirn der Ratten, die AKBA erhielten, konnte ebenfalls nur AKBA detektiert werden und keine Metabolite.

In der Leber, im Plasma oder im Hirn der Tiere der Kontrollgruppe wurden weder KBA noch AKBA oder einer der Metabolite detektiert.

Die *in vitro*-identifizierten Metabolite korrelierten sehr gut mit den *in vivo* im Plasma und in der Leber gefundenen Metaboliten. Ein Überblick über alle von KBA und AKBA identifizierten Metabolite ist in Tab. 4.16 dargestellt.

Tab. 4.16: Übersicht über die identifizierten Metabolite von KBA und AKBA *in vitro* und *in vivo*

	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>		
	Rattenleber- mikrosomen	Ratten- hepatozyten	Plasma	Leber	Hirn
KBA	+	+	+	+	+
Monohydroxyliert	+	+	+	+	-
Dihydroxyliert	+	+	+	+	-
Trihydroxyliert	-	+	-	+	-
Hydroxyliert,Dehydriert	+	-	-	-	-
AKBA	+	+	+	+	+
Monohydroxyliert	+	+	-	-	-

4.2.5 Deacetylierung von AKBA zu KBA

Nach Inkubation von AKBA mit RH konnten nur geringe Mengen an KBA detektiert werden. Weniger als 2 % der AKBA-Ausgangskonzentration wurden nach zweistündiger Inkubation (4.2.1.2) zu KBA deacetyliert. Da das Ionisierungsverhalten von KBA und AKBA ähnlich ist, wurden ihre Peakflächen direkt miteinander verglichen (Abb. 4.21).

Die Plasma-, Leber- und Hirnproben der Tiere, die AKBA erhielten, wurden auf die Anwesenheit von KBA untersucht. Im Plasma war KBA fast nicht detektierbar und in

der Leber verhielt es sich ähnlich wie in RH. Im Chromatogramm von KBA (Abb. 4.22 C, D), sind bei $t = 11,2$ min nur sehr geringe Mengen KBA detektierbar. Die Peaks bei $t = 9,7, 9,9, 10,6$ und $12,8$ min stammen nicht von KBA, da sie auch in der Kontrolle vorhanden waren und nicht die für KBA charakteristischen Fragmente zeigten. Im Hirn der Ratten, die AKBA erhielten, konnte kein KBA identifiziert werden.

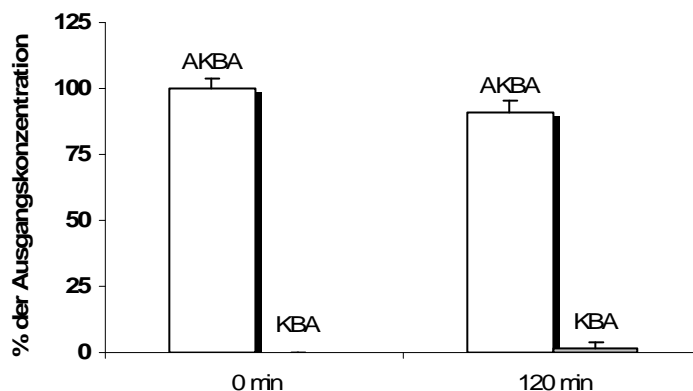


Abb. 4.21: Deacetylierung von AKBA zu KBA in RH. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Einzelwerte ($n=6$) an

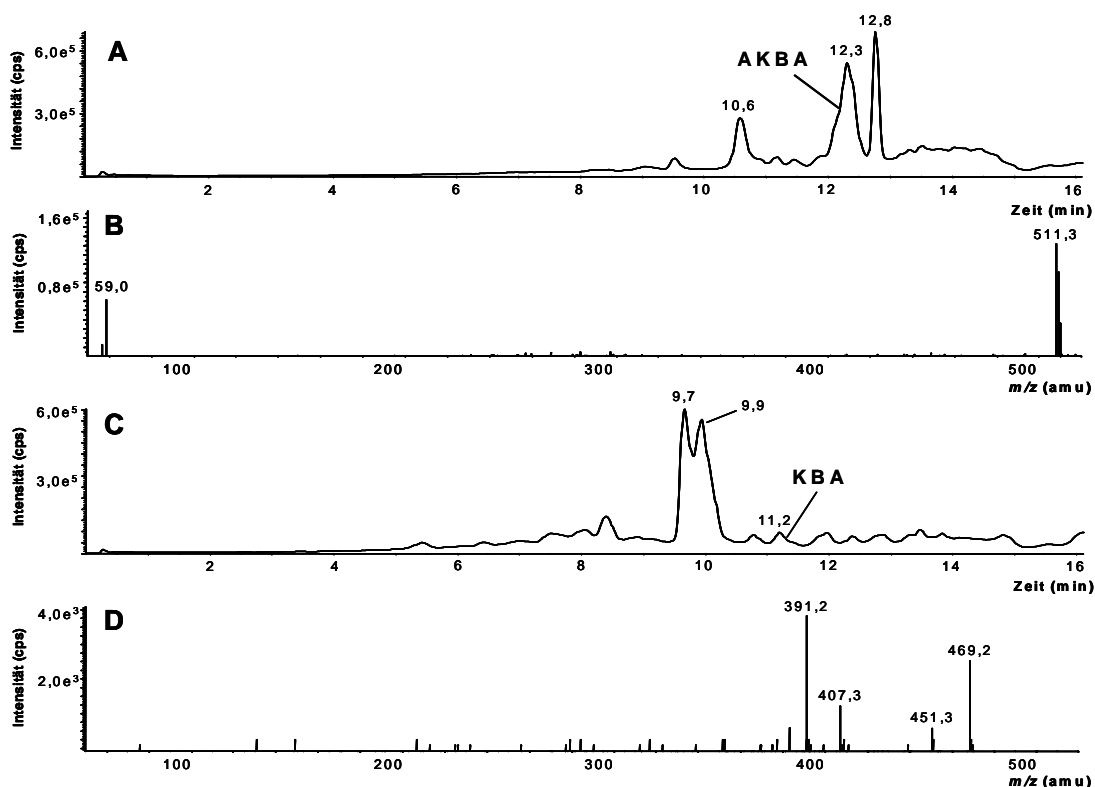


Abb. 4.22: SIM-Chromatogramme und Produkt-Ionen-Spektren von AKBA (A, B) und KBA (C, D) in der Leber von Ratten, die mit AKBA gefüttert wurden

4.3 Permeationsuntersuchungen *in vitro*

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln der Einfluss der Löslichkeit und des Metabolismus auf die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren untersucht wurde, befasst sich dieses Kapitel mit der Absorption bzw. Permeation der beiden am stärksten wirksamen Boswelliasäuren, KBA und AKBA, durch Biomembranen. Aus den folgenden Versuchen sollen Hinweise gewonnen werden, inwieweit die Permeabilität der beiden Boswelliasäuren Einfluss auf deren Bioverfügbarkeit hat.

Die Validität des Caco-2-Testsystems wurde durch die Messung des TEER-Werts vor und nach den Transporten sowie durch mikroskopische Begutachtung der Zellmonolayer belegt. Als Positivkontrolle diente Propranolol, welches als lipophile Substanz sehr gut transzellulär transportiert. Die in dieser Studie ermittelten P_{app} -Werte für Propranolol liegen mit $17,0 \cdot 10^{-6}$ cm/s ($n = 3$, CV = 1,7 %) in dem Bereich von 11,0 bis $35,6 \cdot 10^{-6}$ cm/s, wie sie in anderen Studien ermittelt werden konnten^{97,149,150}.

Weber *et al.* haben zuvor *Boswellia serrata* Extrakt, KBA und AKBA als potente Pgp-Inhibitoren identifiziert¹³¹. Um zu klären, ob die Boswelliasäuren selbst Substrat von Pgp sind oder die Hemmung allosterisch erfolgt, wurde mit Hilfe von Caco-2-Zellen, welche Pgp auf der Oberseite des konfluenten Monolayers exprimieren¹⁵¹, überprüft, ob die Anwesenheit des Pgp-Inhibitors Verapamil zu einer erhöhten Permeation durch den Zellmonolayer führt.

Die Permeationsversuche wurden außer mit den Reinsubstanzen KBA und AKBA auch mit dem *Boswellia serrata* Extrakt und mit der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung durchgeführt. Der Vergleich sollte klären, ob der Extrakt in nanoskaliger Formulierung besser durch Zellmonolayer permeieren kann.

Es lagen keine Toxizitätsdaten von Boswelliasäuren in Verbindung mit Caco-2-Zellen vor. Um eine negative Beeinflussung des Zellsystems auszuschließen und der geringen Löslichkeit des Extrakts in wässrigen Medien gerecht zu werden, wurde eine niedrige Probenkonzentration gewählt. Damit auf der Akzeptorseite die erwarteten geringen Mengen an KBA oder AKBA detektiert werden konnten, wurde die bereits erwähnte quantitative LC-MS-Methode angewandt (3.1.2.1). Die Methode lies bei einem LLOQ von 5 ng/ml und dem Einsatz von 10 µg/ml Substanz auf der Donorseite die Bestimmung von bis zu 0,05 % permeierter Substanz in Bezug auf die aufgegebene Konzentration von KBA oder AKBA auf die Donorseite zu.

In anfänglichen Untersuchungen wurde der LC-MS-Analytik eine Probenaufarbeitung mittels Extrelut® (3.2.5) vorgeschaltet, um im Transportpuffer (KRB) enthaltenes Phosphat abzutrennen. Phosphate können zu einer erheblichen Signalsuppression bei der massenspektrometrischen Detektion führen¹³⁸. Die Permeationsuntersuchungen offenbarten jedoch, dass KRB als Lösungsmittel zu keiner relevanten Signalsuppression führte. Der Vergleich von mittels Extrelut® aufgearbeiteten Proben mit direkt mit Methanol verdünnten Proben zeigte keinen Unterschied in der Signalintensität. Um sicherzustellen, dass die Phosphat-Ionen die Ionisierung der Analyten über einen gesamten Analysenlauf nicht beeinflussten, wurde die Systemeignungslösung (3.1.1)

am Anfang und am Ende jedes Analysenlaufs sechsfach injiziert und die mittleren Peakflächen miteinander verglichen. Es konnten keine Abweichungen der Mittelwerte von mehr als 2 % festgestellt werden.

4.3.1 Transportversuche im Caco-2-Modell

Folgende Transportversuche wurden mit frisch hergestellten Prüflösungen von KBA, AKBA, *Boswellia serrata* Extrakt und nanoskaliger *Boswellia serrata* Formulierung (3.6.1) jeweils in sechs Ansätzen durchgeführt:

37° C	Apikal	→	Basolateral	
37° C	Apikal	→	Basolateral	+ 50 µM Verapamil
37° C	Basolateral	→	Apikal	
37° C	Basolateral	→	Apikal	+ 50 µM Verapamil
4° C	Apikal	→	Basolateral	

4.3.1.1 Bestimmung der Permeabilität von KBA

Bei den Transportversuchen bei 37° C in absorptiver Richtung konnten 0,87 % der apikal zugegebenen KBA-Reinsubstanzlösung und 0,80 % der zugegebenen KBA-Extraktlösung auf der basolateralen Seite nachgewiesen werden.

Die Transporte von basolateraler nach apikaler Seite zeigten für die KBA-Reinsubstanzlösung sowie für die KBA-Extraktlösung eine Permeation von jeweils weniger als 0,10 % der basolateral eingesetzten Konzentration.

Bei 4° C permeierte KBA als Reinsubstanz zu 0,43 % und aus dem Extrakt zu 0,77 % von der apikalen zu der basolateralen Seite.

In Anwesenheit des Pgp-Inhibitors Verapamil konnte keine Veränderung der Permeation von KBA weder in absorptiver noch in sekretorischer Richtung festgestellt werden. Bei den Transportversuchen mit der KBA-Extraktlösung jedoch wurde eine erniedrigte Permeation von 0,47 % von der apikalen in die basolaterale Richtung beobachtet. Abb. 4.23 zeigt die Ergebnisse der Permeationsversuche von KBA.

4.3.1.2 Bestimmung der Permeabilität von AKBA

AKBA konnte bei den Transporten bei 37° C von der apikalen zu der basolateralen Seite im Akzeptorkompartiment nicht detektiert werden. In Gegenwart von Verapamil wurde AKBA nur aus der AKBA-Extraktlösung auf der basolateralen Seite nachgewiesen (0,20 %). Weder bei den Transporten von basolateraler nach apikaler Seite noch bei 4° C konnte AKBA im Akzeptorkompartiment detektiert werden.

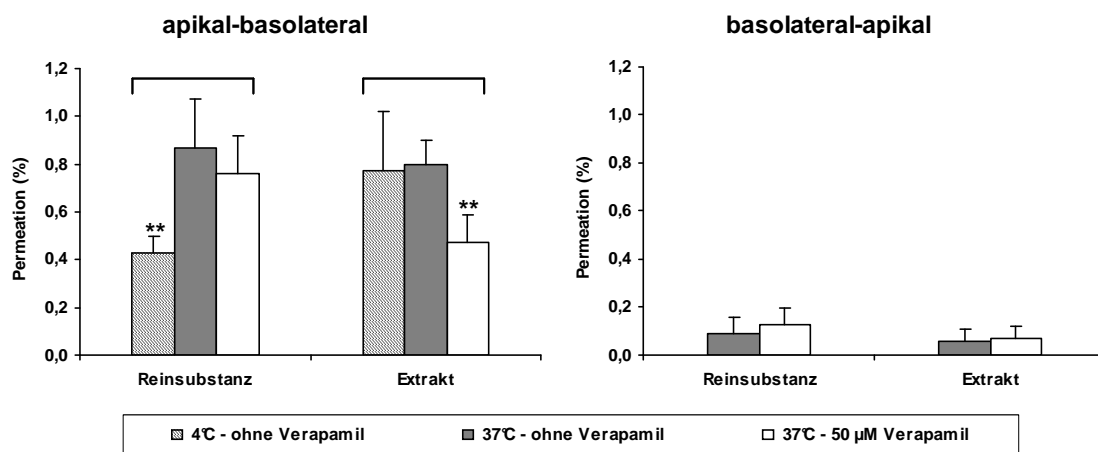


Abb. 4.23: Permeation von KBA als Reinsubstanz und aus *Boswellia serrata* Extrakt durch Caco-2-Zellmonolayer bei verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Einzelwerte ($n = 6$) an. ** $p < 0,01$

4.3.1.3 Bestimmung der apparenten Permeationskoeffizienten von KBA und AKBA

Aus der kumulativen Arzneistoffkonzentration im Akzeptorkompartiment wurde für KBA als Reinsubstanz ein P_{app} -Wert von $1,69 \cdot 10^{-6}$ cm/s ermittelt. In Gegenwart von Verapamil betrug dieser $1,52 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Aus dem Extrakt zeigte KBA einen P_{app} -Wert von $2,14 \cdot 10^{-6}$ cm/s, mit Verapamil wurden $1,21 \cdot 10^{-6}$ cm/s ermittelt (Abb. 4.24).

AKBA konnte weder als Reinsubstanz noch aus dem Extrakt zu einem der Prüfzeitpunkte im Akzeptorkompartiment nachgewiesen werden, somit war die Bestimmung des P_{app} -Werts nicht möglich.

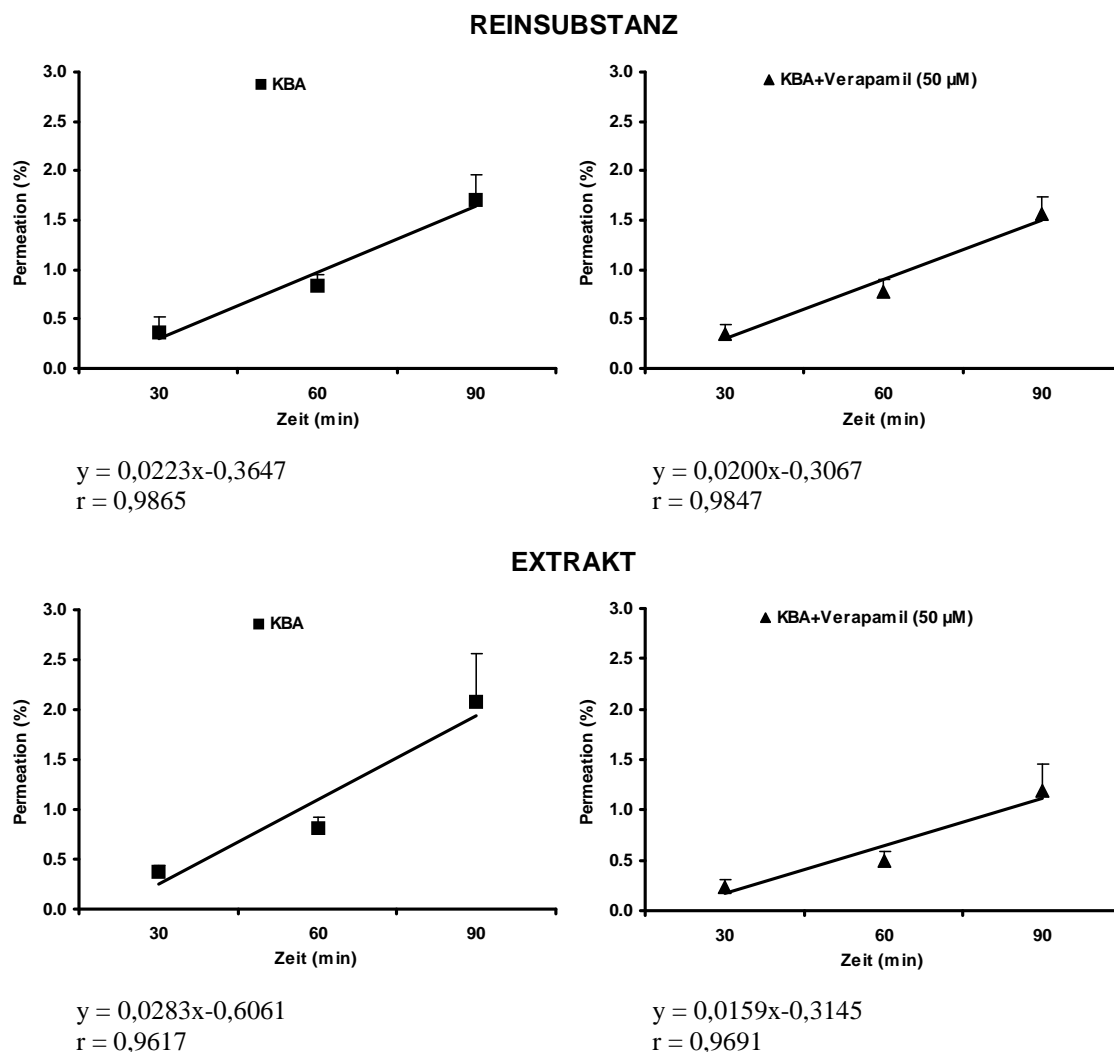


Abb. 4.24: Permeation von KBA als Reinsubstanz und aus *Boswellia serrata* Extrakt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Einzelwerte ($n = 3$) an. Die angelegten Geraden wurden durch lineare Regression ohne Wichtung erhalten

4.3.1.4 Bestimmung der Verteilung von KBA und AKBA im Caco-2-Modell

Nach Abschluss der Transportversuche von apikaler Seite in basolaterale Richtung wurde bei dem Vergleich der Konzentrationen von KBA und AKBA in der Donor- und der Akzeptorkammer ein erheblicher Verlust in der Massenbilanz beobachtet. Daher wurde zusätzlich untersucht, welche Menge an Prüfsubstanz in die Zellen aufgenommen oder an den Zellen adsorbiert wurde. Die eingesetzten Konzentrationen der Prüflösungen dienten als 100 %-Wert.

79 % der eingesetzten Konzentration an KBA wurden in dem lysierten Zellhomogenat nachgewiesen. Auf der apikalen Seite verblieben nach 90-minütiger Inkubation ca. 11 % KBA, weniger als 2 % permeierten durch die Zellen in das basolaterale Kompartiment (Abb. 4.25 A). Aus dem Extrakt konnten 45 % KBA auf der apikalen

Seite und 43 % in dem lysierten Zellhomogenat wiedergefunden werden. Die Permeation lag bei etwa 2 % (Abb. 4.25 C).

AKBA konnte in dem lysierten Zellhomogenat zu 92 % wiedergefunden werden. Etwa 3 % verblieben im apikalen Kompartiment, basolateral wurde kein AKBA nachgewiesen (Abb. 4.25 B). Aus dem Extrakt wurden auf apikaler Seite ca. 56 % der eingesetzten Konzentration an AKBA detektiert, in dem lysierten Zellhomogenat befanden sich etwa 24 % AKBA. Im basolateralen Kompartiment wurde kein AKBA nachgewiesen (Abb. 4.25 D).

Verapamil hatte auf die Verteilung von KBA und AKBA keinen signifikanten Einfluss. Transportversuche ohne Caco-2-Zellen wurden durchgeführt, um auszuschließen, dass KBA und AKBA an der Polycarbonat-Filtermembran adsorbieren und die Ergebnisse verfälschen. Es wurde jedoch keine bedeutsame Adsorption festgestellt.

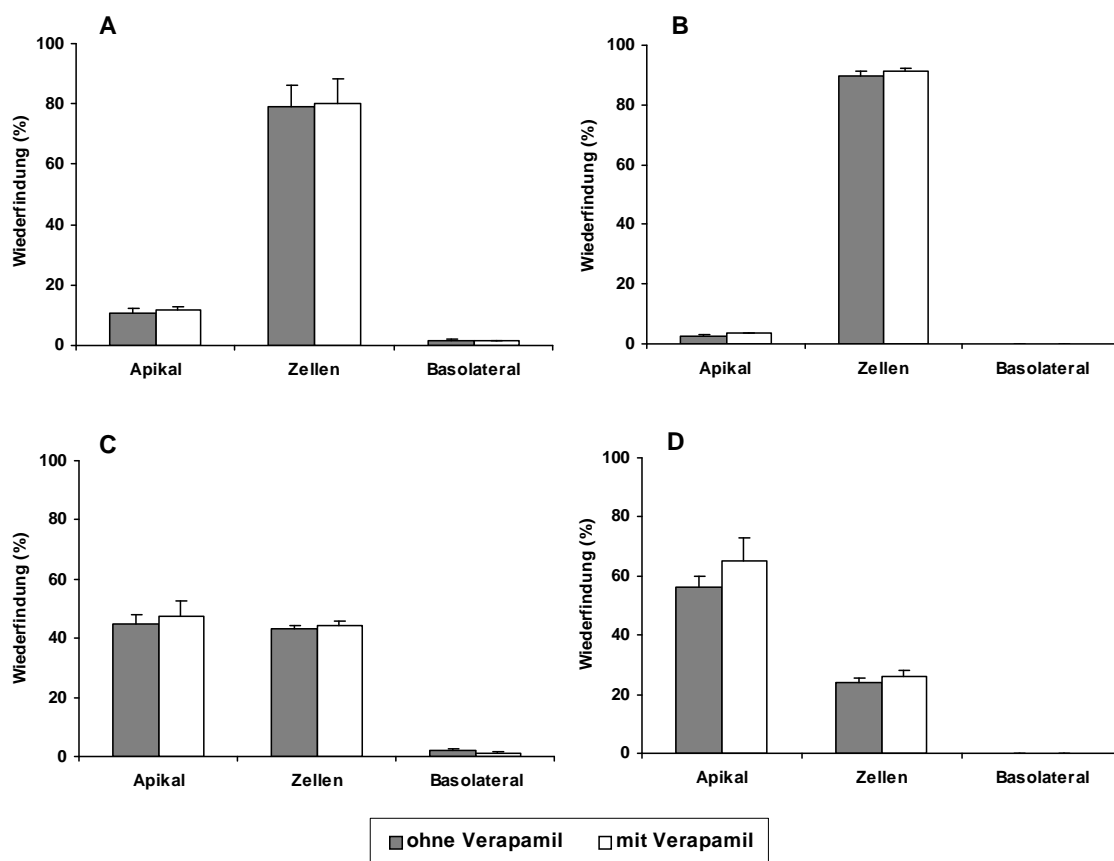


Abb. 4.25: Verteilung von KBA (A) und AKBA (B) im Caco-2-Modell nach apikaler Probenaufnahme der Reinsubstanzen und anschließender, 90-minütiger Inkubation im Brutschrank bei 37° C. Die Verteilung von KBA und AKBA nach apikaler Probenaufnahme des *Boswellia serrata* Extrakts zeigen C und D. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Einzelwerte (n = 3) an

4.3.1.5 Der Einfluss verbesserter Löslichkeit auf die Permeabilität von KBA und AKBA

Die Transportversuche mit der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung zeigten keine Verbesserung der Permeabilität von KBA und AKBA.

Bei 37° C wurden nach den Transporten von apikaler nach basolateraler Seite 0,14 % KBA in der Akzeptorkammer nachgewiesen, in Gegenwart von Verapamil waren es 0,30 %. Bei 4° C permeierten 0,53 % durch den Caco-2-Monolayer. Die KBA-Konzentrationen nach den Transporten von basolateraler nach apikaler Seite lagen unterhalb des LLOQ (entspr. < 0,05 %).

AKBA konnte aus der nanoskaligen Formulierung bei keinem der Versuche in der Akzeptorkammer nachgewiesen werden.

Die TEER-Werte der Zellmonolayer, die mit der Prüflösung der nanoskaligen Formulierung inkubiert wurden, waren nach 60 min um 60-80 % niedriger. Da die TEER-Werte zu Beginn der Untersuchungen bei 2000 Ohm*cm² lagen, konnten die Versuche mit der nanoskaligen Formulierung dennoch ausgewertet werden.

4.4 Interaktionen von KBA und AKBA mit MRP2 und OATP1B3

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen zu den Interaktionsstudien von KBA und AKBA mit den Transportproteinen MRP2 und OATP1B3 aufgeführt. Aus den Resultaten sollen erste Hinweise gewonnen werden, inwieweit Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln auftreten können.

4.4.1 Interaktionen von KBA und AKBA mit MRP2

Der Transport von GSMF war in Gegenwart von jeweils 1 μM und 3 μM KBA und AKBA signifikant erhöht. Auch der Extrakt hatte bei Konzentrationen von 1 μM und 3 μM eine aktivierende Wirkung auf den Transport von GSMF jedoch in geringerem Ausmaß als die Reinsubstanzen. Bei höheren Konzentrationen kann man insbesondere bei KBA eine Tendenz zur Hemmung des Transports von GSMF erkennen (Abb. 4.26).

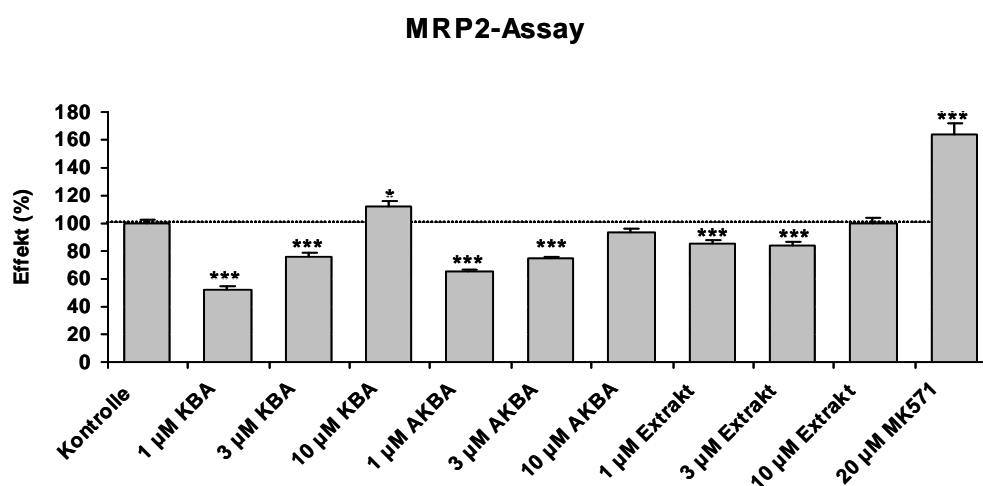


Abb. 4.26: Der Einfluss von KBA, AKBA und *Boswellia serrata* Extrakt auf den GSMF-Efflux in MDCK-Zellen. Die Fluoreszenz der Kontrolle (Inkubation mit Puffer) dient als 100 %-Wert und MK571 dient als Positivkontrolle. Werte, die größer als 100 % sind, weisen auf eine Hemmung von MRP2 hin. Werte, die kleiner als 100 % sind, deuten auf eine Aktivierung von MRP2 hin. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM für 8 Experimente, die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, angegeben. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.4.2 Interaktionen von KBA und AKBA mit OATP1B3

Abb. 4.27 zeigt, dass sowohl KBA und AKBA als auch der *Boswellia serrata* Extrakt die Aufnahme von Fluo-3 hemmen. Die Stärke der Hemmung durch AKBA und den Extrakt in allen getesteten Konzentrationen ist mit der des OATP1B3-Inhibitors BSP (1 μM) vergleichbar. KBA zeigt in höheren Konzentrationen eine mit 1 μM BSP vergleichbare Wirkung.

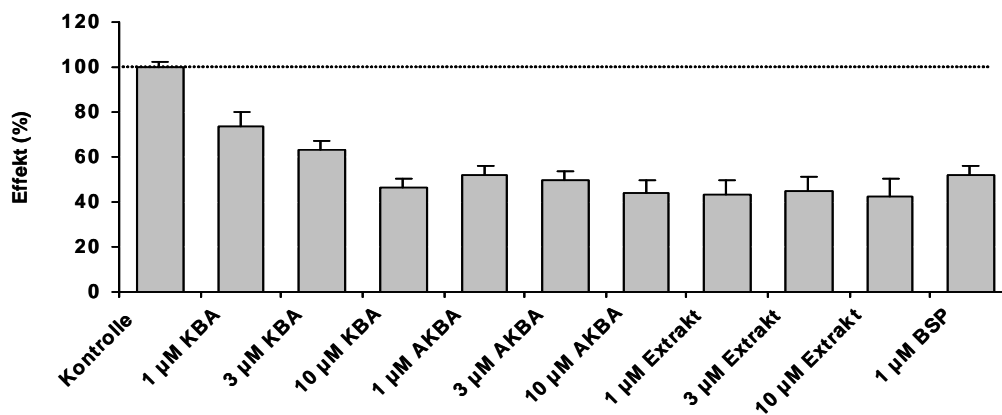
OATP1B3-Assay

Abb. 4.27: Der Einfluß von KBA, AKBA und *Boswellia serrata* Extrakt auf die Fluo-3-Aufnahme in HEK292-Zellen. Die Fluoreszenz der Kontrolle (Inkubation mit Puffer) dient als 100 %-Wert und BSP dient als Positivkontrolle. Werte, die kleiner als 100 % sind, zeigen eine Hemmung von OATP1B3 an. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM für 8 Experimente, die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, angegeben. Alle Proben unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$) von der Kontrolle

5 Diskussion

Auswirkung einer verbesserten Löslichkeit auf die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren

Die Gewährleistung der Linearität am LLOQ ist gerade bei bioanalytischen Methoden nicht unproblematisch. Häufig müssen Analysen-Läufe gemäß FDA-Richtlinie¹⁴⁶ abgelehnt und wiederholt werden, weil es aufgrund sehr kleiner Peakflächen am LLOQ zu hohen Schwankungen kommt. Die Vorgaben zur Linearität, Präzision und Richtigkeit können dann häufig nicht eingehalten werden.

Daher wurde die von Reising *et al.* entwickelte LC-MS Methode⁶⁶ zur Bestimmung von KBA und AKBA aus Plasma und Hirngewebe hinsichtlich des MRM-Massenübergangs von AKBA modifiziert.

Durch den modifizierten MRM-Massenübergang konnte eine Erhöhung der Signalfläche um den Faktor vier (Tab. 5.1) und eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses für AKBA am LLOQ erzielt werden. Die Signalflächen wurden dadurch konstanter und Analysenläufe erfüllten häufiger die Vorgaben der FDA-Richtlinie. Die modifizierte LC-MS-Methode wurde zur Bestimmung von AKBA aus Plasma und Hirngewebe revalidiert. Die Methode zur Bestimmung von KBA und AKBA aus Lebergewebe wurde gemäß FDA-Richtlinie¹⁴⁶ in vollem Umfang erfolgreich validiert und KBA und AKBA erstmals in der Leber von Wistar-Ratten quantifiziert.

Tab. 5.1: Peakflächen von AKBA bei zwei unterschiedlichen MRM-Übergängen

Peakfläche (cps)	
m/z 513 → 91,3	m/z 513 → 95,3
$3,1 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^6$

Die Steady-state-Plasmakonzentrationen der 27 untersuchten Glioblastom-Patienten waren wenig einheitlich. Das kann in erster Linie damit begründet werden, dass die Dosierung nicht normiert war und die Patienten unterschiedliche Weihrauchpräparate mit abweichenden Inhaltsstoffen eingenommen hatten. Obwohl die Patienten teilweise große Mengen an Weihrauchextrakt einnahmen, so konnten doch, wie in bereits veröffentlichten Studien nur niedrige Plasmakonzentrationen detektiert werden⁶²⁻⁶⁶.

Vor diesem Hintergrund wurde in einer Tierstudie anhand der modifizierten LC-MS-Methode untersucht, ob die verbesserte Löslichkeit einer nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung zu höheren Plasma-, Leber- und Hirnkonzentrationen von KBA und AKBA führt.

In den ersten Stunden gleichen sich sowohl für KBA als auch für AKBA die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven der Extrakt-Gruppe und der Gruppe, die die nanoskalige Formulierung bekam. Laut Literatur ist der maximale Plasmaspiegel nach oraler Einmalgabe nach ein bis drei Stunden zu erwarten^{62,66}. Die Extrakt-Gruppe erreicht maximale Plasmaspiegel von KBA und AKBA nach zwei Stunden, woraufhin es zu einem steten Abfall der Plasmakonzentrationen kommt. Die Plasmaspiegel der Gruppe, die die nanoskalige Formulierung bekam, fallen zwar nach zwei Stunden wieder leicht ab, nach vier Stunden steigen sie aber erneut an und sind nach acht Stunden sogar höher als beim ersten Maximum nach zwei Stunden. Die Plasmakonzentrationen sind jedoch in den ersten vier Stunden nach Gabe der nanoskaligen Formulierung aufgrund der hohen Standardabweichungen der Einzelwerte nicht signifikant höher als die der Extrakt-Gruppe.

Die Leberspiegelkurven in Abb. 4.8 lassen eine gewisse Ähnlichkeit zu den Plasmaspiegelkurven erkennen. In der Extrakt-Gruppe ist jedoch das Maximum der KBA-Konzentration erst nach vier Stunden erreicht, das Maximum der AKBA-Konzentration analog zu den Plasmawerten bereits nach zwei Stunden. Die Kurven der Gruppe, die die nanoskalige Formulierung bekam, weisen das bereits bei den Plasmaproben beobachtete zweite Maximum ebenso nach acht Stunden auf. Die maximalen Konzentrationen von KBA und AKBA im Lebergewebe der Tiere, die mit der nanoskaligen Formulierung gefüttert wurden, sind aber in den ersten vier Stunden nicht signifikant höher als die der Tiere, die den Extrakt bekamen.

Der zweite Anstieg der Plasmaspiegel- und Leberspiegelkurven der Ratten, die mit der nanoskaligen Formulierung gefüttert wurden, kann mehrere Ursachen haben. Möglich wäre, dass die beiden Boswelliasäuren einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen, was den Kurvenverlauf erklären könnte. Ob die Boswelliasäuren tatsächlich einem solchen Mechanismus unterliegen, kann jedoch ohne weitere Untersuchungen, wie die Bestimmung der KBA- und AKBA-Konzentration in der Galle, nicht festgestellt werden^{152,153}. Besonders fraglich wäre, warum KBA und AKBA nur in nanoskaliger Form, nicht aber in Extraktform, einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen sollten.

Wahrscheinlicher ist eine verzögerte Freisetzung von KBA und AKBA aus der nanoskaligen Formulierung. Es ist denkbar, dass die aus Emulgator bestehenden Partikel KBA und AKBA verzögert und über einen längeren Zeitraum abgeben.

In dieser Arbeit wurde für KBA eine mittlere und für AKBA eine schlechte Permeabilität *in vitro* bestimmt. Da die Untersuchungen jedoch auf einen Zeitraum von 90 min beschränkt blieben, ist es nicht auszuschließen, dass KBA und AKBA bei verzögerter Freisetzung nach einem längeren Zeitraum eine höhere Permeabilität aus der nanoskaligen Formulierung aufweisen. Während hohe Konzentrationen an KBA und AKBA aus dem Extrakt die Transportmechanismen im Gastrointestinaltrakt schnell sättigen können, würde eine solche Sättigung durch konstante, niedrigere Konzentrationen im Darm verhindert werden. Die Freigabe würde dafür aber über einen längeren Zeitraum verlaufen, was zu einer größeren Fläche unter der Kurve

(„Area under the curve“, AUC) führen würde und somit auch eine verbesserte Bioverfügbarkeit bewirken könnte.

Obwohl die nanoskalige Formulierung die maximalen Plasma- und Leberkonzentrationen nicht signifikant beeinflusst, so scheint es jedoch zu einem Retardierungseffekt zu kommen. Um den Einfluss der verzögerten Freisetzung der nanoskaligen Formulierung auf die Bioverfügbarkeit genauer bewerten zu können, müssten mehr Datenpunkte über einen längeren Zeitraum als acht Stunden erhoben werden. Durch die Bestimmung der AUC der beiden Formulierungen wäre dann ein direkter Vergleich der Bioverfügbarkeit des unbehandelten Extrakts mit der der nanoskaligen Formulierung möglich.

Die Hirnkonzentrations-Zeit-Kurven (Abb. 4.8) zeigen für beide Gruppen sowohl für KBA als auch für AKBA ein Maximum nach vier Stunden. Die mittleren KBA-Konzentrationen im Hirn der Extrakt-Gruppe liegen jedoch unterhalb des LLOQ. AKBA scheint die Blut-Hirn-Schranke in der nanoskaligen Formulierung leichter überwinden zu können als in Extraktform. Die Konzentrationen im Hirn sind nach Gabe der nanoskaligen Formulierung im Vergleich zum Extrakt signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Bei der Untersuchung der Hirngängigkeit von KBA und AKBA stellten Reising *et al.* fest, dass KBA und AKBA in Wistar-Ratten vergleichbare Konzentrationen im Hirn erreichten, obwohl die Plasmakonzentration von KBA deutlich höher war als die von AKBA. Nach Gleichung (5.1) ergaben sich Hirn-Plasma-Quotienten von 0,5 für KBA und 0,8 für AKBA¹⁴¹.

$$\text{Hirn-Plasma-Quotient} = \frac{c_{\text{Gewebe}} (\text{ng} / \text{g})}{c_{\text{Blut}} (\text{ng} / \text{ml})} \quad (5.1)$$

Obwohl diese Bestimmung des Hirn-Plasma-Quotienten nur die Konzentrationsverhältnisse zu einem Einnahmezeitpunkt wiedergeben und die Bildung des Verhältnisses der AUCs von Hirn- und Plasmakonzentration sinnvoller wäre, so gibt dieser Vergleich doch erste Hinweise auf das Verteilungsverhalten der beiden Boswelliasäuren zwischen Blut und Hirngewebe.

In dieser Arbeit wurden für AKBA mit 3,2 (Extrakt) und 2,3 (nanoskalige Formulierung) ebenfalls deutlich höhere Hirn-Plasma-Quotienten als für KBA mit 1,3 (Extrakt) und 1,1 (nanoskalige Formulierung) bestimmt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen der vorherigen Studie und bestätigen die Annahme, dass die erhöhte Lipophilie von AKBA im Vergleich zu KBA auch zu einer besseren Hirnpenetration führt. Auffällig ist, dass der Hirn-Plasma-Quotient von AKBA in der Extrakt-Gruppe in der Zeit zwischen der zweiten und der achten Stunde nach oraler Gabe stetig steigt, wohingegen die Hirn-Plasma-Quotienten von AKBA der Gruppe, die die nanoskalige Formulierung bekam, sowie die von KBA konstant bleiben.

Begründet ist dies jedoch nicht mit einer Akkumulation von AKBA im Hirn. Vielmehr fallen nach einmaliger oraler Gabe des *Boswellia serrata* Extrakts die Plasmakonzentrationen schneller ab als die Hirnkonzentrationen und führen somit zu einem über die Zeit steigenden Hirn-Plasma-Quotienten. Nach einmaliger oraler Gabe der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung fallen sowohl die Plasma- als auch die Hirnkonzentration von AKBA in gleichem Maße ab, weshalb die Hirn-Plasma-Quotienten über die Zeit weitestgehend konstant bleiben (Tab. 5.2).

Tab. 5.2: Hirn-Plasma-Quotienten von KBA und AKBA aus der Tierstudie mit Wistar-Ratten

t (h)	Extrakt		Nanoskalige <i>Boswellia serrata</i> Formulierung	
	KBA	AKBA	KBA	AKBA
2	1,19	1,95	1,18	2,01
4	1,41	3,05	1,27	2,88
8	1,30	4,71	0,95	2,06
\bar{x}	1,30	3,24	1,13	2,32

Im Gegensatz zu bisherigen Studien mit Ratten und Menschen⁶³⁻⁶⁶ waren die Plasmakonzentrationen von AKBA in dieser Studie höher als die von KBA. Funktion und Morphologie des Gastrointestinaltrakts können sich bei jungen und erwachsenen Tieren unterscheiden^{154,155}. Der Einsatz von noch sehr jungen Wistar-Ratten in dieser Studie könnte demnach für das modulierte Absorptionsverhalten von KBA und AKBA verantwortlich sein.

Wie zuvor erwähnt wurde im Rahmen dieser Arbeit Hirntumorgewebe-Proben von zwei Glioblastom-Patienten analysiert. Die Patienten mit den ID-Nr. 24 und 25 wiesen KBA-Plasmakonzentrationen von 152,0 bzw. 80,1 ng/ml auf. Wenn man die bei den Patienten 24 und 25 in dieser Arbeit ermittelten mittleren Hirn-Plasma-Quotienten von 1,3 bei Ratten (Extrakt) zugrunde legt, sollten im Tumorgewebe KBA-Konzentrationen von etwa 200 bzw. 105 ng/g Gewebe detektierbar sein. AKBA wurde im Plasma von Patient 24 mit 10,6 ng/ml und bei Patient 25 mit 10,2 ng/ml nachgewiesen. Bei einem Hirn-Plasma-Quotienten von 3,2 sollten im Tumorgewebe beider Patienten ca. 30 ng AKBA pro g Gewebe detektierbar sein.

Die Tatsache, dass im Hirngewebe der beiden Patienten weder KBA noch AKBA in quantifizierbaren Mengen gefunden wurden, zeigt die Problematik direkter Vergleiche von Tier- und Humandaten bei *in vivo*-Experimenten. Inwieweit die beschriebenen antiinflammatorischen und antitumoralen Wirkmechanismen von KBA und AKBA bei Glioblastom-Patienten, für die *in vitro*-Konzentrationen im μM -Bereich notwendig sind (Kapitel 2.1.3), klinisch relevant sind, bleibt in Hinsicht auf die geringen Hirnspiegel fraglich. Da aber nur von zwei Patienten Tumormaterial zur Verfügung stand, sind diese

Daten allenfalls ein Hinweis auf sehr niedrige humane Hirnkonzentrationen der Boswelliasäuren. Für eine genauere Bestimmung der Konzentration von KBA und AKBA im Hirn sind Untersuchungen an mehreren Patienten notwendig.

Durch die verbesserte Löslichkeit der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung sollte eine Vervielfachung sowohl der maximalen Plasmaspiegel als auch der Bioverfügbarkeit des Extrakts erreicht werden. Die Konzentrations-Zeit-Kurven von KBA und AKBA aus Plasma und Leber geben zwar den Hinweis, dass die AUC der beiden Analyte in nanoskaliger Form größer ist als aus dem Extrakt, die praktische Relevanz der nanoskaligen Formulierung von KBA und AKBA ist dennoch fragwürdig. Durch das eingesetzte Verfahren können nur geringe Mengen an Extrakt in nanoskalige Form überführt werden, so dass die resultierende Formulierung lediglich 10 % *Boswellia serrata* Extrakt enthält. Bei Einsatz der nanoskaligen Formulierung müsste daher die bereits sehr hohe Dosierung des Extrakts (Normdosierung: 3-4*1000-2000 mg/Tag) verzehnfacht werden. Dennoch geben die Versuche mit der nanoskaligen Formulierung erste Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Pharmakokinetik von Boswelliasäuren mit Hilfe einer geeigneten Formulierung. Des Weiteren wird ersichtlich, dass die schlechte Löslichkeit der Boswelliasäuren nicht der alleinige limitierende Faktor für die schlechte Bioverfügbarkeit dieser Wirkstoffe ist.

Außer der Löslichkeit können auch der Metabolismus und die Permeabilität erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen haben. Daher wurden im Anschluss an die bioanalytischen Untersuchungen der Metabolismus von KBA und AKBA *in vitro* und *in vivo* untersucht sowie die Permeabilität der beiden Boswelliasäuren im Caco-2-Modell bestimmt.

Einfluss des Metabolismus auf die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren

Erste Erkenntnisse zu Wechselwirkungen der Boswelliasäuren mit metabolisierenden Enzymen zeigten Frank *et al.* durch Interaktionsstudien mit isolierten Enzymen. Extrakte von *Boswellia serrata*, *Boswellia frereana*, *Boswellia sacra* und *Boswellia carterii* hemmten nicht-selektiv die CYP-Isoenzyme 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4. Es wird jedoch vermutet, dass die Boswelliasäuren nicht alleine für die starke Hemmung der verschiedenen CYP-Isoenzyme in den untersuchten Weihrauchextrakten verantwortlich sind¹⁵⁶. Bisher wurde der Metabolismus von Boswelliasäuren allerdings nicht untersucht.

Der Metabolismus ist ein wichtiger Faktor für die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen. So kann eine extensive Metabolisierung die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen sehr stark herabsetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Metabolismus auf die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren erstmals detailliert untersucht.

Die pharmakologischen Effekte von *Boswellia serrata* werden hauptsächlich den Boswelliasäuren KBA und AKBA zugeschrieben. Die Untersuchungen dieser Arbeit konzentrierten sich daher auf die Bestimmung der metabolischen Stabilität dieser zwei Boswelliasäuren. Die metabolische Stabilität wurde in RLM untersucht. Die Cytochrom-P450-Enzyme der Lebermikrosomen katalysieren in Anwesenheit des Cofaktors NADPH hauptsächlich Phase-I-Metabolisierungsreaktionen. Das eingesetzte NRS generierte NADPH aus NADP⁺ in situ durch die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase was gegenüber reinem NADPH den Vorteil hatte, dass konstante NADPH-Konzentrationen über den Zeitraum der Inkubation garantiert wurden. Phase-II-Glucuronidierungsreaktionen wurden durch Zugabe von UDP-Glucuronsäure anstelle von NADPH zu den RLM katalysiert.

Die erhöhte Selektivität des eingesetzten MRM-Modus im Vergleich zu den SIM- oder EMS-Modi ermöglichte es, auf eine zeitaufwendige Aufreinigung der Probe zu verzichten. Die Quantifizierung war bei regelmäßiger Reinigung des Q0, welcher durch die erhöhte Matrixbelastung schneller verunreinigt wurde, problemlos möglich.

Da den Lebermikrosomen zahlreiche Enzyme und Cofaktoren, die in der Leber vorkommen fehlen, wurde die metabolische Stabilität auch in RH untersucht und mit der in Lebermikrosomen verglichen. Weiterhin bieten Hepatozyten die Möglichkeit zu untersuchen, ob weitere Phase-II-Metabolisierungsreaktionen, wie Sulfatierungen oder Konjugationen mit Aminosäuren, ablaufen oder ob es zu kombinierten Phase-I- und II-Reaktionen kommt.

Durch Optimierung der Kryokonservierung und der Auftau- und Stabilisationsmethoden sind tiefgefrorene Hepatozyten den frisch isolierten mittlerweile nahezu ebenbürtig was Zellintegrität, Lebensfähigkeit und metabolische Aktivität betrifft. Da durch die Einfrier- und Auftauschritte jedoch nach wie vor wichtige Enzymsysteme geschädigt werden können und somit für den Assay nicht mehr zur Verfügung stehen, wurden die in dieser Arbeit verwendeten RH frisch isoliert¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

Als Spezies wurde die Ratte gewählt, damit eine direkte Vergleichbarkeit zu nachfolgenden *in vivo*-Studien gegeben war. Um aber auch eine erste Vorstellung über die hepatische Metabolisierungsrate von KBA und AKBA im Menschen zu bekommen, wurde die metabolische Stabilität zusätzlich in HLM untersucht.

Die Untersuchungen zur metabolischen Stabilität haben erkennen lassen, dass KBA in RLM, HLM und RH einem beträchtlichen Phase-I-Metabolismus unterliegt, wobei die metabolische Umsatzgeschwindigkeit in allen drei Modellen vergleichbar war. KBA wurde bereits nach 30 min zu mehr als 80 % metabolisiert. Diese ausgeprägte metabolische Umwandlung kann einer der Hauptgründe für die geringe orale Bioverfügbarkeit sein, die in Ratten und im Menschen nach Gabe von sehr hohen Mengen von *Boswellia serrata* Extrakt beobachtet wurde. Gegenüber Phase-II-Glucuronidierungsreaktionen in RLM und HLM scheint KBA jedoch stabil zu sein.

Das pharmakokinetische Verhalten von AKBA hingegen wirft einige Fragen auf. Obwohl deren Konzentration in Weihrauchextrakten mit der von KBA vergleichbar oder sogar höher ist^{11,160}, konnte AKBA im Vergleich zu KBA in Ratten- und Humanplasma nur in geringeren Konzentrationen detektiert werden⁶²⁻⁶⁶.

Dabei ist AKBA lipophiler als KBA und sollte besser permeabel sein. Eine mögliche Erklärung für die niedrigen AKBA-Plasmaspiegel könnte ein ausgeprägter First-pass-Metabolismus sein. Obwohl sich die Strukturen der beiden Substanzen nur durch die Acetylierung der Hydroxyl-Gruppe am C-3-Atom unterscheiden, differieren AKBA und KBA jedoch erheblich in ihrem metabolischen Verhalten. AKBA zeigte sich mit weniger als 20 % metabolischer Umwandlung nach zwei Stunden in RLM und HLM weitaus stabiler gegenüber Phase-I-Enzymen, bzw. in RH gegenüber Phase-I- und II-Enzymen. Ein ausgeprägter hepatischer Metabolismus kann daher nicht der Grund für die niedrige systemische Bioverfügbarkeit von AKBA sein.

Für die Identifizierung und Verifizierung der Metabolite von Boswelliasäuren konnten erfolgreich zwei LC-MS-Methoden entwickelt werden. Bei jeder Methode wurden diverse Mess-Modi wie MI, EMS, EPI, NL, PrecIS sowie die Kombination dieser mittels IDA eingesetzt. Dadurch war eine effiziente Detektion der Boswelliasäuren und deren Derivate sowie eine zweifelsfreie Bestimmung der Metabolite in einem vertretbaren Zeitrahmen möglich.

Weil nicht alle sechs untersuchten Boswelliasäuren eine Keto-Gruppe aufweisen, erfolgte die Ionisierung nicht im positiven Modus, bei dem die Protonierung der Analyte wahrscheinlich aufgrund der hohen Elektronendichte an der Keto-Gruppe erfolgt, sondern im negativen Modus mit einer wahrscheinlichen Deprotonierung der Analyte an der Carboxyl-Gruppe des C-4-Atoms (Abb. 5.1).

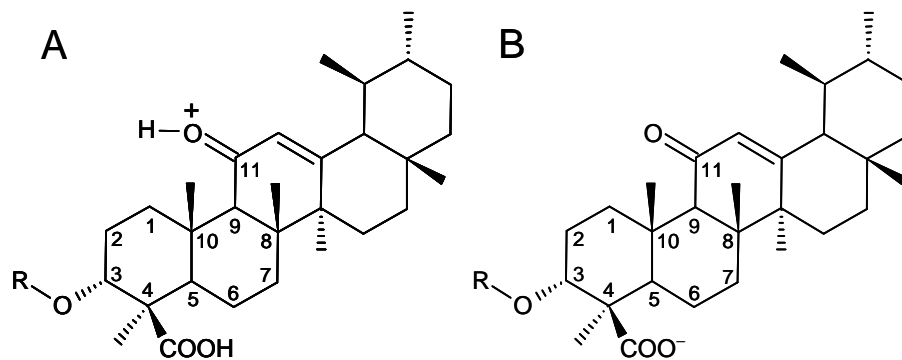


Abb. 5.1: Vermutete Ionisierung der Keto-Boswelliasäuren im A positiven und B negativen Ionisierungsmodus mittels APCI

Die Kollisionsenergie, welche für die Fragmentierung der Analyte notwendig ist, ist bei acetylierten Boswelliasäuren deutlich niedriger als bei denen ohne Acetyl-Gruppe. Diese scheint leicht vom Molekül abgespalten zu werden und ist dann im negativen Produkt-Ionen-Spektrum als Acetat-Ion sichtbar, wogegen das übrige Gerüst im Spektrum nicht sichtbar ist. Wahrscheinlich weil bei der Fragmentierung ein neutrales Molekül entsteht.

Die Fragmente der Boswelliasäuren ohne Acetyl-Gruppe sind nicht eindeutig erklärbar. Für KBA ist zwar eine Wasserabspaltung erkennbar, welche zu dem Fragment mit m/z 451 führt, das Fragment mit m/z 407 kann jedoch schwer aus der weiteren Abspaltung der Carboxyl-Gruppe resultieren, da so keine funktionelle Gruppe für die negative Ladung vorhanden wäre. Auch das Fragment bei m/z 391 kann nicht erklärt werden. Am Beispiel der Kontrollgruppe konnte aber ausgeschlossen werden, dass diese Fragmente von einem anderen Molekül als KBA gebildet wurden, weshalb die Strukturaufklärung der Fragmente für die Identifizierung der Metabolite nicht notwendig war.

Da für die Identifizierung von Metaboliten der Boswelliasäuren nicht im selektiven MRM-Modus gearbeitet werden konnte, mussten die *in vitro*-Proben nach Beendigung der Inkubationszeit mittels Festphasenextraktion aufgereinigt werden, um störende Matrixeffekte zu minimieren. Für die Festphasenextraktion wurde eine Copolymer-Phase (Divinylbenzol und N-Vinylpyrrolidon) gewählt. Die Phase bot durch ihre ausgeglichenen hydrophilen und lipophilen Eigenschaften gegenüber C-18-Phasen eine bessere Reproduzierbarkeit bezüglich der Retention der Boswelliasäuren und deren Metabolite. Die *in vivo*-Proben waren der Festphasenextraktion nicht zugänglich, da diese die Festphasensäulen schnell verstopften. Sie wurden daher mittels sorbensgestützter Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgereinigt.

Die Identifizierung der Metabolite von Boswelliasäuren wurde in RLM und RH durchgeführt. Obwohl diese *in vitro*-Modelle allgemein anerkannt und etabliert sind, ist für eine vollständige Aussage über alle gebildeten Metabolite einer Substanz das

Tiermodell nach wie vor unerlässlich^{113,161}. Daher wurden die Untersuchungen zusätzlich *in vivo* in Rattenplasma, -leber und -hirn durchgeführt.

Die Inkubation von sechs Boswelliasäuren mit Phase-I-Enzymen *in vitro* zeigte, dass oxidative Reaktionen zu mono-, di- und in manchen Fällen auch trihydroxylierten Derivaten die bevorzugten metabolischen Wege von KBA, AKBA, α BA und β BA darstellen. Die in dieser Arbeit identifizierten Phase-I-Metabolite stehen in Übereinstimmung mit den für die Oleanolsäure beschriebenen Metaboliten Hydroxyl- und Dihydroxyl-Oleanolsäure und zeigen zusammen mit der Arbeit von Jeong *et al.* einen ersten detaillierten Einblick in den Metabolismus von Triterpenen⁶¹.

Für KBA wurden in RLM neben mono- und dihydroxylierten Metaboliten zwei Derivate mit einer Massenverschiebung von +14 u detektiert, welche vor KBA eluierten. Unter Beachtung des chromatographischen Verhaltens, welches auf hydrophilere Eigenschaften im Vergleich zu KBA hindeutet, könnte es sich dabei um ein Keto-Derivat oder kombinierte Dehydrierung und Hydroxylierung von KBA handeln. Das metabolische Profil von KBA *in vitro* war mit dem *in vivo* vergleichbar, so wurden ausschließlich Phase-I- jedoch keine Phase-II-Metabolite detektiert. Mono- und dihydroxylierte KBA-Metabolite wurden sowohl in RLM und RH als auch in Rattenplasma und Rattenleber nachgewiesen. In den RH und der Rattenleber wurden zusätzlich in geringen Mengen trihydroxylierte Metabolite von KBA gefunden. Im Rattenhirn hingegen wurden keine KBA-Metabolite detektiert, was auf die erhöhte Hydrophilie der hydroxylierten Derivate zurückgeführt werden kann. Dies würde die Passage durch die Blut-Hirn-Schranke erheblich erschweren.

Die Untersuchungen zur metabolischen Stabilität in RLM und RH haben gezeigt, dass die metabolische Umwandlungsrate von AKBA geringer ist als die von KBA. Folglich wurden für AKBA *in vitro* auch nur monohydroxylierte Metabolite detektiert. *In vivo* konnten weder im Plasma noch in der Leber oder im Hirn der Ratten AKBA-Metabolite nachgewiesen werden. Die begrenzte Metabolisierung von AKBA durch Phase-I-Enzyme steht im Einklang mit den Ergebnissen der ebenfalls acetylierten Boswelliasäuren, A α BA und A β BA, für die nach der Inkubation mit RLM keine Metabolite detektiert wurden. Offenbar scheint durch die Acetylierung der Hydroxyl-Gruppe am C-3-Atom die Metabolisierung behindert zu werden. Die Tatsache, dass aus AKBA einige Hydroxyl-Derivate gebildet wurden, könnte auf deren Keto-Gruppe am C-11-Atom zurückzuführen sein, welche A α BA und A β BA nicht aufweisen. Genau wie bei KBA konnten für AKBA weder *in vitro* noch *in vivo* Phase-II-Metabolite nachgewiesen werden. Es scheint, dass AKBA ebenso wie KBA nur Phase-I-Metabolisierungen unterliegt.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass AKBA *in vivo* zu KBA deacetyliert wird. In einigen pharmakokinetischen Studien^{62,63} konnte AKBA im Plasma der Probanden nicht nachgewiesen werden, was die Theorie, dass AKBA *in vivo* abgebaut wird und somit nicht mehr detektiert werden kann, unterstützte. Die Tatsache, dass AKBA ein Acetyl-Derivat von KBA ist, verleitet zu der Annahme, dass AKBA zu KBA umgewandelt wird und somit am Wirkort nicht mehr zur Verfügung steht. Die Untersuchungen in RH

zeigten, dass AKBA jedoch nur in sehr geringen Mengen zu KBA deacetyliert wird (< 2 %). Im Plasma und in der Leber der Ratten, die AKBA erhielten, war KBA fast nicht detektierbar. Die Deacetylierung von AKBA zu KBA in Hepatozyten und *in vivo* ist also zu vernachlässigen. Sie stellt keine relevante Variante einer möglichen Metabolisierung dar und kann nicht für die geringe systemische Bioverfügbarkeit von AKBA verantwortlich sein, wie bisher angenommen wurde.

Für viele Substanzen sind die Dauer und das Ausmaß ihrer Wirkung durch die metabolische Stabilität limitiert. Die Charakterisierung des metabolischen Verhaltens ist daher ein Kernpunkt bei der Bewertung des therapeutischen Effekts von Arzneistoffen. Aus dieser Arbeit kann abgeleitet werden, dass der ausgeprägte hepatische Metabolismus von KBA wohl einen großen Einfluss auf deren Bioverfügbarkeit hat. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann jedoch weder ein ausgeprägter Metabolismus noch eine Deacetylierung für die geringe systemische Bioverfügbarkeit von AKBA verantwortlich gemacht werden.

Ein weiterer, für die Bioverfügbarkeit von Substanzen ausschlaggebender Faktor, kann die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt sein. Oral verabreichte Substanzen wie die Boswelliasäuren müssen durch die Epithelzellschicht des Darms permeieren, um in den systemischen Kreislauf zu gelangen. Ist die Permeabilität einer Substanz gering, ist auch mit niedrigen systemischen Konzentrationen zu rechnen. Wenn die Substanz ein Substrat von Efflux-Proteinen ist, kann dessen Permeabilität dadurch entscheidend beeinflusst werden. Pgp ist ein in der apikalen Membran des Dünndarms lokalisiertes ABC-Transportprotein, das für die Exkretion vieler Arzneistoffe zurück in das Darmlumen verantwortlich ist¹⁶².

Weber *et al.* haben *Boswellia serrata* Extrakt, KBA und AKBA als potente Pgp-Inhibitoren in Schweinehirn-Kapillarendothelzellen (PBCEC) und humanen parenteralen Leukämiezelllinien (VLB) identifiziert¹³¹. AKBA inhibierte Pgp bei Konzentrationen von 3 µM in PBCEC- und 10 µM in VLB-Zellen. KBA hingegen zeigte nur bei einer Konzentration von 10 µM in PBCEC-Zellen inhibierende Effekte, in VLB-Zellen konnte keine signifikante Pgp-Inhibition nachgewiesen werden. Da der in der Studie eingesetzte Calcein-AM-Assay nicht zwischen Pgp-Substraten und -Inhibitoren unterscheiden konnte, ist bisher ungeklärt, ob die Boswelliasäuren selbst ein Substrat von Pgp sind oder die Hemmung allosterisch erfolgt.

Nachfolgend wurde untersucht, inwiefern die Absorption oder die Interaktion mit Pgp einen Beitrag zu der schlechten Bioverfügbarkeit der Boswelliasäuren leistet.

Einfluss der Permeabilität auf die Bioverfügbarkeit von KBA und AKBA

Nachdem zunächst der Einfluss des hepatischen Metabolismus auf die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren erörtert wurde, widmeten sich darauf folgende Untersuchungen dem Einfluss der intestinalen Absorption auf die systemische Verfügbarkeit von KBA und AKBA. Zur Vorhersage der intestinalen Absorption wurden Permeationsuntersuchungen mit dem Caco-2-Zellmodell durchgeführt.

Bei physiologischen Bedingungen (37° C, pH 7,4) war die Permeation von KBA als Reinsubstanz und aus dem Extrakt in der Absorptionsrichtung (apikal nach basolateral) mit 0,87 % bzw. 0,80 % signifikant höher ($p < 0,01$) als in der Sekretionsrichtung (basolateral nach apikal) mit weniger als 0,10 % bzw. 0,15 %. Basierend auf der geringen Sekretion kann man schließen, dass KBA keinem Efflux-Mechanismus unterliegt.

Bei 4° C war die Permeabilität von KBA als Reinsubstanz von apikaler nach basolateraler Seite mit 0,43 % signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt, was darauf hindeutet, dass KBA zumindest teilweise mit Transportproteinen interagiert. Die Permeation von KBA aus dem Extrakt hingegen unterschied sich mit 0,80 % bei 37° C nicht signifikant zu der bei 4° C mit 0,77 %. Hierfür ist möglicherweise die hohe Standardabweichung der Einzelwerte bei den 4° C-Versuchen verantwortlich.

Weber *et al.*¹³¹ beobachteten eine Hemmung von Pgp durch KBA, AKBA und *Boswellia serrata* Extrakt. Die Zugabe des Pgp-Inhibitors Verapamil zu dem Transportpuffer führte jedoch weder von apikaler nach basolateraler Seite noch in umgekehrter Richtung zu einer erhöhten Permeation von KBA. Es kann daher angenommen werden, dass KBA kein Substrat von Pgp ist.

Bei den Transporten mit dem Extrakt jedoch konnte eine signifikant niedrigere Permeabilität festgestellt werden ($p < 0,05$). Anstatt 0,80 % permeierten in Anwesenheit von Verapamil nur 0,43 % KBA von apikaler nach basolateraler Seite. Für diese Erscheinung liegt bisher keine Erklärung vor.

AKBA permeierte in beide Richtungen zu weniger als 0,05 % durch den Caco-2-Monolayer. Eine Permeation von 0,05 % entspricht dem LLOQ der eingesetzten Methode. Auch die Zugabe von Verapamil zu dem Transportpuffer führte zu keiner Verbesserung der Permeabilität. Lediglich bei 37° C konnte AKBA aus dem Extrakt in Anwesenheit von Verapamil von apikaler nach basolateraler Seite in sehr geringen Mengen permeieren. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass AKBA schlechter permeabel als KBA und, genau wie KBA, kein Pgp-Substrat ist.

Trotz der von Weber *et al.*¹³¹ gezeigten Interaktion von Boswelliasäuren mit Pgp konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass weder KBA noch AKBA Substrate dieses Efflux-Proteins sind. Es kann daher angenommen werden, dass die von Weber *et al.*¹³¹ beobachtete Hemmung des Pgp durch KBA und AKBA auf eine allosterische Hemmung zurückzuführen ist. Zusammen mit der Erkenntnis, dass der sekretorische Transport von KBA und AKBA geringer ist als der absorptive, kann eine limitierende

Wirkung auf die orale Bioverfügbarkeit durch Efflux-Mechanismen von Pgp ausgeschlossen werden.

Gemäß der Einteilung nach Yee gilt KBA bei einer erwarteten *in vivo*-Absorption von 20-70 % als Substanz mit mittlerer Permeabilität, AKBA gilt als schlecht permeabel⁹⁷.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Permeabilität bilden einen wichtigen Baustein zur weiteren Aufklärung des pharmakokinetischen Verhaltens von KBA und AKBA und können die bereits veröffentlichten Konzentrationen in Plasma und Hirn bei Menschen und Ratten zum Teil erklären⁶²⁻⁶⁶. Es ist eine weit verbreitete Meinung, dass die meisten lipophilen Substanzen gut durch die Zellmembran des intestinalen Epithels, welches die Hauptbarriere für die orale Absorption von Arzneistoffen darstellt, permeieren. Die Untersuchungen dieser Arbeit gaben jedoch Hinweise auf eine verminderte Fähigkeit lipophiler Substanzen, wie KBA und AKBA, Caco-2-Zellmonolayer zu überwinden. Die niedrigen systemischen Konzentrationen der metabolisch stabilen AKBA sind demnach wohl zu einem großen Teil auf deren schlechte Permeation aus dem Gastrointestinaltrakt zurückzuführen. Demgegenüber ist die begrenzte systemische Verfügbarkeit von KBA eher das Ergebnis eines umfangreichen hepatischen Metabolismus in Verbindung mit einer mittleren Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt.

Am Ende der Transportversuche wurde interessanterweise eine deutliche Diskrepanz in der Massenbilanz festgestellt. Die Summe der auf der apikalen und der basolateralen Seite detektierten Stoffmengen war für KBA und AKBA als Reinsubstanzen geringer als 15 % und für den Extrakt weniger als 60 % von der eingesetzten Stoffmenge. Daher wurde die Menge an Probesubstanz bestimmt, welche in die Zellen aufgenommen bzw. an den Zellen adsorbiert worden war.

Sowohl KBA als auch AKBA wurden als Reinsubstanzen zu mehr als 75 % der aufgegebenen Menge in dem Zellhomogenat wiedergefunden. Aus dem Extrakt wurden mit 20-40 % etwas geringere Mengen in dem Zellhomogenat gefunden. Der Zusatz von Verapamil hat keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung.

Da weder KBA noch AKBA bei diesen Untersuchungen maßgeblich an der Polycarbonat-Filtermembran der Transwell[®] Platten adsorbierten, wird angenommen, dass die beiden Boswelliasäuren hauptsächlich in die Zellen aufgenommen werden und dort akkumulieren oder an den Zellen adsorbieren.

Der eingesetzte *Boswellia serrata* Extrakt scheint offensichtlich Komponenten zu enthalten, welche die Akkumulierung oder die Adsorption von KBA und AKBA in oder an den Caco-2-Zellen verhindert, was erklären würde warum KBA und AKBA aus dem Extrakt in geringeren Mengen im Zellhomogenat gefunden wurden als die Reinsubstanzen. Eine Unterscheidung zwischen aufgenommener und adsorbierter Substanz war mit der eingesetzten Methode nicht möglich.

Die Untersuchungen zur Verteilung von KBA und AKBA im Caco-2-Modell sind ein weiterer Hinweis auf die Fähigkeit von Caco-2-Zellen lipophile Arzneistoffe

zurückzuhalten. Ähnliche Verluste in der Mengenbilanz wurden für den lipophilen, nicht-steroidalen antiinflammatorischen Arzneistoff Indomethacin berichtet¹⁶³.

Sterk *et al.* konnten zeigen, dass die Einnahme von *Boswellia serrata* Extrakt zusammen mit fettreicher Nahrung zu einer Zunahme der Bioverfügbarkeit von KBA und AKBA um ein Vielfaches führte⁶⁴. Bei der Durchführung weiterer klinischer Studien sollte daher vor allem auf die standardisierte fettreiche Nahrung geachtet werden.

Weiterhin ist es möglich, durch die Entwicklung innovativer Arzneistoffformulierungen eine verbesserte Absorption von Arzneistoffen aus dem Gastrointestinaltrakt zu erreichen. Durch den Einsatz nichtionischer Tenside wie Polysorbat konnte in diversen Untersuchungen eine verbesserte Permeation von Arzneistoffen durch Biomembranen erreicht werden. So konnte die Permeabilität von lipophilen und schwer löslichen Carotinoiden und Tocopherolen durch Zusatz von Polysorbaten verbessert werden, ohne toxisch auf die Caco-2-Zellen zu wirken¹⁶⁴.

Es wurde daher untersucht, ob die erhöhte Löslichkeit von *Boswellia serrata* Extrakt als nanoskalige Formulierung auch zu einer verbesserten Permeation durch Caco-2-Monolayer führt. Die hydrophile Hülle der Nanopartikel, die den lipophilen Extrakt umschließt, soll außerdem die Passage des Arzneistoffes durch die Epithelzellschicht verbessern.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte der nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung jedoch keine Verbesserung der Permeabilität von KBA und AKBA zugeschrieben werden, auch wenn die Löslichkeit des Extrakts in wässrigen Medien erheblich gesteigert werden konnte.

Im Gegensatz zu den Transportversuchen mit KBA und AKBA als Reinsubstanzen und dem Extrakt, bei denen die TEER-Werte über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant blieben, fielen die TEER-Werte durch Beifügung der nanoskaligen Formulierung auf die apikale Seite innerhalb von 60 min um 60-80 % (Tab. 5.3).

Tab. 5.3: TEER-Werte der Caco-2-Zellmonolayer vor und nach der Inkubation mit der Emulgatorhaltigen nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung

	Vor Inkubation (n=6)		Nach Inkubation (n=6)	
	MW	SD	MW	SD
TEER-Wert (Ohm*cm ²)	2049,7	± 25,4	363,6	± 23,3

Die Zellen des Darmepithels sind durch Tight-junctions miteinander verbunden. Sie dienen als Barriere zwischen der apikalen und basolateralen Membran. Lediglich kleine, nicht-ionisierte, hydrophile Moleküle wie Wasser, Glycerol oder Ethanol können diese

ungehindert passieren. Der hydrostatische und osmotische Druck ist hierbei die treibende Kraft.

Dieser parazelluläre Absorptionsweg ist bei intaktem Epithel für Arzneistoffe von untergeordneter Bedeutung, da die Tight-junctions nur 0,1 % der Oberfläche des Darmepithels ausmachen⁸¹. Es besteht jedoch die Möglichkeit die Tight-junctions, z. B. durch die Applikation von Absorptionsverbessernern, teilweise zu öffnen¹⁶⁵. Auch eine pathologische Veränderung der Tight-junctions kann zu einem teilweisen Verlust der Barrierefunktion der Zellschicht führen¹⁶⁶.

Der in der nanoskaligen Formulierung enthaltene Emulgator scheint mit Komponenten der Tight-junctions zu interagieren, was zu einer Aufweitung dieser führt und somit den parazellulären Absorptionsweg öffnet. Ähnliche Effekte sind für Emulgatoren bereits beobachtet worden¹⁶⁷. Ein dadurch erleichterter parazellulärer Transport der Boswelliasäuren hätte ebenfalls zu erhöhten Plasmakonzentrationen geführt. Da jedoch der Abfall der TEER-Werte nicht mit einer erhöhten Absorption einherging, scheint die parazelluläre Absorption von KBA und AKBA aus dem Gastrointestinaltrakt wie für viele lipophile Arzneistoffe nur von untergeordneter Bedeutung zu sein⁸¹. Vielmehr wird der transzelluläre Weg die entscheidende Route bei der Permeation von KBA und AKBA durch die Epithelzellschicht sein.

Diverse Untersuchungen zeigen, dass der in der nanoskaligen Formulierung enthaltene Emulgator nicht nur lösungsvermittelnde Eigenschaften hat, sondern auch das Pgp hemmt^{168,169}. Da in den Permeabilitätsuntersuchungen jedoch festgestellt werden konnte, dass weder KBA noch AKBA Substrate dieses Efflux-Proteins sind, hat die Pgp-Hemmung durch die nanoskalige Formulierung keinen Einfluss auf die Absorption der beiden Boswelliasäuren aus dem Magen-Darm-Trakt.

Auch wenn die Verarbeitung von *Boswellia serrata* Extrakt in nanoskalige Partikel nicht der für Boswelliasäuren geeignete Weg zu sein scheint, so zeigen die Ergebnisse doch, dass das Augenmerk auf die Entwicklung von Formulierungen gelegt werden sollte, die die Permeabilität der Boswelliasäuren durch die intestinale Epithelzellschicht verbessern. Da Boswelliasäuren mit fettreicher Nahrung eine verbesserte Bioverfügbarkeit aufweisen, wäre die Entwicklung von Arzneistoffträgern auf Lipid-Basis die logische Folgerung, die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren zu verbessern.

Eine solche Möglichkeit stellt die Formulierung von „Self-emulsifying drug delivery systems“ (SEDDS) dar. Die Bioverfügbarkeit zahlreicher lipophiler schwer löslicher Arzneistoffe konnte durch diese Technik signifikant verbessert werden¹⁷⁰.

Wechselwirkung von KBA und AKBA mit MRP2 und OATP1B3

Das ABC-Transportprotein MRP2 ist im Darm, in der Niere und vor allem in der Leber für die Exkretion diverser organischer Moleküle verantwortlich.

In zahlreichen Studien wurde eine Aktivierung von ABC-Transportern, unter denen auch MRP2 war, durch Substanzen in niedrigen Konzentrationen beobachtet, die bei höheren Konzentrationen abnahmen. Da die eingesetzten Substanzen zwar mit MRP2 interagierten, jedoch selbst nicht transportiert wurden, gehen die Autoren davon aus, dass eine für die allosterische Inhibierung oder Aktivierung zuständige Bindungstasche existiert, welche die Affinität des Transporters zum Substrat reguliert¹⁷¹.

Ähnliche Effekte wurden auch bei Phenylbutazon beobachtet, welches MRP2 durch eine allosterische Bindung bei niedrigen Konzentrationen aktiviert und bei höheren Konzentrationen inhibiert¹⁷².

Vor diesem Hintergrund scheint der erhöhte Efflux von GSMF in Gegenwart von niedrigen Konzentrationen an KBA, AKBA oder dem *Boswellia serrata* Extrakt durch eine allosterische Bindung dieser Substanzen an MRP2 hervorgerufen zu werden, welche das Transportprotein aktiviert. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Aktivierung ab und unterscheidet sich bei 10 µM nicht mehr signifikant von der Kontrolle.

In der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten pharmakokinetischen Studie wurden in der Leber von Ratten nach oraler Gabe von *Boswellia serrata* Extrakt KBA und AKBA in Konzentrationen von 1 µM bzw. 2 µM detektiert. Da MRP2 hauptsächlich in der Leber exprimiert wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass KBA und AKBA das pharmakokinetische Verhalten von gleichzeitig eingenommenen Arzneistoffen beeinflussen können. So könnte es z.B. durch Comedikation von *Boswellia serrata* Extrakt mit Methotrexat, welches ebenfalls über MRP2 ausgeschieden wird, zu einer erhöhten biliären Exkretion des Cytostatikums kommen, was wiederum zu erniedrigten Plasmaspiegeln führen würde.

Es wäre auch denkbar, dass KBA und AKBA ihre eigene Bioverfügbarkeit vermindern, indem sie bei niedrigen Konzentrationen MRP2 und somit ihre eigene hepatische Exkretion stimulieren.

Im Gastrointestinaltrakt hingegen sind keine MRP2-stimulierenden Effekte zu erwarten, weil hier nach oraler Gabe mit sehr viel höheren Konzentrationen gerechnet werden muss. Obwohl die KBA- und AKBA-Konzentrationen im Gastrointestinaltrakt nicht bekannt sind, ist es bei einer Normdosierung von 3-4*1000-2000 mg Extrakt sehr wahrscheinlich, dass die erreichten Konzentrationen von KBA und AKBA 10 µM überschreiten und somit keine Aktivierung von MRP2 mehr stattfindet.

Eine Untersuchung der Wirkung von höheren Konzentrationen von KBA und AKBA auf die MRP2-Aktivität wäre mit Sicherheit sehr interessant, konnte jedoch aufgrund der schlechten Löslichkeit der Boswelliasäuren und dem *Boswellia serrata* Extrakt nicht durchgeführt werden.

Ähnlich wie MRP2 spielt das in der Leber lokalisierte OATP1B3 bei der Elimination zahlreicher Substanzen eine wichtige Rolle.

Die verminderte Aufnahme von Fluo-3 im angewandten Testsystem deutet darauf hin, dass KBA, AKBA und *Boswellia serrata* Extrakt potente Modulatoren von OATP1B3 sind. So ist die Stärke der Hemmung mit der des OATP1B3-Inhibitors BSP vergleichbar. Bei KBA und in geringerem Maße auch bei AKBA ist eine konzentrationsabhängige Hemmung von OATP1B3 zu erkennen, wobei die Hemmung mit steigender Konzentration zunimmt. Der Extrakt scheint OATP1B3 unabhängig von der eingesetzten Konzentration zu hemmen.

Wie bereits erwähnt wurden im Rahmen einer pharmakokinetischen Studie in der Leber von Ratten KBA und AKBA in Konzentrationen von 1 μM bzw. 2 μM detektiert. Diese Konzentrationen reichen aus, um OATP1B3 *in vivo* nach oraler Einnahme zu hemmen.

Basierend auf diesen Resultaten sollte die Möglichkeit von Interaktionen von *Boswellia serrata* Extrakten mit anderen anionischen Arzneistoffen durch die Modulation von OATP1B3 in Betracht gezogen werden, um negative Auswirkungen auf die Pharmakotherapie zu vermeiden.

Die transportervermittelte Aufnahme von Arzneistoffen in Zellen oder die Ausschleusung aus Zellen sind, genau wie die Löslichkeit, der Metabolismus und die Permeabilität, weitere wichtige Faktoren, die die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen beeinflussen können. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien haben gezeigt, dass KBA und AKBA das Potential haben, mit Substraten von MRP2 und OATP1B3 zu interagieren.

Methotrexat, welches bei vielen Tumorerkrankungen und auch bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa zur Standardmedikation zählt, ist ein Substrat von MRP2 und interagiert mit OATP1B3. Dies sollte bei der Comedikation mit *Boswellia serrata* Extrakt, der sich in einigen klinischen Studien bei diesen Erkrankungen ebenfalls als wirksam erwiesen hat, unbedingt berücksichtigt werden.

Fazit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Metabolismus haben gezeigt, dass mangelnde metabolische Stabilität von KBA die Ursache für deren geringe Bioverfügbarkeit darstellt. Die Untersuchungen zur Permeabilität ergaben, dass die geringe Bioverfügbarkeit der metabolisch stabilen AKBA hingegen durch deren schlechte Permeabilität hervorgerufen wird.

Obwohl eine Verbesserung der Löslichkeit alleine nicht zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit führt, so zeigt diese Arbeit doch, dass mit Hilfe einer geeigneten Formulierung sehr wohl die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren verbessert werden könnte.

Angesichts der beobachteten niedrigen *in vivo*-Konzentrationen von KBA und AKBA stellt sich jedoch die Frage, inwieweit die antiinflammatorische Wirksamkeit von Weihrauchextrakten tatsächlich durch KBA und AKBA und mittels der bisher beschriebenen Mechanismen hervorgerufen wird.

Die Konzentrationen, die für die 5-LO-Hemmung *in vitro* notwendig sind, reichten für die am stärksten wirksame Boswelliasäure AKBA je nach experimentellem Modell von 1,5 bis 50 μM . Der NF κ B-Signalweg wurde von den Boswelliasäuren in Konzentrationen von 3-10 μM gehemmt und die HLE wurde am stärksten durch AKBA gehemmt, deren IC₅₀-Wert 15 μM betrug.

Da die *in vivo* gemessenen Konzentrationen von AKBA jedoch 0,1 μM bei Menschen und 0,2 μM bei Ratten nicht überschritten, ist es nicht auszuschließen, dass Weihrauchextrakt durch andere als die bisher beschriebenen Mechanismen seine antiinflammatorische Wirksamkeit ausübt.

Nach einer mündlichen Auskunft von Professor Dr. Oliver Werz gibt es Hinweise, dass nicht nur die ketylierten sondern auch die nicht-ketylierten β -Boswelliasäuren eine Wirkung auf ein weiteres Ziel mit pharmakologischer Relevanz ausüben. Wenn sich herausstellt, dass diese Interaktionen bereits bei nanomolaren Konzentrationen ablaufen, könnte das einen weiteren Schritt zur Aufklärung der antiinflammatorischen Wirkung von Weihrauchzubereitungen darstellen. Zukünftige Studien sollten daher noch stärker als bisher auf die nicht ketylierten Boswelliasäuren fokussiert sein.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Der Extrakt des indischen Weihrauchs (*Boswellia serrata*) ist eines der wenigen pflanzlichen Heilmittel, dem von der EMEA der Orphan Drug Status zur Behandlung des peritumoralen Hirnödems verliehen wurde.

Boswellia serrata Extrakt und die Boswelliasäuren, welche als das wirksame Prinzip von Weihrauch identifiziert wurden, zeigten in zahlreichen *in vitro*-Untersuchungen antiinflammatorische Wirksamkeit durch Interaktionen mit der 5-LO, dem NFκB und der humanen Leukozytenelastase. Den Boswelliasäuren konnte außerdem antitumorale Aktivität nachgewiesen werden.

Die Wirksamkeit von Weihrauchpräparaten konnte in mehreren klinischen Studien bei Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, rheumatoider Arthritis und Asthma gezeigt werden.

Untersuchungen zum pharmakokinetischen Verhalten der Boswelliasäuren wurden weitaus seltener durchgeführt und zeigten alle, dass Weihrauch nur eine geringe orale Bioverfügbarkeit aufweist. Trotz hoher Dosen konnten die *in vitro* am stärksten wirksamen Boswelliasäuren KBA und AKBA nur in geringen Konzentrationen von 1,6 μM KBA und 0,1 μM AKBA im Plasma von Patienten und Probanden nachgewiesen werden. Auch in einer pharmakokinetischen Studie mit Ratten konnten nach Gabe von hoch dosiertem *Boswellia serrata* Extrakt nur niedrige Plasma- und Hirnkonzentrationen detektiert werden.

Weihrauchextrakt wird häufig von Glioblastom-Patienten in Comedikation zur Zytostatikatherapie eingenommen. Die im Rahmen dieser Arbeit im Steady-state gemessenen KBA- und AKBA-Plasmakonzentrationen von 27 Glioblastom-Patienten waren trotz hoher Dosierung gering. Im Hirngewebe, welches von zwei Patienten zur Verfügung stand, konnten weder KBA noch AKBA detektiert werden.

Die Bioverfügbarkeit einer Substanz kann im Wesentlichen durch deren Löslichkeit, Metabolismus und Permeabilität beeinflusst werden. Ziel der Arbeit war es daher, den Einfluss dieser Faktoren auf die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren zu untersuchen. Weihrauchextrakte sind in wässrigen Medien schlecht löslich. In einer Rattenstudie wurde deshalb untersucht, inwieweit die verbesserte Löslichkeit des Extrakts in einer nanoskaligen *Boswellia serrata* Formulierung zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit führt.

Eine bestehende LC-MS-Methode zur Bestimmung von KBA und AKBA aus Plasma und Hirngewebe wurde hinsichtlich des MRM-Massenübergangs von AKBA optimiert und revalidiert. Zur Vervollständigung des pharmakokinetischen Profils wurden KBA- und AKBA-Konzentrationen auch in der Leber der Ratten bestimmt. Die analytische Methode wurde hierfür nach den anerkannten FDA-Richtlinien erfolgreich validiert. Es war somit erstmals möglich KBA und AKBA in Lebergewebe zu quantifizieren.

Die Plasma- und Leberkonzentrationen waren jedoch bei den Ratten, die die nanoskalige *Boswellia serrata* Formulierung bekamen, in den ersten Stunden nach der oralen Verabreichung nicht signifikant höher als bei den Ratten, die den unbehandelten Extrakt erhielten. Während hingegen die Plasmaspiegel nach acht Stunden bei der unverarbeiteten Extraktformulierung stark abfielen, stiegen sie nach der Einnahme der nanoskaligen Formulierung erneut an. Dies ist vermutlich auf die verzögerte Freisetzung von KBA und AKBA aus der nanoskaligen Formulierung zurückzuführen. Dennoch führte die Gabe der nanoskaligen Formulierung zu keiner signifikanten Erhöhung der Plasma-, Leber- und Hirnspiegel. Die schlechte Löslichkeit des Extrakts stellte demnach nicht den einzigen limitierenden Faktor für die Bioverfügbarkeit dar.

Die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes wird außer von seiner Löslichkeit auch von seinem metabolischen Verhalten beeinflusst. So gibt es zahlreiche Beispiele für Arzneistoffe deren schlechte Bioverfügbarkeit aus einem rapiden metabolischen Abbau resultiert. Eine genaue Kenntnis des Metabolismus ist für die Entwicklung von neuen Formulierungen von entscheidender Bedeutung. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterhin der Einfluss des Metabolismus auf die Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren untersucht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur metabolischen Stabilität von KBA und AKBA in Rattenlebermikrosomen (RLM), Humanlebermikrosomen (HLM) und frisch isolierten Rattenhepatozyten (RH) zeigten, dass KBA einer stark ausgeprägten hepatischen Metabolisierung unterliegt. AKBA hingegen erscheint metabolisch relativ stabil, obwohl sie sich strukturell nur durch die Acetylierung der Hydroxyl-Gruppe am C-3-Atom von KBA unterscheidet. Die metabolischen Umwandlungsraten waren dabei in allen drei Modellen vergleichbar.

Für die Identifizierung der Metabolite wurden zwei LC-MS-Methoden entwickelt, die eine effiziente Identifizierung und Verifizierung von Boswelliasäuren und ihren Metaboliten in diversen Biomatrizes erlaubten.

Die Untersuchungen in RLM ergaben, dass Boswelliasäuren hauptsächlich Phase-I-Metabolite bilden. Oxidative Reaktionen zu mono-, di-, und seltener auch trihydroxylierten Metaboliten waren die bevorzugten metabolischen Wege von KBA, AKBA, α BA und β BA *in vitro*. Von A α BA und A β BA konnten keine Metabolite detektiert werden. Das metabolische Profil von KBA und AKBA wurde außerdem in RH untersucht und war mit dem in RLM vergleichbar. In einer Rattenstudie konnten dann im Plasma und in der Leber jedoch nicht im Hirn der Ratten KBA-Metabolite nachgewiesen werden, während für AKBA *in vivo* keine Metabolite detektiert wurden. Phase-II-Metabolite von KBA und AKBA konnten weder *in vitro* noch *in vivo* nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass diese beiden Boswelliasäuren ausschließlich durch Phase-I-Reaktionen metabolisiert werden.

Bisher war man davon ausgegangen, dass die niedrigen Plasmakonzentrationen von AKBA *in vivo* durch eine Deacetylierung zu KBA zustande kommen. Diese These konnte im Rahmen dieser Arbeit widerlegt werden. Die Ergebnisse der Metabolismusuntersuchungen ergaben, dass weniger als 2 % AKBA zu KBA

umgewandelt werden. Eine Deacetylierung kann demnach nicht für die geringe Bioverfügbarkeit von AKBA verantwortlich sein.

Aus den Metabolismusuntersuchungen kann geschlossen werden, dass die ausgeprägte hepatische Metabolisierung von KBA erheblich zu deren geringen Bioverfügbarkeit beiträgt. Für AKBA hingegen scheint der Metabolismus nicht der limitierende Faktor für die Bioverfügbarkeit zu sein.

Als weitere pharmakokinetische Kenngröße kann die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes maßgeblich beeinflussen. Daher wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss der Permeabilität auf die Bioverfügbarkeit von KBA und AKBA untersucht.

Im Caco-2-Zellmodell wurde für KBA bei 37° C ein P_{app} -Wert von $1,69 \cdot 10^{-6}$ cm/s in Absorptionsrichtung bestimmt, was einer mittleren Permeabilität entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass KBA und AKBA offensichtlich keinem Efflux-Transport unterliegen. AKBA erwies sich sowohl in absorptiver und sekretorischer Richtung als auch bei 4° C als schlecht permeabel. Die Bestimmung eines P_{app} -Werts war nicht möglich, weil die Konzentrationen im Akzeptorkompartiment unterhalb des LLOQ von 5 ng/ml der analytischen Methoden blieben.

Da KBA und AKBA die Aktivität des ABC-Transportproteins Pgp modulieren, wurde in dieser Arbeit überprüft, ob diese beiden Boswelliasäuren auch Substrate des Pgp sind. Die Permeation von KBA und AKBA war in Anwesenheit des Pgp-Inhibitors Verapamil jedoch nicht signifikant verändert, was darauf hindeutet, dass KBA und AKBA keine Pgp-Substrate sind. Die in vorherigen Studien beobachtete Hemmung von Pgp ist daher eher auf eine allosterische Wechselwirkung zurückzuführen.

Anhand der nanoskaligen Formulierung wurde weiterhin überprüft, ob KBA und AKBA aus dieser besser durch den Caco-2-Zellmonolayer permeieren können. Der in der nanoskaligen Formulierung enthaltene Emulgator führte zu einer Aufweitung der Tight-junctions, was sich in einem Abfall der TEER-Werte bemerkbar machte. Da es aber nicht zu einer Verbesserung der Permeation kam, wird die parazelluläre Route für KBA und AKBA nicht den relevanten Transportweg durch das Epithel des Gastrointestinaltrakts darstellen. Wie zahlreiche andere Arzneistoffe auch scheinen KBA und AKBA, transzellulär aufgenommen zu werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden einen wichtigen Baustein zur weiteren Aufklärung des pharmakokinetischen Verhaltens von KBA und AKBA. So ist die begrenzte systemische Verfügbarkeit von KBA auf eine mittlere Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt in Kombination mit der umfangreichen hepatischen Metabolisierung zurückzuführen. Die niedrigen systemischen Konzentrationen von AKBA hingegen liegen eher in der schlechten Absorption begründet.

Da die Bioverfügbarkeit von AKBA durch Einnahme mit einer fettreichen Mahlzeit um ein Vielfaches gesteigert werden kann, sind Lipid-basierte Arzneistoffträger, wie die bereits bei diversen lipophilen Arzneistoffen erfolgreich eingesetzten SEDDS, wohl eine vielversprechende Möglichkeit die Bioverfügbarkeit von AKBA zu verbessern.

Auf der Basis der extensiven Metabolisierung von KBA und der schlechten Permeabilität von AKBA stellt sich im Allgemeinen die Frage nach dem tatsächlichen Wirkmechanismus von KBA und AKBA. In keiner pharmakokinetischen Studie konnten die *in vitro* pharmakologisch aktiven Konzentrationen dieser beiden Boswelliasäuren erzielt werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch andere Wirkmechanismen als die bisher beschriebenen existieren. Des Weiteren können auch andere Boswelliasäuren an diesen Wirkmechanismen beteiligt sein. Zukünftige pharmakologische als auch klinische Studien sollten daher das Augenmerk ebenso auf nicht ketylierte Boswelliasäuren richten.

Unter dem Gesichtspunkt möglicher Arzneimittelinteraktionen wurde die Wirkung von KBA und AKBA auf die hauptsächlich in der Leber vorkommende Efflux-Pumpe MRP2 und das in der Leber für die Elimination zahlreicher Arzneistoffe verantwortliche OATP1B3 in zwei zellbasierten Assays untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass KBA und AKBA die Aktivität von MRP2 und OATP1B3 in Konzentrationen modulieren, welche im Rahmen dieser Arbeit in der Leber von Ratten nachgewiesen wurden.

Da Weihrauchextrakt häufig in Comedikation verwendet wird, sollte im Hinblick auf die Arzneimittelsicherheit in Zukunft geprüft werden, ob es zu praxisrelevanten Arzneimittelinteraktionen mit klinisch relevanten MRP2- und OATP1B3-Substraten wie Methotrexat, welches insbesondere zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis aber auch bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa eingesetzt wird, kommt.

7 Literaturverzeichnis

1. Martinez D, Lohs K, Janzen J. Weihrauch und Myrrhe: Kulturgeschichte und wirtschaftliche Bedeutung, Botanik, Chemie, Medizin. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH Stuttgart, 1989.
2. Blaschek W, Hänsel R, Keller K, Reichling J, Rimpler H, Schneider G. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. 5 ed. Springer Verlag, Heidelberg, 1998.
3. Madaus G. Lehrbuch der biologischen Heilmittel. Georg Olms Verlag, Leipzig, 1938.
4. Ammon HP. Arzneimittel aus indischer Kultur. Pharmazeutische Zeitung 2000; 145(51/52):10-16.
5. Ammon HP, Mack T, Singh GB, Safayhi H. Inhibition of leukotriene B4 formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. *Planta Med* 1991; 57(3):203-207.
6. Ammon HP. Salai-Guggal-(Indischer Weihrauch)-Gummiharz aus *Boswellia serrata*: Boswelliasäuren als Nicht-Redoxhemmstoffe der Leukotrienbiosynthese - Neue therapeutische Möglichkeit? *Deutsches Ärzteblatt* 1998; 95(1-2):A-30-A-31.
7. Böker DK, Winking M. Die Rolle von Boswelliasäure in der Therapie maligner Gliome. *Deutsches Ärzteblatt* 1997; 94(18):A 1197-A 1199.
8. Winking M, Sarikaya S, Rahmanian A, Jodicke A, Boker DK. Boswellic acids inhibit glioma growth: a new treatment option? *J Neurooncol* 2000; 46(2):97-103.
9. EMEA. Orphan Designation (EU/3/02/117). 2000.
10. Safayhi H, Ammon HP. Pharmakologische Aspekte von Weihrauch und Boswelliasäuren. *Pharmazeutische Zeitung* 1997; 142(39):11-20.
11. Simmet T, Zugmaier W, Buchele B. Analytik von pentazyklischen Triterpenen aus Weihrauchharz, Weihrauch- Extrakt Kapseln und H15 Tabletten. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 2004;(2):123-127.
12. Singh GB, Atal CK. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Agents Actions* 1986; 18(3-4):407-412.
13. Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, Anazodo MI, Subramanian LR, Ammon HP. Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261(3):1143-1146.
14. Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP. Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto-beta-boswellic acid. *Mol Pharmacol* 1995; 47(6):1212-1216.
15. Sailer ER, Subramanian LR, Rall B, Hoernlein RF, Ammon HP, Safayhi H. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity. *Br J Pharmacol* 1996; 117(4):615-618.

16. Sailer ER, Schweizer S, Boden SE, Ammon HP, Safayhi H. Characterization of an acetyl-11-keto-beta-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur J Biochem* 1998; 256(2):364-368.
17. Altmann A, Fischer L, Schubert-Zsilavecz M, Steinhilber D, Werz O. Boswellic acids activate p42(MAPK) and p38 MAPK and stimulate Ca(2+) mobilization. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290(1):185-190.
18. Poeckel D, Tausch L, Altmann A, Feisst C, Klinkhardt U, Graff J et al. Induction of central signalling pathways and select functional effects in human platelets by beta-boswellic acid. *Br J Pharmacol* 2005; 146(4):514-524.
19. Poeckel D, Tausch L, George S, Jauch J, Werz O. 3-O-acetyl-11-keto-boswellic acid decreases basal intracellular Ca²⁺ levels and inhibits agonist-induced Ca²⁺ mobilization and mitogen-activated protein kinase activation in human monocytic cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(1):224-232.
20. Poeckel D, Tausch L, Kather N, Jauch J, Werz O. Boswellic acids stimulate arachidonic acid release and 12-lipoxygenase activity in human platelets independent of Ca²⁺ and differentially interact with platelet-type 12-lipoxygenase. *Mol Pharmacol* 2006; 70(3):1071-1078.
21. Poeckel D, Werz O. Boswellic acids: biological actions and molecular targets. *Curr Med Chem* 2006; 13(28):3359-3369.
22. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107(1):7-11.
23. Syrovets T, Buchele B, Krauss C, Laumonnier Y, Simmet T. Acetyl-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha induction in monocytes by direct interaction with IkappaB kinases. *J Immunol* 2005; 174(1):498-506.
24. Roy S, Khanna S, Shah H, Rink C, Phillips C, Preuss H et al. Human genome screen to identify the genetic basis of the anti-inflammatory effects of *Boswellia* in microvascular endothelial cells. *DNA Cell Biol* 2005; 24(4):244-255.
25. Safayhi H, Rall B, Sailer ER, Ammon HP. Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281(1):460-463.
26. Jing Y, Xia L, Han R. Growth inhibition and differentiation of promyelocytic cells (HL-60) induced by BC-4, an active principle from *Boswellia carterii* Birdw. *Chin Med Sci J* 1992; 7(1):12-15.
27. Hoernlein RF, Orlikowsky T, Zehrer C, Niethammer D, Sailer ER, Simmet T et al. Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topoisomerase I. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288(2):613-619.
28. Huang MT, Badmaev V, Ding Y, Liu Y, Xie JG, Ho CT. Anti-tumor and anti-carcinogenic activities of triterpenoid, beta-boswellic acid. *Biofactors* 2000; 13(1-4):225-230.
29. Shao Y, Ho CT, Chin CK, Badmaev V, Ma W, Huang MT. Inhibitory activity of boswellic acids from *Boswellia serrata* against human leukemia HL-60 cells in culture. *Planta Med* 1998; 64(4):328-331.

30. Glaser T, Winter S, Groscurth P, Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP et al. Boswellic acids and malignant glioma: induction of apoptosis but no modulation of drug sensitivity. *Br J Cancer* 1999; 80(5-6):756-765.
31. Hostanska K, Daum G, Saller R. Cytostatic and apoptosis-inducing activity of boswellic acids toward malignant cell lines in vitro. *Anticancer Res* 2002; 22(5):2853-2862.
32. Jing Y, Nakajo S, Xia L, Nakaya K, Fang Q, Waxman S et al. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. *Leuk Res* 1999; 23(1):43-50.
33. Xia L, Chen D, Han R, Fang Q, Waxman S, Jing Y. Boswellic acid acetate induces apoptosis through caspase-mediated pathways in myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(3):381-388.
34. Liu JJ, Nilsson A, Oredsson S, Badmaev V, Duan RD. Keto- and acetyl-keto-boswellic acids inhibit proliferation and induce apoptosis in Hep G2 cells via a caspase-8 dependent pathway. *Int J Mol Med* 2002; 10(4):501-505.
35. Liu JJ, Nilsson A, Oredsson S, Badmaev V, Zhao WZ, Duan RD. Boswellic acids trigger apoptosis via a pathway dependent on caspase-8 activation but independent on Fas/Fas ligand interaction in colon cancer HT-29 cells. *Carcinogenesis* 2002; 23(12):2087-2093.
36. Liu JJ, Huang B, Hooi SC. Acetyl-keto-beta-boswellic acid inhibits cellular proliferation through a p21-dependent pathway in colon cancer cells. *Br J Pharmacol* 2006; 148(8):1099-1107.
37. Syrovets T, Gschwend JE, Buchele B, Laumonnier Y, Zugmaier W, Genze F et al. Inhibition of I κ B kinase activity by acetyl-boswellic acids promotes apoptosis in androgen-independent PC-3 prostate cancer cells in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280(7):6170-6180.
38. Zhao W, Entschladen F, Liu H, Niggemann B, Fang Q, Zaenker KS et al. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in highly metastatic melanoma and fibrosarcoma cells. *Cancer Detect Prev* 2003; 27(1):67-75.
39. Weller M, Schmidt C, Roth W, Dichgans J. Chemotherapy of human malignant glioma: prevention of efficacy by dexamethasone? *Neurology* 1997; 48(6):1704-1709.
40. Solary E, Bertrand R, Pommier Y. Apoptosis induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemic HL-60 cells. *Leuk Lymphoma* 1994; 15(1-2):21-32.
41. Syrovets T, Buchele B, Gedig E, Slupsky JR, Simmet T. Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and II α . *Mol Pharmacol* 2000; 58(1):71-81.
42. Bundesverband für Gesundheitsinformation und Verbraucherschutz-Info Gesundheit e.V. Rheumatoide Arthritis. 2003.
43. Etzel R. Special extract of *Boswellia serrata* (H15) in the treatment of rheumatoid arthritis. *Phytomedicine* 1996; 3(1):91-94.
44. Sander O, Herborn G, Rau R. [Is H15 (resin extract of *Boswellia serrata*, "incense") a useful supplement to established drug therapy of chronic polyarthritis? Results of a double-blind pilot study]. *Z Rheumatol* 1998; 57(1):11-16.
45. Kimmatkar N, Thawani V, Hingorani L, Khiyani R. Efficacy and tolerability of *Boswellia serrata* extract in treatment of osteoarthritis of knee--a randomized double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine* 2003; 10(1):3-7.

46. DVVV e.V. Deutsche Morbus Crohn/Colitis Ulcerosa Vereinigung. 2008.
47. Gupta I, Parihar A, Malhotra P, Singh GB, Ludtke R, Safayhi H et al. Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis. *Eur J Med Res* 1997; 2(1):37-43.
48. Gupta I, Parihar A, Malhotra P, Gupta S, Ludtke R, Safayhi H et al. Effects of gum resin of *Boswellia serrata* in patients with chronic colitis. *Planta Med* 2001; 67(5):391-395.
49. Gerhardt H, Seifert F, Buvari P, Vogelsang H, Repges R. [Therapy of active Crohn disease with *Boswellia serrata* extract H 15]. *Z Gastroenterol* 2001; 39(1):11-17.
50. Madisch A, Miehlke S, Eichele O, Mrwa J, Bethke B, Kuhlisch E et al. *Boswellia serrata* extract for the treatment of collagenous colitis. A double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22(12):1445-1451.
51. Gupta I, Gupta V, Parihar A, Gupta S, Ludtke R, Safayhi H et al. Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with bronchial asthma: results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study. *Eur J Med Res* 1998; 3(11):511-514.
52. Fischmann A. Blutgefäße des Glioblastoma multiforme: Elektronenmikroskopische und immunozytochemische Untersuchungen zu Veränderungen der perivaskulären extrazellulären Matrix und der Endothelzellen. Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen, 2004.
53. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10):987-996.
54. Boado RJ, Pardridge WM, Vinters HV, Black KL. Differential expression of arachidonate 5-lipoxygenase transcripts in human brain tumors: evidence for the expression of a multitranscript family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(19):9044-9048.
55. Golubic M, Prayson RA, Vargo L, Bondar J, Barnett GH. Increased expression of 5-lipoxygenase in glioblastoma multiforme. *Adv Exp Med Biol* 2003; 525:205-208.
56. Simmet T, Luck W, Winking M, Delank WK, Peskar BA. Identification and characterization of cysteinyl-leukotriene formation in tissue slices from human intracranial tumors: evidence for their biosynthesis under in vivo conditions. *J Neurochem* 1990; 54(6):2091-2099.
57. Streffer JR, Bitzer M, Schabet M, Dichgans J, Weller M. Response of radiochemotherapy-associated cerebral edema to a phytotherapeutic agent, H15. *Neurology* 2001; 56(9):1219-1221.
58. Janssen G, Bode U, Breu H, Dohrn B, Engelbrecht V, Gobel U. Boswellic acids in the palliative therapy of children with progressive or relapsed brain tumors. *Klin Padiatr* 2000; 212(4):189-195.
59. Acebo E, Raton JA, Sautua S, Eizaguirre X, Trebol I, Perez JL. Allergic contact dermatitis from *Boswellia serrata* extract in a naturopathic cream. *Contact Dermatitis* 2004; 51(2):91-92.
60. Kiela PR, Midura AJ, Kuscuoglu N, Jolad SD, Solyom AM, Besselsen DG et al. Effects of *Boswellia serrata* in mouse models of chemically induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(4):G798-G808.

61. Jeong DW, Kim YH, Kim HH, Ji HY, Yoo SD, Choi WR et al. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm Drug Dispos* 2007; 28(2):51-57.
62. Tawab MA, Kaunzinger A, Bahr U, Karas M, Wurglics M, Schubert-Zsilavec M. Development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of 11-keto-beta-boswellic acid in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 761(2):221-227.
63. Sharma S, Thawani V, Hingorani L, Shrivastava M, Bhate VR, Khiyani R. Pharmacokinetic study of 11-Keto beta-Boswellic acid. *Phytomedicine* 2004; 11(2-3):255-260.
64. Sterk V, Buchele B, Simmet T. Effect of food intake on the bioavailability of boswellic acids from a herbal preparation in healthy volunteers. *Planta Med* 2004; 70(12):1155-1160.
65. Buchele B, Simmet T. Analysis of 12 different pentacyclic triterpenic acids from frankincense in human plasma by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 795(2):355-362.
66. Reising K, Meins J, Bastian B, Eckert G, Mueller WE, Schubert-Zsilavec M et al. Determination of boswellic acids in brain and plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2005; 77(20):6640-6645.
67. Langguth P, Fricker G, Wunderli-Allensbach H. *Biopharmazie*. Wiley VCH-Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, 2004.
68. Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 1998.
69. Stegemann S, Leveiller F, Franchi D, de Jong H, Linden H. When poor solubility becomes an issue: from early stage to proof of concept. *Eur J Pharm Sci* 2007; 31(5):249-261.
70. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 44(1):235-249.
71. Chen Y, Liu J, Yang X, Zhao X, Xu H. Oleanolic acid nanosuspensions: preparation, in-vitro characterization and enhanced hepatoprotective effect. *J Pharm Pharmacol* 2005; 57(2):259-264.
72. Laszczyk M, Jager S, Simon-Haarhaus B, Scheffler A, Schempp CM. Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from the outer bark of birch (betulae cortex). *Planta Med* 2006; 72(15):1389-1395.
73. Puspa J, Klor HU. Plant sterols and stanols. *Ther Umsch* 2007; 64(3):153-159.
74. Takahashi Y, Kondo H, Yasuda T, Watanabe T, Kobayashi S, Yokohama S. Common solubilizers to estimate the Caco-2 transport of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* 2002; 246(1-2):85-94.
75. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol* 1990; 42(12):821-826.
76. Liversidge GC, Cundy KC. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int J Pharm* 1995; 125(1):91-97.

77. Francis M, Cristea M, Winnik F. Polymeric micelles for oral drug delivery: why and how. *Pure Appl Chem* 2004; 76(7-8):1321-1335.
78. Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972; 175(23):720-731.
79. Wilson T.H. *Intestinal Absorption*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1962.
80. Hillgren KM, Kato A, Borchardt RT. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Med Res Rev* 1995; 15(2):83-109.
81. Hirtz J. The gastrointestinal absorption of drugs in man: a review of current concepts and methods of investigation. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 19 Suppl 2:77S-83S.
82. Balimane PV, Han YH, Chong S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *AAPS J* 2006; 8(1):E1-13.
83. Fricker G, Miller DS. Relevance of multidrug resistance proteins for intestinal drug absorption in vitro and in vivo. *Pharmacol Toxicol* 2002; 90(1):5-13.
84. Pavek P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome p450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab* 2008; 9(2):129-143.
85. FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *Guidance for Industry, Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms based on a Biopharmaceutics Classification System*. 2000.
86. Bohets H, Annaert P, Mannens G, Van Beijsterveldt L, Anciaux K, Verboven P et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr Top Med Chem* 2001; 1(5):367-383.
87. Lennernas H. Human intestinal permeability. *J Pharm Sci* 1998; 87(4):403-410.
88. Proulx P. Structure-function relationships in intestinal brush border membranes. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1071(3):255-271.
89. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* 1998; 41(7):1007-1010.
90. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59(1):221-226.
91. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1990; 79(6):476-482.
92. Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res* 1990; 7(9):902-910.
93. Wilson G, Hassan IF, Dix CJ, Williamson I, Shah R, Mackay M et al. Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier. *Journal of Controlled Release* 1990; 11(1-3):25-40.

94. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175(3):880-885.
95. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46(1-3):27-43.
96. Rubas W, Cromwell ME, Shahrokh Z, Villagran J, Nguyen TN, Wellton M et al. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *J Pharm Sci* 1996; 85(2):165-169.
97. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm Res* 1997; 14(6):763-766.
98. Sambuy Y, de A, I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21(1):1-26.
99. Volpe DA. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J Pharm Sci* 2008; 97(2):712-725.
100. van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2005; 1(2):175-185.
101. Balimane PV, Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov Today* 2005; 10(5):335-343.
102. Hunnius. *Pharmazeutisches Wörterbuch*. 7. Auflage ed. de Gruyter, Berlin, New York, 1993.
103. Mutschler E. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2001.
104. Testai E. The drug-metabolizing enzymatic system and the experimental tools used for in vitro toxicology for metabolic studies. *Cell Biol Toxicol* 2001; 17(4-5):271-285.
105. Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 2005; 28(3):249-268.
106. Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther* 1995; 68(3):385-424.
107. Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999; 20(1-2):12-137.
108. Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S et al. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a PhRMA perspective. *J Clin Pharmacol* 2003; 43(5):443-469.
109. Pfrunder A, Schiesser M, Gerber S, Haschke M, Bitzer J, Drewe J. Interaction of St John's wort with low-dose oral contraceptive therapy: a randomized controlled trial. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56(6):683-690.
110. Kane GC, Lipsky JJ. Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc* 2000; 75(9):933-942.

111. Wrighton SA, VandenBranden M, Stevens JC, Shipley LA, Ring BJ, Rettie AE et al. In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development. *Drug Metab Rev* 1993; 25(4):453-484.
112. Lin JH, Wong BK. Complexities of glucuronidation affecting in vitro in vivo extrapolation. *Curr Drug Metab* 2002; 3(6):623-646.
113. Jia L, Liu X. The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practice (II): In Vitro Experiments. *Curr Drug Metab* 2007; 8(8):822-829.
114. Yamazaki H, Inoue K, Turvy CG, Guengerich FP, Shimada T. Effects of freezing, thawing, and storage of human liver samples on the microsomal contents and activities of cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 1997; 25(2):168-174.
115. Guillouzo A, Morel F, Fardel O, Meunier B. Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies. *Toxicology* 1993; 82(1-3):209-219.
116. Li AP, Maurel P, Gomez-Lechon MJ, Cheng LC, Jurima-Romet M. Preclinical evaluation of drug-drug interaction potential: present status of the application of primary human hepatocytes in the evaluation of cytochrome P450 induction. *Chem Biol Interact* 1997; 107(1-2):5-16.
117. Li AP. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact* 2007; 168(1):16-29.
118. Morel F, Beaune PH, Ratanasavanh D, Flinois JP, Yang CS, Guengerich FP et al. Expression of cytochrome P-450 enzymes in cultured human hepatocytes. *Eur J Biochem* 1990; 191(2):437-444.
119. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969; 43(3):506-520.
120. Loretz LJ, Li AP, Flye MW, Wilson AG. Optimization of cryopreservation procedures for rat and human hepatocytes. *Xenobiotica* 1989; 19(5):489-498.
121. Baranczewski P, Stanczak A, Sundberg K, Svensson R, Wallin A, Jansson J et al. Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep* 2006; 58(4):453-472.
122. Hopfgartner G, Husser C, Zell M. Rapid screening and characterization of drug metabolites using a new quadrupole-linear ion trap mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 2003; 38(2):138-150.
123. King R, Fernandez-Metzler C. The use of Qtrap technology in drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2006; 7(5):541-545.
124. Hirohashi T, Suzuki H, Chu XY, Tamai I, Tsuji A, Sugiyama Y. Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292(1):265-270.
125. Schrödter NC. Auswirkungen der obstructiven Cholestase auf die intestinale Expression von MRP2 bei Ratten und Menschen. Medizinische Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, 2007.

126. FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry, Drug Interaction Studies-Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling. 2006.
127. Forster F, Volz A, Fricker G. Compound profiling for ABCC2 (MRP2) using a fluorescent microplate assay system. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69(1):396-403.
128. Draber K. Expression und Lokalisation des Anionentransportproteins OATP-B im kardiovaskulären System. Medizinische Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald, 2007.
129. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F et al. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 2001; 120(2):525-533.
130. Baldes C, Koenig P, Neumann D, Lenhof HP, Kohlbacher O, Lehr CM. Development of a fluorescence-based assay for screening of modulators of human organic anion transporter 1B3 (OATP1B3). *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 62(1):39-43.
131. Weber CC, Reising K, Muller WE, Schubert-Zsilavecz M, Abdel-Tawab M. Modulation of Pgp function by boswellic acids. *Planta Med* 2006; 72(6):507-513.
132. Kariv I, Rourick RA, Kassel DB, Chung TD. Improvement of "hit-to-lead" optimization by integration of in vitro HTS experimental models for early determination of pharmacokinetic properties. *Comb Chem High Throughput Screen* 2002; 5(6):459-472.
133. Shou WZ, Magis L, Li AC, Naidong W, Bryant MS. A novel approach to perform metabolite screening during the quantitative LC-MS/MS analyses of in vitro metabolic stability samples using a hybrid triple-quadrupole linear ion trap mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 2005; 40(10):1347-1356.
134. Prakash C, Shaffer CL, Nedderman A. Analytical strategies for identifying drug metabolites. *Mass Spectrom Rev* 2007; 26(3):340-369.
135. Gelpi E. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1995; 703(1-2):59-80.
136. Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S. A Global View of LC/MS, How to solve your most challenging analytical problems. 2. Auflage ed. Global View Publishing, Pittsburg, 2002.
137. Cole R. Electrospray Ionization Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
138. Glish GL, Vachet RW. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(2):140-150.
139. Gates P. High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS). University of Bristol . 2008.
140. Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Haegele KD, Horning MG, Stillwell RN. Atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry. Solvent-mediated ionization of samples introduced in solution and in a liquid chromatograph effluent stream. *J Chromatogr Sci* 1974; 12(11):725-729.

141. Reising K. Bioanalytik von Keto- Boswelliasäuren und Untersuchung der Modulation der P-Glycoproteins durch Weihrauch und seine Inhaltsstoffe. Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt, 2007.
142. Operating Principle of a Quadrupole Mass Spectrometer. <http://www.in-process.com/2/massenspektrometrie/quadrupolmassenspektrometer.html> . 2008.
143. Applied Biosystems. Description of the Different Scan Modes in MS/MS Operation. <http://abstracts.aapspharmaceutica.com/expoaaps07/Data/EC/Event/Exhibitors/1018/94f7478b-a669-4f96-8cb4-2f90e2db3b3d.pdf> . 2006.
144. de Vries HE, Kuiper J, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol Rev* 1997; 49(2):143-155.
145. Kaunzinger A, Baumeister A, Cuda K, Haring N, Schug B, Blume HH et al. Determination of 11-keto-boswellic acid in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2002; 28(3-4):729-739.
146. FDA, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2005.
147. Kromidas S. Validierung in der Analytik. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1999.
148. Ganzera M, Khan IA. A reversed phase high performance liquid chromatography method for the analysis of boswellic acids in *Boswellia serrata*. *Planta Med* 2001; 67(8):778-780.
149. Greulich M. Einfluß von Tensiden auf die Resorption von Substraten der ABC-Transportproteine. Ruprecht-Karls-Universität, Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät, Heidelberg, 2003.
150. Potthast H, Dressman JB, Junginger HE, Midha KK, Oeser H, Shah VP et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen. *J Pharm Sci* 2005; 94(10):2121-2131.
151. Gesellschaft für Phytotherapie e.V. Erläuterungen zum Vorgehen bei der Beurteilung von in vitro Untersuchungen pharmakokinetischer Interaktionen mit Phytopharmaka. 2004.
152. Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP, Ducharme MP. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302(1):369-373.
153. Xing J, Chen X, Zhong D. Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats. *Life Sci* 2005; 78(2):140-146.
154. Sacchi VF, Magagnin S. Age-related modifications of leucine uptake in brush-border membrane vesicles from rat jejunum. *Mech Ageing Dev* 1992; 63(3):257-273.
155. Said HM, Sharifian A, Bagherzadeh A. Transport of biotin in the ileum of suckling rats: characteristics and ontogeny. *Pediatr Res* 1990; 28(3):266-269.
156. Frank A, Unger M. Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction. *J Chromatogr A* 2006; 1112(1-2):255-262.
157. Griffin SJ, Houston JB. Comparison of fresh and cryopreserved rat hepatocyte suspensions for the prediction of in vitro intrinsic clearance. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(5):552-558.

158. Stephenne X, Najimi M, Ngoc DK, Smets F, Hue L, Guigas B et al. Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex 1. *Cell Transplant* 2007; 16(4):409-419.
159. Lahoz A, Donato MT, Montero S, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. A new in vitro approach for the simultaneous determination of phase I and phase II enzymatic activities of human hepatocyte preparations. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22(2):240-244.
160. Buchele B, Zugmaier W, Simmet T. Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 791(1-2):21-30.
161. Liu X, Jia L. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and in vivo studies. *Curr Drug Metab* 2007; 8(8):815-821.
162. Liang XJ, Aszalos A. Multidrug transporters as drug targets. *Curr Drug Targets* 2006; 7(8):911-921.
163. Neuhoﬀ S, Ungell AL, Zamora I, Artursson P. pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25(2-3):211-220.
164. O'Sullivan SM, Woods JA, O'Brien NM. Use of Tween 40 and Tween 80 to deliver a mixture of phytochemicals to human colonic adenocarcinoma cell (CaCo-2) monolayers. *Br J Nutr* 2004; 91(5):757-764.
165. Hayashi M, Tomita M. Mechanistic analysis for drug permeation through intestinal membrane. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007; 22(2):67-77.
166. Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23(4):379-383.
167. Dimitrijevic D, Shaw AJ, Florence AT. Effects of some non-ionic surfactants on transepithelial permeability in Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol* 2000; 52(2):157-162.
168. Hugger ED, Novak BL, Burton PS, Audus KL, Borchardt RT. A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro. *J Pharm Sci* 2002; 91(9):1991-2002.
169. Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* 2002; 16(4-5):237-246.
170. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomed Pharmacother* 2004; 58(3):173-182.
171. Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A et al. Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J Biol Chem* 2003; 278(26):23538-23544.
172. El Sheikh AA, van den Heuvel JJ, Koenderink JB, Russel FG. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with multidrug resistance protein (MRP) 2/A. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320(1):229-235.

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Zentrallabor Deutscher Apotheker in Eschborn, an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt, an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg und am „Institute for Marine Biosciences“ in Halifax unter der Leitung von Professor Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz angefertigt.

Mein Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die interessante Fragestellung. Durch seine Unterstützung wurde mir unter anderem ein Auslandsaufenthalt ermöglicht, welcher einen wichtigen Beitrag sowohl für die erfolgreiche Anfertigung dieser Arbeit als auch für die Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizonts geleistet hat. Seine stete Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft waren mir eine große Hilfe.

Herrn Professor Dr. Oliver Werz für die Begutachtung dieser Arbeit.

Frau Dr. Mona Tawab danke ich herzlich für ihre engagierte Betreuung dieser Arbeit. Ihr Interesse an Kooperationen und ihre hilfreichen Anregungen haben viele neue Möglichkeiten eröffnet und waren für den Erfolg dieser Arbeit ausschlaggebend.

Herrn Professor Dr. Walter E. Müller für die großzügige Bereitstellung der Laboratorien bei den Tierstudien und den *in vitro*-pharmakologischen Untersuchungen.

Herrn Professor Dr. Jochen Klein und Herrn Dr. Gunter P. Eckert für die Durchführung und die Unterstützung bei der Planung der Tierstudien sowie für die Isolierung der Rattenhepatozyten.

Herrn Professor Dr. Michael Karas für die Bereitstellung der Laboratorien und Massenspektrometer sowie für die Hilfsbereitschaft bei der Methodenentwicklung.

Herrn Dr. Dietrich Volmer für seine Einladung in das Labor in Halifax und die Bereitstellung der Geräte sowie Herrn Dr. Rambod Daneshfar für seine Mitarbeit und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Professor Dr. Gert Fricker für die Bereitstellung der Laboratorien in Heidelberg bei den zellbiologischen Untersuchungen sowie Frau Johanna Kanzer und Frau Jessica Hummel für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der zellbiologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Ulf Nestler für die Bereitstellung der Plasma- und Hirnproben von Glioblastom-Patienten.

Allen Kollegen am ZL, besonders Frau Dr. Astrid Kaunzinger und den Mitarbeitern der Abteilung „AMK, Ausgangsstoffe, Phytopharmaka, Packmittel“ für die herzliche Aufnahme in ihr Team, die gute Zusammenarbeit und ständige Hilfsbereitschaft bei

jeglichen Fragestellungen. Durch die Bereitschaft aller, ihr Fachwissen und ihre Erfahrung jederzeit weiterzugeben, habe ich sehr viel lernen können.

Meinen Doktoranden-Kollegen Frau Dr. Karen Reising für die gute Einarbeitung in die Bioanalytik und Frau Dr. Kornelia Griesmann für das nette Beisammensein und die interessanten Diskussionen in den Kaffeepausen.

Allen Kollegen der Arbeitskreise Schubert-Zsilavec, Müller und Karas, besonders Gero Hooff für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft bei meinen „Exkursionen in fremde Laboratorien“ sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meiner Familie und Zenawit für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die Unterstützung, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte.

Publikationen

Einzelne Kapitel der Arbeit „Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Boswelliasäuren *in vitro* und *in vivo* mittels LC-MS“ wurden bereits veröffentlicht bzw. vorgestellt:

Journals

Drug Metabolism and Disposition 2008, 36(6): 1135-42

Krüger P., Daneshfar R., Eckert G.P., Klein J., Volmer D.A., Bahr U., Müller W.E., Karas M., Schubert-Zsilavec M., Abdel-Tawab M.
“Metabolism of boswellic acids *in vitro* and *in vivo*“

European Journal of Pharmaceutical Sciences 2008, in press

Krüger P., Kanzer J., Hummel J., Fricker G., Schubert-Zsilavec M., Abdel-Tawab M.
”Permeation of Boswellia extract in the Caco-2 model and possible interactions of its constituents KBA and AKBA with OATP1B3 and MRP2”

Poster und Abstracts

DPhG Jahrestagung 2007, Erlangen

Krüger P., Daneshfar R., Eckert G.P., Volmer D.A., Bahr U., Müller W.E., Karas M., Schubert-Zsilavec M., Abdel-Tawab M.
”Determination of boswellic acid metabolites *in vitro* and *in vivo* by LC-MS/MS“

Arbeitstagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2008, Heidelberg

Nestler U., Schumacher J., Winking M., Krüger P., Tawab M., Böker D.K.
“Comparison of serum levels of boswellic acids with cytotoxic concentrations in cell culture”

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Phillip Krüger
Geburtsdatum: 17. Juni 1977
Geburtsort: Kiel
Familienstand: ledig, keine Kinder

Berufsausbildung und Berufserfahrung

ab 08/2008 Laborleiter der Analytik bei Almirall-Sofotec
01/2005 – 05/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Zentrallabors Deutscher Apotheker, stellvertretender Abteilungsleiter der Abteilung: „AMK, Ausgangsstoffe, Phytopharmaka, Packmittel“
08/2003 – 12/2004 Apotheker in der Bären Apotheke, Kiel
11/2002 – 05/2003 Pharmaziepraktikant am Groote Schuur Hospital und Medicines Information Centre, Kapstadt
05/2002 – 11/2002 Pharmaziepraktikant in der Stern Apotheke, Kiel

Ausbildung

11/2006 – 12/2006 Forschungsaufenthalt am Institute for Marine Biosciences des National Research Council of Canada, Halifax
01/2005 – 12/2008 Promotionsstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt, im Fachbereich pharmazeutische Chemie bei Professor M. Schubert-Zsilavec
07/2003 3. Staatsexamen Pharmazie, Approbation als Apotheker
10/1999 – 03/2002 Pharmaziestudium an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
10/1997 – 09/1999 Pharmaziestudium an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel
1987 – 1996 Gymnasium in Kiel-Elmschenhagen mit Abschluss (Abitur)
1983 – 1987 Grundschule in Schwentinental

Anhang

0090-9556/08/3606-1135-1142\$20.00
DRUG METABOLISM AND DISPOSITION
Copyright © 2008 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics
DMD 36:1135-1142, 2008

Vol. 36, No. 6
18424/3343048
Printed in U.S.A.

Metabolism of Boswellic Acids in Vitro and in Vivo

Phillip Krüger, Rambod Daneshfar, Gunter P. Eckert, Jochen Klein, Dietrich A. Volmer,
Ute Bahr, Walter E. Müller, Michael Karas, Manfred Schubert-Zsilavecz, and
Mona Abdel-Tawab

Central Laboratory of German Pharmacists, Eschborn, Germany (P.K., M.S.-Z., M.A.-T.); Institutes of Pharmacology (G.P.E., J.K., W.E.M.) and Pharmaceutical Chemistry (U.B., M.K., M.S.-Z.), J. W. Goethe-University, Center for Drug Research, Development and Safety, Frankfurt, Germany; Institute for Marine Biosciences, National Research Council, Nova Scotia, Halifax, Canada (R.D.); and Medical Research Council, Department of Human Nutrition Research, Cambridge, United Kingdom (D.A.V.)

Received September 11, 2007; accepted March 17, 2008

ABSTRACT:

Boswellia serrata resin dry extract is among the few herbal remedies designated with an orphan drug status for the treatment of peritumoral brain edema. In addition, boswellic acids (BAs), the main active ingredients of *B. serrata* extracts, have potent anti-inflammatory properties, and may represent promising agents for the treatment of inflammatory diseases. Pharmacokinetic studies, however, revealed poor bioavailability, especially of 11-keto- β -boswellic acid (KBA) and 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA), the most potent BAs. To address the question of whether BAs are extensively metabolized, we determined the metabolic stability of KBA and AKBA in vitro, investigated the in vitro metab-

olism of BAs, and compared the metabolic profiles of KBA and AKBA with those obtained in rats in vivo. In rat liver microsomes and hepatocytes as well as in human liver microsomes, we found that KBA but not AKBA undergoes extensive phase I metabolism. Oxidation to hydroxylated metabolites is the principal metabolic route. In vitro, KBA yielded metabolic profiles similar to those obtained in vivo in rat plasma and liver, whereas no metabolites of AKBA could be identified in vivo. Furthermore, AKBA is not deacetylated to KBA. This study indicates that the efficacy of *B. serrata* extract may be enhanced by increasing the bioavailability of AKBA.

Pentacyclic triterpenes have gained significant importance because their chemical structures resemble those of steroids. In particular, boswellic acids (BAs), the main active components of the gum resin extract of *Boswellia serrata* (Salai guggal), have received considerable attention. Based on positive data on the treatment of peritumoral brain edema accompanying gliomas (Winking et al., 2000), the European Medicines Agency designated an orphan drug status to *B. serrata* dry resin extract in 2002, thus boosting the status of *B. serrata* extract as an herbal remedy.

Traditionally, *B. serrata* extract is used in Indian ayurvedic medicine for the treatment of inflammatory and arthritic diseases (Gupta et al., 1998; Culioli et al., 2003). BAs possess potent anti-inflammatory properties by inhibiting 5-lipoxygenase, human leukocyte elastase and the nuclear factor- κ B pathway, without exerting the adverse effects known for steroids (Safayhi et al., 1992, 1997; Gupta et al., 1997; Syrovets et al., 2005; Poeckel and Werz, 2006). Among the six most important derivatives of BAs (see Fig. 4), KBA and AKBA are the most potent inhibitors of 5-lipoxygenase with IC₅₀ values of 2.8 and 1.5 μ M, respectively (Safayhi et al., 1992; Sailer et al., 1996). In several clinical trials the efficacy of *B. serrata* extract was comparable with that of sulfasalazine and mesalazine for the treatment of Crohn's

disease and ulcerative colitis, with a risk-benefit analysis in favor of BAs (Gupta et al., 1997, 2001; Gerhardt et al., 2001). Efficacy, however, could not be clearly demonstrated for other inflammatory diseases such as asthma and polyarthritis (Gupta et al., 1998; Sander et al., 1998). Moreover, *B. serrata* extract also exhibited antiproliferative and cytotoxic effects (Poeckel and Werz, 2006).

Preliminary pharmacokinetic studies found only very low concentrations of KBA in human plasma after oral administration of *B. serrata* extract, ranging from 0.17 μ M after a single dose administration of 786 mg (Sterk et al., 2004), to 1.6 μ M after taking 1600 mg (Abdel Tawab et al., 2001), to 2.7 μ M subsequent to the intake of 333 mg (Sharma et al., 2004). AKBA, the most potent BA, was determined at a concentration of 0.1 μ M after a multiple-dose administration of 786 mg of *B. serrata* extract (Büchtele and Simmet, 2003). In the pharmacokinetic study carried out by Sharma et al. (2004), AKBA was not detected in plasma, possibly because of the deacetylation of AKBA to KBA in vivo. In rats dosed with 240 mg/kg of *B. serrata* extract, plasma levels of KBA and AKBA were determined to be 0.4 and 0.2 μ M, respectively, whereas they reached concentrations of 0.3 μ M in the brain (corresponding to 99 and 95 ng of KBA and AKBA per g of brain, respectively) (Reising et al., 2005). The studies mentioned above clearly suggest a substantial potential of BAs for the treatment of inflammatory diseases and central nervous system malignancies, if sufficient systemic concentrations can be achieved.

Among many factors affecting bioavailability, poor absorption,

Article, publication date, and citation information can be found at
<http://dmd.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/dmd.107.018424.

ABBREVIATIONS: BA, boswellic acid; KBA, 11-keto- β -boswellic acid; AKBA, 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid; RLM, rat liver microsome(s); HLM, human liver microsome(s); α BA, α -boswellic acid; β BA, β -boswellic acid; A α BA, 3-acetyl- α -boswellic acid; A β BA, 3-acetyl- β -boswellic acid; LC, liquid chromatography; MS/MS, tandem mass spectrometry; Pgp, P-glycoprotein; PBCEC, porcine brain capillary endothelial cell.

and/or extensive metabolism may play a crucial role in limiting the systemic availability of BAs. The present study will focus on the contribution of hepatic metabolism to the low bioavailability observed with KBA and AKBA. To date, no data describing the metabolism of pentacyclic triterpenes, including BAs, is available. To our knowledge, only the metabolism of oleanolic acid, leading to the formation of hydroxylated metabolites upon incubation with rat liver microsomes, has been described (Jeong et al., 2007). Furthermore, the fate of the most potent BA, AKBA, is not known. It is unclear whether AKBA is predominantly deacetylated to the pharmacologically active KBA or whether it is metabolized via other pathways. Based on the particular therapeutic importance of *B. serrata* extracts, the present study has three objectives: first, to investigate the metabolic stability of KBA and AKBA in rat liver microsomes (RLM), rat hepatocytes, and human liver microsomes (HLM); second, to determine whether AKBA is deacetylated to KBA in vivo; and finally, to identify the metabolites of BAs in vitro and to compare the in vitro metabolic profiles of the most potent BAs, KBA and AKBA, with those in rat plasma, liver, and brain after oral administration.

Methods and Materials

Chemicals and Reagents. Boswellic acids [α -boswellic acid (α BA), (3 α)-3-hydroxy-olean-12-en-23-oic acid; β -boswellic acid (β BA), (3 $\alpha,4\beta$)-3-hydroxyurs-12-en-23-oic acid; 3-acetyl- α -boswellic acid (A α BA), (3 α)-3-acetoxy-olean-12-en-23-oic acid; 3-acetyl- β -boswellic acid (A β BA), (3 α)-3-acetoxy-urs-12-en-23-oic acid; 3-acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA), (3 α)-3-acetoxy-urs-12-en-11-keto-23-oic acid; and 11-keto- β -boswellic acid (KBA), (3 α)-3-hydroxy-urs-12-en-11-keto-23-oic acid] (purity > 99%) were purchased from Phytoflan (Heidelberg, Germany). All solvents were of analytical grade. Methanol, acetonitrile, tetrahydrofuran, *n*-hexane, 2-propanol, and ethyl acetate were from Caledon (Georgetown, ON, Canada). Water was collected from a Milli-Q organic free water system (Millipore Corporation, Bedford, MA). Extrelut NT was obtained from VWR (Darmstadt, Germany). Solid-phase extraction cartridges were obtained from Waters (Milford, MA, USA). Tris buffer was acquired from Applichem (Darmstadt, Germany). Pooled HLM (>25 donor livers), NADPH-regenerating solutions A and B, and UGT Reaction Mix solutions A and B were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Potassium phosphate monobasic, Krebs-Henseleit buffer, 7-ethoxycoumarin, 7-hydroxycoumarin, 7-hydroxycoumarinsulfate, asiatic acid, and pooled male RLM were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Microsomal Incubation and Sample Preparation. Stock solutions of each BA were prepared at concentrations of 500 μ M in methanol-water (50:50, v/v). The NADPH-regenerating system was used in this study because it provides constant NADPH levels over the entire incubation period. The final incubation solutions consisted of 50 mM potassium phosphate buffer containing 1 mg/ml microsomal protein, 10 μ M BA, 1.3 μ M NADP⁺, 3.3 mM glucose 6-phosphate, 3.3 mM MgCl₂, and 0.4 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase. The total volume was 250 μ l. Controls were incubated without the NADPH-regenerating system. The solutions were incubated at 37°C in a water bath. After 60 min, the metabolic reaction was stopped by adding 250 μ l of ice-cold acetonitrile. The solutions were vortex-mixed, put on ice for 15 min, and centrifuged for 10 min at 8000g at 4°C. Aliquots of the supernatants were diluted to 500 μ l with water. The sample solutions containing 20% or less acetonitrile were transferred to a solid-phase extraction cartridge. After washing with 1 ml of water, the metabolites were eluted from the cartridges with 1 ml of methanol. After solvent evaporation, the samples were redissolved in 200 μ l of methanol-water (50:50, v/v) and used for LC-MS/MS analysis.

Metabolic Stability. The incubation conditions for the phase I reactions were the same as described above, but the incubation time was extended to 2 h, to allow sufficient time for the reactions. For the glucuronidation reactions, solutions containing 1 mg/ml microsomal protein, 10 μ M KBA or AKBA, 2 mM UDP-glucuronic acid cofactor, 50 mM Tris-HCl, 8 mM MgCl₂, and 25 μ g/ml alamethicin in deionized water were incubated as described previously. The total volume was 250 μ l. Aliquots (50 μ l) of the reaction mixtures were drawn at 15, 30, 60, and 120 min, and the reaction was stopped by adding equal

amounts of ice-cold acetonitrile containing asiatic acid (10 μ M) as an internal standard, followed by centrifugation for 10 min at 8000g at 4°C. The supernatants were analyzed directly by LC-MS/MS in the multiple reaction monitoring mode. Controls were incubated without the cofactors.

For determining the metabolic stability in rat hepatocytes, 100 μ M KBA or 100 μ M AKBA was added to freshly isolated hepatocyte suspensions, which were previously incubated for 15 min at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% O₂. The incubation mixture was then kept for 2 h under the same incubation conditions. The metabolic capacity was monitored by determining the ability of the hepatocytes to metabolize 7-ethoxycoumarin. Cytochrome P450, UDP glucuronosyltransferase, and sulfotransferases were shown to be active over the entire incubation period. Incubations were stopped at 0, 15, 30, 60, and 120 min by adding 200 μ l of cold methanol. Afterward, the terminated incubation samples were vortex-mixed, put on ice for 15 min, and centrifuged for 10 min at 8000g at 4°C. The supernatants were stored at -20°C until they were analyzed by LC-MS/MS. The metabolic stability of KBA and AKBA was calculated on the basis of six determinations, at each time point, respectively.

Isolation of Rat Hepatocytes. A male Wistar rat was anesthetized with pentobarbital before abdominal midline incision and liver cannulation. Hepatocytes were then isolated by collagenase perfusion (Berry and Friend, 1969). Isolated hepatocytes were suspended in Krebs-Henseleit buffer supplemented with 10 mM fructose and 3 mM glycine (pH 7.4), at a cell density of 1×10^6 cells/ml. The viability of hepatocytes, based on trypan blue exclusion, was >85%.

Animal Study. Female albino Wistar rats ranging from 101 to 125 g in body weight were supplied by Charles River Laboratories (Wilmington, UK). The animals were housed under standard conditions, with standard chow diet and water freely available. Fifteen milligrams of KBA and AKBA were suspended in 3 g of aqueous 0.2% agarose gel (w/v). To enhance bioavailability, 30 μ l of neutral oil was added as a lipophilic component (Sterk et al., 2004). The control group was given only agarose gel. The second group was given KBA suspension at a dose of 12.5 mg/kg [corresponding to the dose of 240 mg of *B. serrata* extract/kg applied in previous studies (Reising et al., 2005; Winking et al., 2000)], and the third group received AKBA suspension at the same dose. Each group consisted of four rats. The treatment was administered once by oral gavage via a pharyngeal tube with a maximal application volume of 0.43 ml. Oral application was chosen because it is the most common application route of frankincense. All experiments were carried out by appropriately trained individuals according to the guidelines of the German Protection of Animals Act (Deutsches Tierschutzgesetz, BGBl 1998, Part I, 30, S. 1105ff.), in accordance with the Declaration of Helsinki. Two hours after the oral administration, the rats were decapitated, and brain and liver were isolated. The brain samples (weight range = 1.18–1.35 g) and 1.2 g of the livers were rinsed and homogenized in 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), yielding suspensions containing 200 mg of brain and 200 mg of liver/ml of buffer, respectively. The homogenates were stored at -20°C before sample preparation. The blood samples were collected from the trunk immediately after decapitation and transferred to tubes containing 0.03 ml of heparin to avoid coagulation. They were centrifuged at 2000g for 10 min to obtain the plasma fractions, which were then stored at -20°C until analysis.

Preparation of in Vivo Samples. Based on the method described by Büchele and Simmet (2003), 0.8 g of Extrelut NT/ml of plasma was used for sorbent assisted liquid-liquid extraction in Extrelut glass columns. For the extraction, 6 ml of brain or liver homogenate were passed through the Extrelut NT3 glass columns containing 5 g of Extrelut. After 15 min, KBA and AKBA were eluted with a solvent mixture consisting of tetrahydrofuran-*n*-hexane-ethyl acetate-2-propanol (160:160:160:15, v/v/v/v). The plasma samples were eluted with 6 ml of solvent, whereas 30 ml was used for the elution of brain and liver samples. The eluates were dried under a stream of nitrogen at 40°C, and the residues were reconstituted in 150 μ l of methanol and cooled on ice for 15 min before centrifugation at 2000g (4°C) for 10 min. The clear supernatants were used for LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS. For the experiments on the metabolic stability of KBA and AKBA, isocratic separation was performed on a PerkinElmer series 200 high-performance liquid chromatography system with a reversed-phase 18 column (Hypersil BDS, 150 \times 4 mm, 5 μ m particles; MZ-Analysetechnik, Mainz, Germany) at 40°C and a flow rate of 1 ml/min. The mobile phase consisted of methanol-water-glacial acetic acid (8:1:0.4, v/v/v). Mass spectro-

METABOLISM OF BOSWELLIC ACIDS

1137

metric analysis was performed on a triple quadrupole mass spectrometer (API 300; MDS Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with an atmospheric pressure chemical ionization interface operating in positive ionization mode at 425°C. Multiple reaction monitoring was used to quantify KBA and AKBA in RLM, HLM, and rat hepatocytes, using asiatic acid as the internal standard. The details of the method have been published elsewhere (Reising et al., 2005). Screening for glucuronides was performed in the full scan mode followed by product ion scanning. Additionally, neutral loss scans (for glucuronides, sulfates, and amino acid conjugates via neutral losses of 176, 80, 129, 75, and 57 u) and precursor ion scans (based on the KBA fragment ions at m/z 391, 407, 423, and 421 and the AKBA fragment ion at m/z 59) were performed in the negative ionization mode. Data acquisition and processing was conducted using Analyst 1.4.1 software.

For metabolite identification, a sensitive LC-MS/MS method was established, providing rapid and comprehensive screening for metabolites with simultaneous data-dependent acquisition of MS/MS data for potential candidates. Liquid chromatography was carried out on an Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) high-performance liquid chromatography system using a reversed-phase 18 column [Ultrasorb ODS (30), 30 × 3.2 mm, 5 μm; Phenomenex, Torrance, CA] for the separation of BAs and their metabolites at a flow rate of 0.6 ml/min. The injection volume was 10 μl. The mobile phase consisted of water (A) and methanol (B). Three gradient programs were used to achieve adequate retention behavior for the different BAs. The gradient programs started with 50% B and changed to 100% B within 12 min for KBA and AKBA and within 10 min for αBA, βBA, AαBA, and AβBA, respectively. This gradient was then held for 4 min for KBA and AKBA and 6 min for the remaining four BAs. Finally it was changed to 50% B within 1 min followed by 5 min of equilibration at 50% B before the next injection. The mass spectrometry experiments were conducted on a hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer (QTRAP 4000; MDS Sciex) equipped with a Turbo V atmospheric pressure chemical ionization interface operating in negative ionization mode with the following source parameters: needle current, -3 μA; curtain gas, 20 psi; temperature, 450°C; and gas 1, 30 psi. Data acquisition and processing was performed with the Analyst 1.4.1 software. The mass spectrometric conditions were optimized by infusing standard solutions of the respective BA using a syringe pump (Harvard Apparatus Inc., South Natick, MA). The following parameters were obtained for the declustering potential (volts) and the collision energy (volts), respectively: KBA, -120, -55; AKBA, -85, -20; αBA, -170, -50; βBA, -170, -50; AαBA, -65, -20; and AβBA, -65, -20. Screening for metabolites was performed in the linear ion trap mode, with information dependent acquisition in the enhanced product ion mode. In the enhanced product ion mode, the precursor ion was selected in Q1 and the collision-induced dissociation was conducted in the collision cell q2. The product ions were detected in the linear ion trap, providing enhanced sensitivity over traditional triple quadrupole experiments. Some metabolites were not seen in the information dependent acquisition experiments because of matrix interferences. These metabolites could be observed, however, by narrowing the Q1 isolation window to increase selectivity.

Identification of metabolites was based on comparing the MS/MS spectra with those of BAs. Only if the same fragmentation pattern was obtained, the metabolites were assigned to the corresponding BA. Furthermore, the peaks of the metabolites should not be detectable in the respective control group.

Results

Metabolic Stability of KBA and AKBA. After 15 min of incubation with RLM, more than 80% of the initial KBA concentration was metabolized and less than 1% of the starting concentration remained after 120 min. Extensive phase I metabolism was also observed in HLM. After 15 min, more than 60% of the initial KBA concentration was metabolized and less than 10% of the starting concentration remained after 120 min (Fig. 1). On the other hand, AKBA was less susceptible to phase I metabolism than KBA, with approximately 80% of the starting concentration still remaining 120 min after incubation with RLM and HLM, respectively (Fig. 1).

The direct glucuronidation experiments performed in RLM and

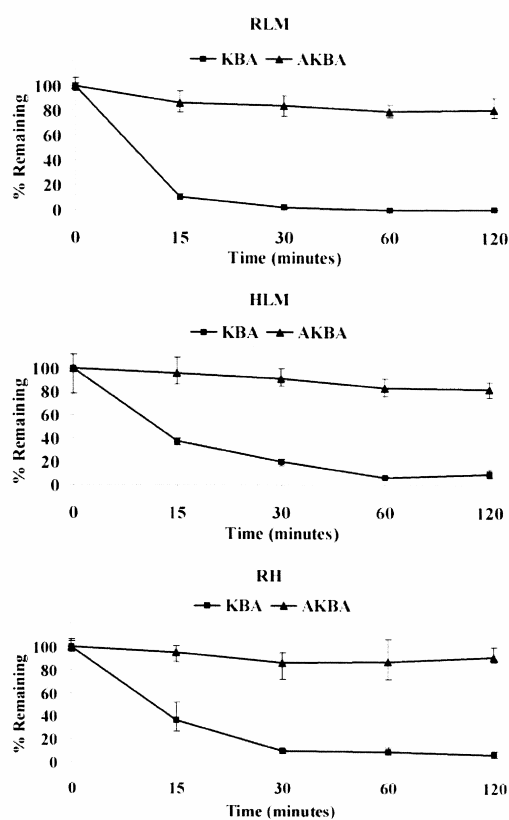


Fig. 1. Metabolic stability of KBA (■) and AKBA (▲) in RLM, HLM, and rat hepatocytes (RH). The error bars represent the S.D.s of three individual experiments for RLM and HLM and six individual experiments for rat hepatocytes. The metabolic stability curves in RLM and HLM result from phase I metabolism of KBA and AKBA, whereas the metabolic stability curve in rat hepatocytes is based on phase I and II metabolism.

HLM in parallel revealed no decrease in the initial concentrations of KBA and AKBA. Furthermore, KBA and AKBA glucuronides could not be detected upon screening with LC-MS/MS (data not shown). This finding clearly indicates that KBA and AKBA are subjected mainly to phase I metabolism. Moreover, no substantial differences between RLM and HLM were observed in their metabolic turnover rates.

Upon incubation of KBA and AKBA with rat hepatocytes, metabolic turnover rates similar to those described above for RLM and HLM were obtained (Fig. 1). Also, for rat hepatocytes more than 80% of the initial KBA was metabolized after 30 min, whereas approximately 80% of the starting AKBA concentration still remained after 120 min.

Identification of the KBA Metabolites in Vitro. The initial screening of the in vitro RLM reaction medium revealed the formation of metabolites with mass shifts of +16, +32, and +14 u in comparison to KBA. Upon screening for m/z 485.4 (corresponding to mass shifts of +16 u), three major metabolites eluting earlier than KBA

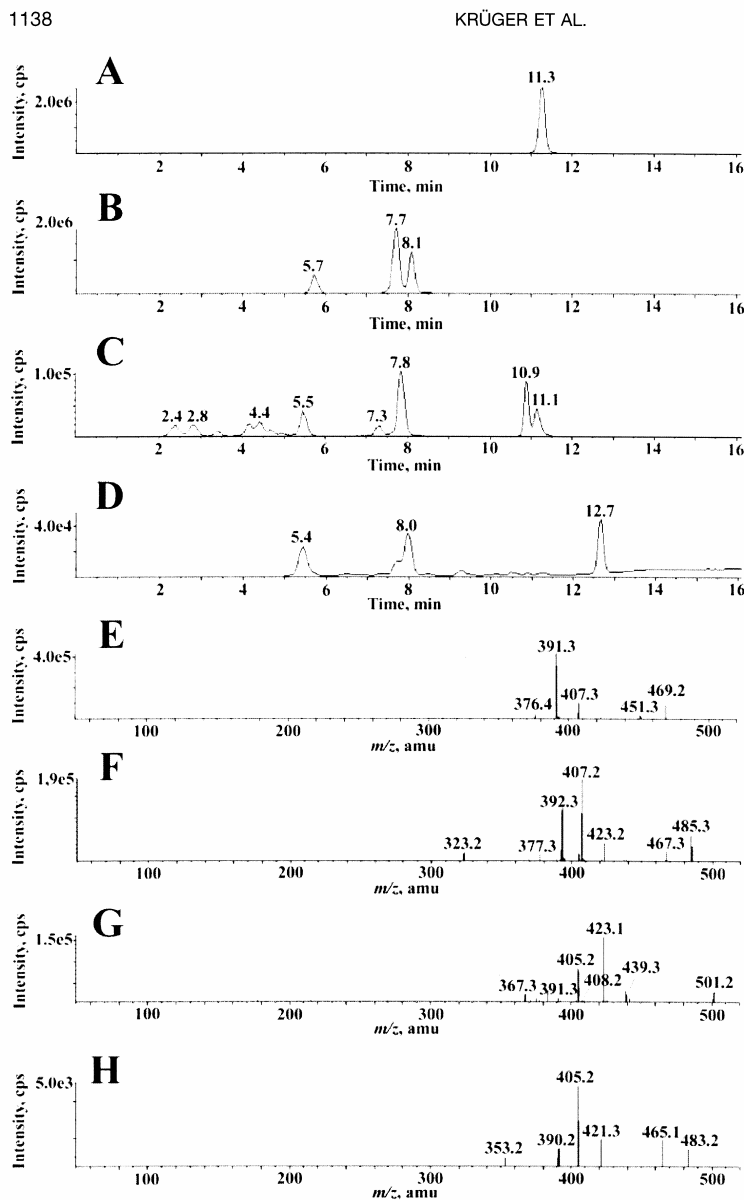


FIG. 2. SIM chromatograms and product ion spectra of KBA (A and E) and the corresponding metabolites for mass shifts of +16 u (B and F), +32 u (C and G), and +14 u (D and H) *in vitro*.

(Fig. 2A) were detected (Fig. 2B), indicating the presence of derivatives with more hydrophilic properties than the parent compound. Because these peaks were absent in the control incubations, they can be clearly assigned to metabolic conversions of KBA.

This assumption is further supported by comparing the MS/MS spectra of KBA and its metabolites, providing consistent structure-specific fragmentation patterns. Whereas the MS/MS of KBA produced fragments at m/z 376.4, 391.3, 407.3, and 451.3 (Fig. 2E), the

three metabolites yielded the same fragment species with a characteristic mass shift of 16 u at m/z 392.3, 407.2, 423.2, and 467.3 (Fig. 2F). The peaks at 10.9 and 11.1 min could not be related to KBA, as they were also present in the control group and did not show the characteristic fragmentation pattern of KBA.

Upon screening for m/z 501.4 (corresponding to a +32 u mass shift), various signals were observed between retention times $t = 2.4$ and 7.8 min (Fig. 2C), exhibiting characteristic fragment ion shifts of

METABOLISM OF BOSWELLIC ACIDS

1139

TABLE I
Overview of all metabolites of KBA and AKBA detected in vivo in comparison with those identified in vitro

Boswellic Acid	In Vitro		In Vivo		
	RLM	Hepatocytes	Plasma	Liver	Brain
KBA	+	+	+	+	+
Monohydroxylated KBA derivatives	+	+	+	+	-
Dihydroxylated KBA derivatives	+	+	+	+	-
Trihydroxylated KBA derivatives	-	+	-	+	-
Hydroxylated and dehydrogenated KBA derivatives	+	-	-	-	-
AKBA	+	+	+	+	+
Monohydroxylated AKBA derivatives	+	+	-	-	-

+32 u, in comparison with those of KBA at m/z 408.2, 423.1, and 439.3 (Fig. 2G). Furthermore, the two peaks at $t = 5.4$ and 8.0 min (Fig. 2D) ($[M - H]^-$ at m/z 483.4) were not present in the control, suggesting metabolites corresponding to a mass shift of +14 u. As expected, the fragmentation pattern of these products (fragment ions at m/z 390.2, 405.2, and 421.3) again resembled that of KBA, indicating a link to KBA. The peak at 12.7 min could not be related to KBA.

Incubation of KBA with hepatocytes yielded only phase I metabolites, represented by KBA derivatives with mass shifts of +16 u ($t = 5.6, 7.7,$ and 7.9 min) and +32 u ($t = 2.5, 4.4,$ and 7.8 min) as well as +48 u ($t = 2.0$ min). No phase II metabolites could be identified, either by screening for glucuronides, sulfates, and amino acid conjugates or by precursor ion scanning.

Metabolites of KBA in Vivo in Rat Plasma, Liver and Brain in Comparison with Its Metabolites in Vitro. After the identification of the KBA metabolites in vitro, the metabolites of KBA were further explored in vivo in the course of a feeding study. To ensure sufficient metabolic conversion of KBA, screening for the in vivo metabolites in rats was carried out 2 h after oral administration of KBA suspension. This time interval was chosen on the basis of previous pharmacokinetic studies (Reising et al., 2005) and the rapid metabolism of KBA observed in vitro upon incubation with RLM.

In rat plasma, two derivatives with a mass shift of +16 u ($t = 5.7$ and 8.1 min) and one derivative with a mass shift of +32 u ($t = 7.8$ min) were detected, in addition to the parent compound KBA. All MS/MS spectra of these metabolites correlated well with the corresponding spectra of KBA and its metabolites obtained in vitro after microsomal incubation, indicating that these metabolites were identical.

The analysis of the rat liver revealed the formation of various metabolites showing the same fragmentation pattern as KBA and its metabolites in vitro. In addition to KBA, three metabolites with a mass shift of +16 u ($t = 5.7, 7.7,$ and 8.0 min) and four KBA derivatives exhibiting a mass shift of +32 u ($t = 2.8, 3.4, 4.4,$ and 7.8 min) were detected as well as one derivative corresponding to KBA +48 u ($t = 1.8$ min). These results suggest that the liver plays an important role in the metabolism of KBA. The analysis of the rat brain revealed the presence of KBA, but no metabolites could be detected.

Moreover, the rat plasma, liver, and brain were screened for the occurrence of phase II metabolism of KBA and/or KBA metabolites but no conjugates were found. In the control group consisting of rats fed with agarose suspension only, neither KBA nor any metabolite were identified in rat plasma, liver, or brain. Table I presents an overview of all metabolites of KBA detected in vivo in comparison with those identified in vitro.

Identification of AKBA Metabolites in Vitro. The experiments on the metabolic stability of AKBA in the liver microsomes described

in the previous section showed that the transformation rate of AKBA is much lower than that of KBA. Hence, the initial screening of the RLM in vitro reaction medium revealed the formation of derivatives with mass shifts of only +16 u. Upon screening for m/z 527.3, corresponding to a +16 u mass shift, three different metabolites with retention times of $t = 7.7, 8.2,$ and 9.4 min were detected, which were absent in the control incubations. As the MS/MS spectra of AKBA as well as those of the metabolites observed showed a characteristic fragment at m/z 59 (acetic acid anion), these metabolites can be assigned to AKBA. In hepatocytes, AKBA yielded only one AKBA derivative with a mass shift of +16 u ($t = 8.1$). Again, no phase II metabolites could be detected.

Metabolites of AKBA in Vivo in Rat Plasma, Liver, and Brain in Comparison to Its Metabolites in Vitro. Only AKBA but no metabolites were detected in rat plasma, liver, and brain 2 h after oral administration of AKBA suspension. A representative selected ion monitoring (SIM) chromatogram and product ion spectrum of AKBA ($t = 12.3$) in the rat liver is shown in Fig. 3, A and B. The peaks at $t = 12.8, 10.6,$ and 9.5 are not derived from AKBA, as they were also present in the control animals and did not show the characteristic fragmentation pattern of AKBA. Screening the plasma, liver, and brain samples for the occurrence of phase II metabolism of AKBA and AKBA metabolites, no evidence for phase II metabolism could be found, as in the case of KBA.

Checking for Deacetylation as an Alternative Metabolic Pathway for AKBA. Because AKBA represents an acetyl derivative of KBA, it could be metabolized to KBA via deacetylation. AKBA incubated with rat hepatocytes, however, yielded only very small amounts of KBA, not exceeding 2% of the initial AKBA concentration. Also, the plasma, liver and brain of the rats fed with AKBA were screened for the presence of KBA. In the plasma, KBA was almost undetectable. As shown in the SIM chromatogram of KBA in Fig. 3C, KBA ($t = 11.2$) was detected only in negligible amounts in the liver, not exceeding those determined in hepatocytes, indicating that deacetylation of AKBA to KBA takes place in the liver to a minor extent only. The peaks at $t = 9.7$ and 9.9 were also present in the control group and did not show the characteristic fragmentation pattern of KBA represented in Fig. 3D. Therefore, they cannot be related to KBA. Furthermore, no KBA was detected in the brain samples of the rats fed with AKBA.

Identification of Metabolites of α BA, β BA and Their Acetylated Derivatives in Vitro. The incubation of α BA and β BA with rat liver microsomal preparations and its subsequent analysis by LC-MS/MS revealed the formation of various metabolites. In addition to metabolites with +16 and +32 u mass shifts seen for both BA derivatives, metabolites with a mass shift of +48 u were observed for β BA. No metabolites were detected on incubation of α BA and β BA with microsomal enzymes.

Discussion

To date only one study exists on the microsomal incubation of *Boswellia* species, which focused on investigating the inhibitory effect of *Boswellia* extract on cytochrome P450 enzymes (Frank and Unger, 2006). Our study represents the first investigation of BA metabolism. An overview of all phase I metabolites obtained in vitro from different BAs and their respective retention times and mass shifts is given in Fig. 4.

In general, the incubation of BAs with phase I enzymes in vitro revealed that oxidation, yielding derivatives with mass shifts of +16 and +32 u and in some cases of +48 u, corresponding to mono-, di-, and trihydroxylated metabolites, respectively, is the principal metabolic route of KBA, AKBA, α BA, and β BA. The phase I metabolites

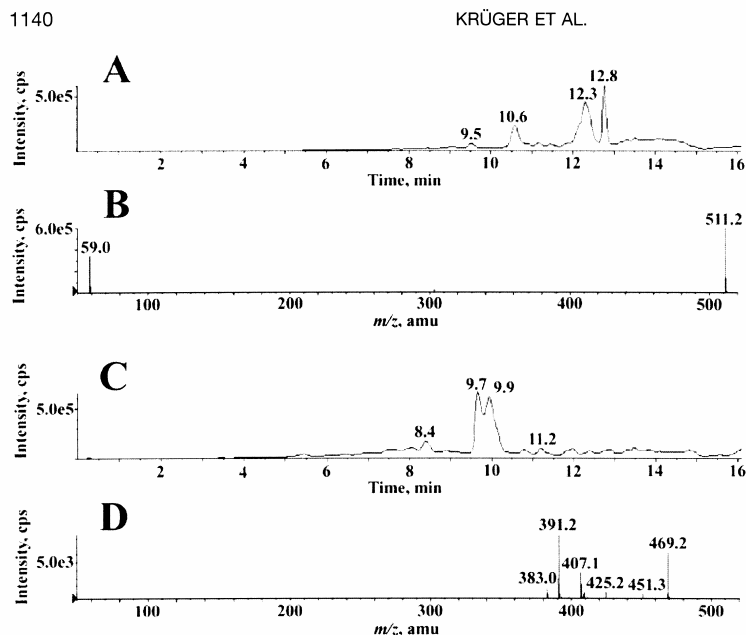


FIG. 3. SIM chromatograms and product ion spectra of AKBA (A and B) ($t_r = 12.3$) and KBA (C and D) ($t_r = 11.2$) in the rat liver samples from the group given AKBA, showing that only negligible amounts of KBA were produced from AKBA by deacetylation.

of BAs identified in this study are in agreement with the phase I metabolites described for oleanolic acid, which have been characterized as hydroxyl- and dihydroxyoleanolic acid (Jeong et al., 2007). Together, this previous investigation and the present study represent the first detailed insight into the metabolism of pentacyclic triterpenes.

The incubation of KBA with RLM yielded three monohydroxylated and six dihydroxylated metabolites as well as two additional metabolites, exhibiting a +14 u mass shift. Taking the chromatographic elution behavior of these metabolites into consideration, indicating more hydrophilic properties in comparison to KBA, the mass shift of +14 u may be attributed to ketone formation or dehydrogenation and hydroxylation of KBA. The incubation of KBA with hepatocytes yielded similar metabolites represented by three mono- and three dihydroxylated KBA derivatives as well as one trihydroxylated metabolite.

In vivo hydroxylated derivatives of KBA were detected only in rat plasma and liver. The observed absence of KBA metabolites in rat brain may be attributed to the increased hydrophilicity of the hydroxylated derivatives, not allowing them to pass the blood-brain barrier. Both the in vitro experiments in RLM and hepatocytes as well as the in vivo feeding study revealed the formation of the same metabolic profiles suggesting that no phase II metabolism is taking place.

For AKBA, only derivatives with a mass shift of +16 u, corresponding to monohydroxylated metabolites, were detected in vitro, and no metabolites were identified in vivo. The limited metabolism of AKBA by phase I enzymes coincides with observations made for other acetylated BAs (A α BA and A β BA), for which no phase I metabolites were identified at all in vitro. Obviously, the acetyl group at position 3 is responsible for the impeded phase I metabolism. Nevertheless, some hydroxylated metabolites were identified for AKBA in vitro compared with A α BA and A β BA. This result may be attributed to the presence of a keto group at position 11.

In general, microsomes and hepatocytes are used not only for the

elucidation of drug metabolism but are also typically applied during the drug-screening process for determining metabolic stability (Shearer et al., 2005). Because the pharmacological effects of *B. serrata* are attributed mainly to KBA and AKBA, this study focused on the metabolic stability of these two BAs in rat liver microsomes and hepatocytes. In addition, the metabolic stability was also determined in HLM to get a preliminary idea about the hepatic transformation rate of KBA and AKBA in humans.

The present study revealed that KBA undergoes extensive hepatic phase I metabolism. This might represent one of the major reasons for the low systemic KBA bioavailability observed in rats and humans after the oral administration of very high doses of *Boswellia* extract. In contrast, the pharmacokinetic behavior of AKBA raises several questions. Although the concentration of AKBA is equivalent or even exceeds that of KBA in *Boswellia* extracts, AKBA was detected in rat and human plasma at even lower concentration levels than KBA (Bücheler et al., 2003; Reising et al., 2005). This finding is surprising, because AKBA is more lipophilic than KBA and should therefore be more easily absorbed. A possible explanation could be extensive first-pass metabolism. However, the present study revealed that although AKBA differs from KBA only by acetylation of the hydroxyl group at position 3, its metabolic behavior is completely different. AKBA was more stable toward phase I enzymes than KBA. Therefore, extensive hepatic metabolism could not explain the low systemic availability of AKBA.

Furthermore, the present study revealed that deacetylation of AKBA to KBA takes place only to a minor extent and thus cannot be responsible for the low systemic availability of AKBA as assumed previously (Abdel Tawab et al., 2001; Sharma et al., 2004).

A further reason for the lower plasma levels of AKBA compared with KBA might be the greater volume of distribution of AKBA associated with its greater lipophilicity. Indeed, the brain/plasma ratio determined for AKBA (0.8) in a previous study (Reising et al., 2005)

METABOLISM OF BOSWELLIC ACIDS

1141

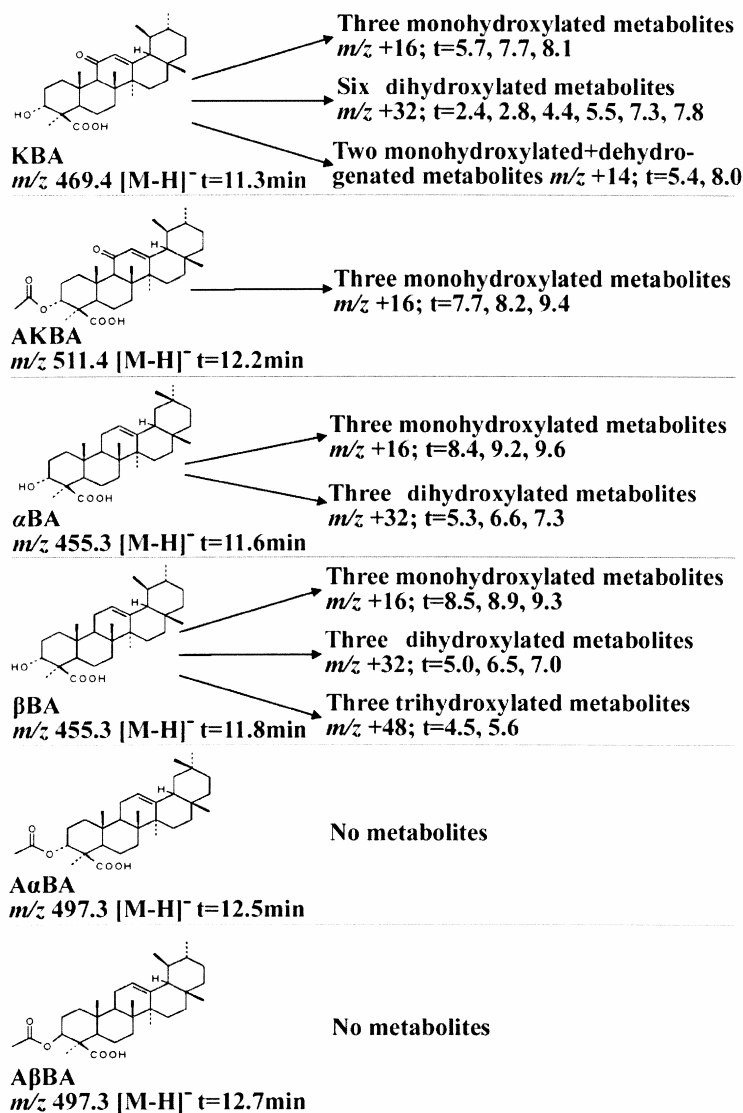


FIG. 4. Chemical structures of the six most important derivatives of BAs, KBA, AKBA, α BA, β BA, A α BA, and A β BA, and their corresponding phase I metabolites in vitro.

was higher than that of KBA (0.5), although only half the plasma levels of KBA were determined for AKBA. These are very promising results, as they suggest a higher brain penetration of AKBA compared with that for KBA. Based on these findings, the metabolic stability determined for AKBA is of particular importance. Finally, the influence of intestinal metabolism and poor absorption on limiting the systemic availability of BAs should not be underestimated. Initial results of subsequent in vitro permeability studies using Caco-2 cells, which are still in progress, suggest poor absorption of KBA and AKBA from the gastrointestinal tract. It seems that the poor systemic

availability of AKBA may be attributed mainly to its poor absorption and the low bioavailability of KBA results from its metabolic instability and poor absorption (P. Krueger, J. Kanzer, J. Hummel, G. Fricker, and M. Abdel-Tawab, unpublished observations).

In a previous study *B. serrata* extract, as well as KBA and AKBA, was identified as potent inhibitors of P-glycoprotein (Pgp) in porcine brain capillary endothelial cells (PBCECs) and human lymphocytic leukemia parenteral (VLB) cell lines (Weber et al., 2006). AKBA produced a significant inhibition of Pgp at concentrations of 3 and 10 μ M in PBCECs and VLB cells, respectively, whereas KBA exerted

significant Pgp inhibition at a concentration of 10 μM in PBCECs but not in VLB cells compared with untreated cells. As this study could not differentiate whether substrate inhibitor or allosteric effects were responsible for the observed Pgp inhibition, the relevance of Pgp efflux, as a possible factor affecting the bioavailability of KBA and AKBA, cannot be assessed at present.

For numerous drugs, the duration and intensity of action is determined by their metabolic rate. Characterizing the metabolic behavior is therefore an important issue to assess the therapeutic effect of drugs. Considering the results of this study, it can be concluded that the observed extensive hepatic metabolism of KBA strongly contributes to its low bioavailability. However, the low bioavailability of the more lipophilic AKBA, which may not be attributed to extensive hepatic metabolism, will surely represent a pivotal question in further studies addressing the permeability of boswellic acids.

References

- Abdel Tawab M, Kaunzinger A, Bahr U, Karas M, Wurglics M, and Schubert-Zsilavecz M (2001) Development of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of 11-keto- β -boswellic acid in human plasma. *J Chromatogr Biomed Appl* **761**:221–227.
- Berry MN and Friend DS (1969) High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* **43**:506–520.
- Büchele B and Simmet T (2003) Analysis of 12 different pentacyclic triterpenic acids from frankincense in human plasma by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **795**:355–362.
- Culoli G, Mathe C, Archier P, and Vicillesecaes C (2003) A lupane triterpene from frankincense (*Boswellia* sp., Burseraceae). *Phytochemistry* **62**:537–541.
- Frank A and Unger M (2006) Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction. *J Chromatogr A* **1112**:255–262.
- Gerhardt H, Seifert F, Buvari P, Vogelsang H, and Regges RZ (2001) Therapy of active Crohn disease with *Boswellia serrata* extract H 15. *Gastroenterology* **39**:11–17.
- Gupta I, Parihar A, Malhotra P, Singh GB, Luedtke R, Safayhi H, and Ammon HPT (1997) Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with ulcerative colitis. *Eur J Med Res* **2**:37–43.
- Gupta I, Gupta V, Parihar A, Gupta S, Luedtke R, Safayhi H, and Ammon HPT (1998) Effects of *Boswellia serrata* gum resin in patients with bronchial asthma: results of a double-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study. *Eur J Med Res* **3**:511–514.
- Gupta I, Parihar A, Malhotra P, Gupta S, Luedtke R, Safayhi H, and Ammon HPT (2001) Effects of gum resin of *Boswellia serrata* in patients with chronic colitis. *Planta Med* **67**:391–395.
- Jeong DW, Kim YH, Kim HH, Ji HY, Yoo SD, Choi WR, Lee SM, Han CK, and Lee HS (2007) Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats. *Biopharm Drug Dispos* **28**:51–57.
- Poockel D and Werz O (2006) Boswellic acids: biological actions and molecular targets. *Curr Med Chem* **13**:3359–3369.
- Reising K, Meins J, Bastian B, Eckert G, Mueller WF, Schubert-Zsilavecz M, and Abdel Tawab M (2005) Determination of boswellic acids in brain and plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* **77**:6640–6645.
- Safayhi H, Mack T, Sabieraj J, Anazodo M, Subramanian LR, and Ammon HPT (1992) Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* **261**:1143–1146.
- Safayhi H, Rall B, Sailer ER, and Ammon HPT (1997) Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. *J Pharmacol Exp Ther* **281**:460–463.
- Sailer ER, Subramanian LR, Rall B, Hoernlein RF, Ammon HPT, and Safayhi H (1996) Acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity. *Br J Pharmacol* **117**:615–618.
- Sander O, Herborn G, and Rau R (1998) Is H15 (resin extract of *Boswellia serrata*, "incense") a useful supplement to established drug therapy of chronic polyarthritis? Results of a double-blind pilot study. *Z Rheumatol* **57**:11–16.
- Sharma S, Thawani V, Hingorani L, Shrivastava M, Bhat VR, and Khyani R (2004) Pharmacokinetic study of 11-keto- β -boswellic acid. *Phytochemistry* **11**:1255–1260.
- Shearer TW, Smith KS, Diaz D, Asher C, and Ramirez J (2005) The role of *in vitro* ADMET assays in antimalarial drug discovery and development. *Comb Chem High Throughput Screen* **8**:89–98.
- Sterk V, Büchele B, and Simmet T (2004) Effect of food intake on the bioavailability of boswellic acids from a herbal preparation in healthy volunteers. *Planta Med* **70**:1155–1160.
- Syrovets T, Büchele B, Krauss C, Laumonier Y, and Simmet T (2005) Acetyl-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF- α induction in monocytes by direct interaction with I κ B kinases. *J Immunol* **174**:498–506.
- Weber CC, Reising K, Müller WF, Schubert-Zsilavecz M, and Abdel Tawab M (2006) Modulation of Pgp function by boswellic acids. *Planta Med* **72**:507–513.
- Winking M, Sarikaya S, Rahmanian A, Jodicke A, and Boker DK (2000) Boswellic acids inhibit glioma growth: a new treatment option? *J Neurooncol* **46**:97–103.

Address correspondence to: Dr. Mona Abdel-Tawab, Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker, Carl-Mannich-Strasse 20, D-65760 Eschborn, Germany. E-mail: m.tawab@zentrallabor.com