

**Pharmakokinetik und Pharmakodynamik
der R(+)- α -Liponsäure**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich Chemische und
Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main**

**von
Dorothee Krone
aus Lorsch**

**Frankfurt 2002
D F 1**

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe –
Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Walter E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Theo Dingermann
Prof. Dr. Hartmut Derendorf

Datum der Disputation: 12.12.2002

DANKSAGUNG

Mein besonderen Dank gilt meinen beiden Gutachtern, Herrn Professor T. Dingermann und Herrn Professor H. Derendorf für die freundliche Betreuung meiner externen Dissertation. Vor allem aber für den großen Einsatz beider, wodurch die Durchführung dieser Arbeit überhaupt möglich wurde.

Ich bin meinem Arbeitgeber, der Viatrix GmbH & Co. KG zu großem Dank verpflichtet, daß für mich die Möglichkeit bestand, diese Dissertation anzufertigen und mich in den USA an der University of Florida über vier Monate im Themengebiet Pharmakokinetik weiterzubilden.

Vor allem Herrn Dr. M. Locher möchte ich danken, ohne sein Engagement und seine Unterstützung wäre diese Arbeit und die Weiterbildungsmaßnahme nicht möglich gewesen. Die vielen wertvollen Diskussionen und die Durchsicht der Arbeit waren eine wertvolle Unterstützung.

Sehr großen Anteil am Gelingen aller Untersuchungen haben alle Kollegen aus den unterschiedlichen Bereichen der Abteilung Early Phase Development, ohne deren engagierte Arbeit und Mithilfe wäre diese umfangreiche Sammlung an Untersuchungsergebnisse nicht denkbar gewesen.

In der Gruppe Radiokinetik möchte ich Frau G. Motzheim, Frau M. Wolter, Frau B. Fühler, Frau R. Erdmann, Frau H. Batzke, Herrn H.-H. Raffel, Frau Dipl. Biol. I. Langer und Herrn Dr. M. Schwahn für die nette Zusammenarbeit in der Gruppe über 3 Jahre und für die Durchführung der Tierversuche danken. Besonders Frau G. Motzheim und Frau M. Wolter bin ich dankbar, durch ihre Erfahrung war es möglich, die Mikrodialyse in der Gruppe zu etablieren und durchzuführen. Herrn Dr. G. Peter bin ich dankbar, daß er mir die Möglichkeit geboten hat, in den USA zu studieren. Außerdem habe ich während der Zeit in seiner Gruppe durch seinen umfangreichen Erfahrungsschatz im ADME-Bereich sehr viel von ihm gelernt.

In der Gruppe Bioanalytik möchte ich Herrn Dipl. Ing. P. Romeis, Herrn Dipl. Ing. A. Kraft, Frau G. Brandt, Herrn Dipl. Ing. H. Bernady, Frau Dipl. Ing. K. Rieth und Frau N. Boschmann für die Unterstützung bei den Studien durch die wertvollen Diskussionen und durch die Durchführung der bioanalytischen Arbeiten danken. Besonders Herrn Dipl. Ing. A. Kraft bin ich zu großem Dank verpflichtet, da er im Rahmen seiner Diplomarbeit die Methode für die Konzentrationsbestimmung in Gewebedialysaten und im Plasma der Muttersubstanz und der Metaboliten aufgebaut hat. Für die vielen Tips und Anregungen und die über fast 11 Jahre sehr guter Zusammenarbeit möchte ich meinem Kollegen Herrn Dipl. Ing. P. Romeis danken.

Auch meinen Kollegen in der Gruppe Pharmakokinetik, Frau A. Franz, Frau Dipl. Ing. G. Viertel, Herrn Dr. G. Niebch, Frau Dr. S. Reichert, Herrn Dr. M. Wedel, Frau A. Thoma und Frau Dipl. Ing. P. Lapp möchte ich für die Kollegialität, die Unterstützung und die vielen Diskussionen über pharmakokinetische Fragestellungen danken. Speziell Frau A. Thoma, Frau Dipl. Ing. G. Viertel und Frau A. Franz bin ich für die engagierte Mitarbeit an den Studienberichten sehr dankbar.

Von der Universität Leipzig möchte ich mich bei Herrn Dr. J. Teichert und Herrn Prof. Preiss für die Bereitstellung der Ergebnisse (Konzentrationsbestimmungen in Urin und Plasma, Kapitel 5.2.1) aus der klinischen Studie danken.

Für die Unterstützung bei der Durchführung der klinischen Studien möchte ich mich bei allen Kollegen der Abteilung Clinical Development, besonders bei Herrn P. Cnota, Herrn Dr. P. Ruus, Frau Dr. K. Erb und Herrn Dr. R. Hermann, bedanken.

Frau Dr. J. Walgren und Frau Prof. M. Buse möchte ich danken, daß sie die in-vitro Versuche an Hepatozyten durchgeführt und uns die Zell-Proben für weitere Arbeiten zur Verfügung gestellt haben.

Auch Herrn Dr. T. Kißner, Herrn Dr. U. Werner und Herrn Dr. K. Wessel möchte ich für die vielen Anregungen und Literaturhinweise danken.

Für die nette Aufnahme und Unterstützung in den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. H. Derendorf (University of Florida, Gainesville) und von Herrn Prof. T. Dinger mann (Universität in Frankfurt) bin ich sehr dankbar.

Für die sehr sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit und die vielen guten Anregungen und hilfreichen Verbesserungsvorschlägen möchte ich Frau Dr. C. Wicke meinen besonderen Dank aussprechen.

Abschließend möchte ich meinem Mann Jörg danken, der während der Anfertigung dieser Arbeit viele Entbehrungen akzeptieren mußte und mich trotzdem immer in meinem Vorhaben bestärkt hat.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	10
2.1 <i>Das Indikationsgebiet</i>	10
2.1.1 Diabetes mellitus Typ I	10
2.1.2 Diabetes mellitus Typ II	11
2.1.2.1 Akute Komplikationen des Diabetes mellitus	13
2.1.2.2 Chronische Komplikationen des Diabetes mellitus	14
2.2 <i>α-Liponsäure</i>	16
2.2.1 Biochemischer Hintergrund	18
2.2.2 Medizinische Anwendungsgebiete	21
2.2.3 Die Pharmakokinetik der α -Liponsäure	22
2.2.4 Die Pharmakodynamik der α -Liponsäure	27
3. AUFGABENSTELLUNG	38
4. MATERIAL UND METHODEN	40
4.1 <i>Reagenzien und Geräte allgemein</i>	40
4.2 <i>Reagenzien und Geräte der einzelnen bioanalytischen Methoden</i>	43
4.2.1 Enantioselektive HPLC-Methode zur Bestimmung von R(+)- und S(-)- α -LA in Plasma	43
4.2.2 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA in Gewebehomogenaten	46
4.2.3 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, TNLA und BNLA in Gewebedialysaten	48
4.2.4 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA und BNLA in Plasma und Urin	50
4.2.5 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, TNLA und BNLA in Plasma	53
4.2.6 Bestimmung der Plasmaproteinbindung von LA	55
4.2.7 In-vitro Untersuchungen an Hepatozyten	56
4.3 <i>Reagenzien, Material und Geräte für Kinetikstudien</i>	58
4.3.1 Kinetikstudien an der Ratte	58
4.3.2 Kinetikstudien am Menschen	60
4.4 <i>Bioanalytische Methoden</i>	61
4.4.1 Enantioselektive HPLC-Methode zur Bestimmung von R(+)- und S(-)- α -LA in Plasma	64
4.4.1.1 Aufarbeitung der Plasmaprobe	66
4.4.1.2 Validierung der Methode	67

4.4.2	ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA in Gewebehomogenaten	68
4.4.2.1	Aufbereitung des biologischen Materials	68
4.4.2.2	Validierung der Methode	69
4.4.3	ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, TNLA und BNLA in Gewebedialysaten	69
4.4.3.1	Validierung der Methode	69
4.4.4	ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA und BNLA in Plasma und Urin	70
4.4.4.1	Aufarbeitung der Plasmaprobe	70
4.4.4.2	Aufarbeitung des Urins	71
4.4.4.3	Validierung der Methode	71
4.4.5	ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, TNLA und BNLA in Plasma	72
4.4.5.1	Aufarbeitung der Plasmaprobe	72
4.4.5.2	Validierung der Methode	72
4.4.6	Bestimmung der Plasmaproteinbindung von LA	73
4.4.7	In-vitro Untersuchungen an Hepatozyten	74
4.4.7.1	Gewinnung und Aufarbeitung der Zellen und des Mediums	74
4.5	Mikrodialyse	74
4.5.1	Aufbau der Mikrodialysen-Sonde	75
4.5.2	Prinzip	75
4.5.3	Messungen	76
4.6	Studienmodelle	78
4.6.1	Die Ratte	79
4.6.1.1	Kinetikstudien an der Ratte	80
4.6.1.2	Mikrodialyse zur Gewinnung von Gewebeflüssigkeit im Muskel	81
4.6.2	Der Mensch	82
4.6.2.1	Kinetikstudien am Menschen	83
4.7	Pharmakokinetik	84
4.7.1	Kompartimentelle Auswertung	84
4.7.1.1	Lineare Pharmakokinetik im Ein-Kompartiment-Modell	86
4.7.1.2	Lineare Pharmakokinetik im Zwei-Kompartiment-Modell	87
4.7.2	Nicht kompartimentelle Auswertung	102
4.7.3	Statistische Auswertung	106
5.	ERGEBNISSE	108
5.1	Untersuchungsmodell Ratte	108
5.1.1	Absolute Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik	108
5.1.2	Untersuchung der Dosislinearität im Plasma	114

5.1.3	α -Liponsäure-Konzentrationen im Gewebe	119
5.1.3.1	Nach oraler Einfach- und Mehrfachgabe	119
5.1.3.2	Nach intravenöser Mehrfachgabe	122
5.1.4	Bestimmung der Plasmakonzentration und der freien Gewebekonzentration von R(+)- α -Liponsäure und ihrer Metaboliten im Muskel	125
5.1.5	Bestimmung der intrazellulären R(+)- α -Liponsäure-Konzentration in Hepatozyten und im Zellüberstand	135
5.2	<i>Untersuchungsmodell Mensch</i>	137
5.2.1	Pharmakokinetik der α -Liponsäure und ihrer Metaboliten im Plasma und Urin nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure	137
5.2.2	Pharmakokinetik der R(+)- α -Liponsäure im Plasma nach oraler Gabe von Dexlipotam	148
6.	DISKUSSION	160
6.1	<i>Pharmakokinetik der R(+)-α-Liponsäure</i>	160
6.1.1	Resorption	160
6.1.2	Bioverfügbarkeit	162
6.1.3	Distribution	163
6.1.4	Metabolismus	167
6.1.5	Halbwertszeiten der Muttersubstanz und der Metaboliten	170
6.1.6	Elimination	171
6.1.7	Extrazelluläre und intrazelluläre Konzentrationen in Hepatozyten	172
6.2	<i>Pharmakodynamik der R(+)-α-Liponsäure</i>	173
6.2.1	Die wirksame Dosierung und Behandlung	173
6.2.2	Mögliche Wirkungspotentiale der Metaboliten	175
6.3	<i>Korrelation zwischen der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik</i>	179
7.	LITERATURVERZEICHNIS	181
	ANHANG	187
A	Untersuchungsmodell Ratte	
B	Untersuchungsmodell Mensch	

LEBENS LAUF

Abkürzungsverzeichnis

α	Makrokonstante oder Hybridkonstante zur Beschreibung der α -Phase
AGE	„advanced glycosylation end products“
Appl.	Applikation
$a_{s,c}$	das Produkt aus Input- und Dispositionsfunktion
AUC	Fläche unter der Plasma-Konzentration-Zeit Kurve („Area under the curve“)
AUMC	Fläche unter der Kurve $t \cdot C(t)$ („Area under the first moment plasma concentration-time curve“)
β	Makrokonstante oder Hybridkonstante zur Beschreibung der β -Phase
bl _d	unterhalb der Nachweisgrenze („below limit of detection“)
bl _q	unterhalb der Bestimmungsgrenze („below limit of quantification“)
BMBA	2,4-Bis(methylmercapto)butansäure
BMHA	4,6-Bis(methylmercapto)hexansäure
BMOA	6,8-Bis(methylmercapto)octansäure
BNLA	Bisnorliponsäure
C_c	Konzentration im zentralen Kompartiment
C_{Filtrat}	Konzentration im Filtrat nach Ultrafiltration
C_{in}	Konzentration im Perfusat
CoA	Coenzym A
CL	totale Körperclearance aus dem Plasma
CL_R	renale Clearance
C_{max}	maximale Plasmakonzentration nach Substanzgabe
C_{obs}	ermittelte Konzentration
C_{out}	Konzentration im Mikrodialysat
C_p	Konzentration im peripheren Kompartiment
C_{ss}	Konzentration während des Fließgleichgewichtzustandes (steady state)
C_{theor}	tatsächliche oder theoretische Konzentration
C_u	Konzentration im Urin
CV	Variationskoeffizient
D	Dalton
DHLA	Dihydroliponsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
$d_{s,c}$	Dispositionsfunktion
Δt	Zeitspanne des Sammelintervalls

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DTT	1,4-Dithiothreitol
ECD	elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-tetra Natriumsalz
E_i	Summe der Austrittsgeschwindigkeitskonstanten aus dem i-ten Kompartiment
eq	Äquivalent
f	Fraktion der verabreichten Dosis, die systemisch verfügbar ist
F	absolute Bioverfügbarkeit in %
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
FADH ₂	Flavin-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
f_{pl}	freie nicht an Plasmaprotein gebundene Fraktion der Arzneistoffmenge im Körper
f_t	freie nicht an Gewebe gebundene Fraktion der Arzneistoffmenge im Körper
HbA _{1c}	nicht enzymatisch glykosyliertes Hämoglobin
HDL	high density lipoprotein, Cholesterin
HPLC	“High performance liquid Chromatography”
I.E.	internationale Enzymeinheiten
in_s	Inputfunktion
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
k	kleinste (langsamste) Geschwindigkeitskonstante der Disposition
k_{ij}	Transfer-Geschwindigkeitskonstante zwischen dem i-ten und dem j-ten Kompartiment (Mikrokonstante)
LA	α -Liponsäure
LDL	low density lipoprotein, Cholesterin
MIT	mittlere Zeit, die verstreichen muß, bis die Dosis ins System gelangt („Mean input time“)
Mittel _{arith}	arithmetisches Mittel
Mittel _{geo}	geometrisches Mittel
MRT	mittlere Verweilzeit („Mean residence time“)
n	Anzahl der gemessenen Konzentrationen
n*	Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung
na	keine Probe entnommen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NAD ⁺	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
nc	nicht kalkuliert
nm	nicht analysiert
nr	es wurde kein Ergebnis ermittelt
OPA	o-Phthaldialdehyd
pa	nach Applikation der Testsubstanz („post application“)
p.a.	pro analysis
PAR	Peak-Flächen-Verhältnis („Peak Area ratio“)
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PKB	Proteinkinase B
p.o.	per oral
PPAR γ	Peroxisomal Proliferator Activated Receptors
ROS	reaktive Sauerstoff-Moleküle („reactive oxygen species“)
s	Laplace Operator
S	Summe der Abweichungsquadrate
SD	Standardabweichung
T	Infusionszeitdauer
t ₁	Zeitpunkt der erste Teilgabe
t ₂	Zeitpunkt der zweiten Teilgabe
t _{1/2}	Halbwertszeit
t _{lag}	Verzögerungszeit
t _{max}	Zeit bis nach Arzneimittelgabe die maximale Konzentration erreicht ist
t _{mid}	mittlerer Zeitpunkt eines Sammelintervalls
t _{mid, max}	mittlere Zeitpunkt, der angibt, wann die maximale Ausscheidungsrate erreicht ist
t _N	Zeitpunkt der n-ten Teilgabe
TNLA	Tetranorliponsäure
TPP	Thiaminpyrophosphat
R ₀	Infusionsrate (Geschwindigkeitskonstante Nullter Ordnung)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$R_{in-vivo}$	Wiederfindungsrate („Recovery“): Konzentration des Analyten im Dialysat beim Verlassen der Sonde, bezogen auf die Konzentration des Analyten in der biologischen Matrix
$R_{in-vitro}$	Wiederfindungsrate („Recovery“): Konzentrationsdifferenz zwischen der Konzentration im Perfusat und der Konzentration im Dialysat
R_{max}	maximale Urinausscheidungsrate
RP	Reverse Phase
UF	Ultrafiltration
v	Volumeneinheit
V_c	Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment
VLDL	very low density lipoprotein, Cholesterin
V_p	Verteilungsvolumen im peripheren Kompartiment
V_{ss}	Verteilungsvolumen im Gleichgewichtszustand (steady-state)
V_z	Verteilungsvolumen während der terminalen Dispositionsphase
w	Gewichtseinheit
WF	Wichtungsfaktor
X_0	applizierte Dosis
X_1	applizierte Dosis – erster Teil der gegebenen Dosis
X_2	applizierte Dosis – zweiter Teil der gegebenen Dosis
X_a	absorbierbare Arzneistoffmenge
X_c	Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment
X_p	Arzneistoffmenge im peripheren Kompartiment
X_N	applizierte Dosis – n-ter Teil der gegebenen Dosis

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das R(+)-Enantiomer der rac- α -Liponsäure ist als Coenzym wichtiger Multienzymkomplexe (Pyruvat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase) essentiell für die Zell- und Stoffwechselfunktion. Gerade in den wichtigen Prozessen der Zelle, die Substrate für die Atmungskette bereitstellen (Glykolyse, Citratcyclus), spielt die R(+)- α -Liponsäure eine entscheidende Rolle. Zusätzlich besitzt dieser Wirkstoff die Eigenschaft als Chelatkomplex-Bildner, Radikalfänger und Antioxidans zu wirken, und er kann damit den Organismus vor „oxidativem Stress“ schützen. Klinische und präklinische Studien geben Hinweise, daß R(+)- α -Liponsäure einen positiven Effekt auf die Insulinsensitivität, die Insulin stimulierte Glukoseaufnahme und die Glukoseoxidation hat, weiterhin die Glukoneogenese hemmt und damit eine positive Wirkung auf den Krankheitsverlauf des Typ II – Diabetes hat.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die in der Literatur beschriebenen lang anhaltenden Wirkungen (Pharmakodynamik) der R(+)- α -Liponsäure (12 – 24 h nach Gabe des Wirkstoffes) mit meßbaren Konzentrationen dieser Substanz im Organismus in Zusammenhang zu bringen, um erste Ansätze für die Korrelation zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, also für die Konzentrations-(Dosis)-Wirkungsbeziehung, zu geben. Außerdem sollte geklärt werden, weshalb die Mehrfachgabe zu einer deutlichen Absenkung der nach Einfachgabe wirksamen Dosis führte.

Eine wichtige Grundlage dazu ist die genaue Kenntnis der Pharmakokinetik der Wirksubstanz und ihrer wichtigsten Stoffwechselprodukte. Bisher ist nur die Pharmakokinetik der R(+)- und S(-)- α -Liponsäure nach Gabe der razemischen α -Liponsäure untersucht worden. Da noch keine Erkenntnisse über die Pharmakokinetik der Metaboliten oder der R(+)- α -Liponsäure nach Gabe des reinen R-Enantiomers bestanden, lag der Schwerpunkt der Arbeit auf den Untersuchungen der Pharmakokinetik des R(+)-Enantiomers und der Metaboliten nach Gabe von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz (Dexlipotam) und rac- α -Liponsäure am Tier (Einfach- und Mehrfachgabe) und am Menschen (Einfachgabe).

Untersuchungsmodell Ratte:

Erster Ausgangspunkt der kinetischen Untersuchungen war das zentrale Kompartiment, abgebildet durch den Blutkreislauf. Die resultierende Plasmakonzentrations-Zeitkurve nach oraler (p.o.), intravenöser (i.v.) oder intraperitonealer (i.p.) Gabe von Dexlipotam konnte mathematisch, basierend auf einem Zwei-Kompartiment-Modell, beschrieben werden. Charakteristisch für die Pharmakokinetik der R(+)- α -Liponsäure war die kurze terminale Halbwertszeit (0,6 – 1,6 h) und die hohe, mit dem hepatischen Blutfluß vergleichbare, totale Plasma-Clearance. Diese Eigenschaften führten zu einem schnellen Absinken der Plasmakonzentration auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze (6 h nach Gabe des Wirkstoffes). Mit Hilfe der Mikrodialyse wurde nach 1-stündiger Infusion von Dexlipotam die freie ungebundene R(+)- α -Liponsäure-Konzentration im Interstitium des Muskels bestimmt. Der zeitliche Verlauf der Gewebekonzentration konnte basierend auf der physiologischen Grundlage eines peripheren Kompartiments (Zwei-Kompartiment-Modell) beschrieben werden. Es zeigte sich, daß nur der freie ungebundene Anteil der im Plasma vorliegenden Konzentration (20 %) für die Distribution in das Gewebe zur Verfügung steht. Die ermittelten Halbwertszeiten der Muttersubstanz im Plasma und im Muskel lagen in vergleichbarer Größenordnung und gaben keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Kinetik im Plasma und im Gewebe.

Sowohl nach p.o. als auch nach einmal täglicher i.v. Mehrfachgabe über 3 – 4 Wochen konnte keine Anreicherung im Plasma bestimmt werden. Dieser Befund erklärte somit nicht die nach Mehrfachgabe erforderliche Dosisreduktion.

Die in weiteren Untersuchungen bestimmten Gewebekonzentrationen in der Leber, in der Niere, im Muskel und im Herzen, die sich aus dem freien ungebundenen und dem reversibel gebundenen Anteil der extrazellulären und intrazellulären Konzentration zusammensetzten, zeigten einen zur Plasmakinetik korrespondierenden Zeitverlauf. Nur einzelne spezifische Geweberegionen zeigten nach p.o. (Aorta) und nach i.v. (Nerven) Mehrfachgabe eine Anreicherung des Wirkstoffes.

In in-vitro Testmodellen wurde weiterhin die Pharmakokinetik auf zelluläre Ebene untersucht. Es zeigte sich, daß Hepatozyten in der Lage sind, R(+)- α -Liponsäure aufzunehmen und die durch β -Oxidation entstandenen Metaboliten Bisnorliponsäure (BNLA) und Tetranorliponsäure (TNLA) zu bilden und aus der Zelle heraus zu transportieren. Im Hinblick auf die Konzentrations-Wirkungsbeziehung rückten die Metaboliten Tetranorliponsäure und Bisnorliponsäure in das Interesse, da diese Stoffwechselprodukte wie die Muttersubstanz über einen aktiven Dithiolan-Ring verfügen, der möglicherweise das für die Wirkung verantwortliche Strukturelement darstellt.

Im Interstitium des Muskels wurde der Metabolit TNLA in vergleichbaren Konzentrationen wie die Muttersubstanz gemessen, der Metabolit BNLA war dort nur in Spuren meßbar. Im Plasma hingegen waren die maximalen TNLA-Konzentrationen um den Faktor 3 geringer als die Muttersubstanz-Konzentrationen. Der Metabolit BNLA war im Plasma nur in geringem Ausmaß, um den Faktor 15 geringer als die Muttersubstanz, meßbar.

Untersuchungsmodell Mensch:

Im Menschen wurden die Metaboliten TNLA, BNLA, 6,8-Bis(methylmercapto)octansäure (BMOA), 4,6-Bis(methylmercapto)hexansäure (BMHA) und 2,4-Bis(methylmercapto)butansäure (BMBA) im Plasma und im Urin pharmakokinetisch untersucht. Die Metaboliten BMOA, TNLA und BNLA zeigten Halbwertszeiten in vergleichbarer Größenordnung wie die Muttersubstanz (0,5 – 0,9 h). Für die Metaboliten BMBA und BMHA wurden höhere terminale Halbwertszeiten (2 h) ermittelt. Aufgrund der insgesamt kurzen Halbwertszeiten konnte eine Kumulation der Metaboliten nach Mehrfachgabe ausgeschlossen werden. Mit Hilfe eines pharmakokinetischen Modells (Zwei-Kompartiment-Modell) war es möglich, die Bildung der Stoffwechselprodukte BNLA, TNLA, BMOA, BMHA und BMBA im Plasma zeitlich simultan zu beschreiben. Dadurch konnte der Metabolisierungsweg der α -Liponsäure im Organismus genauer erklärt und die resultierenden Konzentrationen der Metaboliten auf Basis der Muttersubstanz-Konzentrationen errechnet werden.

Es war nicht möglich, die gemessenen Konzentrationen, weder von der Muttersubstanz noch von den möglichen wirksamen Metaboliten, in den verschiedenen Kompartimenten (Blutkreislauf, Gewebe oder Zelle) mit der lang anhaltenden Wirkung in einen zeitlichen Zusammenhang zu bringen. Weitere Untersuchungen mit empfindlicheren Meßmethoden und weitergehende zusätzliche Konzentrationsbestimmungen in den Kompartimenten in der Zelle (z.B. Mitochondrien) sind erforderlich, um die Korrelation zwischen der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik der R(+)- α -Liponsäure oder möglicher wirksamer Metaboliten zu beschreiben.

2. EINLEITUNG

2.1 Das Indikationsgebiet

Diabetes mellitus (lat. mellitus mit Honig versüßt) ist eine Stoffwechselkrankheit, bei der eine verminderte Aufnahme und Verstoffwechslung der Glukose im Gewebe stattfindet, was zu einem permanent erhöhten Blutzuckerspiegel führt. Der Krankheitsbegriff wurde unterteilt in zwei Hauptformen [McCance und Huether, 1997; Mutschler et al, 2001]:

Diabetes mellitus Typ I oder juveniler Diabetes (insulin-dependent diabetes mellitus IDDM)

Diabetes mellitus Typ II oder Altersdiabetes (non-insulin-dependent diabetes mellitus NIDDM)

2.1.1 *Diabetes mellitus Typ I*

Der Typ I des Diabetes mellitus mit einer Häufigkeit von ungefähr 10 % der gesamten Diabetes mellitus Fälle, ist durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet. Dieser liegt vor, wenn die Bauchspeicheldrüse infolge der Zerstörung von Inselzellen (β -Zellen oder B-Zellen, Langerhans-Inseln) nicht mehr in der Lage ist, Insulin zu sezernieren [McCance und Huether, 1997].

Der Typ I ist keine Erbkrankheit, allerdings geben die Eltern die Veranlagung an die Kinder weiter. Doch diese Veranlagung trägt nur zu einem geringen Teil zu einer Typ I - Diabetes-Erkrankung bei. Am Ausbruch der Krankheit müssen deshalb noch andere umweltbedingte Faktoren beteiligt sein, die allerdings noch nicht im Detail bekannt sind. Dabei stehen viele unterschiedliche Aspekte, wie z.B. Belastung durch Schadstoffe, Medikamente und Virusinfektionen zur Diskussion.

Diese Krankheit beeinflusst den Metabolismus von Fetten, Proteinen und Kohlenhydraten. Als Folge vom Typ I – Diabetes kumuliert Glukose im Blut und wird verstärkt renal ausgeschieden. Bei normalen Glukose-Konzentrationen im Blut ist die Niere in der Lage, die gesamte filtrierte Glukose tubulär zu reabsorbieren. Wird zu viel Glukose geliefert, kann es zur Überschreitung des tubulären Transportmaximums für Glukose und damit verbunden zu einer Blockade der Nettowasser-Resorption kommen. Der Einzelne zeigt die typischen Krankheitssymptome von Polyurie (erhöhte Harnausscheidung), Polydipsie (gesteigertes Durstempfinden als Folge der erhöhten Plasmaosmolarität), Polyphagie (erhöhte Nahrungsaufnahme), Erschöpfung und damit verbunden Körpergewichtsverlust.

Therapiert wird der Typ I – Diabetes durch genau dosierte über den Tag verteilte Insulingaben, die den Blutzuckerspiegel ständig auf einem normalen Niveau halten, um damit die verbundenen diabetischen Spätfolgen (Kapitel 2.1.2.2) zu vermeiden.

2.1.2 Diabetes mellitus Typ II

Der weitaus häufiger auftretende Typ ist der Typ II des Diabetes mellitus. Im Jahre 1998 litten bereits etwa dreieinhalb Millionen Menschen in Deutschland an Diabetes. Inzwischen geht man davon aus, daß sechs Millionen Diabetiker in Deutschland leben, ungefähr jeder zehnte Erwachsene in Deutschland [Schweitzer, 2002] leidet an dieser Erkrankung. Meistens sind Menschen, die älter als 40 Jahre sind, von diesem Krankheitsbild betroffen, sehr häufig sind diese übergewichtig (80 % der Typ II Erkrankten).

Im Gegensatz zum Typ I - Diabetes ist beim Typ II - Diabetes die erbliche Veranlagung sehr viel höher zu bewerten. Aber auch beim Typ II - Diabetes reicht diese in der Regel nicht aus, um die Erkrankung auszulösen, sondern auch exogene Faktoren, wie z.B. Bewegungsmangel und Hypertonie aber auch Umwelteinflüsse spielen eine große Rolle [McCance und Huether, 1997].

Da die Entstehung des Typ II - Diabetes ein allmählicher Prozeß ist, wird die Erkrankung oft nicht frühzeitig wahrgenommen. Die charakteristischen Beschwerden, wie z. B. Müdigkeit, Sehstörungen und Gewichtsverlust werden oft als Alterserscheinungen aufgefaßt und nicht näher untersucht. In Deutschland werden Typ II - Diabetiker oft erst erkannt, wenn sie 55 - 60 Jahre alt sind. Dann haben sich meistens schon die ersten Folgeschäden (Kapitel 2.1.2.2) entwickelt.

Beim Typ II - Diabetes liegt ein relativer Insulinmangel vor. Die Körperzellen zeigen eine Resistenz gegenüber der Insulinwirkung und als Folge ist die Insulinsekretion gestört. Im Gegensatz zum Typ I - Diabetes, bei dem der Körper nicht genügend bzw. kein Insulin produzieren kann, ist beim Typ II - Diabetes zu viel Insulin im Blut, da der Körper eine Insulinresistenz aufweist und immer mehr Insulin notwendig ist, um die Körperzellen zu stimulieren.

In einem gesunden Körper wird bei erhöhtem Blutzuckerspiegel Insulin ausgeschüttet und um den Blutzuckerspiegel wieder zu normalisieren, wird Glukose in die Zellen aufgenommen. Bei Typ II - Diabetikern hingegen werden immer weniger Zellen für Glukose aufnahmefähig und somit zirkuliert diese verstärkt im Blut. Da der Körper einen erhöhten Blutzuckerspiegel jedoch als Insulinmangel interpretiert, gibt er das Signal noch mehr Insulin zu produzieren. Diese Überproduktion des Insulins wird als Hyperinsulinämie bezeichnet.

Die Hyperinsulinämie und die Insulinresistenz bilden zusammen den fatalen Kreislauf des Typ II - Diabetes. Da sich immer zuviel Insulin im Blut befindet, werden die Rezeptoren der Zellmembranen immer unempfindlicher. Darüber hinaus steigt jedoch kontinuierlich der Blutzuckerspiegel, woraufhin die Bauchspeicheldrüse immer mehr Insulin produziert, um diesen auf ein normales Niveau abzusenken.

Typische Krankheitssymptome eines Typ II - Diabetikers sind Erschöpfung, Hautausschläge, häufig wiederkehrende Infektionskrankheiten und Veränderungen in der Sehfähigkeit.

Neben strenger einzuhaltender Diät und genauer Nahrungsplanung mit Bewegung wird dieser Typ des Diabetes mellitus mit Arzneistoffen der Gruppe der Sulfonylharnstoffe, Biguanide, Thioazolidine, und α -Glukosidase Inhibitoren therapiert [Mutschler et al, 2001]. Das Ziel ist es, den Blutglukosespiegel zu kontrollieren.

- **α -Glukosidase Inhibitoren**

Antidiabetika dieser Gruppe, wie z.B. Acarbose und Miglitol hemmen das für die Aufspaltung der Kohlenhydrate im Darm notwendige Enzym α -Glukosidase. Die Freisetzung und folgende Resorption der Glukose ins Blut wird somit verzögert und das Insulin kann die aufgenommene Menge Glukose besser bewältigen. Als Folge davon lassen sich postprandiale Blutzuckerspitzen vermeiden. Die α -Glukosidase Inhibitoren greifen zwar am geringsten in den Stoffwechsel ein, sind aber auch in ihrer Blutzucker senkenden Eigenschaft am schwächsten.

- **Biguanid-Derivate**

Von den Antidiabetika dieser Gruppe ist nur noch der Wirkstoff Metformin zugelassen. Er wirkt auf unterschiedliche Weise: Zum einen steigert der Wirkstoff die Aufnahme von Glukose in die Körperzellen, indem er die Sensitivität des peripheren Gewebes gegenüber Insulin verstärkt. Er verringert die Insulinresistenz, indem er wie Insulin die Translokation der Glukosetransporter bewirkt und dadurch den Transport von Glukose in die Zelle stimuliert. Außerdem inhibiert Metformin die hepatische Glukose Produktion (Glykogenolyse und Glukoneogenese), und erniedrigt den Plasmaspiegel von Triglyceriden, LDL- und VLDL-Cholesterin durch einen positiven Einfluß auf den Fettstoffwechsel.

- **Insulinotrope Antidiabetika**

Die insulinotropen Antidiabetika, zu denen die Sulfonylharnstoffe und Repaglinid gehören, treiben die Bauchspeicheldrüse zu vermehrter Insulinproduktion an. Der Wirkmechanismus der Insulinfreisetzung erfolgt durch das Blockieren der Kaliumkanäle von B-Zellen. Als Folge davon nehmen die Kaliumpermeabilität und dadurch das Membranruhepotential ab. Die hierdurch bedingte Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle führt zu einer erhöhten intrazellulären Calciumionen-Konzentration und damit zu einer gesteigerten Exozytose von Insulin.

- **Glitazone**

Thiazolidindione gehören zu den Insulin-Sensitizern. Sie setzen am peripheren Muskel- und Fettgewebe an und erhöhen dort die Aufnahme von Blutzucker in das Gewebe. Als Folge sinken der Nüchternblutzucker und der HbA_{1c}-Wert (nichtenzymatische Glykosylierung des Hämoglobins). Entscheidend beteiligt an diesem Effekt ist die Stimulation des γ -Subtyps des PPAR (Peroxisomal Proliferator Activated Receptors). Die zu den intrazellulären Rezeptoren gehörenden PPAR steigern durch Interaktion mit der DNA die Bildung von Proteinen, welche die Differenzierung von Fettzellen fördern und zur Aufrechterhaltung der Glukose- und Lipidhomöostase beitragen: Durch vermehrte Expression und Translokation von Glukosetransportern wird die Glukoseaufnahme in die Zellen gesteigert, in der Leber die Glukoneogenese verringert, die Glykolyse dagegen erhöht. Außerdem wird weniger Tumornekrosefaktor- α exprimiert, von dem angenommen wird, dass er für die Insulinresistenz mit verantwortlich ist.

2.1.2.1 Akute Komplikationen des Diabetes mellitus

Die Stoffwechselkrankheit Diabetes mellitus zeigt unterschiedliche Auswirkungen auf den gesamten Körper [McCance und Huether, 1997; Mutschler et al, 2001].

Hypoglykämie

Die Hypoglykämie beschreibt einen zu niedrigen Glukose-Plasmaspiegel. Sie entsteht häufig bei Diabetikern des Typs I unter Behandlung mit Insulin. Um der Hypoglykämie vorzubeugen, muß häufig die individuelle Glukose-Konzentration im Blut kontrolliert werden und die Insulindosierung entsprechend angepaßt werden.

Diabetische Ketoazidose

Die diabetische Ketoazidose entsteht bei absolutem oder relativem Insulinmangel und einer damit verbundenen Erhöhung von Insulin regulierten Hormonen, wie zum Beispiel Katecholamine, Kortisol, Glukagon und Wachstumshormone. Unter diesen Umständen wirken die Katecholamine, Kortisol, Glukagon und Wachstumshormone als Insulin-Antagonisten, die hepatische Glukoseproduktion (Glukoneogenese) wird gesteigert. Zusätzlich wird die periphere Glukoseverwertung durch die Katecholamine, das Kortisol, und die Wachstumshormone vermindert. Insulinmangel führt weiter zur gesteigerten Lipolyse im Fettgewebe sowie in der Leber und im Muskel.

Der erhöhte Glukagonspiegel ist für die erhöhte Glukoneogenese (Neubildung von Glukose aus Aminosäuren) und damit für den Eiweißabbau vor allem in der Muskulatur und für die Ketogenese (Bildung von Ketonkörpern) in der Leber verantwortlich.

Wegen des verstärkten Abbaus von Fettsäuren und der begrenzten Endoxidation von Acetyl-Coenzym-A im Citratcyclus, wird vermehrt Acetyl-Coenzym-A gebildet. Daraus resultiert eine Überproduktion an Acetacetat, β -Hydroxybutyrat und Aceton und verursacht die hohe Konzentrationen an Ketonkörpern. Die Hyperketonämie (erhöhte Ketonkörperkonzentration im Blut) könnte dadurch verursacht werden, daß die Ketone nicht mehr dem peripheren Gewebe zur Verfügung stehen. Durch den Verlust an Bicarbonaten wird das Bicarbonat-Puffersystem beeinträchtigt, was zur metabolischen Azidose führt. Der arterielle pH-Wert fällt unter 7,3, und Ketonkörper sind messbar im Urin und im Serum.

2.1.2.2 Chronische Komplikationen des Diabetes mellitus

Auf lange Sicht schädigt ein zu hoher Blutzuckerspiegel verschiedene Bereiche des Körpers [Mutschler et al, 2001; McCance und Huether, 1997].

Diabetische Neuropathie

Die diabetische Neuropathie betrifft beide Typen des Diabetes mellitus im gleichen Umfang. Der pathologische Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Man vermutet, daß zum einen die durch die Hyperglykämie hervorgerufenen metabolischen und Redox-Abnormalitäten alleine oder zusammen mit der entstehenden Mikroangiopathie die Neuropathie hervorrufen [Malik, 1997]. Die Nervenschädigung beginnt sowohl in peripheren Nervenfasern als auch im zentralen Nervensystem mit der Degeneration des Axons, bevorzugt in unmyelinisierten Fasern, in denen die Axone lediglich in Schwannsche Zellen eingebettet sind. Die metabolische Aktivität der Schwannschen Zellen ist durch das veränderte Axon zerstört, dies verursacht einen Verlust an Myelin. Dieser Verlust kann aber wieder regeneriert werden. Charakteristisch für eine lang andauernde diabetische Neuropathie ist ein Wechselgebilde zwischen Demyelination und Remyelination in den Nervenzellen. Die Nervenleitgeschwindigkeit und die Sensibilität verschlechtern sich im Krankheitsverlauf.

Diabetische Mikroangiopathie

Charakteristisch für die diabetische Mikroangiopathie ist die Verdickung der Kapillargefäßmembranen. Eine mögliche Erklärung für die Gefäßwandverdickung könnte die verminderte Gewebepfusion sein. Die Häufigkeit der Gefäßveränderungen erscheint proportional zu dem Fortschreiten der Krankheit und den Blutglukosespiegeln. Hypoxie und Ischämie von verschiedenen Organen könnte auf die diabetische Mikroangiopathie zurückzuführen sein. Vor allem die Netzhaut (Retinopathie) und die Niere (Nephropathie) sind von der diabetischen Mikroangiopathie betroffen.

Retinopathie

Die Retina gilt als metabolisch sehr aktives Gewebe und ist mit aller kleinsten Blutgefäßen, sogenannten Kapillaren, ausgestattet. Das macht sie zu einem sehr verwundbaren Ziel für kapilläre Gefäßverschlüsse im Diabetes mellitus, häufiger jedoch beim Typ II - als beim Typ I - Diabetiker. Die Schädigungen äußern sich in diffusen Gefäßwandverdickungen durch Anlagerung von Eiweißen und Fetten, die das Gefäß brüchig machen. Die Durchblutungsstörungen führen zu einer Unterversorgung, die das Wachstum von neuen Blutgefäßen anregt, sogenannte Mikroaneurysmen (kleine Aussackungen) der Netzhautgefäße, aus denen es zu Blutungen in den Glaskörper kommen kann. Als Folge treten leichte Sehstörungen auf, die bei Früherkennung gut behandelt werden können, bei nicht Erkennen aber zur Erblindung führen können.

Diabetische Nephropathie

Die Filterfunktion der Nieren wird durch die Glomeruli, kleine Knäule aus haarfeinen Blutgefäßen, erfüllt. Durch die dünnen Wände dieser Blutgefäße verlassen kleine Moleküle wie überschüssiges Wasser, Salze, Stoffwechselabbauprodukte, Harnstoff und Gifte den Blutkreislauf und gelangen in den primären Harn. Größere Moleküle, wie z.B. die Blutkörperchen oder Eiweiße werden zurückgehalten. Die Hyperglykämie, die Hyperfiltration, die erhöhte Blutviskosität und der daraus resultierende erhöhte glomerulären Druck führen zu Kapillarveränderungen in der Niere. Der genaue Mechanismus ist aber bis heute noch nicht sicher bekannt. In den ersten Jahren des Krankheitsverlaufs bilden sich Membranverdickungen an den Glomeruli, die in einer diffusen Glomerulosklerose resultieren. Die Folge ist eine zunehmend eingeschränkte Nierenfunktion. Es werden Proteine renal ausgeschieden (Proteinurie), da die Rückresorption in der Niere nicht mehr funktioniert, größere Moleküle werden durch die erweiterte Porengröße nicht mehr zurückgehalten. Der Tod durch Nierenversagen tritt häufiger bei Typ I -, als bei Typ II - Diabetikern ein.

Diabetische Makroangiopathie

Die diabetische Makroangiopathie ist eine der häufigsten Krankheitsbilder der Typ II - Diabetiker, die sehr oft zum Tode führt. Durch Veränderungen an der Gefäßwand, und im fortgeschrittenen Stadium durch Ablagerung von Blutplättchen und Fibrin, wird die Proliferation der subendothelialen glatten Muskulatur in der arteriellen Gefäßwand ausgelöst. Es kommt zur Verdickung, Verhärtung und zum Elastizitätsverlust (Arteriosklerose). Auch andere Faktoren im Krankheitsverlauf des Diabetes mellitus, wie zum Beispiel Hyperglykämie, Hypertriglyzeridämie, hohe Cholesterin-Konzentrationen (HDL, high density lipoprotein), Lipoproteinoxidation und die Bildung von AGE (advanced glycosylation end products), durch die irreversible Interaktion zwischen Glukose und Proteinen, beschleunigen die makrovaskulären Komplikationen. Sehr häufig werden größere periphere Gefäße beeinträchtigt, wie zum Beispiel im Bereich der Extremitäten oder die koronaren und zerebralen Gefäße, was zu Amputationen von Extremitäten, Herzinfarkt, oder zum Schlaganfall führen kann.

Infektionen

Diabetiker, sowohl des Typs II als auch des Typs I, unterliegen einem erhöhten Risiko für Infektionen. Dafür sind mehrere Gründe verantwortlich. Zum Beispiel ist durch das eingeschränkte Sehvermögen und Schmerzempfinden die Verletzungsgefahr erhöht. Die mikrovaskulären und makrovaskulären Komplikationen führen zu einer Sauerstoffunterversorgung im Gewebe. Diese Unterversorgung wird noch gesteigert, weil die erhöhten Konzentrationen an Glukohämoglobin in den roten Blutkörperchen die Freisetzung von Sauerstoff im Gewebe behindern. Der erhöhte Glukosespiegel in den Körperflüssigkeiten dient außerdem Pathogenen als hervorragende Energiequelle und bewirkt eine schnelle Proliferation. Die schlechte Blutversorgung schränkt auch die Abwehrmechanismen im Körper ein, die weißen Blutkörperchen gelangen nun langsamer an die betroffene Stelle. Außerdem sind die Funktionen der Leukozyten, die Chemotaxis (die Beweglichkeit der Phagozyten) und die Phagozytose beeinträchtigt.

2.2 α -Liponsäure

Bisher gibt es keinen klinischen Beweis dafür, daß orale Antidiabetika auch einen günstigen Einfluß auf das Auftreten oder Fortschreiten der diabetischen Spätfolgen haben, bzw. deren Symptome verringern können.

Mit Dextlipotam, dem Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, versucht man nun einen Arzneistoff zu entwickeln, der zum einen die akuten Komplikationen im Diabetes mellitus lindert, aber auch eine positive Wirkung auf die Vorbeugung, bzw. Therapie der diabetischen Spätfolgen zeigt.

Physikalisch-chemische Eigenschaften der rac- α -Liponsäure

rac- α -Liponsäure (Strukturformel Abbildung 1), auch Thioctsäure genannt, ist eine schwefelhaltige Fettsäure.

Summenformel:	$C_8H_{14}O_2S_2$
Molekular Gewicht:	206,33 g/mol.
Chemical Abstracts Nr.:	57828-26-9

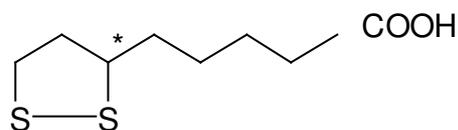


Abb. 1 Struktur der rac- α -Liponsäure (1,2-Dithiolan-3-pentansäure)
* optisch aktives Zentrum

Sie wurde Ende der vierziger Jahre als Wachstumsfaktor für verschiedene Mikroorganismen entdeckt [Snell et al, 1937]. 1951 gelang es erstmals Reed die α -Liponsäure in kristalliner Form aus Lebergewebe rein zu isolieren [Reed et al, 1951]. Er war es auch, der den Namen „ α -Liponsäure“ in Anlehnung an die hohe Lipophilie der Verbindung und ihrer Säureeigenschaft vorschlug.

Da α -Liponsäure in Position 3 des Dithiolanrings ein Chiralitätszentrum besitzt, kann sie in 2 optisch aktiven Formen vorliegen (siehe Abbildung 2) [Biewenga et al, 1997a].

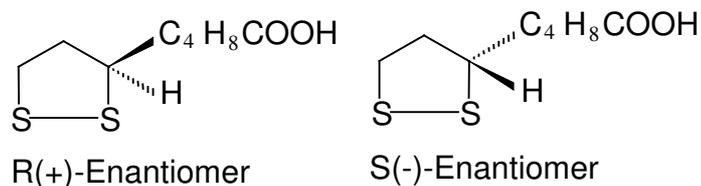


Abb. 2: Die zwei optisch aktiven Formen der α -Liponsäure

Bei der chemischen Synthese des Razemats kristallisiert die α -Liponsäure in gelben Nadeln, ihr Schmelzpunkt liegt bei 61 °C.

In den üblichen organischen Lösungsmitteln ist α -Liponsäure gut löslich, wenig dagegen in Wasser. Charakteristisch für die Struktur der α -Liponsäure ist der Gehalt von zwei Schwefelatomen in einem Ringsystem. Dadurch kann sie ein sogenanntes intramolekulares Redoxsystem (Abbildung 3) bilden, das mit zahlreichen Oxidantien reagieren kann [Biewenga et al, 1997a].

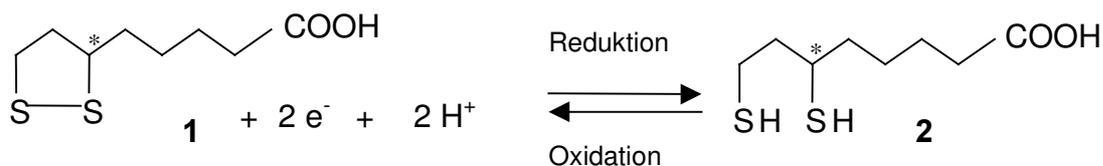


Abb. 3: Das Redoxpaar α -Liponsäure (1) und Dihydroliponsäure (2) ($E_0 = -0,29\text{V}$, pH 7.1, 22°C) / * optisch aktives Zentrum

Durch Hitze oder ultraviolette Strahlung kann die S-S-Bindung im Liponsäure-Molekül homolytisch gespalten werden. Das so entstandene Thiyl-Radikal kann mit anderen Molekülen weiter reagieren, durch die Polymerisation entstehen lineare Disulfid-Ketten.

Eine weitere Eigenschaft der α -Liponsäure und Dihydroliponsäure ist die Fähigkeit, Chelatkomplexe über die Carboxylgruppe und über die Schwefelatome zu bilden [Biewenga et al, 1997a].

Dexlipotam, das Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure

Unter dem Namen Dexlipotam verbirgt sich das Trometamolsalz von R(+)- α -Liponsäure (Abbildung 4). Das Trometamolsalz besitzt eine wesentlich bessere Löslichkeit in wässrigen Medien als die freie Säure und zeigt weniger Neigung zur Polymerisation.

Summenformel: $C_{12}H_{25}NO_5S_3$

Molekular Gewicht: 327,46 g/mol.

Dexlipotam liegt als gelbes, kristallines Pulver mit spezifischem Geruch vor. Der Schmelzpunkt von Dexlipotam liegt bei 116°C. Die Substanz ist gut löslich in Wasser, Methanol und alkalischen Lösungen, schlecht löslich in Ethanol, Octanol, sauren Medien und Chloroform.

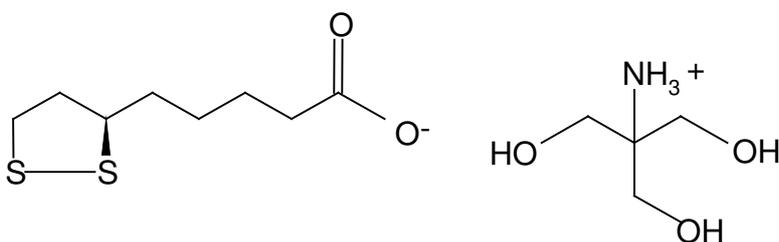


Abb. 4: Struktur des Dexlipotams
(R-5-(1,2-Dithiolan-3-yl)pentansäure 1,1,1-tris(hydroxymethyl)amino-methyl Salz)

2.2.1 Biochemischer Hintergrund

Natürliches Vorkommen

In der Natur kommen nur die R(+)- α -Liponsäure und ihre reduzierte Form, die R(+)-Dihydroliponsäure vor [Biewenga et al, 1997a]. Als natürlicher Cofaktor ist die R(+)- α -Liponsäure in verschiedenen Multienzymkomplexen zu finden, wie zum Beispiel in dem Pyruvat-Dehydrogenase-(PDH)-, dem α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Enzymkomplex und dem Glycin-Oxidationssystem. R(+)- α -Liponsäure findet sich in geringen Mengen in allen tierischen und pflanzlichen Zellen. Bakterien, Pflanzen und höhere Organismen sind in der Lage, R(+)- α -Liponsäure in ihrem Stoffwechsel selbst herzustellen [Biewenga et al, 1997b].

Die in den Zellen vorliegende R(+)- α -Liponsäure ist in Multienzymkomplexen als prosthetische Gruppe säureamidartig an einen Lysinrest gebunden (siehe Abbildung 5). Man geht davon aus, daß durch den langen, flexiblen Arm der Lipoyl-Gruppe Substrate von einem aktiven Zentrum im Enzymkomplex zum anderen transportiert werden können [Biewenga et al, 1997a; Stryer, 1990].

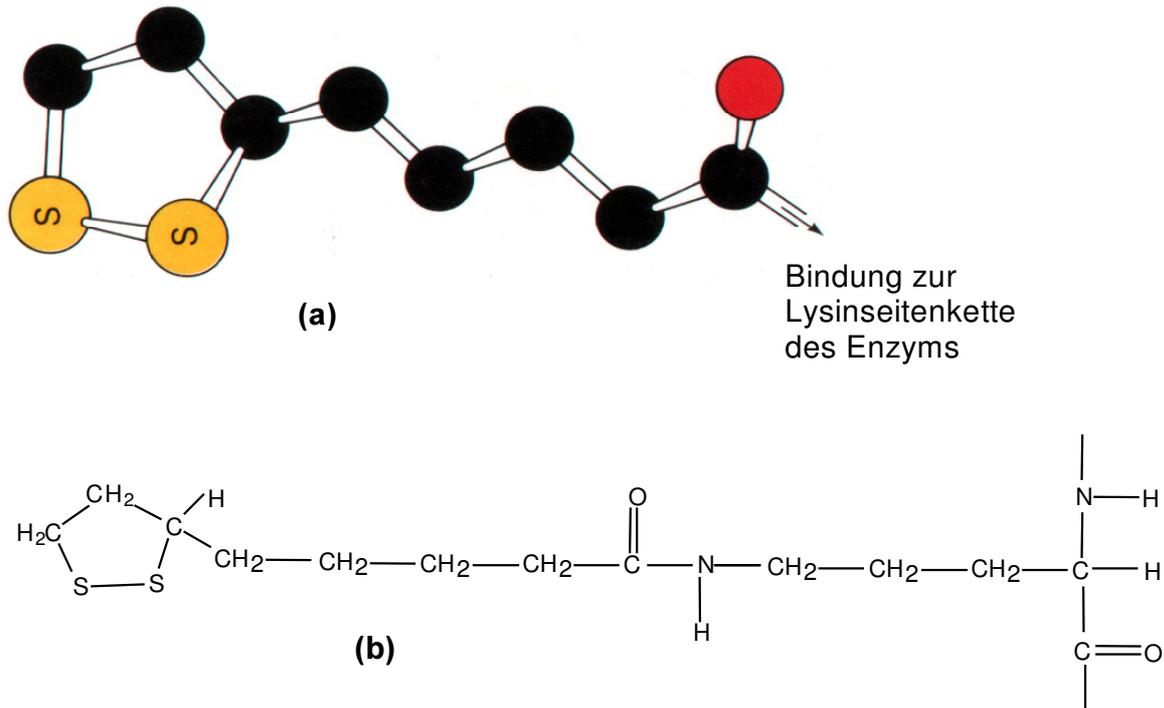


Abb. 5: Modell des Lipoylrestes im Liponamid (a) und Struktur des Liponamids (b) [Stryer, 1990]

Endogene Spiegel freier α -Liponsäure sind im Organismus sehr gering, bis heute ist keine freie Liponsäure im Organismus nachgewiesen worden [Biewenga et al, 1997a].

Biochemische Wirkungsweise

Das Redoxpaar, die α -Liponsäure und die Dihydroliponsäure, wirkt im Organismus als potentes Antioxidans [Packer et al, 1995; Biewanga et al, 1997a] und ist in der Lage endogene Antioxidantien (Glutathion, Vitamin C und Vitamin E) zu regenerieren und oxidierte, und damit funktionsunfähige Proteine (Methionin, Cystein, Tyrosin) wiederherzustellen [Abbildung 6, Evans und Goldfine, 2000].

Die α -Liponsäure und die Dihydroliponsäure, als lipophile Substanzen, können in der Zellmembran den Organismus vor freien Radikalen und Lipid-Peroxiden schützen. Durch die zusätzliche hydrophile Eigenschaft ist α -Liponsäure außerdem in der Lage, im Cytosol freigesetzte Radikale abzufangen. Zusätzlich dienen die Substanzen dem Organismus als Chelatkomplexbildner.

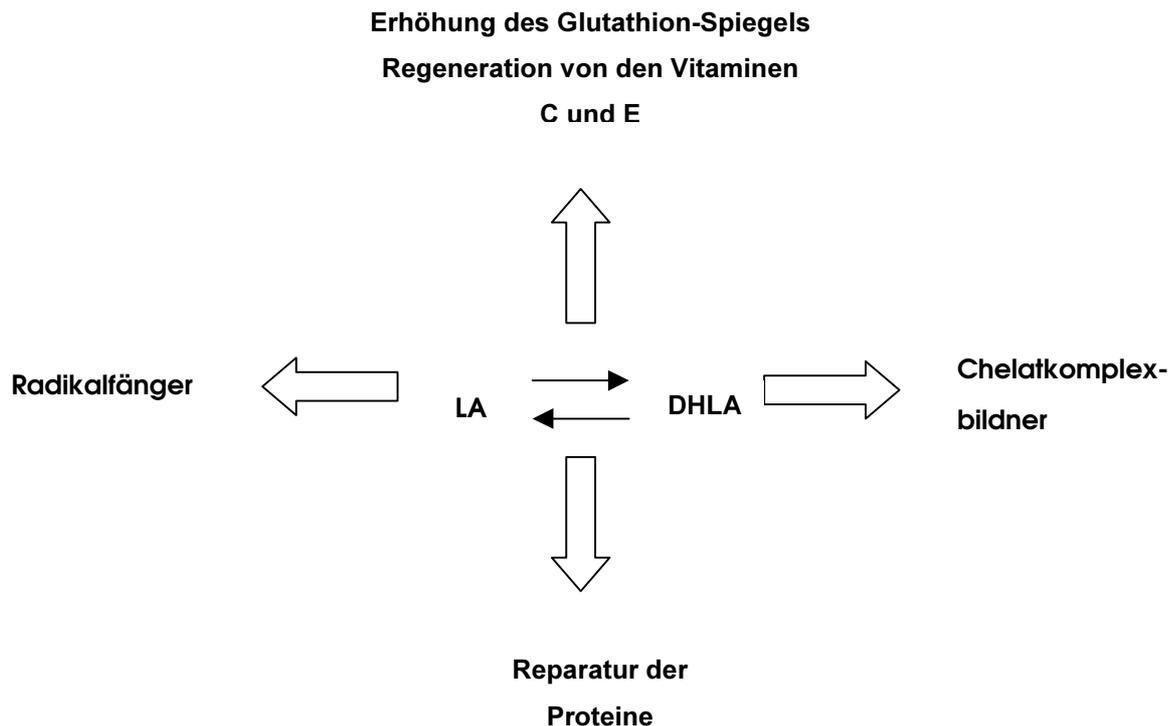


Abb. 6: Funktion der α -Liponsäure (LA) und der Dihydroliponsäure (DHLA) als Antioxidans [Evans und Goldfine, 2000].

α -Liponsäure nimmt eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel als Cofaktor des Pyruvat-Dehydrogenase-(PDH-)Multienzymkomplexes ein (Abbildung 7).

Der Pyruvat-Dehydrogenase-(PDH-)Multienzymkomplex ist aus drei Untereinheiten aufgebaut:

Die **E1**-Untereinheit, die Decarboxylase-Dehydrogenase oder Pyruvat-Dehydrogenase, enthält Thiamindiphosphat als prosthetische Gruppe, welche das Pyruvat, das in der Glykolyse gebildet wird, bindet und decarboxyliert.

Die **E2**-Untereinheit, das sogenannte Kernenzym Dihydrolipoyl-Transacetylase, enthält die enzymatisch an einen Lysinrest gebundene R(+)- α -Liponsäure. Der so ausgebildete Arm überspannt alle drei Untereinheiten des Enzymkomplexes und hat die Aufgabe, die in der E1-Untereinheit entstandene Hydroxyethylgruppe auf CoA zu übertragen. Die gebundene R(+)- α -Liponsäure wird dabei zur R(+)- α -Dihydroliponsäure reduziert.

Die **E3**-Untereinheit, die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase, ist ein Flavoprotein und hat die Aufgabe die enzymatisch gebundene R(+)- α -Dihydroliponsäure durch Oxidation wieder zu regenerieren [Stryer, 1990].

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex ist in den Mitochondrien lokalisiert und katalysiert die oxidative Decarboxilierung des Pyruvats zu Acetyl-CoA, ein entscheidender Schritt im oxidativen Glukose-Stoffwechsel [Randle, 1998]. Acetyl-CoA ist ein zentrales Zwischenprodukt im Intermediärstoffwechsel. Es dient unter anderem als Ausgangsstoff im Citratcyclus für die oxidative Energiegewinnung.

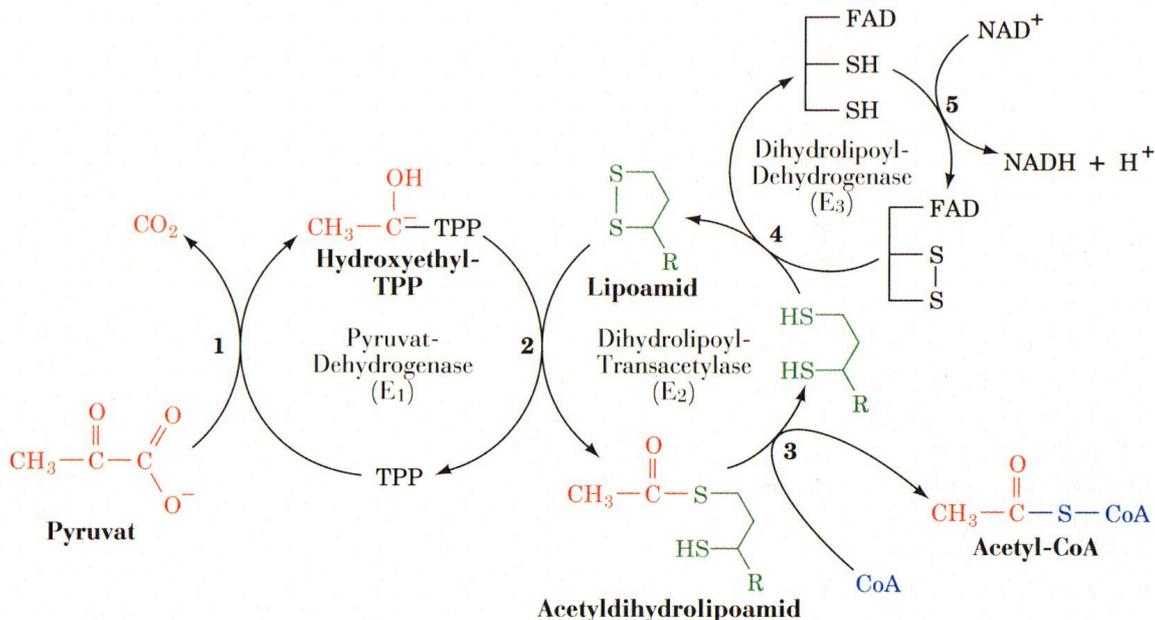


Abb. 7: Die fünf Reaktionen des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes. E₁ (Pyruvat-Dehydrogenase) enthält TPP und katalysiert die Reaktionen 1 und 2. E₂ (Dihydrolipoyl-Transacetylase) enthält Lipoamid und katalysiert die Reaktion 3. E₃ (Dihydrolipoyl-Dehydrogenase) enthält FAD und ein redoxaktives Disulfid und katalysiert die Reaktionen 4 und 5 [Voet und Voet, 1992]

2.2.2 Medizinische Anwendungsgebiete

rac- α -Liponsäure wurde als Arzneimittel in Deutschland seit dem Jahre 1959 zur Behandlung von Lebererkrankungen [Möller und Schmitt, 1977; Marshall et al, 1982] bei Pilzvergiftungen [Teutsch und Brennan, 1978; Dluholucky et al, 1980], sowie später bei peripheren Polyneuropathien angewendet. Das klinisch-chemische Rational für die letztgenannte Indikation beruhte ursprünglich darauf, daß bei Patienten mit Diabetes mellitus und in einigen Fällen mit Polyneuritis und kardiovaskulären Erkrankungen ein erniedrigter Spiegel an α -Liponsäure gefunden wurde [Shigeta et al, 1961; Evans und Goldfine, 2000; Kleemann et al, 1989].

Bis heute wird rac- α -Liponsäure (Thioctacid[®]) in Deutschland als Arzneimittel für die Behandlung der Polyneuropathie, einer Sensibilitätsstörung an Händen und Füßen als Spätfolge des Typ II – Diabetes, eingesetzt. rac- α -Liponsäure normalisiert die bei der diabetischen Polyneuropathie erniedrigte Nervenleitgeschwindigkeit und verbessert die sensorische Funktionsstörung der peripheren Nerven [Ziegler et al, 1999].

Üblicherweise wird eine tägliche Dosis von 600 mg rac- α -Liponsäure die ersten 3 Wochen intravenös, anschließend von 600 – 1200 mg peroral verabreicht [Mutschler et al, 2001].

Die Wirksamkeit von rac- α -Liponsäure konnte nach intravenöser Applikation gezeigt werden, während die Wirksamkeit nach oraler Gabe bisher nicht klar bewiesen werden konnte. Eine Multizenterstudie NATHAN I (Neurological Assessment of Thioctic Acid in Neuropathy Studie) über 4 Jahre in Europa und Nordamerika soll nun beweisen, daß auch die orale Gabe von rac- α -Liponsäure das Fortschreiten der diabetischen Neuropathie verlangsamen kann [Evans und Goldfine, 2000; Ziegler et al, 1999].

Weiterhin stellte man fest, daß rac- α -Liponsäure die Glukoseaufnahme in die Zelle verbessert und zudem die Glukoseoxidation und die Glukogensyntheserate erhöht (Kapitel 2.2.4).

Neuere Studien gaben aber den Hinweis, daß die Blutzucker senkenden Eigenschaften der rac- α -Liponsäure alleine auf das physiologische R-Enantiomer zurückzuführen sind (Kapitel 2.2.4). Das S-Enantiomer hingegen erwies sich als wirkungslos. Deshalb ist das Interesse, Dexlipotam, das Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, als Arzneistoff zu entwickeln, sehr groß.

2.2.3 Die Pharmakokinetik der α -Liponsäure

Untersuchungen mit radioaktiv markierter rac- α -Liponsäure im Tier

Erste Untersuchungen wurden mit radioaktiv markierter, razemischer α -Liponsäure ([7,8- 14 C]-rac- α -Liponsäure) nach intravenöser und oraler Gabe an Ratten (10 mg/kg) durchgeführt [Peter und Borbe, 1996]. Bei den gemessenen Konzentrationen in diesen Studien handelte es sich immer um die Gesamtradioaktivität der Substanz, daher konnten keine Aussagen gemacht werden, zu welchen Anteilen die Muttersubstanz und / oder die Metaboliten in den untersuchten Geweben oder im Plasma vorlagen.

Die oral verabreichte Radioaktivität wurde sehr schnell und fast vollständig resorbiert. An der narkotisierten Ratte erhobene Daten nach intraluminaler Injektion in 5 in situ ligierte Segmente des Gastrointestinaltraktes zeigten, daß die Absorption von rac- α -Liponsäure schnell und über den gesamten Bereich erfolgte.

Die Ausscheidung der Gesamtradioaktivität erfolgte vorherrschend über die Niere, mehr als 80 % der applizierten Dosis wurde innerhalb von 24 h im Urin wiedergefunden.

Die Muttersubstanz und möglicherweise auch ihre Metaboliten zeigten ein hohes Verteilungsvolumen (Ratte: 12,3 l/kg, 10 mg/kg i.v.), die intravenös applizierte Radioaktivität verteilte sich schnell und weit in das Gewebe. Die Plasmahalbwertszeit bezogen auf die Gesamtradioaktivität betrug 80 h nach Einmalgabe.

In ausgewählten Gewebeproben der peripheren Nerven (Nervus ischiadicus und Nervus femoralis) wurden maximale radioaktive Konzentrationen bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt (0,5 h nach intravenöser und oraler Gabe) gemessen. Im Verlauf der mehrfachen oralen Gabe der radioaktiven Substanz an Ratten erfolgte eine Anreicherung der Radioaktivität im peripheren Nervengewebe im Vergleich zur Einmalgabe um den Faktor 10. Diese lag deutlich höher als im Plasma (Faktor 3) und lieferte höhere Konzentrationen als im Plasma.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden weitere Organe nach einfacher und mehrfacher Gabe untersucht, [Peter, 1991; Peter, 1994]. Tabelle 1 stellt die ermittelten [14 C]-Konzentrationen in unterschiedlichen Geweben, im Plasma und Blut mit den ermittelten Eliminationshalbwertszeit zusammen.

Tab. 1 Gemessene Radioaktivitätskonzentrationen in unterschiedlichen Organen, im Plasma und im Blut von Ratten nach einfacher und mehrfacher oraler Gabe von [¹⁴C]-rac- α -Liponsäure [Peter und Borbe, 1996; Peter, 1991 und 1994]

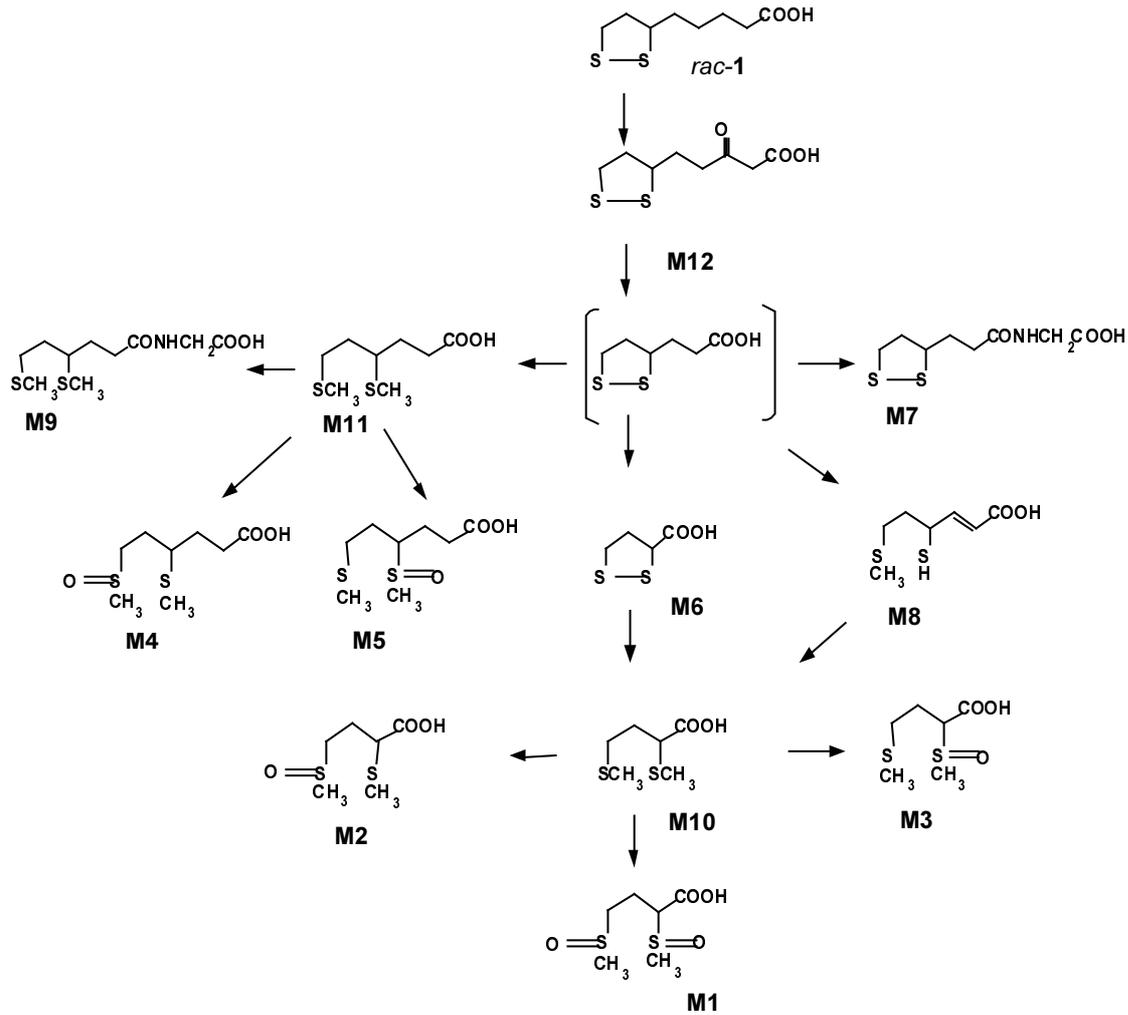
Organe	Radioaktivitätskonzentrationen (ng-eq/ml oder g)					
	Einfachgabe*			Mehrfachgabe**		
	Zeitpunkt			Zeitpunkt		
	24 h	168 h	t _{1/2} [h]	24 h	168 h	t _{1/2} [h]
Plasma	241	23	51,9	645	138	81,7
Blut	193	45	108,7	818	498	132,2
Nervus ischiadicus	146	73	(95,7)	1174	858	(513,7)
Nervus femoralis	blq	blq	nc	1430	1015	nc
Retina	blq	blq	nc	619	338	nc
Cerebellum	55	28	(142,6)	562	537	(568,1)
Haut	207	98	145,8	1810	1488	nc
Muskel	99	38	nc	890	749	(593,8)
Herz	118	55	135,0	1222	821	280,5
Leber	2081	401	90,5	5195	2492	122,1
Lunge	199	85	92,8	1398	686	187,5
Niere	807	202	87,9	3619	1497	150,3
Aorta	nm	nm	nc	nm	nm	nc

*n=5
 **n=4
 nc nicht kalkuliert
 nm nicht analysiert
 blq unterhalb der Bestimmungsgrenze
 [orale Dosierung: 10 mg/kg]
 die Werte in Klammern sind nur orientierend

Die Metabolisierung der rac- α -Liponsäure wurde in der Arbeit von Schupke untersucht. [¹⁴C]-rac- α -Liponsäure wurde Mäusen (Dosis 30 mg/kg), Ratten (30 mg/kg) und Hunden (10 mg/kg) oral verabreicht und der so gewonnene Urin und das entnommene Plasma wurden auf mögliche Metaboliten untersucht [Schupke et al; 2001]. Die Versuche mit [¹⁴C]-markierter α -Liponsäure zeigten, daß ein Großteil der eingesetzten Radioaktivität zwar mit dem Urin wieder ausgeschieden wurde, die Muttersubstanz selbst jedoch darin nur in Spuren nachzuweisen war.

In der zitierten Arbeit wurden neben der Muttersubstanz 12 weitere Metaboliten identifiziert. α -Liponsäure unterliegt einem intensiven Metabolismus. In den Mitochondrien erfolgt eine β -Oxidation an der Seitenkette [Lang, 1992]. Zusätzlich findet eine Reduktion des 1,2-Dithiolanringes, vermutlich außerhalb des Mitochondriums mit nachfolgender S-Methylierung statt. Außerdem konnten Mono- und Di-Sulfoxide, aber auch Konjugate mit der Aminosäure Glycin identifiziert werden.

Die folgende Darstellung zeigt die identifizierten Metaboliten und ihre Bildungswege in den untersuchten Spezies [Schupke et al, 2001]:



- Abb. 8 Biotransformations-Schema der α -Liponsäure [Schupke et al, 2001]
- M1: Zweifach-S-oxidierte Form der 2,4-Bis-(methylmercapto)-butansäure (BMBA)
 - M2: Mono-S-oxidierte Form der 2,4-Bis-(methylmercapto)-butansäure (BMBA)
 - M3: Mono-S-oxidierte Form der 2,4-Bis-(methylmercapto)-butansäure (BMBA)
 - M4: Mono-S-oxidierte Form der 4,6-Bis-(methylmercapto)-hexansäure (BMHA)
 - M5: Mono-S-oxidierte Form der 4,6-Bis-(methylmercapto)-hexansäure (BMHA)
 - M6: Tetranorliponsäure
 - M7: Glycin-Derivat der Bisnorliponsäure
 - M8: S-methyliertes Derivat der Bisnorliponsäure
 - M9: Glycin-Derivat der 4,6-Bis-(methylmercapto)-hexansäure (BMHA)
 - M10: 2,4-Bis-(methylmercapto)-butansäure (BMBA)
 - M11: 4,6-Bis-(methylmercapto)-hexansäure (BMHA)
 - M12: 3-Ketoliponsäure

Bisnorliponsäure konnte nicht als Metabolit identifiziert werden und wurde deshalb in Klammern dargestellt.

Bei Mäusen und Ratten sind die dimethylierten und die dimethyliert-mono-oxidierten Derivate der Bisnorliponsäure bevorzugte Endprodukte des Metabolismus. Der Metabolit M7, ein Glycinkonjugat der Bisnorliponsäure wurde nur im Urin der Maus identifiziert. Die 3-Ketoliponsäure (M12) wurde nur im Rattenplasma nachgewiesen.

Dagegen zeigte der Hund eine verstärkte sequentielle β -Oxidation an Butansäure-Derivaten. Die meisten identifizierten Metaboliten wurden aus der Tetranorliponsäure gebildet. Er zeigte somit ein anderes Biotransformationsverhalten als Nagetiere.

Untersuchungen mit radioaktiv markierter rac- α -Liponsäure im Menschen

Bisher wurde radioaktive α -Liponsäure dem Menschen nicht verabreicht. Die Substanz und möglicherweise auch ihre Metaboliten zeigten ein hohes Verteilungsvolumen in den untersuchten Tierspezies und bindeten sich zu einem großen Teil an das Gewebe. Die dadurch erzeugte lange Verweildauer der Radioaktivität im Körper verbietet einen Humanversuch im ethischen Sinne. Aus diesem Grund ist der Ausscheidungsweg im Menschen noch nicht voll aufgeklärt.

Untersuchungen mit nicht markierter rac- α -Liponsäure im Tier

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit radioaktiv markierter Substanz, zeigte sich in der Ratte im Hinblick auf die Muttersubstanz ein anderes pharmakokinetisches Bild. Auch die Untersuchungen mit der nicht markierten rac- α -Liponsäure zeigten, daß die Muttersubstanz sehr schnell resorbiert wird, wie es sich auch bei den radioaktiven Untersuchungen zeigte, die Elimination aber deutlich schneller erfolgte. Die Eliminationshalbwertszeit im Plasma war nur sehr kurz, < 0,5 h. Die absolute Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe im Vergleich zur intravenösen Gabe war sehr limitiert, sie betrug nur circa 10 %. Es konnten somit nach einer oralen Gabe von rac- α -Liponsäure bei einer Dosis von 10 mg/kg nur bis 5 h nach der Applikation messbare Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden. Für die Messung wurde eine enantioselektive HPLC-Methode verwendet (LOQ = 15 ng/ml, LOD = 2 ng/ml). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit konnte nach mehrfacher einmal täglicher oraler Gabe bei gleicher Dosis keine Anreicherung der Muttersubstanz im Plasma festgestellt werden [Niebch et al, 1996].

Untersuchungen mit nicht markierter rac- α -Liponsäure im Menschen

Zusätzlich wurde in der Arbeit von Schupke nicht markierte rac- α -Liponsäure (Dosis 600 mg) Menschen verabreicht und der gewonnene Urin und das entnommene Plasma wurden untersucht, um Kenntnis über die Bildung der Metaboliten im Menschen zu erhalten [Schupke et al, 2001].

Im Menschen zeigte sich ein ähnliches Bild, wie es sich auch in Ratten und Mäusen darstellte. Vor allem Derivate der Bisnorliponsäure wurden im Urin und im Plasma gefunden.

Nach oraler Gabe von α -Liponsäure im Menschen konnten als Hauptmetaboliten 2,4-Bis-(methylmercapto)-butansäure (BMBA, M10) und 4,6-Bis-(methylmercapto)-hexansäure (BMHA, M11) im Urin und im Plasma identifiziert werden [Schupke et al, 2001; Locher et al, 1995].

3-Ketoliponsäure (M12), ein Zwischenprodukt im Verlauf der β -Oxidation der α -Liponsäure, wurde im Humanplasma in größeren Mengen gefunden.

Die Arbeiten von Hermann et al geben einen Überblick über den Kenntnisstand der Kinetik der α -Liponsäure im Menschen [Hermann et al, 1996; Hermann und Niebch, 1997]. Für die Quantifizierung der α -Liponsäure-Konzentrationen wurde eine enantioselektive HPLC-Methode verwendet (LOQ = 15 ng/ml, LOD = 2 ng/ml). In unbehandelten Testpersonen konnte keine freie α -Liponsäure im Plasma nachgewiesen werden. Sowohl nach intravenöser (200 – 1200 mg) als auch nach oraler Applikation (50 – 600 mg) konnte ein dosisproportionaler Anstieg der im Körper vorhandenen Plasmakonzentrationen beider Enantiomeren nachgewiesen werden. Dabei zeigte das S(-)-Enantiomer regelmäßig eine geringere AUC und eine höhere Gesamtkörper-Clearance als das R(+)-Enantiomer. Daraus kann man schließen, daß es stereoselektive Unterschiede im stark ausgeprägten hepatischen Metabolismus oder in der Aufnahme und Verteilung der α -Liponsäure geben könnte.

In den Tabellen 2 und 3 sind die pharmakokinetischen Parameter der α -Liponsäure-Enantiomeren nach intravenöser und nach oraler Gabe dargestellt.

Tab. 2 Pharmakokinetische Parameter der α -Liponsäure-Enantiomeren in gesunden Probanden nach intravenöser Gabe von 600 und 1200 mg rac- α -Liponsäure als 35 min-Infusion [Hermann und Niebch, 1997]

Pharmakokinetische Parameter nach intravenöser Gabe				
Enantiomer	$t_{1/2}$ [h]		Cl_{tot} [ml/min/kg]	
	R	S	R	S
600 mg rac-α-Liponsäure / 35 min als Infusion				
Median	0,59	0,48	9,88	12,75
Min	0,45	0,37	8,20	11,13
Max	0,71	0,73	12,33	15,73
1200 mg rac-α-Liponsäure / 35 min als Infusion				
Median	0,83	0,50	8,33	11,65
Min	0,47	0,36	5,56	8,33
Max	1,09	0,92	11,81	16,43

(n = 8)

Tab. 3 Pharmakokinetische Parameter der α -Liponsäure-Enantiomeren in gesunden Probanden nach oraler Gabe von 200 mg rac- α -Liponsäure als Tablette [Hermann und Niebch, 1997]

Pharmakokinetische Parameter nach oraler Gabe										
Enantiomer	AUC [$\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$]*		F [%]*		C_{max} [$\mu\text{g}/\text{ml}$]*		t_{max} [h]*		$t_{1/2}$ [h]**	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
200 mg rac-α-Liponsäure als Tablette (4 x 50 mg)										
Mittel _{geo}	0,41	0,25	22,4	17,2	0,46	0,28	-	-	-	-
Mittel _{arith}	0,45	0,28	25,9	20,9	0,60	0,38	0,70	0,70	0,71	0,82
S.D.	$\pm 0,20$	$\pm 0,13$	$\pm 17,1$	$\pm 16,6$	$\pm 0,41$	$\pm 0,28$	$\pm 0,41$	$\pm 0,41$	$\pm 0,68$	$\pm 0,99$
200 mg rac-α-Liponsäure als Tablette (1 x 200 mg)										
Mittel _{geo}	0,39	0,23	21,6	16,2	0,44	0,28	-	-	-	-
Mittel _{arith}	0,41	0,25	24,1	19,1	0,49	0,31	0,90	0,90	0,33	0,33
S.D.	$\pm 0,13$	$\pm 0,09$	$\pm 12,7$	$\pm 12,8$	$\pm 0,27$	$\pm 0,16$	$\pm 0,74$	$\pm 0,74$	$\pm 0,20$	$\pm 0,24$

*(n = 12) oder ** (n = 8)

Die Eliminationshalbwertszeiten beider Enantiomeren liegen sowohl nach intravenöser als auch nach oraler Gabe in der gleichen Größenordnung von < 1 h (Tabelle 2 und 3). Es waren keine signifikanten Unterschiede für die Enantiomeren zu erkennen. In Abhängigkeit von der applizierten Menge konnten nur bis zu 2 h (200 mg) oder 4 h (600 mg) nach Substanzgabe messbare Plasmaspiegel der Muttersubstanz (verwendete analytische Meßmethode: LOQ = 15 ng/ml, LOD = 2 ng/ml für beide Enantiomeren) nachgewiesen werden. Aufgrund der kurzen Eliminationshalbwertszeit und den damit verbunden kurzen Plasmakonzentrations-Zeitverläufen konnte auch nach Mehrfachgabe einer einmal täglichen Dosis von 600 mg α -Liponsäure keine Anreicherung im Plasma festgestellt werden.

Ein hoher First-Pass-Effekt erklärt auch die, verglichen mit der i.v. Gabe, deutlich niedrigeren Plasmaspiegel nach oraler Gabe und die relativ niedrige Bioverfügbarkeit. Die Gesamtkörper-Clearance entspricht der Größenordnung des Leberplasmaflusses (ca. 11 bis 17 ml/min kg, siehe Tabelle 2). Die absolute Bioverfügbarkeit lag im Bereich von 20 % für das S(-)-Enantiomer und 25 – 30 % für das R(+)-Enantiomer (Tabelle 3).

2.2.4 Die Pharmakodynamik der α -Liponsäure

Die in diesem Kapitel beschriebenen Wirkungen der α -Liponsäure auf den Organismus beziehen sich auf die akuten Folgen des Diabetes mellitus. Das Wirkungspotential der Substanz auf die Spätschäden des Diabetes mellitus wurde hier außer Acht gelassen.

Stereospezifische Unterschiede in der Pharmakodynamik

Im Kapitel 2.2.1 wurden der Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex und dessen Wirkungsweise im Organismus beschrieben. Nur das R-Enantiomer der α -Liponsäure ist an die E2-Untereinheit über die Aminosäure Lysin kovalent gebunden. In den Arbeiten von Oehring und Bisswanger wurde die Aufnahme der α -Liponsäure-Enantiomeren in die Zellen von *Escherichia coli* Bakterien untersucht [Oehring und Bisswanger, 1992]. Die Einbaurrate des R-Enantiomers war zweifach höher als die der S-Form. Genauere Untersuchungen bei der Inkubation mit beiden Enantiomeren zeigten außerdem, daß nur das R-Enantiomer kovalent an Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2) gebunden wurde. Die Arbeiten von Loeffelhardt zeigten zusätzlich, daß unter normalen Umständen nur das physiologisch vorkommende R-Enantiomer als Cofaktor akzeptiert und in die Lipoyl-Domäne (E2) des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes eingebaut wurde [Loeffelhardt et al, 1996]. In Abwesenheit des R-Enantiomers wurden aber andere Analoga (Kapitel 6, Diskussion), z.B. das S-Enantiomer, aber in einem weitaus geringerem Ausmaß, akzeptiert. Auch im Fall der E3-Untereinheit, der mitochondrialen NADH-abhängigen Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3), wurde das R-Enantiomer als Substrat bevorzugt reduziert. Das S-Enantiomer zeigte keine Reaktivität [Schempp et al, 1994; Haramaki et al, 1996, Loeffelhardt et al, 1995].

Regulation der akuten Komplikationen des Diabetes mellitus

Mehrere Mechanismen des R-Enantiomers, die die Glukoseverwertung steigern, aber auch die Glukoneogenese und die Fettsäureoxidation reduzieren und damit den diabetischen Stoffwechsel positiv beeinflussen, werden im folgenden erläutert.

Regulation des NADH/NAD⁺- Gleichgewichts

Bei Diabetes verursacht die Hyperglykämie durch die Stimulation des Sorbitol-Dehydrogenase-Stoffwechsels (Bildung von D-Fruktose aus Sorbitol und Glukose) einen NADH-Überschuß und eine Verschiebung des Laktat/Pyruvat-Gleichgewichts in Richtung des Laktats. Diese beiden Faktoren jedoch hemmen die Funktion des PDH-Multienzymkomplexes, wodurch die Glykolyse-Kapazität der Zelle abnimmt (siehe Abbildung 9) [Packer, 1998 und Packer 1999]. Ein weiterer Effekt ist eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen.

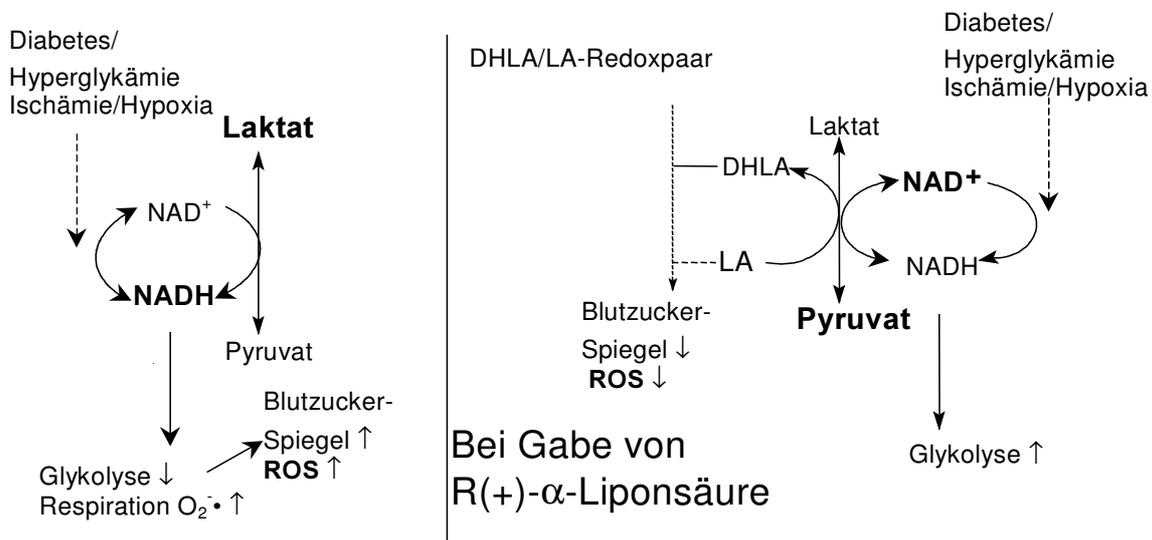


Abb. 9: Vermuteter Mechanismus der Wiederherstellung des Redox-Gleichgewichts bei Hyperglykämie durch R(+)-α-Liponsäure [Packer, 1998 und 1999]. Unter diabetischen Bedingungen ist der Sorbitol-Dehydrogenase-Stoffwechsel stimuliert, so daß das NADH/NAD⁺- und das Laktat/Pyruvat-Verhältnis erhöht ist. Diese Veränderungen führen zu einer verstärkten Produktion von reaktiven Sauerstoff-Moleküle (ROS). Durch die Gabe von R(+)-α-Liponsäure wird der Redoxstatus in der Zelle wieder normalisiert. Durch die Reduktion von α-Liponsäure zu Dihydroliponsäure werden das NADH/NAD⁺- und das Laktat/Pyruvat - Verhältnis erniedrigt. Außerdem ist das Redoxpaar in der Lage, entstehende Radikale abzufangen.

Bei der Gabe von R(+)-α-Liponsäure, wird diese durch die mitochondriale Dihydrolipoyl-Dehydrogenase in der E3-Untereinheit des PDH-Multienzymkomplexes reduziert, wodurch NADH zu NAD⁺ oxidiert wird (Abbildung 9). Dadurch kann das NADH/NAD⁺- und das Laktat/Pyruvat-Verhältnis wieder normalisiert werden. Es erhöht sich die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes, und der Glukoseverbrauch der Zellen wird wieder gesteigert.

Regulation des Blutzuckerspiegels durch Aktivierung der Glukose-Transporter

Die Krankheit Diabetes mellitus ist hauptsächlich auf einen permanent erhöhten Blutzuckerspiegel zurückzuführen, der durch einen Insulinmangel oder durch eine vorliegende Insulinresistenz verursacht wird. Die Wirkung des Insulins besteht darin, daß es an spezifische Rezeptoren an der Plasmaußenmembran in Muskel- und Fettzellen bindet, eine Signaltransduktionskette induziert und dadurch die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 bewirkt (siehe Abbildung 10). Diese Transporter ruhen normalerweise in Vesikeln im Cytoplasma und wandern nun in die Plasmamembran, wo sie die Aufnahme der Glukose in die Zelle ermöglichen [Packer 1998; Yaworsky et al, 1998]. In die Signaltransduktionskette, die die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 hervorruft, sind mehrere Schritte verbunden: Die Autophosphorylierung des Insulinrezeptors, die Tyrosin-Phosphorylierung der bindenden Proteine, der Insulin Rezeptor Substrate (IRS 1 – 4), deren Bindung an das Enzym Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-Kinase) und die Aktivierung der PI-3-Kinase zur Produktion der phosphorylierten Phosphoinositole. Diese wiederum dienen zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB), die ihrerseits als Mediator für die GLUT4-Translokations fungiert.

Bei der Gabe von R(+)- α -Liponsäure hat sich nun gezeigt, daß diese ebenfalls die Fähigkeit besitzt, die Translokation der Glukosetransporter zu bewirken und den Blutzuckerspiegel somit zu senken. Man vermutet, daß R(+)- α -Liponsäure einen direkten Einfluß auf den Glukosetransporter GLUT4 ausübt, aber auch vergleichbar wie Insulin die Signaltransduktionskette auslöst kann und teilweise gleiche Mediatoren, wie zum Beispiel die Proteinkinase B, stimuliert (siehe Abbildung 10). Es konnte gezeigt werden, daß die Wirkung der R-Form weitaus höher ist, als die der S-Form [Estrada et al, 1996, Yaworsky et al, 2000].

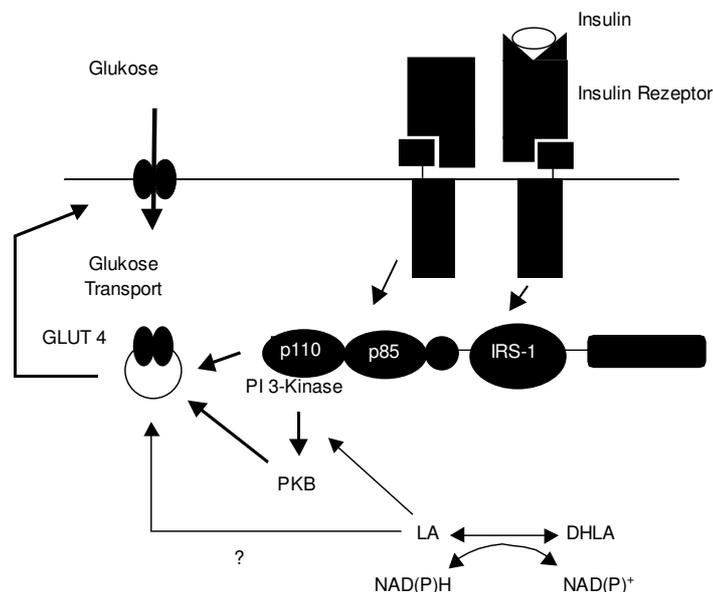


Abb. 10: Vermuteter Mechanismus, wie α -Liponsäure die Insulin abhängige Glukoseaufnahme beeinflusst [Packer, 1999]. Eine Signaltransduktionskette wird induziert, wodurch die Proteinkinase B (PKB) aktiviert wird. Diese dient als Mediator für die Translokation des Glukosetransporters GLUT4. Der Einfluß von α -Liponsäure wird zum einen auf die Aktivität der PKB, auf Mediatoren der Signaltransduktionskette und / oder auf den Glukosetransporter GLUT4 selbst vermutet.

Regulation des Blutzuckerspiegels durch Verminderung der Acetyl-CoA-Konzentration

Da bei einer Diabetes-Erkrankung immer weniger Zuckermoleküle von den Zellen aufgenommen werden können, reagiert der Organismus wie im Hungerzustand und schaltet auf Fettabbau zur Energiegewinnung um. Hierbei werden Fettsäuren aus dem Fettgewebe freigesetzt und verwertet (β -Oxidation), wobei Acetyl-CoA entsteht. Im gesunden Organismus würde dieses im Citratcyclus durch Kondensation mit Oxalacetat abgebaut werden. Da Oxalacetat jedoch wiederum aus Pyruvat gebildet wird und dieses aufgrund des bei Diabetikern verschobenen Pyruvat/Laktat-Gleichgewichts nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht, entsteht ein Acetyl-CoA-Überschuß. Dieser wird nun auf folgenden Wegen abgebaut: Durch den Überschuß an Acetyl-CoA wird die Pyruvat-Carboxylase aktiviert. Aus Pyruvat entsteht Oxalacetat, das durch die gestörte Stoffwechsellage als Substrat für die Glukoneogenese dient und nicht mehr für den Citratcyclus zur Verfügung steht. Da jedoch bei Diabetikern sowieso schon ein Glukose-Überschuß vorliegt, ist dies natürlich ein fataler Kreislauf.

Das überschüssige Acetyl-CoA wird durch die Bildung von Acetoacetat, D-3-Hydroxybutyrat und Aceton abgefangen. Diese sogenannten Ketokörper führen zur diabetische Neuritis und werden mit dem Urin ausgeschieden [Stryer, 1996].

Die Wirkung der freien R(+)- α -Liponsäure liegt nun darin, so vermutet man, daß sie nach Reduktion zur Dihydroliponsäure mit ihren SH-Gruppen in die Funktion des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes eingreifen und dort, anstelle des CoA die Acetyl-Gruppe von der E2-Untereinheit übernehmen kann. Das so gebildete Acetylipoat entzieht somit überschüssiges Acetyl-CoA [Singh und Bowman, 1970 und Wagh et al, 1987]. Eine andere vermutete Wirkung besteht darin, daß die freie R(+)- α -Liponsäure die Acetyl-CoA-Spiegel durch die Bildung von Lipoyl-CoA ab senkt [Khamaisi et al; 1999, Blumenthal 1984; Singh und Bowman, 1970]. In beiden Ansätzen führt das Absenken der Acetyl-CoA-Spiegel zu einer Hemmung der Glukoneogenese und damit verbundenen Hemmung der Glukosebildung.

Wirkung als Radikalfänger und als Antioxidans

Freie Radikale sind sehr aggressive Agenzien und stellen, aufgrund ihrer Eigenschaft Radikal-Kettenreaktionen auszulösen, eine besondere Gefahr für den Organismus dar. Sie sind mitverantwortlich für den Alterungsprozeß und haben eine denaturierende Wirkung auf Lipide, Enzyme und die DNA. Freie Radikale entstehen durch zahlreiche exogene Quellen, wie z.B. Strahlung, Chemikalien und Zigarettenrauch, im Körper. Aber auch der Organismus selbst kann unkontrolliert Radikale bilden, vor allem in Stoffwechselprozessen, bei denen O_2 -Moleküle beteiligt sind, z.B. in den Mitochondrien. Dort findet ein Elektronentransport zur ATP-Produktion statt. Dabei entstehen reaktive Zwischenprodukte, die unkontrollierte Radikalreaktionen hervorrufen können. Durch Alterungsprozesse oder durch Krankheit, speziell Diabetes, kommt es zu einem erhöhten Spiegel an freien Radikalen, der zu „oxidativem Stress“ führt. Dadurch werden Moleküle, Zellen und Gewebe geschädigt. Um diese Schädigung zu verhindern, hat der Organismus Schutzfunktionen durch den Einsatz von Antioxidantien („Radikalfänger“) entwickelt.

Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C, Vitamin E, die Carotinoide, die Flavonoide, die Polyphenole und die α -Liponsäure sind Substanzen, die den Organismus vor einem Schaden durch freie Radikale schützen. Die dadurch verbrauchten Antioxidantien werden durch weitere Antioxidantien wieder regeneriert. Ein solch mehrstufiger Cyclus ist in Abbildung 11 dargestellt. α -Liponsäure besitzt eine Sonderstellung unter den Antioxidantien. Durch ihr Redoxpotential (- 320 mV), welches niedriger als das des Glutathion-Systems ist (- 280 mV), kann sie in ihrer reduzierten Form nicht nur nicht-enzymatisch Glutathion oder Vitamin C regenerieren, welches seinerseits wiederum Vitamin E regenerieren kann, sondern sie besitzt sogar die Fähigkeit, als Radikalfänger für Superoxid- ($O_2^{\cdot -}$) und Peroxyl-Radikale (HO_2^{\cdot}) zu dienen [Packer, 1998 und Packer, 1999].

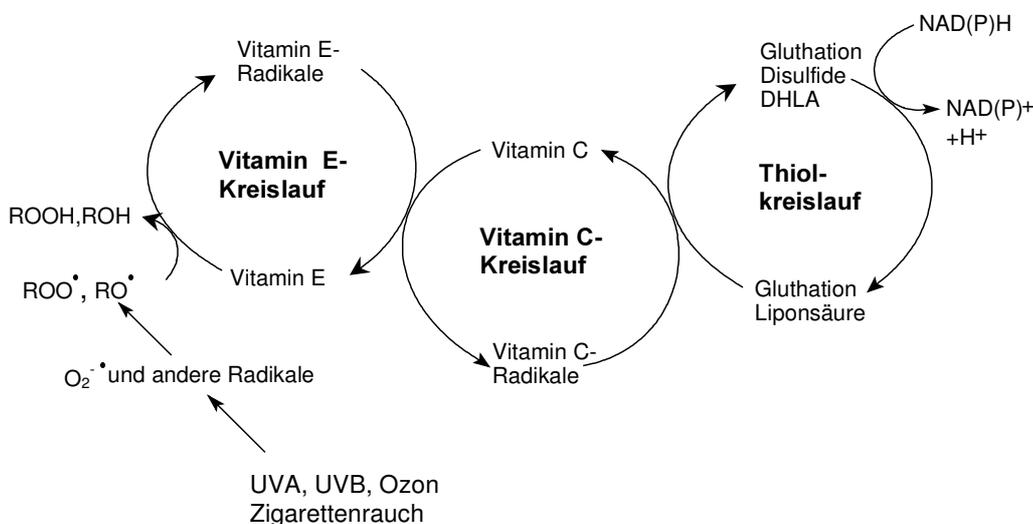


Abb. 11: Zusammenspiel und Regeneration der verschiedenen Antioxidantien [Packer, 1998 und 1999]. Vitamin E wird zum Vitamin E - Radikal, wenn dieses Lipidperoxid-Radikale abfängt. Diese so entstandenen Vitamin E - Radikale können durch die Reaktion mit Vitamin C wieder regeneriert werden. Vitamin C - Radikale, die durch die Reaktion mit Vitamin E - Radikalen gebildet wurden, können über die Reaktion mit Thiol-Antioxidantien (Dihydroliponsäure oder reduziertes Glutathion) wieder regeneriert werden.

Wirkung als Chelatkomplexbildner

Dihydroliponsäure und α -Liponsäure sind in der Lage über ihre Carboxylgruppe und über die Schwefelatome Chelatkomplexe mit Metallionen einzugehen und können somit als Antioxidantien wirken. Die antioxidative Eigenschaft kommt dadurch zustande, daß entweder ein Komplex gebildet wird, in dem alle Koordinationsstellen für O_2 besetzt sind oder wenn die Elektronendichte von dem Metallion zum Chelatkomplexbildner ausgeglichen ist und dadurch kein Elektron zum O_2 transferiert werden kann [Moini et al, 2002].

Die antioxidative Eigenschaft als Chelatkomplexbildner hat in-vivo eine bedeutende Rolle in dem Entstehungsprozess von freien Radikalen im Organismus. Obwohl der genaue Mechanismus der Entstehung noch nicht bekannt ist, weiß man, daß Chelatkomplex bildende Stoffe Lipidperoxidation verhindern können.

Zum Beispiel wird das Metallion Cu^{2+} als ein Katalysator für die liposomale Peroxidation und die Ascorbinsäure-Oxidation angesehen [Peimian et al, 1995 und Biewenga et al, 1997a]. Die Chelatkomplexbildung von Cu^{2+} kann daher den Organismus vor „oxidativem Stress“ schützen.

Weitere Beispiele für antioxidative Schutzsysteme sind Transferrin und Ceruloplasmin, die Eisen-Ionen binden und dadurch die Entstehung der durch die Metalle katalysierten freien Radikale verhindern [Packer, 1998]. Außerdem kann die Glukose-Autooxidation durch geringe Spuren von Metallen ausgelöst werden. Dabei entstehen Hydrogenperoxide und Proteinfragmente, die „oxidativen Stress“ im Organismus erzeugen [Packer, 1999].

α -Liponsäure ist in der Lage Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} und Pb^{2+} vermutlich alleine über die Carboxylgruppe zu binden. Eine andere Möglichkeit der Komplexbildung kann über die zwei Schwefelatome erfolgen.

Zum Beispiel wird Phenylarsenoxid über diesen Weg komplexiert, indem sich ein Sechser-Ring um das Arsen bildet. Die Dihydroliponsäure ist in der Lage, Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} und Fe^{3+} als Chelatkomplex zu binden [Biewenga et al, 1997a; Moini et al, 2002].

In den Arbeiten von Ou et al wurde die Metallkomplexbildungseigenschaft von α -Liponsäure am Beispiel von Cu^{2+} untersucht. Es zeigte sich, daß die Cu^{2+} -katalysierte Ascorbinsäure-Oxidation unter Zugabe von α -Liponsäure (eingesetzte Konzentration: 100 $\mu\text{mol/l}$) gehemmt werden konnte. Die Wirkung der α -Liponsäure (eingesetzte Konzentration: 250 $\mu\text{mol/l}$) auf die Cu^{2+} -katalysierte Peroxidation wurde über das Ausmaß der Hydroperoxid-Kumulation bestimmt. Auch hier zeigte die Testsubstanz einen inhibitorischen Effekt durch die Cu^{2+} -Komplexbildende Eigenschaft. Die R-Form zeigte eine geringfügig bessere Wirkung als die S-Form [Ou et al, 1995]. Außerdem verhindert α -Liponsäure die Cd^{2+} -induzierte Lipidperoxidation in Hirn und Herzgeweben [Sumathi et al, 1994; Biewenga et al, 1997b].

Regulation des Blutzuckerspiegels durch Regeneration des Vitamin C

Packer beschreibt in seinen Arbeiten eine mögliche Erklärung, wie die antioxidante Wirkung der α -Liponsäure mit dem therapeutischen Nutzen für die Glukoseverwertung in Zusammenhang gebracht werden kann (Abbildung 12). Vitamin C (Ascorbinsäure) wird durch die bei Diabetes vermehrt vorliegenden freien Radikale zur Dehydroascorbinsäure oxidiert. Diese tritt nun wiederum mit der Glukose in Konkurrenz, um über das Glukosetransport-System (GLUT) in die Zellen aufgenommen zu werden, was zu einer verminderten Glukoseaufnahme und zu einer Zunahme der Überzuckerung führt.

Gibt man nun α -Liponsäure, wird diese in die Zelle transportiert, im Zellinneren reduziert und kann von den Zellen als Dihydroliponsäure exportiert werden. Im extrazellulären Raum kann diese nun, wie schon erläutert, die Dehydroascorbinsäure reduzieren und somit die Insulin unabhängige Glukoseaufnahme-fähigkeit der Zellen wieder verbessern [Packer, 1998].

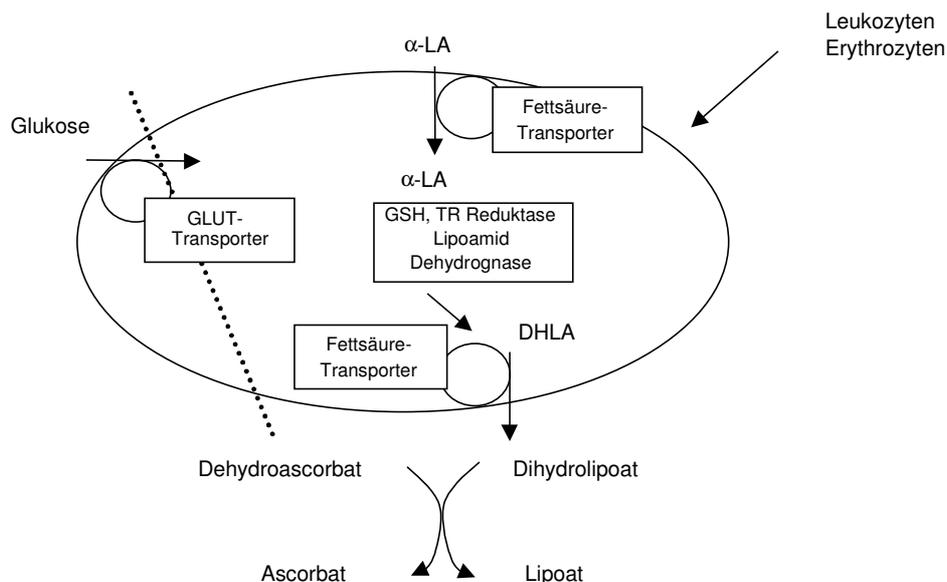


Abb. 12: Ein möglicher Erklärungsansatz, wie α -Liponsäure die Insulin unabhängige Glukoseaufnahme in die Zelle stimuliert. Dihydroliponsäure (DHHLA) erhöht das Ascorbat / Dehydroascorbat-Verhältnis durch die Reduktion von Dehydroascorbat zu Ascorbat. Dadurch kann das Dehydroascorbat nicht mehr mit der Glukose konkurrieren, um über den GLUT-Transporter in die Zelle aufgenommen zu werden. Die exogen zugeführte α -Liponsäure wird in das Zellinnere transportiert, zu Dihydroliponsäure reduziert und in der reduzierten Form wiederum aus der Zelle transportiert. Die Reduktion wird durch die Enzyme Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (NADH-abhängiges Enzym, E3-Einheit), GSSG-Reduktase und Thioredoxin-Reduktase (NADPH-abhängiges Enzym) katalysiert [Packer, 1999].

Das Untersuchungsmodell Ratte

- In-vitro Untersuchungen**

Die Leber gilt als Hauptorgan für die Regulation der Glukose-Konzentration. In Leberfunktionsuntersuchungen von diabetischen Alloxan-Ratten konnte gezeigt werden, daß die unter diabetischen Bedingungen erhöhte Glukosefreisetzung bei der Behandlung von rac- α -Liponsäure wieder normalisiert werden konnte [Nishihata et al, 1988]. Die Untersuchungen wurden an der isolierten perfundierten Leber aus diabetischen Ratten im Vergleich zu normalen Ratten vorgenommen. Eine erhöhte Glukose-Konzentration im Perfusat erzeugt durch die Glukoneogenese war nur im diabetischen Tiermodell messbar und konnte durch die Zugabe von rac- α -Liponsäure im Perfusat (Konzentration 2,5 $\mu\text{mol/l}$) wieder normalisiert werden. Durch die Zufuhr von Acetoacetat in der Konzentration von 250 $\mu\text{mol/l}$ konnte aber die Glukose-Konzentration in perfundierten Leberorganen gesunder Tiere erhöht werden. Auch diese Erhöhung im Perfusat konnte durch die Zugabe von rac- α -Liponsäure (Konzentration 2,5 $\mu\text{mol/l}$) wieder normalisiert werden.

Für die Beantwortung der Frage, welchen Einfluß die R(+)- α -Liponsäure auf den Stoffwechsel in der Leber ausübt, wurden der Pyruvatmetabolismus und die Fettsäureoxidation in kultivierten Hepatozyten unter dem Einfluß von Dexlipotam untersucht. Diese Zellen stammten von Ratten, die mindestens 24 h nüchtern gesetzt wurden. Die Inkubation mit R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz (eingesetzte Konzentrationen: 25, 50, 100 und 200 μ mol/l) über eine Zeitdauer von 3 h, mit anschließendem Austausch des Zellmediums, führten zu einer Erhöhung der Pyruvatoxidation durch PDH-Aktivierung und gleichzeitig zu einer Erniedrigung der Glukoneogenese und der Fettsäureoxidation [Walgren et al, 2002].

• In-vivo Untersuchungen

In diabetischen Rattenmodellen wurde durch die Behandlung mit α -Liponsäure ein verstärkter Glukose-Metabolismus beobachtet, der auf das Niveau, das bei nicht diabetischen Tieren beobachtet wurde, angehoben werden konnte [Streeper et al, 1997; Jacob et al, 1996c; Khamaisi et al 1997].

Die α -Liponsäure wurde in diesen Arbeiten in 120 mmol/l Tris(hydroxymethyl)aminomethan Puffer (pH 7,4) gelöst und intraperitoneal, in den Bauchraum der Tiere appliziert.

In den Arbeiten von Khamaisi zeigte sich in diabetischen Streptozotocin-Ratten nach einer Mehrfachgabe von 30 mg/kg rac- α -Liponsäure über 10 Tage eine Reduktion der Blutglukose-Konzentrationen im gefütterten Zustand. Die Behandlung erhöhte die GLUT4-Proteinmenge und die Glukoseverwertung im Muskel. Die Insulin-Konzentration im Plasma wurden jedoch nicht beeinflusst. Die Messungen erfolgten 12 h nach der letzten Gabe und wurden mit den Ergebnissen von gleich behandelten Tieren, aber ohne Wirkstoffverabreichung, verglichen [Khamaisi et al, 1997].

In der übergewichtigen „Zucker-Ratte“, einem diabetischen Tiermodell mit Muskelinsulinresistenz, wurden zum einen die Wirkung der racemischen α -Liponsäure [Jacob et al, 1996c] und zum anderen die Wirkungsunterschiede zwischen der R- und S-Form untersucht [Streeper et al, 1997]. Den Tieren wurde, entweder der Wirkstoff als Einfachgabe (Dosierung 100 mg/kg) oder als Mehrfachgabe über 10 Tage (Dosierung 5 – 100 mg/kg rac- α -Liponsäure, 30 mg/kg R(+)- α -Liponsäure oder 50 mg/kg S(-)- α -Liponsäure) gegeben. Die Messung der Pharmakodynamik-Parameter erfolgte im akuten Behandlungsschema 1 h nach Applikation, im chronischen Behandlungsschema circa 20 h nach der letzten Injektion.

Die rac- α -Liponsäure verbesserte den Glukosestoffwechsel im Insulin resistenten Skelettmuskel. Sowohl die akute als auch die chronische Behandlung steigerten den Insulin stimulierten Glukosetransport. Die chronische Behandlung zeigte außerdem (30 mg/kg als effektive Dosis) eine Verstärkung der Insulin stimulierten Glukoseoxidation und der Glukogensynthese. Als Effekt konnten signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen von Insulin und Fettsäuren in den behandelten Tieren gemessen werden. Es wurde aber weder ein Einfluß auf die Proteinmenge der Glukosetransporter (GLUT4) beobachtet, noch wurde die Aktivität der Hexokinase und der Citratsynthese gesteigert [Jacob et al, 1996c].

Die späteren Untersuchungen mit der R- und S-Form der α -Liponsäure zeigten, daß der oben beschriebene Effekt nach akuter und chronischer Behandlung nur der R-Form zugeschrieben werden konnte. Die S-Form zeigte keinen Effekt auf die Plasmakonzentrationen von Insulin und Fettsäuren und nur eine geringe Verbesserung des Insulin stimulierten Glukosetransports [Streeper et al, 1997].

Durch eine intravenöse Einmalgabe von rac- α -Liponsäure (100 oder 60 mg/kg) konnte in diabetischen Streptozotocin Ratten die Glukoseproduktion inhibiert werden [Khamaisi et al, 1999]. Die präprandialen Glukose-Spiegel im Blut wurden 1 h nach Injektion drastisch reduziert und über 4 h auf dem niedrigen Niveau gehalten, ohne daß die Insulin-Konzentrationen beeinflusst wurden. Die α -Liponsäure-Behandlung bewirkte ein Absenken der CoA- und Acetyl-CoA-Konzentrationen und damit verbunden eine Inhibition der Pyruvat-Carboxylase in der Leber. Damit eignet sie sich als Wirkstoff, um der Überproduktion von Glukose als metabolische Abnormalität im Diabetes entgegenzuwirken.

Das Untersuchungsmodell Mensch

• In-vivo Untersuchungen

Die gewonnenen Erkenntnisse am Tier über den günstigen Effekt der α -Liponsäure auf den Glukosestoffwechsel, die muskuläre Glukoseaufnahme und die Glukoseverwertung konnten auch am Menschen bestätigt werden.

Um den Effekt auf den Glukosemetabolismus erfassen zu können, wurde die euglykämische Insulin-Clamp-Technik angewandt [DeFronzo et al, 1979]. Diese Untersuchungsmethode quantifiziert die Insulin stimulierte Glukoseaufnahme im Gesamtorganismus, erlaubt jedoch keine Aussage über den intrazellulären Stoffwechsel der Glukose oder über genauere Wirkmechanismen. Durch eine Insulin-Infusion wurde der Plasmainsulin-Spiegel über eine längere Zeit konstant auf einem hochphysiologischen Niveau gehalten. Zusätzlich wurde der präprandiale Glukose-Spiegel im Plasma auf ein definiertes Niveau eingestellt, indem die notwendige Glukosezufuhr individuell angepaßt wurde. Diese notwendige Glukose-Infusionsrate in Relation zu den erzeugten Insulin-Plasmaspiegeln wurde als indirekter Indikator für die Insulin-Sensitivität genutzt. Außerdem gab die Glukose-Infusionsrate in Relation zu dem Plasmaglukose-Spiegel unter Fließgleichgewichtsbedingungen ein Maß für die Effektivität der Glukoseverwertung und ein indirektes Maß für die Insulinresistenz (die metabolische Clearance-Rate). Je ausgeprägter die Insulinresistenz, um so geringer die Menge an Glukose, die zur Wahrung der Isoglykämie infundiert werden muß und umgekehrt.

Diese Quantifizierung der Insulin-Sensitivität gelingt aber nur, wenn die hepatische Glukoseproduktion total ausgeschaltet ist. Aber unter den Bedingungen der Hyperinsulinämie, die durch die Insulin-Infusion hervorgerufen wurde, konnte man davon ausgehen, daß die hepatische Glukoneogenese weitgehend ausgeschaltet war [Jacob et al, 1995, 1996a, 1996b und 1999a].

Zum ersten Mal konnte in klinischen Studien [Rett et al, 1995 und 1996; Jacob et al, 1995] gezeigt werden, daß eine akute parenterale Gabe von rac- α -Liponsäure zu einer deutlichen Verbesserung der Glukoseverwertung führte.

Mit Hilfe der euglykämischen Insulin-Clamp-Technik wurde direkt vor und nach der Gabe des Wirkstoffes die Insulin-Sensitivität gemessen und die Differenz individuell bestimmt. rac- α -Liponsäure wurde über 25 min als Infusion (1000 mg) gegeben, 30 min später wurde über 45 min die metabolische Clearance-Rate, ein Maß für die Effektivität der Glukoseverwertung, bestimmt. Gegenüber der gleich behandelten Placebogruppe (n=8) konnte durch die Gabe von rac- α -Liponsäure in Diabetikern (n=10) die Insulin-Sensitivität um 50 % gesteigert werden [Jacob et al, 1995, 1996a, 1996b].

Auch eine akute Behandlung bei einer Dosierung von 600 mg als Infusion erzielte eine Verbesserung der Glukoseverwertung [Rett et al, 1995 und 1996]. In einer Studie im Cross-over-Design wurden 12 übergewichtige Typ II - Diabetiker mit rac- α -Liponsäure behandelt. Die Insulin stimulierte Glukoseverwertung als metabolische Clearance-Rate, konnte gegenüber dem Nichtbehandlungszeitraum um 27 % gesteigert werden.

In einer weiteren Untersuchung der Testsubstanz wurde über 10 Tage jeweils einmal tägliche 500 mg rac- α -Liponsäure (n=19) oder Placebo (n=19) als Infusion verabreicht, am 11 Tag wurde die Wirkung auf die Insulin-stimulierte Glukoseverwertung untersucht [Jacob et al, 1995, 1996a und 1996b]. Die Quantifizierung erfolgte auch in dieser Studie mit einer euglykämischen Insulin-Clamp-Technik, die jeweils am Tag 0, also vor der Gabe und am Tag 11 durchgeführt wurde. Die letzte Infusion wurde mindestens 17 Stunden vor der zweiten Insulin-Clamp-Untersuchung gegeben. Auch hier konnten eine Verbesserung der metabolischen Clearance-Rate und der Insulin-Sensitivität um 30 % gezeigt werden. Die präprandialen Glukose- und Insulin-Plasmakonzentrationen zeigten keine Veränderungen nach der Behandlung. Eine Verbesserung zeigten nur die belastungsinduzierten Werte nach der Behandlung. Die Autoren erklärten dies mit der nur kurzen Behandlungsdauer und der kurzen Beobachtungszeit. Durch die pharmakokinetischen Eigenschaften der Substanz (Kapitel 2.2.3) konnte man aufgrund der langen Zeitdauer zwischen der letzten Wirkstoffgabe und der Messung der Insulin-Sensitivität ausschließen, daß diese Effekte nur durch die letzte Infusion hervorgerufen wurden.

Auch nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure über 4 Wochen konnte eine Verbesserung der Insulin stimulierten Glukoseverwertung und der Insulin-Sensitivität in Diabetikern gezeigt werden [Jacob et al, 1999a]. In dieser Studie wurde die Insulin-Clamp-Technik am Tag vor dem Behandlungsstart und 1 Tag nach der letzten Behandlung (Tag 29) angewendet. Die Gruppen bestanden aus einer Placebogruppe (n=19), und 3 behandelten Gruppen (600 mg einmal täglich (n=19), 600 mg zweimal täglich (n=18) und 600 mg dreimal täglich (n=18)).

Die metabolische Clearance-Rate, ein Maß für die Effektivität der Glukoseverwertung, konnte um 17 % unter Behandlung von α -Liponsäure unabhängig von der Dosierung gesteigert werden. Auch in dem längeren Behandlungszeitraum konnten keine Veränderungen in Glukose- und Insulin-Plasmaspiegeln im nüchternen Zustand beobachtet werden. Auf Grund der präklinischen Erkenntnisse vermutet man, daß nur die R-Form für die metabolische Aktivität verantwortlich sei, die S-Form als nicht natürliches Enantiomer hingegen sogar den gegenteiligen Effekt auslösen könnte, und daß weitere Studien mit der pharmakologisch wirksamen Substanz durchgeführt werden sollten [Streeper et al, 1997 und Estrada et al 1996].

Weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Glukoseverstoffwechslung wurden in Typ 2 – Diabetes-Patienten und in gesunden Probanden nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg) zweimal täglich über 4 Wochen durchgeführt [Konrad et al, 1999]. Die gewählten Gruppen wurden weiter in normal- und übergewichtige Patienten und Probanden unterteilt, jede Untergruppe umfaßte 10 Versuchspersonen. Am Tag 0 vor dem Behandlungsstart und am Tag 29, also 12 h nach der letzten Einnahme, wurde den über 10 – 12 h nüchternen Probanden und Patienten 75 g Glukose oral verabreicht. Zu verschiedenen Zeiten (0, 30, 60, 90 und 120 min nach dem Glukose-Toleranz-Test) wurde diesen Blut entnommen und die Glukose-, Insulin-, Pyruvat-, Laktat- und 3- β -Hydroxybutyrat-Konzentration wurden bestimmt.

Die 4-Wochen-Behandlung mit rac- α -Liponsäure zeigte eine signifikante Reduzierung der Laktat- und Pyruvat-Konzentrationen in beiden Patientengruppen um 46 %, sowohl im nüchternen Zustand als auch nach dem Glukose-Toleranz-Test. Die Absenkung der präprandialen Glukose-Konzentrationen durch die rac- α -Liponsäure-Behandlung konnte nur in normal gewichtigen Diabetikern beobachtet werden. Die Behandlung führte zu einer Steigerung der Insulinsensitivität von 22 % bei normal gewichtigen und 15 % bei übergewichtigen Diabetikern.

3. AUFGABENSTELLUNG

Das physiologische R(+)-Enantiomer der α -Liponsäure zeigte in diabetischen Tiermodellen eine positive Wirkung auf die durch die Stoffwechselkrankheit Typ II - Diabetes verursachten akuten Krankheitsbilder, wie verminderte Insulin stimulierte muskuläre Glukoseaufnahme, reduzierte nicht-oxidative und oxidative Glukoseverwertung sowie gesteigerte hepatische Glukoneogenese.

Am Menschen konnten bisher nur Studien mit der bereits zugelassenen rac- α -Liponsäure durchgeführt werden. Es wurden auch hier ähnliche Effekte beobachtet, die man auf das R(+)-Enantiomer zurückführt. Die Plasma-Pharmakokinetik ist bis heute nur nach Gabe der rac- α -Liponsäure für die beiden Enantiomeren untersucht worden. Es zeigten sich nur kurz meßbare Plasmakonzentrationen der R(+)- und der S(-)- α -Liponsäure (bis 4 h nach Substanzgabe), sowohl nach intravenöser als auch oraler Gabe der wirksamen Dosis (600 mg). Diese nur kurz meßbaren Plasmakonzentrationen des S(-)- wie auch des R(+)-Enantiomers (Kapitel 2.2.3) lassen keine zeitliche Korrelation zu den gemessenen Wirkungen der Substanz zu (> 12 h nach Substanzgabe, Kapitel 2.2.4). Es zeigte sich aber, daß gerade die Mehrfachgabe, im Tier wie auch im Menschen, eine wichtige Voraussetzung für die Wirkung der Substanz im Organismus darstellte. Die wirksame Dosis der Substanz konnte unter der chronischen Behandlung im Vergleich zur akuten Behandlung stark reduziert werden. Im Plasma konnte aber keine Kumulation und damit keine höheren und länger andauernden Konzentrationsspiegel nach mehrmaliger täglicher Gabe der rac- α -Liponsäure beobachtet werden, die die Dosisreduktion erklären könnten.

Wünschenswert ist es, mit Hilfe der Pharmakokinetik die Konzentration-(Dosis)-Wirkungsbeziehung des Arzneimittels sowohl nach einfacher als auch nach mehrfacher Gabe erklären zu können, um die optimale Dosierung bei der therapeutischen Anwendung gewährleisten zu können.

Möglicherweise geben aber die Untersuchungen mit radioaktiv markierter rac- α -Liponsäure nach einfacher und mehrfacher Gabe an Ratten einen Hinweis auf einen Unterschied in der Kinetik. Diese Studien zeigten eine deutlich längere Verweildauer der Radioaktivität, sowohl im Plasma, als auch noch stärker ausgeprägt in unterschiedlichen Geweberegionen (Kapitel 2.2.3). Es waren Unterschiede im kinetischen Verhalten der Radioaktivität im Plasma im Vergleich zu dem Gewebe erkennbar. Die Messung der Radioaktivität konnte aber keinen Aufschluß geben, wie sich diese Radioaktivitätskonzentrationen zusammensetzen. Setzt sich die gemessene Radioaktivität aus der Muttersubstanz alleine zusammen oder sind zusätzlich Metaboliten mit erfaßt worden?

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die in der Literatur beobachteten lang anhaltenden Wirkungen der R(+)- α -Liponsäure nach Gabe von rac- α -Liponsäure und von R(+)- α -Liponsäure (Dexlipotam), mit messbaren Konzentrationen des Wirkstoffes in Zusammenhang zu bringen, um erste Ansätze für die Korrelation zwischen der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik zu entwickeln und um die optimale Dosierung der Substanz zu bestimmen.

AUFGABENSTELLUNG

Mehrere Erklärungsansätze galt es zu untersuchen:

Gibt es Unterschiede in der Pharmakokinetik der R(+)- α -Liponsäure nach Gabe der R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz alleine im Vergleich zum Razemat?

Unterscheiden sich die Plasma- und Gewebekinetik nach Gabe der R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz?

Können mögliche wirksame Metaboliten im Plasma oder im Gewebe mit der Wirkung in Zusammenhang gebracht werden?

Wie sieht die Pharmakokinetik der Metaboliten im Plasma und im Gewebe aus?

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Reagenzien und Geräte allgemein

Referenz - Substanzen

Die eingesetzten Reinsubstanzen als Referenzverbindungen für die Bioanalytik wurden von der ASTA Medica AG, Abteilung Chemical Research (Frankfurt am Main) bezogen. Diese Verbindungen wurden auf ihre Reinheit, Stabilität und damit Tauglichkeit für Kalibrierzwecke für einen festgelegten Zeitraum untersucht und dies wurde in einem Analysenzertifikat dokumentiert.

• R,S- α -Liponsäure	Molmasse: 206,3 g/mol
• R(+)- α -Liponsäure	Molmasse: 206,3 g/mol
• R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz	Molmasse: 328,0 g/mol
• S(-)- α -Liponsäure	Molmasse: 206,3 g/mol
• Homoliponsäure	Molmasse: 234,3 g/mol
• Bisnorliponsäure	Molmasse: 178,3 g/mol
• Tetranorliponsäure	Molmasse: 150,2 g/mol
• 2,4-Bis(methylmercapto)butansäure	Molmasse: 180,3 g/mol
• 6,8-Bis(methylmercapto)octansäure	Molmasse: 236,4 g/mol
• 4,6-Bis(methylmercapto)hexansäure	Molmasse: 208,4 g/mol
• 10-Mercaptodecansäure	Molmasse: 204,3 g/mol

Chemikalien

Merck, Darmstadt, Deutschland

- Acetonitril, HPLC Grade Gradient
- Borsäure, p.a.
- 1-Butanol, p.a.
- $\text{CaCl}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, p.a.
- Chloroform, HPLC Grade Gradient
- Decansäure, zur Synthese
- Dichlormethan, p.a.
- Diethylether, p.a.
- D-Phenylalanin
- Essigsäure (96%), p.a.
- Ethanol abs., p.a.
- β -Glukuronidase/Arylsulfatase, 30/60 U/ml
- HCl 1 mol/l, p.a.
- HCl 2 mol/l, p.a.

- HCl konz. 37 % ig
- Heparin Natriumsalz p.a.
- n-Hexan, p.a.
- KCl, p.a.
- $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$, p.a.
- $KH_2PO_4 \cdot 3 H_2O$, p.a.
- Methanol, HPLC Grade Gradient
- $NaBH_4$, p.a.
- NaCl, p.a.
- $NaHCO_3$, p.a.
- $Na_2EDTA \cdot 2 H_2O$, p.a.
- Natriumsalz Heparin p.a.
- $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, p.a.
- $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$, p.a.
- NaOH 1 mol/l, p.a.
- NaOH 2 mol/l, p.a.
- o-Phthaldialdehyd
- 1-Octansulfonsäure Natriumsalz Monohydrat, p.a.
- Phosphorsäure (85 %), p.a.
- Phosphorsäure, in kristalliner Form, p.a.
- $SnCl_2 \cdot 2 H_2O$
- Toluol, p.a.
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, p.a.
- Zitronensäure Monohydrat, p.a.

Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA

- Urethan, p.a.

Für alle Versuche wurde entmineralisiertes Wasser über eine Millipore- Anlage zusätzlich aufbereitet. Das zur Extraktion in Methode 4.2.1 eingesetzte n-Hexan wurde mit einer basischen $SnCl_2$ -Lösung gewaschen und bei 4°C aufbewahrt.

Geräte

Vortex-Geräte	Janke & Kunkel
Water Purification System Milli-Q Plus	Milipore GmbH
Analysenwaage	Satorius
Laborwaage	Satorius
Comforpette, Multipipette plus, Reference-Pipetten, Varipette	Eppendorf
Kühlzentrifuge Kendro, Megafuge 1.0R	Heraeus
Horizontal-Schüttelmaschine	Heidolph-Elektro
Überkopf-Schüttelmaschine	Heidolph-Elektro
Magnetrührwerk-Heizgerät	Heidolph-Elektro
Mikroprozessor-pH-Meter	Schott-Geräte
Ultraschallbad	Bandelin Elektronik

Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Eppendorf / Brand
Reaktionsgefäße, Safe-Lock, 1,5 ml	Eppendorf
PP-Röhrchen, Minisorb	Nagle Nunc Int.
Spitzröhrchen, 15 ml	Sarstedt
HPLC-Gefäße (Vials und Caps)	Abimed Analysen-Technik

4.2 Reagenzien und Geräte der einzelnen bioanalytischen Methoden

4.2.1 Enantioselektive HPLC-Methode zur Bestimmung von R(+)- und S(-)-LA in Plasma

Geräte

HPLC-Ausstattung	Hewlett Packard (Agilent)	Autosampler / Pumpe: System 1100 Interface: 35900 E
	Hewlett Packard (Agilent)	HP-Chemstation 2D Software
	bai-Kratos Jasco	Fluoreszenz Detektor Spectroflow Fluoreszenz Detektor FP-1520 Anregungswellenlänge: 230 nm Emissionswellenlänge: 418 nm (Analysen-Methode für Rattenplasma) Emissionswellenlänge: 430 nm (Analysen-Methode für Humanplasma)
Vorsäulenmaterial	Merck	Reversed-phase Silicagel; LiChroCART, LiChrospher 60, RP- Select B, 5 µm, 4 mm x 4 mm
Trennsäulenmaterial	Merck	Reversed-phase Silicagel; LiChroCART, LiChrospher 60, RP- Select B, 5 µm, 250 mm x 4 mm
Säulentemperatur		35 °C
Injektionsvolumen		20, 50 oder 100 µl (Analysen-Methode für Rattenplasma) 40 µl (Analysen-Methode für Humanplasma)
Eluent		55 % Eluent A und 45 % Eluent B Flußrate: 1,7 ml/min
Plasmaaufbereitung	Van der Heijden	Vakuumpumpe mit Aquastop
	Jouan	Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer RC10.22

Lösungen

SnCl₂-Lösung:

0,1 mol/l SnCl₂ · 2 H₂O (in 2 mol/l NaOH)

Derivatisierungsreagenz:

0,01 mol/l o-Phthaldialdehyd (in Ethanol abs.) und 0,01 mol/l D-Phenylalanin (in 0,01 mol/l H₃PO₄)

Mischungsverhältnis: 1 + 1 (v / v)

Extraktionsmittel:

n-Hexan und Butanol

Mischungsverhältnis: 99 + 1 (v / v)

Boratpuffer:

0,2 mol/l wässrige Borsäure, pH 9,2 (2 mol/l NaOH)

Phosphorsäure:

0,5 mol/l H₃PO₄ (in H₂O)

Na₂EDTA-Lösung:

0,1 mol/l Na₂EDTA · 2 H₂O (in H₂O)

Phosphatpuffer:

1 mol/l NaH₂PO₄ · 2 H₂O (in H₂O)

Anorganischer Fließmittelanteil (Eluent A):

0,02 mol/l K₂HPO₄ · 3 H₂O (in H₂O), pH 5,8 (Phosphorsäure (85 %))

Organischer Fließmittelanteil (Eluent B):

Acetonitril und Methanol

Mischungsverhältnis: 1 + 1 (v / v)

R(+)- α -Liponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml R(+)- α -Liponsäure gelöst in Acetonitril

S(-)- α -Liponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml S(-)- α -Liponsäure gelöst in Acetonitril

10-Mercaptodekansäure-Stammlösung:

1 mg/ml 10-Mercaptodekansäure gelöst in Methanol

Interner Standard-Arbeitslösung:

100 μ l der S(-)- α -Liponsäure-Stammlösung oder 10-Mercaptodekansäure-Stammlösung wurden in 50 ml 0,001 mol/l NaOH verdünnt – 50 μ l wurden dem jeweiligen Kalibrationsstandard, dem jeweiligen Qualitätsstandard und der zu messenden Rattenplasmaprobe (0,5 ml) hinzugefügt (Konzentration in der Probe: 200 ng/ml).

200 μ l der S(-)- α -Liponsäure-Stammlösung wurden in 50 ml Acetonitril verdünnt – 100 μ l wurden dem jeweiligen Kalibrationsstandard, dem jeweiligen Qualitätsstandard und der zu messenden Humanplasmaprobe (1 ml) hinzugefügt (Konzentration in der Probe 400 ng/ml).

R(+)- α -Liponsäure-Kalibrationslösungen:

R(+)- α -Liponsäure-Stammlösung wurde mit Acetonitril in der Form verdünnt, so daß unterschiedlichen Kalibrationslösungen (siehe untenstehende Tabelle) erhalten wurden. Jeweils 10 μ l der Kalibrationslösungen wurden zu 500 μ l Rattenplasma oder zu 1 ml Humanplasma hinzugefügt.

Die Qualitätsstandards wurden in der gleichen Art und Weise mit einer neu angesetzten Stammlösung hergestellt.

S(-)- α -Liponsäure-Kalibrationslösungen (für die Bestimmung des R- und S-Enantiomers):

S(-)- α -Liponsäure-Stammlösung wurde mit Acetonitril in der Form verdünnt, so daß unterschiedlichen Kalibrationslösungen (siehe untenstehende Tabelle) erhalten wurden. Jeweils 10 μ l der Kalibrationslösungen wurden zu 500 μ l Rattenplasma oder zu 1 ml Humanplasma hinzugefügt.

Die Qualitätsstandards wurden in der gleichen Art und Weise mit einer neu angesetzten Stammlösung hergestellt.

Kalibrationsstandards:

Standard	Rattenplasma-Methode	Humanplasma-Methode
	Konzentration [ng/ml]	Konzentration [ng/ml]
I	15	2,5
II	30	5
III	50	7,5
IV	100	15
V	200	25
VI	500	50
VII	1000	100
VIII	1500	250
IX	2000	500
X	3000	750
XI	5000	1000
XII	-	1500

Qualitätsstandards:

Standard	Rattenplasma-Methode	Humanplasma-Methode
	Konzentration [ng/ml]	Konzentration [ng/ml]
LOW	100	15
MID	1000	250
HIGH	4500	1000

Humanplasma (Leerplasma):

Blut wurde von mehreren gesunden Probanden (Kapitel 4.6.2.1) entnommen, die keine Medikamente über die letzten 4 Wochen eingenommen hatten und mindestens 12 h vor der Blutentnahme nüchtern waren. Das antikoagulierte Blut (NH₄-Heparin) wurde 10 min bei 2000 g zentrifugiert (4 °C) und das so erhaltene Plasma abgetrennt.

Rattenplasma (Leerplasma):

Blut wurde mehreren gesunden Ratten entnommen (Kapitel 4.6.1.1), die mindestens 12 h vor der Blutentnahme nüchtern gesetzt wurden. Das antikoagulierte Blut (NH₄-Heparin) wurde dann 10 min bei 2000 g zentrifugiert (4 °C) und das so erhaltene Plasma gewonnen.

(bestellt von der Firma Charles River)

4.2.2 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA in Gewebehomogenaten

Geräte

HPLC-Ausstattung	Hewlett Packard (Agilent)	Autosampler / Pumpe: System 1100 Interface: 35900 E
	Hewlett Packard (Agilent)	HP-Chemstation 2D Software
	Metrohm	Elektrochemischer Detektor 656 641 VA-detector (Strom-/Spannungsmessgerät) Spannung 1200 mV
	Resteck	pulse dampner (low cost LO-Pulse)
Trennsäulenmaterial	Merck	Reversed phase Silicagel; LiChroCART, LiChrospher 100, RP-18, 5 µm, 250 mm x 4 mm
Eluent		60 % Eluent A und 40 % Eluent B Flußrate: 1,0 ml/min
Gewebeaufbereitung	Schütt Labortechnik	Homogen
	Jahnke und Kunkel	Ultra Turax

Lösungen

Phosphatpuffer I:

0,5 mol/l $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (in H_2O), pH 3,5 (Phosphorsäure (85 %))

Phosphatpuffer II:

0,1 mol/l Na_2HPO_4 , 0,1 mol/l $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (in H_2O), pH 7,0 (Phosphorsäure (85 %))

Anorganischer Fließmittelanteil (Eluent A):

13,3 mmol/l Zitronensäure $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 8,15 mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 mmol/l Octansulfonsäure (Ionenpaarreagenz), 0,05 mmol $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Komplexbildner für Metallionen) in H_2O gelöst - pH 6,0 (2 mol/l NaOH)

Organischer Fließmittelanteil (Eluent B):

Methanol

Trispuffer:

0,1 mol/l Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 5 mmol/l $\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 70 % H_2O und 30 % Methanol gelöst

Homoliponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml Homoliponsäure gelöst in Acetonitril

Interner Standard -Arbeitslösung:

10 µl der Homoliponsäure-Stammlösung wurden in 990 µl HPLC-Eluent verdünnt (1 + 99, v / v), anschließend 500 µl dieser Lösung mit 500 µl HPLC-Eluent verdünnt (1 + 1, v / v) – resultierende Konzentration 5 µg/ml – 10 µl dieser Lösung wurden dem jeweiligen Kalibrationsstandard, dem jeweiligen Qualitätsstandard und der zu messenden Gewebeprobe (200 µl Muskelhomogenat ≈ 50 mg Muskelgewebe) zugesetzt (Konzentration in der Probe 50 ng / 200 µl).

R(+)-α-Liponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml R(+)-α-Liponsäure gelöst in Acetonitril

R(+)-α-Liponsäure-Kalibrationslösung:

die R(+)-α-Liponsäure-Stammlösung wurde 1 + 99 (v / v) mit dem HPLC-Eluent verdünnt (Konzentration 10 µg/ml) – weitere Verdünnungen erfolgen im HPLC-Eluent zu Kalibrationslösungen verschiedener Konzentrationen (siehe unterstehende Tabelle). Jeweils 10 µl der jeweiligen Kalibrationslösung wurden 200 µl Muskelhomogenat zugesetzt.

(Kalibrationsbereich: 5 – 400 ng/ml Muskelhomogenat ≙ 20 – 1600 ng/g Muskel)

Die Qualitätsstandards wurden in der gleichen Art und Weise mit einer neu angesetzten Stammlösung hergestellt (siehe unterstehende Tabelle).

Kalibrationsstandards:

Standard	Konzentration [ng/ml]
I	5
II	10
III	20
IV	30
V	40
VI	50
VII	100
VIII	150
IX	250
X	300
XI	400

Qualitätsstandards:

Standard	Konzentration [ng/ml]
LOW	25
MID	125
HIGH	375

Muskelgewebe (Leergewebe):

Muskelgewebe für Kalibrationszwecke wurde mehreren gesunden und unbehandelten Ratten entnommen (Kapitel 4.6.1.1).

4.2.3 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, TNLA und BNLA in Gewebedialysaten

Geräte

HPLC-Ausstattung Methode TSP	Thermo Separation Products (Thermofinigan)	Autosampler: AS 3000 Pumpe: Spectra System, P2000 Interface: SP 4510
	Hewlett Packard (Agilent)	Programmierbarer elektrochemischer Detektor (ECD), 1049A Spannung: + 1100 - 1200 mV Stromstärke: 0,5 μ A
	Scientifix Software	A/D-Wandler SS 420
	Thermo Quest Corporation	Chrom Quest 2.51
Eluent		63 % Eluent A und 37 % Eluent B Flußrate: 1.0 ml/min
Trennsäulenmaterial	Merck	Reversed phase silicagel: LiChroCART LiChrospher 100, RP-18, 5 μ m, 250 mm x 4 mm;
HPLC-Ausstattung Methode HP	Hewlett Packard (Agilent)	System 1100
		Programmierbarer elektrochemischer Detektor (ECD), 1049A Spannung: + 1100 - 1200 mV
		HP Chemstation 2D Software
Eluent		63 % Eluent A und 37 % Eluent B Flußrate: 1.0 ml/min
Trennsäulenmaterial	Merck	Reversed phase silicagel: LiChroCART LiChrospher 100, RP-18, 5 μ m, 250 mm x 4 mm;

Lösungen

Anorganischer Fließmittelanteil (Eluent A):

0,05 mol/l KH_2PO_4 (in H_2O gelöst), pH 2,3 (Phosphorsäure (85 %))

Organischer Fließmittelanteil (Eluent B):

Acetonitril

Ringerlösung:

145 mmol NaCl, 1,3 mmol/l CaCl_2 , 0,4 mmol/l KCl – pH 7,2 (2 mol/l HCl)

Homoliponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml Homoliponsäure gelöst in Acetonitril

Interner Standard-Arbeitslösungen I und II:

Folgende Arbeitslösungen wurden angesetzt, Arbeitslösung I diente zum Ansetzen der Kalibrationsstandards und der Qualitätsstandards. Arbeitslösung II diente dazu, um die zu messende Probe zu verdünnen. Die Endkonzentration des internen Standards betrug sowohl in der Probe, als auch in dem Kalibrations- und Qualitätsstandard jeweils 500 ng/ml.

- I: 50 µl der Homoliponsäure-Stammlösung wurden in 9,95 ml HPLC-Eluent verdünnt (1 + 199, v / v) – resultierende Konzentration 5 µg/ml.
- II: 10 µl der Homoliponsäure-Stammlösung wurden in 990 µl HPLC-Eluent verdünnt (1 + 99, v / v) – resultierende Konzentration 10 µg/ml, 857,1 µl dieser Lösung wurden auf ein Gesamtvolumen von 10 ml HPLC-Eluent verdünnt - resultierende Konzentration 857,1 ng/ml.

R(+)-α-Liponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml R(+)-α-Liponsäure gelöst in Acetonitril

Bisnorliponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml Bisnorliponsäure gelöst in Acetonitril

Tetranorliponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml Tetranorliponsäure gelöst in Acetonitril

R(+)-α-Liponsäure-, Bisnorliponsäure- oder Tetranorliponsäure-Kalibrationslösung:

Die R(+)-α-Liponsäure-, die Bisnorliponsäure- und die Tetranorliponsäure-Stammlösung wurden jeweils 1 + 99 (v / v) mit dem HPLC-Eluent verdünnt (jeweilige Konzentration: 10 µg/ml) – weitere Verdünnungen erfolgten im HPLC-Eluent zu Kalibrationslösungen verschiedener Konzentrationen.

Jeweils 100 µl der jeweiligen Kalibrationslösung (LA, BNLA und TNLA), 100 µl Ringerlösung, sowie 100 µl der internen Standard-Arbeitslösung I wurden mit 500 µl HPLC-Eluent auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. 100 µl wurden als Kalibrationslösung in die HPLC-Anlage injiziert.

Kalibrationsstandards:

Standard	Methode TSP			Methode HP		
	Konzentration [ng/ml]			Konzentration [ng/ml]		
	LA	BNLA	TNLA	LA	BNLA	TNLA
I	20	10	5	15	10	2
II	30	15	10	20	15	5
III	50	30	20	30	30	10
IV	100	50	40	50	50	20
V	200	100	70	100	100	40
VI	500	200	120	200	200	80
VII	1000	500	200	400	400	150
VIII	2000	1000	300	800	800	300

Die Qualitätsstandards wurden in der gleichen Art und Weise mit einer neu angesetzten Stammlösung hergestellt.

Qualitätsstandards:

Standard	Methode TSP			Methode HP		
	Konzentration [ng/ml]			Konzentration [ng/ml]		
	LA	BNLA	TNLA	LA	BNLA	TNLA
LOW	30	40	10	30	15	10
MID	100	-	30	100	50	40
HIGH	1000	500	200	400	200	150

Mikrodialyseprobe / in-vitro Testlösung / in-vivo Testlösung (4.5.3):

Verdünnung der Probe oder der Testlösung erfolgte zu einem Gesamtvolumen von 120 µl: 70 µl der interner Standard-Arbeitslösung II (entspricht 60 ng Homoliponsäure) + 50 µl der Probe, oder der Testlösung – Injektionsvolumen 100 µl (Verdünnungsfaktor: 2,4 für die Berechnung der Konzentration in ng/ml).

4.2.4 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA und BNLA in Plasma und Urin

Geräte

HPLC-Ausstattung	Knauer	WellChrom MiniStar K-500 mit Injektionsventil Rheodyne 7725i
	Knauer	Knauer HPLC-Auswertesoftware 2.11 TableCurve2D V 4.01
	Thermo Separation Products (ThermoFinnigan)	Elektrochemischer Detektor 2000 mit Standardzelle pulse mode + 1,2 V (550 ms), + 1,3 V (400 ms), -0,45 V (70 ms) (Methode Plasma) + 1,2 V (650 ms), + 1,4 V (550 ms), -0,6 V (70 ms) (Methode Urin)
Trennsäulenmaterial	SEPSERV	Hauptsäule: Ultrasep ES Pharm RP8E, 5 µm, 100 mm x 3 mm (Methode Plasma) Ultrasep ES Pharm RP18, 5 µm, 150 mm x 3 mm (Methode Urin)
	SEPSERV	Vorsäule Ultrasep ES Pharm RP8E, 5 µm, 10 mm x 3 mm
Eluent		71,5 % Eluent A und 28,5 % Eluent B (Methode Plasma) 69 % Eluent A und 31 % Eluent B (Methode Urin) Flußrate: 0,55 ml/min
Festphasen-Extraktion:	Gilson Aspec XL	Bakerbond spe Phenyl-Säulen

Lösungen

Anorganischer Fließmittelanteil (Eluent A):

0,05 mol/l KH₂PO₄ (in H₂O gelöst) - pH 2,5 (H₃PO₄ 85 %) (Methode Plasma)

0,05 mol/l KH₂PO₄ (in H₂O gelöst) - pH 2,3 (H₃PO₄ 85 %) (Methode Urin)

Organischer Fließmittelanteil (Eluent B):

Acetonitril

Enzypuffer:

0,1 mol/l Zitronensäure-Monohydrat-Lösung und 0,2 mol/l Na₂HPO₄

Mischungsverhältnis: 44,7 + 55,3 (v / v)

Enzymlösung:

β-Glukuronidase/Arylsulfatase wurde in Enzypuffer 1 + 99 (v / v) verdünnt.

Kalibrationslösungen für Plasma:

Alle verwendeten Substanzen wurden in Acetonitril gelöst, entsprechend verdünnt, im Stickstoffstrom bei 40°C eingedampft und anschließend in 200 µl entmineralisiertem Wasser gelöst – diese wässrigen Lösungen verschiedener Konzentrationen wurden dem Leerplasma zugesetzt, um folgende Kalibrationsstandards zu erhalten.

Kalibrationsstandards:

Standard	Methode Plasma					
	Konzentration [nmol/ml]					
	LA	BMOA	BMHA	BMBA	BNLA	TNLA
I	0,05	0,25	0,25	0,25	0,02	0,20
II	0,125	0,50	0,50	0,50	0,04	0,40
III	0,30	1,0	1,25	1,00	0,10	1,01
IV	0,75	1,75	2,50	2,00	0,20	2,02
V	2,00	3,75	5,00	3,50	0,40	4,03
VI	5,00	5,00	10,0	5,00	1,00	10,09
VII	10,0	-	20,0	10,0	2,00	20,17
VIII	20,0	-	40,0	15,0	4,00	40,34
IX	35,0	-	70,0	20,0	8,00	80,68
X	50,0	-	100	25,0	-	-

Die Qualitätsstandards wurden in der gleichen Art und Weise hergestellt.

Qualitätsstandards:

Standard	Methode Plasma					
	Konzentration [nmol/ml]					
	LA	BMOA	BMHA	BMBA	BNLA	TNLA
LOW	0,125	0,50	0,50	0,50	-	-
MID	2,00	3,75	5,00	3,50	-	-
HIGH	20,0	-	40,0	15,0	-	-

Kalibrationslösungen für Urin:

Alle verwendeten Substanzen wurden in Acetonitril gelöst, entsprechend verdünnt und dem Urin unbehandelter Probanden in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt, um folgenden Konzentrationsbereich zu erhalten.

Kalibrationsstandards:

Standard	Methode Urin					
	Konzentration [nmol/ml]					
	LA	BMOA	BMHA	BMBA	BNLA	TNLA
I	0,75	3,00	2,00	2,00	1,00	1,00
II	1,50	6,00	5,00	4,00	2,00	4,00
III	3,50	15,0	12,5	12,5	5,00	10,0
IV	7,50	30,0	50,0	35,0	15,0	25,0
V	20,0	75,0	200	100	35,0	75,0
VI	50,0	200	1000	250	100	250
VII	150,0	500	5000	750	250	500

Die Qualitätsstandards wurden in der gleichen Art und Weise hergestellt.

Qualitätsstandards:

Standard	Methode Urin					
	Konzentration [nmol/ml]					
	LA	BMOA	BMHA	BMBA	BNLA	TNLA
LOW	1,50	6,00	5,00	4,00	2,00	4,00
MID	7,50	30,0	50,0	35,0	15,0	25,0
HIGH	50,0	200	1000	250	100	250

Humanplasma (Leerplasma):

Blut wurde von mehreren gesunden Probanden entnommen (Kapitel 4.6.2.1) die keine Medikamente über die letzten 4 Wochen eingenommen hatten und mindestens 12 h vor der Blutentnahme nüchtern waren. Das antikoagulierte Blut (NH₄-Heparin) wurde 10 min bei 2000 g zentrifugiert (4°C) und das so erhaltene Plasma abgetrennt.

Humanurin (Leerurin):

Urin wurde von mehreren gesunden Probanden gesammelt (4.6.2.1), die keine Medikamente über die letzten 4 Wochen eingenommen hatten.

Die Methodenentwicklung und die Validierung wurden in der Universität in Leipzig durchgeführt [Teichert und Preiß, 2000].

4.2.5 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, TNLA und BNLA in Plasma

Geräte

HPLC-Ausstattung	Hewlett Packard (Agilent)	Autosampler / Pumpe: System1100 Interface: 35900 E HP Chemstation LC 3D Software
	ESA	Elektrochemischer Detektor Coulochem II Modell 5200 A Analytische Zelle Modell 5010 1. Zelle Spannung: + 450 mV Stromstärke: 500 nA 2. Zelle Spannung: + 800 mV Stromstärke: 5 µA Schutzzelle Modell 5020 Spannung: + 900 mV
	Alltech	Solvent Recycler 3000
Eluent		63 % Eluent A und 37 % Eluent B Flußrate: 1,5 ml/min
Trennsäulenmaterial	Agilent	Hauptsäule: Reversed phase silicagel ZORBAX SB-C 18, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm Vorsäule: ZORBAX Guard Columns 12,5 mm x 4,6 mm
Plasmaaufbereitung	Van der Heijden	Vakuumpumpe mit Aquastop
	Jouan	Vakuum-Zentrifugal-Verdampfer RC10.22

Lösungen

Anorganischer Fließmittelanteil (Eluent A):

0,05 mol/l KH_2PO_4 (in H_2O gelöst), pH 2,3 (Phosphorsäure (85 %))

Organischer Fließmittelanteil (Eluent B):

Acetonitril

Extraktionsmittel:

Diethylether und Dichlormethan

Mischungsverhältnis: 2 + 1 (v / v)

Homoliponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml Homoliponsäure gelöst in Acetonitril

Interner Standard-Arbeitslösung:

Die Konzentration des internen Standards betrug sowohl in der Probe als auch in dem Kalibrationsstandard 300 ng/ml (Humanmethode).

15 µl der Homoliponsäure-Stammlösung wurden in 985 µl HPLC-Eluent verdünnt 1 + 64,66; (v / v) – resultierende Konzentration 15000 ng/ml – 10 µl wurden dem jeweiligen Kalibrationsstandard, Qualitätsstandard und der zu messenden Probe (0,5 ml) hinzugefügt.

Für die Konzentrationsbestimmung in den Rattenproben wurde ein geringeres Probenvolumen verwendet, die Aufarbeitung blieb unverändert.

15 µl der Homoliponsäure-Stammlösung wurden in 985 µl HPLC-Eluent verdünnt 1 + 64,66; (v / v) – resultierende Konzentration 15000 ng/ml – 10 µl wurden dem jeweiligen Qualitätsstandard und der zu messenden Probe (0,1 ml) hinzugefügt.

R(+)- α -Liponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml R(+)- α -Liponsäure gelöst in Acetonitril

Bisnorliponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml Bisnorliponsäure gelöst in Acetonitril

Tetranorliponsäure-Stammlösung:

1 mg/ml Tetranorliponsäure gelöst in Acetonitril

R(+)- α -Liponsäure-, Bisnorliponsäure- oder Tetranorliponsäure-Kalibrationslösung:

die R(+)- α -Liponsäure-, die Bisnorliponsäure- und die Tetranorliponsäure-Stammlösung wurden jeweils 1 + 99 (v / v) mit dem HPLC-Eluent verdünnt (jeweilige Konzentration: 10 µg/ml) – weitere Verdünnungen erfolgen im HPLC-Eluent zu Kalibrationslösungen verschiedener Konzentrationen. Jeweils 10 µl der jeweiligen Kalibrationslösung wurden zu 0.5 ml Plasma hinzugefügt.

Kalibrationsstandards:

Standard	Konzentration [ng/ml]		
	LA	BNLA	TNLA
I	5	1	1
II	7,5	2	2
III	10	5	5
IV	20	10	7,5
V	50	20	10
VI	100	50	20
VII	200	75	30
VIII	500	150	50

Die Qualitätsstandards wurden in der gleichen Art und Weise mit einer neu angesetzten Stammlösung hergestellt.

Qualitätsstandards:

Standard	Konzentration [ng/ml]		
	LA	BNLA	TNLA
LOW	15	5	3
MID	50	20	10
HIGH	200	70	25

Humanplasma (Leerplasma):

Blut wurde von mehreren gesunden Probanden (Kapitel 4.6.2.1) entnommen, die keine Medikamente über die letzten 4 Wochen eingenommen hatten und mindestens 12 h vor der Blutentnahme nüchtern waren. Das antikoagulierte Blut (NH₄-Heparin) wurde 10 min bei 2000 g zentrifugiert (4 °C) und das so erhaltene Plasma abgetrennt.

Rattenplasma (Leerplasma):

Blut wurde mehreren gesunden Ratten entnommen (Kapitel 4.6.1.1) die mindestens 12 h vor der Blutentnahme nüchtern gesetzt wurden. Das antikoagulierte Blut (NH₄-Heparin) wurde dann 10 min bei 2000 g zentrifugiert (4 °C) und das so erhaltene Plasma gewonnen.
(bestellt von der Firma Charles River)

4.2.6 Bestimmung der Plasmaproteinbindung von LA

Geräte

Filtrationsröhrchen	Centrisart	Centrisart® I Typ SM 13229 (5000 D Filtrationsgrenze)
	Schütt	Wasserbad

Lösungen

Phosphatpuffer:

5 mmol/l NaH₂PO₄ , 20 mmol/l Na₂HPO₄, 5 mmol/l KCl und 120 mmol/l NaCl (in H₂O gelöst) - pH 7,4 (2 mol/l NaOH)

Dexlipotam-Stammlösung:

1,59 mg/ml R(+)-α-Liponsäure als Trometamolsalz (Dexlipotam) gelöst in Acetonitril – entspricht der Konzentration 1 mg/ml bezogen auf R(+)-α-Liponsäure

R(+)- α -Liponsäure-Arbeitslösungen:

Die Konzentrationen 10000, 2000, 500 ng/ml der Arbeitslösungen wurden entsprechend in Phosphatpuffer oder in Plasma angesetzt.

Rattenplasma (Leerplasma):

Blut wurde mehreren gesunden Ratten entnommen (Kapitel 4.6.1.1), die mindestens 12 h vor der Blutentnahme nüchtern gesetzt wurden. Das antikoagulierte Blut (NH₄-Heparin) wurde dann 10 min bei 2000 g zentrifugiert (4 °C) und das so erhaltene Plasma gewonnen.

(bestellt von der Firma Charles River)

4.2.7 In-vitro Untersuchungen an Hepatozyten

Lösungen

Zellmedium:

William's Medium E – beinhaltet 100 mg/l Gentamicin, 1,8 % Rinderserumalbumin (w / w), 5 mmol/l Pyruvat

Lyse-Puffer:

20 mmol/l Tris, 25 mmol/l β -Glycerophosphate, 137 mmol/l NaCl, 2 mmol/l EDTA, 2 mmol/l Pyrophosphat, 1 mmol/l Vanadat, 1 % Triton X-100 (w / v), 10 % Glycerol (w / w), 1 μ mol/l DTT, 10 μ g/ml Leupeptin

Waschlösung:

10 mmol/l Tris, pH 7,4 (HCl, 1 mol/l)

Die Zellgewinnung und Aufarbeitung wurde in der Universität Charlston durchgeführt [Walgren et al, 2002].

Methodenoptimierung der ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, TNLA und BNLA in Gewebedialysaten (Kapitel 4.4.3 und 4.2.3)

Geräte

HPLC-Ausstattung	Hewlett Packard (Agilent)	Autosampler / Pumpe: System 1100
		Programmierbarer elektrochemischer Detektor (ECD), 1049A Spannung: + 1100 - 1200 mV
		HP Chemstation 2D Software
Eluent		63 % Eluent A und 37 % Eluent B Flußrate: 1,0 ml/min
Trennsäulenmaterial	Merck	Reversed phase silicagel: LiChroCART LiChrospher 100, RP-18, 5 μ m, 250 mm x 4 mm;

Lösungen

Die Lösungen der Methode ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von TNLA, LA und BNLA in Gewebedialysaten (Kapitel 4.2.3) wurden auch hier verwendet!

Interner Standard-Arbeitslösungen I und II:

Die Konzentration des internen Standards betrug sowohl in der Probe, Qualitätstandards als auch in dem Kalibrationsstandard 500 ng/ml. Hierfür wurden zwei Arbeitslösungen verwendet, Arbeitslösung I für das Ansetzen der Kalibrations- und Qualitätsstandards und Arbeitslösung II für die Verdünnung der zu messenden Probe.

- I: 50 µl der Homoliponsäure-Stammlösung wurden in 9,95 ml HPLC-Eluent verdünnt (1 + 199, v / v) – resultierende Konzentration 5 µg/ml
- II: 100 µl der Homoliponsäure-Stammlösung wurden in 9,9 ml Acetonitril verdünnt (1 + 99, v / v) – resultierende Konzentration 10 µg/ml, 713 µl dieser Lösung wurden auf ein Gesamtvolumen von 10 ml Acetonitril verdünnt - resultierende Konzentration 713 ng/ml

R(+)- α -Liponsäure-, Bisnorliponsäure- oder Tetranorliponsäure-Kalibrationslösung:

Die R(+)- α -Liponsäure-, die Bisnorliponsäure- und die Tetranorliponsäure-Stammlösung wurden jeweils 1 + 99 (v / v) mit dem HPLC-Eluent verdünnt (jeweilige Konzentration: 10 µg/ml) – weitere Verdünnungen erfolgten im HPLC-Eluent zu Kalibrationslösungen verschiedener Konzentrationen (siehe Tabelle unten).

Jeweils 100 µl der jeweiligen Kalibrationslösung (LA, BNLA und TNLA), sowie 100 µl der internen Standard-Arbeitslösung I wurden mit HPLC-Eluent auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. 100 µl wurden als Kalibrationslösung in die HPLC-Anlage injiziert.

Kalibrationsstandards:

Standard	Konzentration [ng/ml]		
	LA	BNLA	TNLA
I	15	10	5
II	20	15	10
III	50	20	15
IV	100	50	20
V	200	100	50
VI	500	200	100
VII	1000	500	150
VIII	1500	1000	300

Die Qualitätsstandards wurden in der gleichen Art und Weise mit einer neu angesetzten Stammlösung hergestellt.

Qualitätsstandards:

Standard	Konzentration [ng/ml]		
	LA	BNLA	TNLA
LOW	40	20	15
MID	200	100	50
HIGH	1000	500	150

Zellüberstand:

Entnommenes Volumen: 40 µl

93,3 µl der interner Standard-Arbeitslösung II (66,52 ng Homoliponsäure) + 40 µl der Probe – nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 133 µl Eluent A verdünnt - 200 µl Injektionsvolumen (Verdünnungsfaktor: 2 für die Berechnung der Konzentration in ng/ml)

Aufgeschlossene Zellen:

Entnommenes Volumen: 40 µl aus Zellfragmentsuspension

93,3 µl der interner Standard-Arbeitslösung II (66,52 ng Homoliponsäure) + 40 µl der Probe – nach Zentrifugation wurde der Überstand mit 133 µl Eluent A verdünnt - 200 µl Injektionsvolumen (Verdünnungsfaktor: 2 für die Berechnung der Konzentration in ng/ml)

4.3 Reagenzien, Material und Geräte für Kinetikstudien

4.3.1 Kinetikstudien an der Ratte

Materialien

Retroorbitale Blutentnahme	Brandt	Mikro-Haematokrit Glaskapillare
Herzpunktion	Sarstedt	NH ₄ -Monovetten
Trockenfutter für Tierhaltung	ssniff Spezialdiäten	ssniff R [®] Alleindiät für Ratten und Mäuse Nr. V1534-00

Mikrodialyse zur Gewinnung von Gewebeflüssigkeiten im Muskel

Geräte und Materialien

Respirator	Föhr	Respirator, Standardausführung RUS-1301 Trachealkanülen RUS-1301-TKSETX3
Heizplatte	CMA Microdialysis	CMA/150 Temperature Controller
Infusion	Introcant [®] -W	Venenverweilkanüle
	Dispomed [®]	Mandrin
	Travenol	Infusionsgerät Flo-Gard [™] 8000
	DiLab [®]	Infusionspumpe
Blutentnahme	Dispomed [®]	Katheter Vasuflo [®] -T G24 Durchmesser: 0,65 x 19 mm
Gewebeflüssigkeitsentnahme	CMA Microdialysis	Mikrodialyse Pumpe Mikroliter Syringe Pump CMA 102 mit Glasspritzen
	CMA Microdialysis	Mikrodialysen-Sonde mit Einführhilfe CMA/20, 10 mm Membranlänge, cut off 20 000 D

Lösungen

Ringerlösung:

145 mmol NaCl, 1,3 mmol/l CaCl₂, 0,4 mmol/l KCl – pH 7,2

Ethylcarbamat-Lösung:

30 % Urethan (w / v) in physiologischer NaCl-Lösung (0,9 %), Injektionsvolumen 5 ml/kg

In-vitro Testlösung:

1 mg/ml R(+)- α -Liponsäure, Tetranorliponsäure und Bisnorliponsäure in Acetonitril gelöst

1 μ g/ml R(+)- α -Liponsäure, Tetranorliponsäure und Bisnorliponsäure wurde durch eine 1 + 99 (v / v) und dann 1+ 9 Verdünnung (v / v) in Ringerlösung hergestellt.

In-vivo Testlösung:

1 mg/ml R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz (Dexlipotam) in Ringerlösung gelöst, entspricht 630 μ g/ml bezogen auf R(+)- α -Liponsäure

1 μ g/ml R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz (Dexlipotam) wurde durch eine 1 + 99 und dann 1 + 9 Verdünnung in Ringerlösung hergestellt, entspricht 630 ng/ml bezogen auf R(+)- α -Liponsäure

Infusionslösung:

Dexlipotam wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst – resultierende Dosierung 40 mg/kg (bezogen auf die freie Säure) über die Infusionsdauer von 1 h. Die Konzentration der Lösung betrug 6,67 mg/ml (bezogen auf die freie Säure), entspricht 6 ml/h bei einem 1 kg Tier

Beispiel: Tiergewicht: 376 g

- 40 mg (bezogen auf die freie Säure) – 1 kg
- 15,04 mg (bezogen auf die freie Säure) – 0,376 kg
- 15,04 mg (bezogen auf die freie Säure) – 6 ml
- 37,6 mg (bezogen auf die freie Säure) – 15 ml

Einwaage für das gewählte Beispiel

(Umrechnungsfaktor für Dexlipotam/R(+)- α -Liponsäure 1,59):

- 59,78 mg (bezogen auf Dexlipotam) – 15 ml

Antikoagulanz-Lösung:

75 - 80 I.E. Heparin Natriumsalz pro ml Blut

1,87 g Heparin Natriumsalz (entspricht 100 000 I.E.) in 25 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst – von dieser Lösung wurden 20 μ l in die Blutsammelgefäße für ca 0,8 – 1 ml Blut vorgelegt.

4.3.2 Kinetikstudien am Menschen

Materialien und verwendete Tabletten

Thio TAB	ASTA Medica	Filmtablette mit folgendem Inhaltsstoffen: Aktiver Bestandteil: rac- α -Liponsäure (600 mg) Andere Bestandteile: Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylcellulose niedrig substituiert, Magnesiumstearat, Methylhydroxypropylcellulose, Titaniumdioxid Polyethylenglykol, Talk, Indigorot, Aluminiumhydroxydylack Chinilingelb
DEX TAB	ASTA Medica	Filmtablette mit folgendem Inhaltsstoffen: Aktiver Bestandteil: R(+)- α -Liponsäure Trometamolsalz (480 mg) Andere Bestandteile: Zitronensäure, kolloidales Silikon-dioxid, Hydroxypropylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose, Magnesiumstearat, mikrokristalline Cellulose, Polyethylenglykol, Crospovidon, Talk, Titaniumdioxid, Indigorot, Aluminiumhydroxydylack Chinilingelb
Gefäße zum Sammeln des Urins	Sarstedt	Kontainer (0,5 und 2 l)
Urin-Aliquot-Gefäße	Sarstedt	Urin-Monovetten (10 ml)
Material und Gefäße zur Blutentnahme	Sarstedt	NH ₄ -Monovetten (7,5 ml) Venovenweilkatheter

4.4 Bioanalytische Methoden

Analysenmethoden zur quantitativen Bestimmung der Testsubstanz und ihrer Metaboliten in biologischen Proben waren die Grundvoraussetzung für die Ermittlung pharmakokinetischer Daten. Um zuverlässige und interpretierbare Daten zu erhalten, wurden validierte Analysenmethoden eingesetzt.

In Kapitel 4.2 wurden die verwendeten Instrumente, Materialien und Chemikalien aufgelistet und das Ansetzen der verschiedenen Lösungen detailliert beschrieben.

Das weitere Vorgehen, die Validierung der eingesetzten Methoden und die Messung der Proben wurde auf Basis der Richtlinien für Arzneimittelzulassungen durchgeführt (Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation 2001; Bioanalytical Methods Validation for Human Studies, 1998) und ist für die unterschiedlichen Methoden in dem folgenden Kapitel in Kurzform als Tabelle mit den charakteristischen Parameter der einzelnen Methoden beschrieben.

Der Hintergrund der Validierung und ihre Durchführung wird im folgenden Abschnitt zunächst allgemein beschrieben.

Validierung

- **Kalibrierkurve:**

Für jede verwendete Methode sind der Kalibrierbereich, die verwendete Gleichung zur Beschreibung der Kalibrierkurve mit Wichtung und eine Angabe darüber, ob eine interne oder eine externe Kalibrierung durchgeführt wurde, in einer Tabelle aufgeführt.

Die verwendeten Gleichungen wurden entweder als analytische Funktion (Konzentration versus Peak-Flächen-Verhältnis (PAR), Peak-Fläche oder Peak-Höhe) oder als Kalibrationsfunktion (Peak-Flächen-Verhältnis (PAR), Peak-Fläche oder Peak-Höhe versus Konzentration) angegeben. Im Falle einer internen Kalibrierung wurde der verwendete interne Standard angegeben. Der verwendete Ausdruck PAR beschreibt das Flächenverhältnis zwischen Analyten und dem zugesetzten internen Standard.

- **Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze:**

Definition: Die Nachweisgrenze (engl. Limit of detection LOD) eines Analysenverfahrens ist die kleinste Menge oder Konzentration eines Analyten, die unter den angegebenen Bedingungen noch mit vernünftiger Sicherheit vom Grundrauschen unterschieden werden kann.

Die Nachweisgrenze wurde als Wert mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 ermittelt und für jede Methode ausgewiesen.

Definition: Die untere Bestimmungsgrenze (engl. Lower Limit of quantification LOQ) eines Analysenverfahrens ist die kleinste Menge oder Konzentration eines Analyten, die unter den definierten Bedingungen mit akzeptabler Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann.

Die Bestimmungsgrenze wurde auf Basis einer vernünftigen Richtigkeit und Präzision festgesetzt. Es ist in den meisten Fällen der niedrigste Kalibrationsstandard der Kalibrierkurve.

- **Wiederfindungsrate:**

Definition: Die Wiederfindungsrate einer Analysenmethode ist der Prozentsatz eines Analyten, der bei einer Analyse wiedergefunden wird im Verhältnis zu der Menge, die sich in der Probe befunden hatte.

Bestimmt wurde die Wiederfindungsrate von Proben mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen, da diese u.U. mit der Konzentration variiert. Die absolute Wiederfindungsrate wurde durch den Vergleich der Meßwerte der extrahierten Probe mit den Meßwerten der nicht extrahierten Probe bestimmt und in % ausgedrückt.

- **Richtigkeit und Präzision:**

Definition: Die Richtigkeit ist definiert als die Abweichung des gemessenen Wertes vom wahren oder bekannten Wert und ist ein Maß für vorliegende systematische Fehler der Methode.

Definition: Die Präzision (Reproduzierbarkeit) einer Analysenmethode beschreibt das Schwanken von Analyseergebnissen um einen mittleren Wert bei mehrfacher Anwendung eines festgelegten Analysenverfahrens unter vorgegebenen Bedingungen. Sie sagt aus, wie reproduzierbar eine Methode unter Wiederholungsbedingungen arbeitet und ist ein Maß für zufällige Fehler der Analysenmethode.

- **Intra-Assay Richtigkeit oder Intra-Assay Präzision:**

Um die Richtigkeit und Präzision der Methode innerhalb einer Serie zu bestimmen, wurden Proben mit bekanntem Gehalt des oder der Analyten an einem Tag bzw. innerhalb einer Analysenserie mehrfach ($n \geq 5$) analysiert. In den meisten Fällen wurden 3 verschiedene Konzentrationen, die den gesamten Konzentrationsbereich repräsentierten, untersucht.

- **Inter-Assay Richtigkeit oder Inter-Assay Präzision:**

Um die Richtigkeit und Präzision der Methode von Serie zu Serie zu bestimmen, wurde die Analysen von Proben mit bekanntem Gehalt unterschiedlicher Konzentrationen des oder der Analyten an mindestens 5 Tagen wiederholt. Auch hier wurde in den meisten Fällen 3 verschiedene Konzentrationen, die den gesamten Konzentrationsbereich repräsentieren, untersucht.

Die Richtigkeit der Methode für die verschiedenen Konzentrationen wurde wie folgt berechnet:

Gleichung 1
$$\text{Richtigkeit (\%)} = \frac{C_{\text{obs}}}{C_{\text{theo}}} \cdot 100$$

Der Variationskoeffizient (relative Standardabweichung) des Mittelwertes der wiederholten Bestimmung repräsentiert die Präzision der analytischen Methode für die definierte Konzentration.

Gleichung 2
$$\text{Variationskoeffizient (CV)} = \frac{SD}{\text{Mittel}_{\text{arith}}} \cdot 100$$

In den nachfolgenden Tabellen wurden für die Charakterisierung der analytischen Methode nur der niedrigste und der höchste Wert der bestimmten Richtigkeit und der höchste Wert der bestimmten Präzision über eingesetzten Konzentrationen der Qualitätskontrollen (Proben mit definierter Konzentration) angegeben.

- **Selektivität**

Definition: Die Selektivität ist die Fähigkeit eines Untersuchungsverfahrens, in der Anwesenheit von potentiell interferierenden Stoffen nur den oder die Analyten zu erfassen.

Hierfür wurde die Probenmatrix ohne Analyten von verschiedenen Individuen untersucht, um mögliche Interferenzen durch Bestandteile der Bioflüssigkeit zu entdecken.

Nur Limitierungen der Selektivität in der Analysenmethode wurden, falls vorhanden, in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben.

- **Stabilitätsuntersuchungen**

Die Untersuchung des Einflusses von mehreren Einfrier-Auftaucyclen auf die Stabilität des Analyten in der Probe war notwendig, um z.B. Plasmaproben auch mehrfach analysieren zu können.

Auch die Lagerstabilität des oder der Analyten bei der vorgesehenen Lagertemperatur wurde über den vorgesehenen Lagerzeitraum untersucht.

Hierfür wurden Aliquote einer homogenen Probe mit bekannter Konzentration unter standardisierten und unter den zu untersuchenden Bedingungen in Dreifachbestimmung analysiert. Bei vergleichbaren Ergebnissen wurden die akzeptierten Bedingungen ausgewiesen und in den nachstehenden Tabellen zusammengefaßt.

Akzeptanzkriterien für bioanalytische Serien:

- **Kalibrierkurve:**

Kalibrationsstandards wurden in dieser Arbeit akzeptiert, wenn ihre rekalkulierten Konzentrationen nicht mehr als $\pm 15\%$ vom theoretischen Wert abweichen (prozentuale Abweichung vom nominellen Wert). An der Bestimmungsgrenze wurde eine Abweichung von $\pm 20\%$ erlaubt.

Eine Kalibrationskurve bestand mindestens aus 6 unterschiedlichen, akzeptierbaren Kalibrationspunkten, diese sollten mindestens 75 % der Gesamtzahl der Kalibrationsstandards einer Analysenserie betragen.

- **Qualitätsstandards:**

In den meisten Fällen wurden Qualitätsstandards in drei Konzentrationstufen mindestens in doppelter Anzahl mit jeder Analysenserie mitgeführt.

Die Konzentrationen wurden so gewählt, daß diese im niedrigen, mittleren und hohen Bereich der Kalibrierkurve lagen.

Außerdem wurden die Qualitätsstandards in der zu analysierenden Abfolge so verteilt, daß sowohl am Anfang als auch am Ende einer Analysenserie Qualitätsstandards gemessen wurden.

In einer Analysenserie mußten in den meisten Fällen wenigstens vier von sechs der Qualitätsstandards innerhalb der Abweichungsgrenzen von $\pm 15\%$ (Gleichung 1) ihres theoretischen Wertes liegen. Zwei Qualitätsstandards unterschiedlicher Konzentrationen innerhalb einer Analysenserie von sechs durften außerhalb der $\pm 15\%$ Abweichungsgrenzen liegen.

In den Ausnahmefällen, in dem nur Qualitätsstandards in zwei Konzentrationsstufen verwendet wurden, mußten wenigstens zwei (unterschiedlicher Konzentrationen) von vier innerhalb der Abweichungsgrenzen von $\pm 15\%$ (Gleichung 1) ihres theoretischen Wertes liegen (Kapitel 4.4.3 TSP-Methode / BNLA, Kapitel 4.4.4 Plasma-Methode / BMOA).

Falls diese Akzeptanzregel nicht eingehalten werden konnte, wurden die Ergebnisse nicht akzeptiert und die Analysenserie wurde wiederholt.

Für Wiederholungsmessungen mußte aber genügend Probenmaterial zu Verfügung stehen, was bei den Mikrodialyse-Messungen (Kapitel 4.4.3) nicht der Fall war. Hier wurden die Konzentrationen, die in nicht akzeptierten Analysenserien gemessen wurden, trotzdem als Ergebnisse im Anhang mit entsprechender Markierung dargestellt, aber nicht für die pharmakokinetische Auswertung herangezogen. In Kapitel 4.4.4 beschriebene Methode zur Bestimmung von TNLA und BNLA in Plasma wurden keine Qualitätsstandards mitgeführt, die ermittelten Konzentrationen wurden aber für die pharmakokinetische Auswertung als Orientierung herangezogen.

Auf die Darstellung der ermittelten Kalibrations- und Qualitätsstandard-Konzentrationen für die jeweiligen Analysenserien wurden in dieser Arbeit verzichtet.

Falls die Konzentration der zu analysierenden Probe außerhalb des Kalibrationsbereichs lag, wurde die Probe mit geeignetem Material verdünnt und nochmals gemessen.

Falls die Konzentration der Probe unterhalb der Nachweis- oder Bestimmungsgrenze lag, wurde in den Ergebnistabellen entsprechend die Abkürzungen blq (engl. below limit of quantification) oder bld (engl. below limit of detection) verwenden.

4.4.1 Enantioselektive HPLC-Methode zur Bestimmung von R(+)- und S(-)- α -LA in Plasma

Die vorliegende Methode basierte auf dem von Niebch et al. entwickelten Verfahren zur enantioselektiven Analyse der R(+)- und S(-)- α -Liponsäure in Plasma [Niebch et al, 1997]. Sie beinhaltete eine Flüssig-Flüssig-Extraktion der lipophilen Komponenten aus dem Plasma in saurem Milieu und eine Rückextraktion der sauren Bestandteile in eine basische wässrige Phase. Die im Rückextrakt enthaltene α -Liponsäure (**1**) wurde anschließend mit Sn^{II} zur Dihydroliponsäure (**2**) reduziert und diese sofort mit o-Phthaldialdehyd (**10**) und D-Phenylalanin (**9**) zu einem stabilen fluoreszierenden Derivat überführt. Die Derivatisierungsreaktion ist in Abbildung 13 dargestellt.

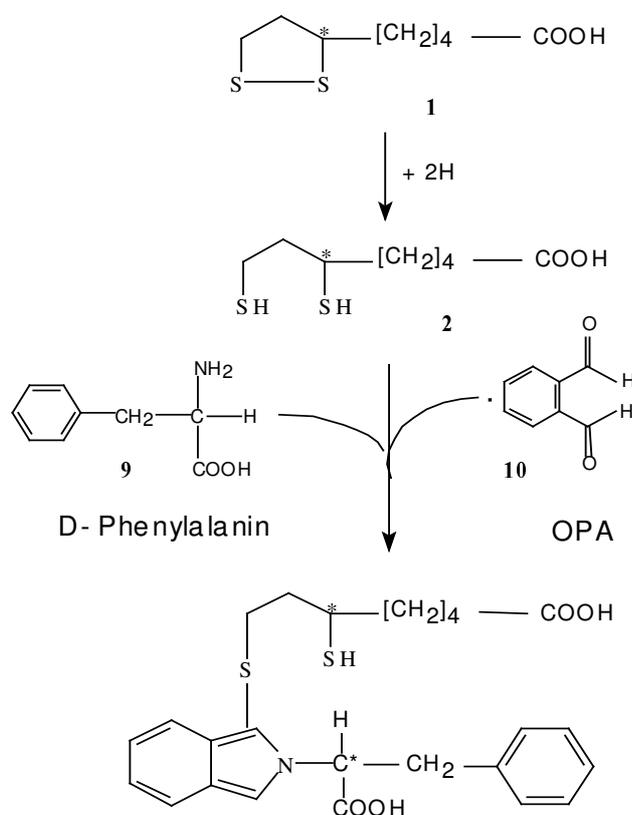


Abb. 13: Schema der enantioselektiven Derivatisierung:

Reaktionsschritte der enantioselektiven Derivatisierung der α -Liponsäure (1) mittels *o*-Phthaldialdehyd (10) und D-Phenylalanin (9). Die Sternchen (*) kennzeichnen asymmetrische Kohlenstoffatome [Niebch et al, 1997].

Da man für die Derivatisierung enantiomerenreines D-Phenylalanin (9) einsetzt hatte, bildeten sich die diastereomeren Derivatisierungsprodukte aus der R(+)- und S(-)- α -Liponsäure. Man konnte also mit dieser Methode die Enantiomere qualitativ und quantitativ bestimmen.

Die erhaltenen Diastereomere konnten mittels reversed-phased HPLC getrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor detektiert werden. Ursprünglich wurde bei der vorliegenden Methode 10-Mercaptodecansäure als „interner Standard“ eingesetzt.

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde in den meisten Fällen nur die reine R(+)- α -Liponsäure quantifiziert und da eine Konversion zwischen den Enantiomeren im Körper ausgeschlossen werden konnte, wurde nun das S-Enantiomer als interner Standard eingesetzt. In einer Ausnahme wurde nach Gabe von rac- α -Liponsäure die R(+)- und S(-)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Rattenplasma bestimmt, dazu wurde der ursprüngliche interne Standard 10-Mercaptodecansäure verwendet (Kapitel 5.1.3.2).

4.4.1.1 Aufarbeitung der Plasmaprobe

Das frisch aufgetaute heparinisierte Plasma (Probe oder Qualitätsstandard) wurde zur Abtrennung der Trübungsstoffe 10 min bei 2600 g zentrifugiert. 0,5 ml oder 1 ml des Überstandes wurden in ein Analysenröhrchen pipettiert und mit 150 µl 1 mol/l HCl und 8 ml Extraktionsmittel (Kapitel 4.2.1) versetzt. Im Falle der Kalibrationsstandards wurde die R(+)- α -Liponsäure (oder die S(-)- α -Liponsäure), und zu allen Proben (Qualitätsstandard, Probe und Kalibrationsstandard) wurde der interne Standard (S(-)- α -Liponsäure oder 10-Mercaptodecansäure) zugeführt. Die Probe wurde bei mittlerer Geschwindigkeit für 10 min über Kopf geschüttelt und anschließend 10 min bei 2600 g zentrifugiert. Zur Rückextraktion wurden 5 ml der organischen Phase in ein Glas-Spitzröhrchen überführt, in dem 200 µl Boratpuffer (Kapitel 4.2.1) vorlagen. Die Probe wurde 1 min gemischt und anschließend 5 min bei 2600 g zentrifugiert. Der größte Teil der organische Phase wurde nun mittels Vakuumpumpe abgesaugt und der verbleibende Rest wurde mit Hilfe des Vakuum-Zentrifugal-Verdampfers entfernt (Programm: Raumtemperatur, Laufzeit 3 min mit zweimaliger Belüftung). 150 µl der verbleibenden wässrigen Phase wurden zur Derivatisierung in ein HPLC-Gefäß überführt.

Zunächst wurden 10 µl SnCl₂-Lösung (siehe 4.2.1) zur Reduktion (10 min bei Raumtemperatur) zugegeben. Dann wurden 20 µl 1,0 mol/l NaH₂PO₄ und 10 µl 0,1 mol/l EDTA-Lösung (Kapitel 4.2.1) zugegeben, kurz durchmischt und anschließend 10 µl Derivatisierungsreagenz (Kapitel 4.2.1) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Derivatisierung durch die Zugabe von 10 µl 1,0 mol/l NaH₂PO₄ und 20 µl 0,5 mol/l Phosphorsäure (Kapitel 4.2.1) abgebrochen. Der pH-Wert der Lösung nach dem Stoppen der Reaktion betrug circa 5,6.

Die erhaltene Lösung (über 230 µl) wurde mit Eluent (Kapitel 4.2.1) 1 + 4 (v / v) verdünnt und im Kühlschrank oder im Probenauftragegerät auf die zur Stabilität erforderlichen 4°C abgekühlt. Je nach Konzentration wurden 20-100 µl (Rattenplasma) oder 40 µl (Humanplasma) dieser Lösung injiziert.

4.4.1.2 Validierung der Methode

		Ratten Plasma	
Kalibrationsbereich	ng/ml	15 – 5000	
Qualitätsstandards	ng/ml	100	1000 4500
Kalibrationsfunktion		$y = a + b \cdot x$ $x = \text{Plasmakonzentration}$ $y = \text{PAR}$	
Wichtung		1/x (Plasmakonzentration)	
Interner Standard		10-Mercaptodecansäure	
		R-Enantiomer	S-Enantiomer
Intra-Assay Präzision	%	≤ 7,58	≤ 7,23
Intra-Assay Richtigkeit	%	97,3 – 102,0	96,4 – 102,8
Inter-Assay Präzision	%	≤ 8,07	≤ 8,05
Inter-Assay Richtigkeit	%	94,2 – 103,4	94,08 – 103,5
Nachweisgrenze	ng/ml	15	15
Bestimmungsgrenze	ng/ml	2	2
Wiederfindungsrate	%	59,2 – 73,2	57,8 – 73,1
Einfrier-Auftaucyclen		3 bei –20 °C	
Langzeitstabilität		über 5 Monate bei –20 °C	

		Human Plasma	
Kalibrierbereich	ng/ml	2,5 - 1500	
Qualitätsstandards	ng/ml	15	250 1000
Kalibrationsfunktion		$y = a + b \cdot x$ $x = \text{Plasmakonzentration}$ $y = \text{PAR}$	
Wichtung		1/x	
Interner Standard		S(-)- α -Liponsäure	
Intra-Assay Präzision	%	≤ 5,73	
Intra-Assay Richtigkeit	%	103,2 – 106,9	
Inter-Assay Präzision	%	≤ 6,64	
Inter-Assay Richtigkeit	%	98,4 – 105,4	
Nachweisgrenze	ng/ml	2,5	
Bestimmungsgrenze	ng/ml	1	
Wiederfindungsrate	%	73,4 – 75,0	
Einfrier-Auftaucyclen		3 bei –20 °C	
Derivatstabilität		48 h bei 4 °C	
Langzeitstabilität		über 4 Jahre bei –20 °C	

4.4.2 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA in Gewebehomogenaten

Die HPLC-Methode wurde entwickelt, um in biologischem Gewebe α -Liponsäure in nicht kovalent gebundener Form (extrazellulär und intrazellulär α -Liponsäure) zu quantifizieren. Die Methode beinhaltet die Homogenisierung des biologischen Materials, eine anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion der lipophilen Komponenten aus dem Gewebehomogenat im sauren Milieu und eine Rückextraktion der sauren Bestandteile in eine basisch wässrige Phase. Der so erhaltene Extrakt konnte nun mittels reversed-phased HPLC getrennt und elektrochemisch detektiert werden. Als interner Standard diente hierfür die Homoliponsäure, die in ihren elektrochemischen Eigenschaften der α -Liponsäure ähnelte.

4.4.2.1 Aufbereitung des biologischen Materials

Das biologische Material wurde zerkleinert und homogenisiert (Ultra Turax) und in Phosphatpuffer II (Kapitel 4.2.2) zu einer Konzentration von 1 g Gewebe in 3 ml Puffer suspendiert. Der letzte Schritt der Zerkleinerung wurde mit einem Potter durchgeführt, um auch Zellverbände aufzuschließen. Die gesamte Aufbereitung des Gewebes erfolgte unter Eiskühlung. Das Probenmaterial für Qualitätskontrollen und Kalibrationsstandards wurden in der gleichen Weise aufbereitet und weiterverarbeitet. Zu 200 μ l Gewebehomogenat wurde 20 μ l HCl (1 mol/l), 180 μ l Phosphatpuffer I (Kapitel 4.2.2) und 1100 μ l Chloroform zugesetzt. Die Probe wurde gut durchmischt (Vortexer) und anschließend 5 min bei 15000 g zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde verworfen und 1 ml der unteren organischen Phase wurde in ein geeignetes Polypropylengefäß überführt. Zu dieser organischen Phase wurden 200 μ l Trispuffer (Kapitel 4.2.2) pipettiert und es wurde wiederum gut geschüttelt. 160 μ l der nun sich bildenden oberen Phase wurden abgetrennt und mit 20 μ l HCl (1 mol/l) versetzt. Nach weiterem Durchmischen wurde diese Probe in HPLC-Gefäße gefüllt und im Autosampler bei 15°C gelagert bis die Probeninjektion startete (100 μ l Injektionsvolumen).

4.4.2.2 Validierung der Methode

	Muskelhomogenat			Muskelgewebe				
Kalibrierbereich	ng/ml	5 - 400			ng/g	20-1600		
Qualitätsstandards	ng/ml	25	125	375	ng/g	100	500	1500
Kalibrationsfunktion	$y = b \cdot x$ $x = \text{Plasmakonzentration}$ $y = \text{PAR}$							
Wichtung	-							
Interner Standard	Homoliponsäure							
Intra-Assay Präzision	%	≤ 13,9						
Intra-Assay Richtigkeit	%	84,3 – 107,2						
Inter-Assay Präzision	%	≤ 14,1						
Inter-Assay Richtigkeit	%	84,1 – 110,9						
Nachweisgrenze	ng/ml	5			ng/g	20		
Bestimmungsgrenze	ng/ml	10			ng/g	40		
Wiederfindungsrate	%	≥ 72						
Einfrüer-Auftaucyclen	4 bei -20 °C							
Langzeitstabilität	über 2 Wochen bei -20 °C							

4.4.3 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, TNLA und BNLA in Gewebedialysaten

Die gewonnenen Gewebedialysate (frei von Markomolekülen und Proteinen) erlaubten die direkte Injektion in das HPLC-System ohne Probenvorbereitung. Die drei Analyten LA, TNLA und BNLA wurden mit Hilfe der reverse-phase HPLC aufgetrennt, elektrochemisch detektiert und quantifiziert [Kraft, 2001].

4.4.3.1 Validierung der Methode

TSP-HPLC		LA	BNLA	TNLA					
Kalibrierbereich	ng/ml	20 - 2000		5 - 300					
Qualitätsstandards	ng/ml	30	100	1000	40	500	10	30	200
Analytische Funktionsgleichung		$y = a + b \cdot x$ $y = \text{Plasmakonzentration}$ $x = \text{PAR}$							
Interner Standard		Homoliponsäure							
Wichtung		keine							
Intra-Assay Präzision	%	≤ 5,2		≤ 11,3		≤ 5,5			
Intra-Assay Richtigkeit	%	90,9 – 105,2		87,0 – 88,9		85,1 – 100,7			
Inter-Assay Präzision	%	≤ 22,3		≤ 11,6		≤ 14,4			
Inter-Assay Richtigkeit	%	94,6 – 101,6		96,9 – 103,0		95,7 – 110,5			
Nachweisgrenze	ng/ml	10		5		1			
Bestimmungsgrenze	ng/ml	20		10		5			
Wiederfindungsrate	%	100 (keine Probenvorbereitung notwendig)							
Langzeitstabilität		10 Wochen bei -20 °C 48 h bei 4 °C							

HP-HPLC		LA	BNLA	TNLA
Kalibrierbereich	ng/ml	15 - 800	10 - 800	2 - 300
Qualitätsstandards	ng/ml	30 100 400	15 50 200	10 40 150
Kalibrationsgleichung		$y = a + b \cdot x$ $x = \text{Plasmakonzentration}$ $y = \text{PAR}$		
Interner Standard		Homoliponsäure		
Wichtung		1/x		
Intra-Assay Präzision	%	≤ 10,2	≤ 9,3	≤ 16,5
Intra-Assay Richtigkeit	%	83,1 – 101,9	91,6 – 101,8	96,3 – 102,5
Inter-Assay Präzision	%	≤ 8,1	≤ 10,9	≤ 13,1
Inter-Assay Richtigkeit	%	97,1 – 102,3	91,8 – 100,0	95,0 – 98,0
Nachweisgrenze	ng/ml	10	5	1
Bestimmungsgrenze	ng/ml	15	10	2
Wiederfindungsrate	%	100 (keine Probenvorbereitung notwendig)		
Langzeitstabilität		10 Wochen bei -20 °C 48 h bei 4 °C		

4.4.4 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA und BNLA in Plasma und Urin

Die von Teichert und Preiß entwickelte Methode für die Bestimmung von α -Liponsäure im Plasma mit Hilfe der ECD-HPLC-Methode wurde für Bestimmung von α -Liponsäure und ihren Metaboliten im Plasma und im Urin weiterentwickelt [Teichert und Preiß, 1995 und 2000]. Die Messung der Proben aus dieser Studie (Kapitel 5.2.1) erfolgte am Institut für Klinische Pharmakologie der Universität Leipzig.

Die verschiedenen Analyten LA, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA und BNLA wurden nach Extraktion aus den Plasma- oder Urinproben mit Hilfe einer reverse-phase-Säule aufgetrennt, elektrochemisch detektiert und quantifiziert.

4.4.4.1 Aufarbeitung der Plasmaprobe

In einem Polypropylenröhrchen wurden 0,5 ml heparinisiertes Plasma (Probe, Kalibrationsstandard oder Qualitätsstandard) mit 3 ml Wasser und mit 10 μ l konzentrierter Salzsäure angesäuert. Das mittels Festphasen-Extraktion über 1 ml-Festphasensäulen gewonnene Eluat wurde im Stickstoffstrom bei 40 °C eingedampft. Die trockenen Extrakte wurden in 200 μ l mobiler Phase (Kapitel 4.2.4) gelöst und 20 μ l Aliquot in das HPLC-System injiziert. Falls notwendig wurde die Lösung für weitere Analysen mit dem verwendeten HPLC-Laufmittel (Kapitel 4.2.4) verdünnt.

4.4.4.2 Aufarbeitung des Urins

In einem Polypropylenröhrchen wurden 0,1 ml Urin (Probe, Kalibrationsstandard oder Qualitätsstandard) mit 0,1 ml Enzympuffer (Kapitel 4.2.4) versetzt und 15 min bei 56°C erwärmt. Nach Zugabe von 3,3 ml Wasser und mit 10 µl konzentrierter Salzsäure erfolgte die Festphasen-Extraktion der Lösung über 1 ml Festphasensäulen. Das so gewonnene Eluat wurde im Stickstoffstrom bei 40°C eingedampft und in 400 µl mobiler Phase (Kapitel 4.2.4) gelöst. 20 µl der Probe wurden in das HPLC-System injiziert. Falls notwendig wurde die Lösung für weitere Analysen mit Laufmittel verdünnt.

4.4.4.3 Validierung der Methode

Plasma:

		LA	BMOA	BMHA	BMBA	BNLA	TNLA
Kalibrierbereich	nmol/ml	0,05 - 50	0,25 - 5	0,25 - 100	0,25 - 25	0,05 - 35	0,2 - 80
Qualitätsstandards	nmol/ml	0,125 2 20	0,5 3,75	0,5 5 40	0,5 3,5 15	-	-
Kalibrationsfunktion		$y = a + b \cdot x$ y = Peakfläche oder Peakhöhe (BMBA) x = Plasmakonzentration					
Wichtung		1/x					
Intra-Assay Präzision	%	≤ 6,5	≤ 4,9	≤ 6,6	≤ 6,5	≤ 5,5	≤ 7,5
Intra-Assay Richtigkeit	%	95,7 – 106,5	99,2 – 105,5	95,8 – 102,1	96,0 – 109,8	95,3 – 101,5	102,4 – 126,8
Inter-Assay Präzision	%	≤ 6,7	≤ 7,1	≤ 7,2	≤ 8,0	≤ 17,8	≤ 14,2
Inter-Assay Richtigkeit	%	99,6 – 104,5	96,8 – 102,1	97,5 – 102,9	95,4 – 105,8	90,2 – 100,6	97,8 – 104,0
Nachweisgrenze	pmol/ml	11	74	70	40	42	36
Bestimmungsgrenze	pmol/ml	22	150	150	80	84	72
Wiederfindungsrate	%	≤ 86,8	≤ 72,2	≤ 82,3	≤ 74,04,4	≤ 77,1	≤ 9,5
Langzeitstabilität	Monate	13 bei -20°C	13 bei -20°C	13 bei -20°C	13 bei -20°C	-	-

Urin:

		LA	BMOA	BMHA	BMBA	BNLA	TNLA
Kalibrierbereich	nmol/ml	0,75 - 150	3,0 - 500	2,0 - 5000	2,0 - 725	1,0 - 250	1,0 - 500
Qualitätsstandards	nmol/ml	1,5 7,5 50	6 30 200	5 50 1000	4 35 250	2 15 100	4 25 250
Kalibrationsfunktion		$y = a + b \cdot x$ y = Peakfläche oder Peakhöhe (BMBA) x = Urinkonzentration					
Wichtung		1/x					
Intra-Assay Präzision	%	≤ 10,6	≤ 11,1	≤ 9,0	≤ 8,2	≤ 11,9	≤ 12,1
Intra-Assay Richtigkeit	%	102,0 – 102,7	94,8 – 110,0	96,4 – 109,7	91,5 – 101,3	94,1 – 94,9	90,2 – 104,4
Inter-Assay Präzision	%	≤ 13,0	≤ 12,0	≤ 8,0	≤ 9,4	≤ 9,6	≤ 9,7
Inter-Assay Richtigkeit	%	98,4 – 110,5	97,3 – 103,7	94,0 – 107,2	98,2 – 101,0	90,9 – 101,8	101,7 – 110,6
Nachweisgrenze	nmol/ml	0,25	0,74	0,8	0,46	0,22	0,56
Bestimmungsgrenze	nmol/ml	0,5	1,48	1,6	0,92	0,44	1,12
Wiederfindungsrate	%	≤ 77,1	≤ 81,4	≤ 78,5	≤ 78,3	≤ 79,2	≤ 42,3
Langzeitstabilität	Monate	8 bei -20°C	8 bei -20°C	8 bei -20°C	8 bei -20°C	8 bei -20°C	8 bei -20°C

4.4.5 ECD-HPLC-Methode zur Bestimmung von LA, TNLA und BNLA in Plasma

Auf Grund der niedrigen Wiederfindungsrate für TNLA wurde die Methode von Teichert und Preiß weiter optimiert. Eine Flüssig-flüssig-Extraktion und anschließender Einengung des Extrakts konnte die Wiederfindungsrate für TNLA steigern. Die verschiedenen Analyten LA, TNLA und BNLA wurden nach Extraktion aus den Plasmaprobe mit Hilfe der reverse-phase-Säule aufgetrennt, elektrochemisch detektiert und quantifiziert.

4.4.5.1 Aufarbeitung der Plasmaprobe

Das frisch aufgetaute Plasma wurde zur Abtrennung der Trübungsstoffe 10 min bei 2600 g zentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes wurden in ein Analysenröhrchen pipettiert und mit 5 µl konz. HCl und 1,5 ml Extraktionsmittel (Kapitel 4.2.5) versetzt.

Je nach Bedarf wurde die R(+)- α -Liponsäure, bzw. der interne Standard (Homoliponsäure) zugeführt. Die Probe wurde bei langsamer Geschwindigkeit für eine kurze Zeitdauer über Kopf geschüttelt und anschließend 5 min bei 2600 g zentrifugiert. Dann wurde die Probe bei -20°C circa 20 – 25 min eingefroren. Die obere Phase konnte nun von der festen flüssigen Phase abgetrennt werden. Die so erhaltene organische Lösung wurde mit Hilfe des Vakuum-Zentrifugal-Verdampfers einrotiert (Programm: 50°C , Laufzeit: 20 min mit dreimaliger Belüftung). Der so erhaltene Rest wurde in 100 µl HPLC-Eluent (Kapitel 4.2.5) gelöst, und in ein HPLC-Gefäß überführt und 50 µl injiziert.

4.4.5.2 Validierung der Methode

Mensch		LA	BNLA	TNLA
Kalibrierbereich	ng/ml	5 - 500	1 - 150	1 - 50
Qualitätsstandards	ng/ml	15 50 200	5 20 75	3 10 30
Kalibrationsgleichung		$y = a + b \cdot x$ $x = \text{Plasmakonzentration}$ $y = \text{PAR}$		
Interner Standard		Homoliponsäure		
Wichtung		1/x		
Intra-Assay Präzision	%	≤ 10,1	≤ 8,3	≤ 15,5
Intra-Assay Richtigkeit	%	97,9 – 96,6	89,1 - 98,9	97,1 – 108,8
Inter-Assay Präzision	%	≤ 15,0	≤ 13,8	≤ 14,4
Inter-Assay Richtigkeit	%	95,7 – 100,6	92,4 – 104,4	94,1 – 103,8
Wiederfindungsrate	%	≤ 58,8	≤ 87,1	≤ 79,5
Nachweisgrenze	ng/ml	2	0,5	0,5
Bestimmungsgrenze	ng/ml	5	2	1
Einfrier-Auftaucyclen		4 bei -20°C		
Langzeitstabilität		10 Wochen bei -20°C 48 h bei 4°C		

Die Konzentrationsbestimmungen in den Ratten-Plasmaproben wurden mit der oben beschriebenen Methode quantifiziert. Für die Quantifizierung wurden die Kalibrationsstandards in Humanplasma, die Qualitätsstandards wurden aber in Rattenplasma angesetzt. Die Aufarbeitung wurde wie oben geschrieben durchgeführt, das eingesetzte Probenvolumen wurde aber auf 0,1 ml reduziert. Somit mußten die gemessene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor 5 multipliziert werden.

4.4.6 Bestimmung der Plasmaproteinbindung von LA

Zur Bestimmung der in-vitro Proteinbindung von α -Liponsäure wurde heparinisiertes Plasma (Leerplasma von Ratten, 4.6.1.1) mit der Testsubstanz versetzt, bei 37°C inkubiert, und die Konzentration des Protein freien Anteils nach Ultrafiltration durch geeignete Filtrationsröhrchen bestimmt. Mit dieser Methode konnte der prozentuale Anteil des an Plasmaproteine gebundenen Wirkstoffes bestimmt werden.

Das Plasma wurde in dem Konzentrationsbereich mit Dexlipotam versetzt, der der erreichten Plasmakonzentration (Konzentration 500, 2000 10000 ng/ml bezogen auf R(+)- α -Liponsäure) unter in-vivo Bedingungen nach Substanzgabe entsprach. Durch Inkubation der Proben bei 37°C über 15 min wurde der Proteinbindungsprozeß im Körper nachgestellt, da dieser von der Temperatur abhängig ist.

Die mögliche unspezifische Bindung der Testsubstanz an z.B. Gefäßmaterialien würde die gemessene Proteinbindung falsch erhöhen. Um diese mögliche unspezifische Bindung zu ermitteln, wurde die Methode auch in Protein freier Lösung durchgeführt.

Das Ansetzen der Plasmaproben wurde somit in der gleichen Art und Weise auch mit Phosphatpuffer (Protein freie Lösung, Kapitel 4.2.6) nachgestellt. Durch den Zentrifugationsschritt (5 min bei 1000 g dann 10 min bei 2000 g) wurden die Proteine (> 5000 D) durch das Filtermaterial von der freien ungebundenen Testsubstanz abgetrennt. Im Falle der Pufferproben mit gleicher Konzentration konnte durch den Zentrifugationsschritt mögliche Verlust durch die Bindung an das Filtermaterial, also nicht spezifische Proteinbindung, mit erfaßt werden. Die durch diese unspezifische Bindung möglicherweise reduzierte Ausgangskonzentration der Testsubstanz konnte so bestimmt und in die Kalkulation mit eingerechnet werden.

Die Konzentration von R(+)- α -Liponsäure des so gewonnenen Protein freien Filtrats und des zentrifugierten Puffers wurden dann mittels ECD-HPLC-Methode für Dialysate (Kapitel 4.4.3) bestimmt.

Die Proteinbindung der Testsubstanz errechnet sich über die Konzentration der filtrierten Pufferprobe (entspricht der Ausgangskonzentration der Plasmaprobe) und der Konzentration des Filtrats der Plasmaprobe (Gleichung 3).

Gleichung 3

$$\text{Proteinbindung (\%)} = \left(1 - \frac{C_{\text{Filtrat Proteinlösung}}}{C_{\text{Filtrat Pufferlösung}}} \right) \cdot 100$$

4.4.7 *In-vitro* Untersuchungen an Hepatozyten

Die Zellexperimente wurden von Walgren und Buse durchgeführt [Walgren et al, 2002]. Die gewonnenen Zellüberstände und Zellen aus diesen Untersuchungen wurden uns zur Konzentrationsbestimmung zur Verfügung gestellt. Die intrazellulären und extrazellulären Konzentrationen von TNLA, BNLA und α -Liponsäure wurden mit Hilfe der ECD-HPLC-Methode für Dialysate (Kapitel 4.4.3 / Änderungen der Methode in Kapitel 4.2.7) bestimmt.

4.4.7.1 *Gewinnung und Aufarbeitung der Zellen und des Mediums*

Long Evans Ratten wurden über 24 h nüchtern gesetzt, getötet und die Leber entnommen. Die so erhaltenen Hepatozyten wurden dann als ganze Zellen über Nacht in Zellmedium (Kapitel 4.2.7) kultiviert. Die Inkubation mit Dexlipotam erfolgte zu unterschiedlichen Zeiten (0, 5, 15, 30, 60, 120, 180 min) und jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 25, 50 und 100 nmol/ml).

Das Zellmedium wurde zu den unterschiedlichen Zeiten abgetrennt und bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden in 0,5 ml Waschlösung gewaschen (Kapitel 4.2.7), und zentrifugiert (2000 g), um das Zellpellet von der Flüssigkeit abzutrennen. Nachdem der Überstand vorsichtig abgetrennt wurde, wurden die Zellen in 50 μl Lyse-Puffer (Kapitel 4.2.7) resuspendiert und wiederum zentrifugiert (14 000 g, 15 min bei 0°C). Aus der so gewonnenen Zellfragmentsuspension wurde ein Aliquot entnommen. Die Proteinkonzentration wurde durch die Coomassie-Methode bestimmt. Die verbleibende Zellfragmentsuspension wurde bei -80°C eingefroren und zusammen mit den Zellüberständen nach Frankfurt verschickt.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen durch eine dünne Injektionsnadel mit Hilfe einer Spritze mehrmals aufgezogen. Dieser Vorgang sollte die Zellfragmentsuspension homogenisieren.

Jeweils ein Aliquot von 40 μl des Zellmediums und der Zellsuspension wurde mit Acetonitril denaturiert und der interne Standard Homoliponsäure (Kapitel 4.2.3 / 4.2.7) zugesetzt. Nach der Zentrifugation (3500 g über 5 min) konnten die ausgefällten Proteine von der Lösung abgetrennt werden. Der Protein freie Überstand wurde mit Eluent A (Kapitel 4.2.3) im Verhältnis 1 + 1 (v / v) verdünnt, um das Mischungsverhältnis des HPLC-Eluenten zu erhalten. Die so gewonnene Lösung wurde in das HPLC-System injiziert, die Analyten aufgetrennt und mit Hilfe der elektrochemischen Detektion (Kapitel 4.4.3) quantifiziert.

4.5 Mikrodialyse

Die Mikrodialyse ermöglicht die Bestimmung der freien Arzneistoffkonzentration im Interstitium verschiedener Gewebe, ohne das Gewebe ernsthaft zu beschädigen. Unser Zielorgan ist in dieser Arbeit der Muskel. Die Mikrodialyse wurde an narkotisierten Ratten während und nach einer Infusion durchgeführt. In den gewonnenen Proben konnte die freie extrazelluläre Gewebekonzentration bestimmt werden.

4.5.1 **Aufbau der Mikrodialylen-Sonde**

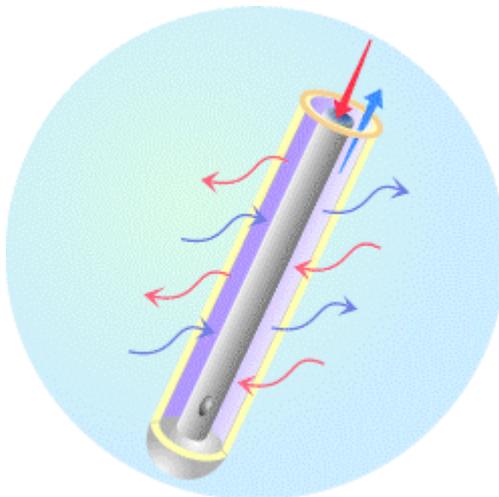


Abb. 14: Die Mikrodialylen Sonde [CMA, 2001],
Der rote Pfeil kennzeichnet das Perfusat, der blaue Pfeil das gewonnenen Dialysat

Die in dieser Arbeit benutzte Mikrodialylen-Sonde besteht aus einem Rohr, in das eine innere Röhre eingearbeitet ist (siehe Abbildung 14). In der inneren Röhre strömt die Perfusionsflüssigkeit (roter Pfeil) nach unten und erreicht durch die unten liegenden Ausgänge den Raum zwischen dem inneren Rohr und der äußeren Dialysemembran. Der Flüssigkeitsfluß bewegt sich im Gegenstrom zum oberen Ende der Zelle. In diesem Bereich findet die Diffusion von Molekülen durch die semipermeable Membran statt. Der blaue Pfeil zeigt das Dialysat beim Verlassen der Sonde [CMA, 2001].

4.5.2 **Prinzip**

Voraussetzung für die Mikrodialyse ist es, daß nach Substanzgabe der Arzneistoff vom Blutgefäß in das Gewebe transportiert wird. Das zu untersuchende Gewebe ist mit dem Arzneistoff, entweder in freier ungebundener oder in Protein-gebundener Form, angereichert.

Die Mikrodialyse basiert auf dem Dialyse-Prinzip. Mit dieser Technik ist es möglich, den freien ungebundenen Anteil der Arzneistoffkonzentration im Interstitium zu bestimmen. Der Anteil, der in Protein-gebundener Form vorliegt, wird mit dieser Technik nicht erfaßt. Abbildung 15 zeigt das Prinzip in schematischer Darstellung. Eine kleine Sonde wird in das zu untersuchende Gewebe implantiert. Sie besteht u.a. aus einer semipermeablen Membran, die für Wasser und andere nieder molekulare Substanzen, nicht jedoch für größere Moleküle, wie Proteine und an Proteine gebundene Arzneistoffe, durchlässig ist. Die Sonde wird auf der Innenseite mit einer Lösung durchgespült, welche die zu untersuchende Substanz nicht enthält, ihre Außenseite ist mit dem extrazellulären Raum in Kontakt. Die Diffusion von Substanzen im extrazellulären Raum durch die Membran hindurch geschieht aufgrund des vorherrschenden Konzentrationsgradienten. Der kontinuierliche Fluß von Lösung durch die Sonde befördert die zu untersuchende Substanz zur Probenentnahme [Kovar et al, 1997; Kovar und Derendorf 1997].

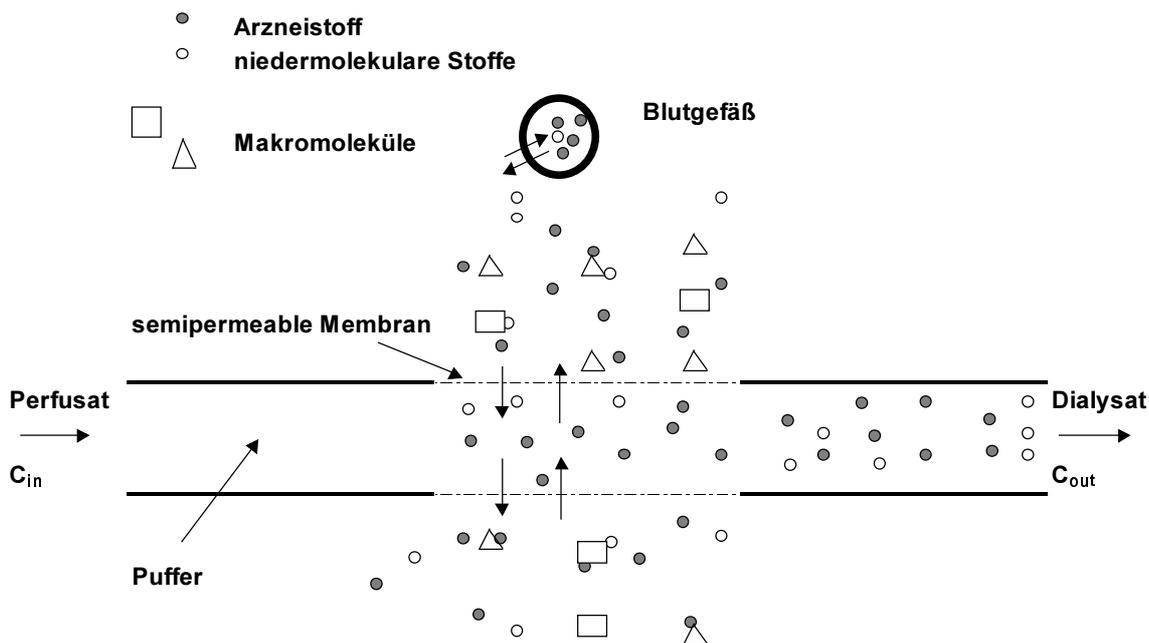


Abb. 15: Schema der Mikro dialyse:

Nach Substanzgabe wird der Arzneistoff, hier R(+)- α -Liponsäure, in das Gewebe transportiert. Der Arzneistoff liegt entweder in Protein-gebundener Form oder in freier Form vor. Durch die Sonde wird Puffer in das Gewebe transportiert. Durch den vorherrschenden Konzentrationsgradienten wird die Substanz durch die Membran diffundieren und kann im Dialysat analytisch gemessen werden. C_{in} beschreibt die Konzentration im Perfusat, C_{out} die Konzentration im Dialysat [Elmqvist und Sawchuk 1997].

Die üblichen Flußraten bewegen sich von einem bis zu fünf Mikrolitern pro Minute. Je größer die Flußrate, desto höher das gewonnene Probenvolumen und desto niedriger die Konzentration des Dialysats.

Das aufgefangene Dialysat kann in der Regel direkt ohne weitere Aufarbeitung der Lösung mittels HPLC analysiert werden. [Kovar, 1997; Kovar und Derendorf, 1997]

4.5.3 Messungen

Das Hauptaugenmerk der Mikro dialyse in der Pharmakokinetik liegt auf der Untersuchung von Konzentrations-Zeitverläufen von Arzneistoffen im Gewebe nach verschiedenen Dosierschemata. Ein Equilibrium zwischen Perfusionsflüssigkeit und Gewebe kann aufgrund des kontinuierlichen Flusses der Perfusionsflüssigkeit nicht erzielt werden. Die Konzentrationen in der Perfusionsflüssigkeit sind jedoch proportional zu den Konzentrationen im Gewebe. Für die quantitative Analyse mußte die Sonde daher vor dem Gebrauch kalibriert werden.

Bei der Retro dialyse wird das Verfahren der Mikro dialyse umgekehrt. Nur das Perfusat enthält die zu untersuchende Substanz. Nimmt man an, daß die Diffusion durch die Membran in beiden Richtungen gleich ist, kann die Wiederfindungsrate aus der Konzentrationsabnahme des Perfusat bestimmt werden.

- In-vitro Wiederfindungsrate

Die zu untersuchende Substanz (R(+)- α -Liponsäure) wurde in einer definierten Konzentration (1000 ng/ml, 4.3.1.1) gelöst in Ringerlösung mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 μ l/min perfundiert und in 10 min-Intervallen über 50 min lang gesammelt. Die Sonde wurde in einem Gefäß mit Ringerlösung plaziert. Auf Grund des vorherrschenden Konzentrationsgradienten diffundierte die Substanz aus dem Perfusat und reicherte sich in dem Gefäß an (schematische Darstellung in Abbildung 16). Aus der Differenz zwischen der Konzentration im Perfusat (C_{in}) und der Konzentration im Dialysat (C_{out}) kann die Wiederfindungsrate der zu testenden Substanz (Gleichung 4) unter in-vitro Bedingungen berechnet werden.

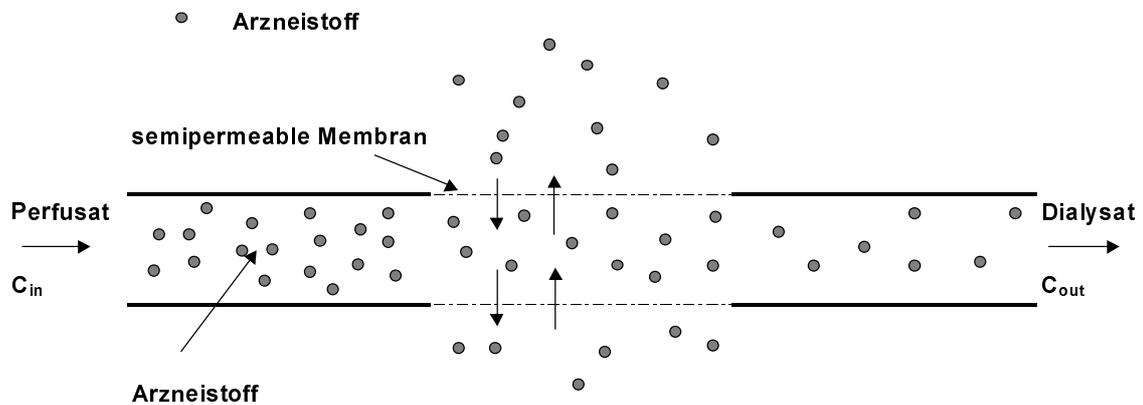


Abb. 16: Schema der Retrodialyse unter in-vitro Bedingungen:
 Durch die Sonde wird der im Puffer gelöste Arzneistoff in die außerhalb liegende Flüssigkeit transportiert und reichert sich dort an. Die Anfangskonzentration im Perfusat (C_{in}) wird dadurch verringert. Aus dieser Differenz zwischen der Konzentration im Perfusat (C_{in}) und im Dialysat (C_{out}) errechnet sich die Wiederfindungsrate [Elmqvist und Sawchuk, 1997].

Gleichung 4
$$R_{in\ vitro} = 1 - \frac{C_{out}}{C_{in}}$$

• In-vivo Wiederfindungsrate

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate unter in-vivo Bedingungen wurde vor dem eigentlichen Mikrodialyseversuch und demnach vor der Applikation des Arzneistoffes durchgeführt. Auch in diesem Fall wurde die zu untersuchende Substanz (R(+)- α -Liponsäure) mit einer definierten Konzentration (630 ng/ml, 4.3.1) durch die Sonde perfundiert. Die Sonde wurde vorher im Muskel eines noch unbehandelten Tieres plaziert. In 10 min-Intervallen wurde das Perfusat aufgefangen und die Konzentration der Lösung bestimmt. Aus der Differenz der gemessenen Konzentrationen im Dialysat und im Perfusat konnte die Wiederfindungsrate (Gleichung 5) unter in-vivo Bedingungen errechnet werden. In Abbildung 17 ist das Prinzip der Retrodialyse schematisch dargestellt.

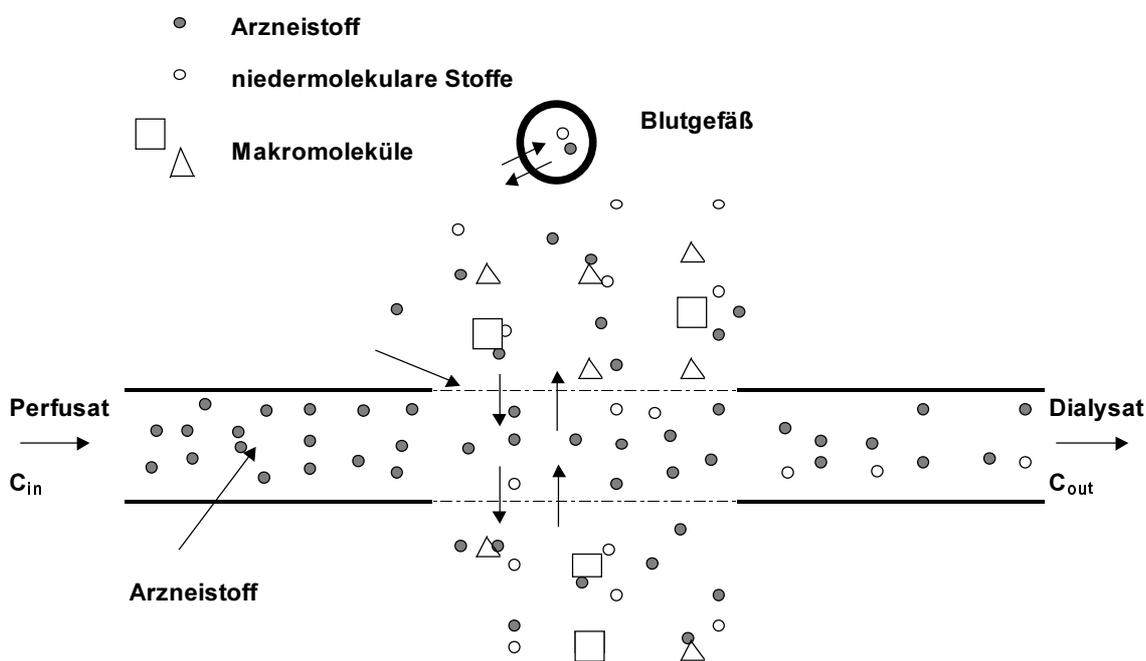


Abb. 17: Schema der Retrodialyse unter in-vivo Bedingungen: Durch die Sonde wird der im Puffer gelöste Arzneistoff in das Gewebe transportiert und reichert sich dort an. Die Anfangskonzentration im Perfusat (C_{in}) wird dadurch verringert. Aus dieser Differenz zwischen der Konzentration im Perfusat und im Dialysat (C_{out}) errechnet sich die Wiederfindungsrate [Elmqvist und Sawchuk, 1997].

Gleichung 5
$$R_{in\ vivo} = 1 - \frac{C_{out}}{C_{in}}$$

4.6 Studienmodelle

In diesem Kapitel werden die notwendigen Methoden der Kinetikstudien, wie zum Beispiel das Prozedere der Applikation oder der Blutentnahme beschrieben. Das genaue Design der jeweiligen Kinetikstudien (Blutentnahmezeiten, Urinsammelintervalle und Anzahl der Tiere oder Probanden) wurde in dieser Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit nur im Ergebnisteil dargestellt.

4.6.1 Die Ratte

Die Nager-Spezies Ratte ist die am häufigsten verwendete Tierspezies für die Testung von Arzneimitteln. Sowohl Untersuchungen zur Toxikologie als auch zur Pharmakodynamik werden an standardisierten Zuchtstämmen durchgeführt. Der Vorteil besteht darin, daß historische Daten zur Beurteilung der beobachteten Effekte gegenüber dem Normzustand (z.B. Organgewichte, Blutnormwerte etc.) vorhanden sind. Darüber hinaus ist diese Spezies einfach zu züchten und zu halten. Erste Untersuchungen über den Metabolismus von rac- α -Liponsäure zeigten, daß der Metabolismus der Ratte dem Menschen ähnelte, während der Hund einen anderen Metabolismus zeigte [Schupke et al, 2001]. Aus diesem Grund wurden erste Untersuchungen an der Ratte vorgenommen.

Für die pharmakokinetischen Studien an Ratten wurden Laborratten folgender Spezifikation und Herkunft verwendet:

Ordnung:	Nagetiere (Rodentia)
Spezies:	Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)
Zuchtstamm:	Wistar (Albino)
Alter:	10 – 12 Wochen
Gewicht:	250 – 450 g
Züchter:	Wiga, Sulzfeld, Deutschland

Tierhaltung

Die Ratten wurden mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn vom Züchter angeliefert und im Tierhaus der VIATRIS GmbH & CO. KG, Abteilung Early Phase Development, Frankfurt, getrennt nach Geschlecht, gehalten. Die Haltung erfolgte bei konstanter Raumtemperatur (20-22°C), einer relativen Luftfeuchte von 50 – 55 %, einem 12/12 h Licht/Dunkel-Wechsel, sowie einem 15-fachen Luftwechsel pro Stunde.

Wenige Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere jeweils in das Versuchslabor gebracht, in dem die gleichen Licht- und Klimabedingungen herrschten wie im Tierhaltungsgebäude.

Ernährung der Versuchstiere

Die Ratten konnten Wasser in beliebiger Menge aus Wasserflaschen trinken und hatten Zugang zu standardisiertem Trockenfutter (Kapitel 4.3.1).

Überprüfung des Gesundheitszustandes

Alle Tiere wurden bei der Anlieferung und während der gesamten Haltungs- und Versuchsdauer von der zuständigen Tierärztin auf äußerliche Anzeichen von Krankheit untersucht. Bei Beeinträchtigung des Normalzustandes wurden die Tiere von den Versuchen ausgeschlossen.

Experimentelle Durchführung der Tierversuche

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche sind nach dem Tierschutzgesetz in seiner Version von August 1986 anzeigepflichtig. Die verwendeten Methoden wurden dementsprechend bei dem zuständigen Regierungspräsidium Darmstadt unter dem Aktenzeichen II 17e-19c 20/25-F 121/ Anz 30 angezeigt. Die Versuchstiere wurden in Gruppen eingeteilt. Bei pharmakokinetischen Untersuchungen wurde die Einteilung nach vorheriger Randomisierung durchgeführt. Bei der Mikrodialyse-Studie war diese Randomisierung nicht möglich, da sich die Studie über mehrere Monate hinzog, und die Tiere für die gesamte Untersuchung nicht gemeinsam bestellt werden konnten.

4.6.1.1 Kinetikstudien an der Ratte

Verabreichung der Testsubstanz

Für die pharmakokinetischen Untersuchungen wurden 3 Applikationsrouten gewählt. Bei allen Applikationen wurde das Tier durch Äther-Inhalation leicht narkotisiert. Die intravenöse Injektion (i.v.) wurde bei den Ratten in eine der Schwanzvenen vorgenommen. Die korrekte Platzierung der Injektionsnadel wurde durch eine erleichterte Beweglichkeit der Nadel in Längsrichtung der Vene und durch Aspiration von Blut sichergestellt. Die orale Gabe (p.o.) wurde den Tieren mittels Schlundsonde verabreicht. Für die dritte Applikationsroute, die intraperitoneale Applikation (i.p.), wurde den Tieren die Applikationslösung in den unteren Bauchraum injiziert. Auch in diesem Fall wurde die korrekte Platzierung der Injektionsnadel durch eine leichte Beweglichkeit der Nadel in waagerechter Richtung sichergestellt. Durch vorherige Aspiration ohne Flüssigkeitsgewinnung wurde außerdem ausgeschlossen, daß durch die Platzierung eine Gefäßverletzung (Blut) oder Darmverletzung (Darmflüssigkeit) hervorgerufen wurde.

Technik der Blutentnahme

Falls nur eine Blutentnahme am Tier vorgenommen wurde, wurde das Blut unter tiefer Äther-Narkose durch Herzpunktion am geöffneten Brustraum vollständig entnommen und das Tier euthanasiert.

Bestand die Notwendigkeit der mehrfachen Blutentnahme, wurde der Ratte unter leichter Äther-Narkose mehrmals, jeweils zu festgelegten Zeitpunkten nach Applikation der Testsubstanz, ca. 500 – 800 µl Blut entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten mit Hilfe heparinierter Glaskapillaren (Kapitel 4.3.1) aus dem retroorbitalen venösen Plexus.

Die Plasmagewinnung aus dem antikoagulierten Blut ist in Kapitel 4.2 beschrieben.

Organentnahme

Nach der Blutentnahme wurden von der toten Ratte die Organe Leber, Niere, Herz und Proben aus dem Hinterlaufmuskel entnommen. Zusätzlich wurde Proben aus dem Nervengewebe (Nervus ischiadicus und Nervus femoralis) und den Gefäßen (Aorta) entnommen und sofort bei –20°C eingefroren. Die entnommenen Gewebeproben wurden mit Zellulose abgetupft, um noch anhaftendes Blut oder eventuell anhaftendes Fremdgewebe zu entfernen.

4.6.1.2 Mikrodialyse zur Gewinnung von Gewebeflüssigkeit im Muskel

Verabreichung der Testsubstanz

Die Testsubstanz wurde als Infusion über 1 h in die Vena femoralis injiziert (Dosierung 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Anästhesie Prozedur

Die Tiere wurden im ersten Schritt durch Inhalation von Äther, anschließend durch i.p. Applikation von Urethan (30 % in NaCl w / v, 5 ml/kg) narkotisiert. Die ausreichende Tiefe der Anästhesie wurde durch Ausbleiben des Zwischenzahn- und Corneareflexes bestätigt.

Weitere Dosierungen der Urethanlösungen wurden verabreicht, wenn erste Anzeichen erkennbar waren, daß das Tier während des Experiments das Bewußtsein wiedererlangen würde.

Blutentnahme

Für die Blutentnahme wurde nach einem Schnitt im Halsbereich ein Katheter in die Arteria carotis eingesetzt und in geeigneter Weise fixiert. Blutproben (ca. 500 µl) wurden zu festgelegten Zeiten während und nach der Infusion in Polypropylengefäße mit Antikoagulan-Lösung (Kapitel 4.3.1) entnommen. Die heparinisierten Blutproben wurden sofort zentrifugiert, und das so gewonnene Plasma wird bei -20°C gelagert.

Mikrodialyseversuch

Von dem Hinterlauf des Tieres, der nicht für die Infusion genutzt wird, wurde die obere Hautschicht entfernt. Im ersten Schritt wurden die Sonden-Einführhilfen (Kapitel 4.3.1) mit Hilfe einer Nadel in den Muskel plaziert. Die Nadel konnte danach leicht herausgenommen werden, und über die Sonden-Einführhilfe konnten zwei Mikrodialysesonden in das Gewebe implantiert werden. Die Schutzfolie, aus der die Einführhilfe bestand, konnte vorsichtig entfernt werden, so daß die Mikrodialysesonden im Muskel implantiert waren. Der Muskel wurde durch Tücher, die mit physiologischer Kochsalz getränkt waren, während der Studie fortwährend befeuchtet.

Folgender Ablauf gliederte den Mikrodialyse-Versuch:

1. Schritt Equilibrierung: Ringerlösung (Kapitel 4.3.1) wurden durch die Sonden mit einer Flußgeschwindigkeit von 5 µl/min perfundiert und über 30 min gesammelt
2. Schritt Retrodialyse: Dexlipotam-Lösung (1 µg/ml, Kapitel 4.3.1) wurde mit der gleichen Fließgeschwindigkeit perfundiert. Das so gewonnene Eluat wurde in 10 min-Schritten über 50 min gesammelt (siehe in-vivo Wiederfindungsrate, Kapitel 4.5.3).
3. Schritt Equilibrierung: Nach der Retrodialyse wurde 30 min lang Ringerlösung (Kapitel 4.3.1) durch die Sonden perfundiert. Das gewonnene Eluat wurde in 10 min-Intervallen gesammelt.
4. Schritt Gewebeflüssigkeitssammlung nach Gabe der Testsubstanz: Nach Start der Infusion wurde in 10 min-Intervallen über 300 min Gewebeflüssigkeit gesammelt.

Falls notwendig wurden die Tiere nach Tracheotomie intubiert und mit Raumluft künstlich beatmet. Die Körpertemperatur wurde während des Experiments mit Hilfe einer Heizplatte (38°C) konstant gehalten. Am Ende des Versuchs wurden die Sonden und die Katheter entfernt, und das Tier euthanasiert.

4.6.2 *Der Mensch*

Die ersten Anwendungen am Menschen hatten zunächst das Ziel, die Verträglichkeit eines neuen, experimentell bereits gut untersuchten Stoffes an gesunden Versuchspersonen zu prüfen. Weiterhin wurde in diesen Studien getestet, ob die aus den Tierversuchen gewonnenen Erkenntnisse (Pharmakokinetik und Pharmakodynamik) auf den Menschen übertragbar sind.

Gesunde Probanden

Geschlecht:	weiblich oder männlich
Alter:	18 – 45 Jahre
Ethnische Zugehörigkeit:	Kaukasier (Europäer)
Körpergewicht:	± 20 % vom Normgewicht (Broca-Index)

Gleichung 6

$$\text{Broca Index (geschlechtsbezogen)} = \frac{\text{Gewicht (kg)}}{(\text{Größe (cm)} - 100) \cdot f}$$

f = 0.9 für Männer, f = 0.85 für Frauen

4.6.2.1 Kinetikstudien am Menschen

Verabreichung der Prüfsubstanz

Die Prüfsubstanz wurde oral in sitzender Position verabreicht. Die Probanden waren 10 h vor und 4 h nach der Verabreichung nüchtern.

Dexlipotam oder rac- α -Liponsäure wurde als Einfachgabe gegeben.

DEX TAB: orale Gabe mit 200 ml gekühltem Trinkwasser, 960 mg Dexlipotam \cong 604.8 mg R(+)- α -Liponsäure (2 Dexlipotam Filmtabletten je 480 mg, Kapitel 4.3.2)

Thio TAB: orale Gabe mit 150 ml gekühltem Trinkwasser, 600 mg R(+)- α -Liponsäure (1 Thioctacid Filmtablette, Kapitel 4.3.2)

Technik der Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde an der Unterarm-Vene mit Hilfe eines Venenverweilkatheters durchgeführt. Das Blut wurde in heparinisierte Plastikgefäße (NH₄-Monovette, Kapitel 4.3.2) zu definierten Zeitpunkten vor und nach Substanzgabe entnommen und innerhalb von 30 min bei 2000 g zentrifugiert. Das so erhaltene überstehende Plasma wurde in neue Probengefäße überführt und bei – 20°C eingefroren.

Die tatsächlichen Zeiten der Blutentnahmen wurden genau dokumentiert. Innerhalb der akzeptierten Abweichungen der Blutentnahmezeiten (<2 h: \pm 1 min; 2-6 h: \pm 3 min) wurden die theoretischen Blutentnahmezeiten für die pharmakokinetische Auswertung herangezogen. Falls die akzeptierten Zeitabweichungen überschritten wurden, wurden die realen Entnahmezeiten für die Auswertung genommen.

Sammeln des Urins

Urin wurde bei gesunden Probanden am Tage der Substanzgabe nach vorgegebenem Zeit-Schema gesammelt.

Eventuell abweichende Entnahmezeiten wurden dokumentiert. Von jeder Urinsammelperiode wurde das Volumen gemessen. Je zwei 10 ml Aliquote (Kapitel 4.3.2) wurden entnommen und bei -20°C gelagert. Zwischenzeitlich abgesetzte Urinmengen im geplanten Zeitintervall wurden bis zum Ende der jeweiligen Sammelperiode bei +4°C im Kühlschrank in geeigneten Gefäßen gelagert, erst wenn die Sammelperiode beendet war, wurde der Gesamt-Urin zur Lagerung eingefroren.

4.7 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik ist ein Teilgebiet der Pharmazie und Pharmakologie. Sie beschäftigt sich damit, den zeitlichen Verlauf der Arzneimittel- sowie der Metaboliten-Konzentrationen im Organismus quantitativ zu beschreiben. Ziel dieses Wissenschaftszweiges ist es, zur optimalen Arzneitherapie eines individuellen Patienten mit einem bestimmten Arzneimittel beizutragen. Grundlage dieses Vorgehens ist die Erkenntnis, daß es nicht ausreichend ist, sich bei der Festlegung einer medikamentösen Therapie einer Krankheit für ein bestimmtes Arzneimittel zu entscheiden, sondern, daß es ebenso wichtig ist, dieses Arzneimittel in einer optimalen Weise anzuwenden.

Zu diesem Zweck sammelt die Pharmakokinetik Informationen über das Schicksal eines Arzneistoffes nach seiner Anwendung am Menschen. Wie schnell wird er resorbiert, wie wird er im Organismus nach der Resorption verteilt, wie wird er metabolisiert und ausgeschieden? Zu diesem Zweck werden in der Regel die Arzneistoff- und Metaboliten-Konzentrationen in Plasma und Urin über die Zeit verfolgt, da diese beiden Körperflüssigkeiten relativ leicht zugänglich sind. Mit Hilfe der ermittelten Daten wird dann versucht, pharmakokinetische Parameter für den jeweiligen Arzneistoff zu bestimmen, die dessen pharmakokinetisches Verhalten charakterisieren und die es erlauben, Arzneistoff-Konzentrationen zu jedem beliebigen Zeitpunkt nach Applikation zu berechnen [Derendorf und Garrett, 1987].

4.7.1 Kompartimentelle Auswertung

Während der Resorption, Verteilung und Elimination eines Arzneistoffes im Organismus ändert sich dessen Konzentration in den Körperflüssigkeiten als Funktion der Zeit nach Arzneistoffapplikation. Diese Transportvorgänge lassen sich als Transport erster Ordnung beschreiben. Die Änderungsgeschwindigkeit der Arzneistoffkonzentration ist nicht konstant, sondern proportional zur jeweils vorliegenden Konzentration.

Ein Arzneistoff, der mit einer Kinetik erster Ordnung eliminiert wird, wird pro Zeiteinheit mit einer konstanten Fraktion der jeweiligen Arzneistoffmenge ausgeschieden. Als Differentialgleichung geschrieben bedeutet dies:

Gleichung 7
$$\frac{dC}{dt} = -k \cdot C$$

(k wird als Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung bezeichnet)

Ein seltener Transportvorgang ist ein Transport nullter Ordnung. Hierbei ist die Änderungsgeschwindigkeit konstant und unabhängig von der jeweils vorliegenden Konzentration des Arzneistoffes.

Gleichung 8
$$\frac{dC}{dt} = -k_0$$

(k₀ wird als Geschwindigkeitskonstante nullter Ordnung bezeichnet)

Beispiele für diese Art des Transportvorgangs liegen immer dann vor, wenn z.B. ein Enzym mit begrenzter Kapazität an dem Transportvorgang beteiligt ist. Aber auch die Infusion eines Wirkstoffs mit einer konstanten Geschwindigkeit ist ein Transportvorgang nullter Ordnung.

Um den zeitlichen Verlauf der Arzneistoffkonzentration im Organismus zu beschreiben, hat es sich als hilfreich erwiesen, den Körper als ein System von kinetischen Kompartimenten anzusehen, selbst wenn diese Kompartimente nicht unbedingt auf einer physiologischen Grundlage basieren. In unserem Fall geht man davon aus, daß der Arzneistofftransport zwischen den einzelnen Kompartimente nach einer Kinetik erster Ordnung erfolgt und daß eine lineare Pharmakokinetik vorliegt. Das System der Kompartimente ermöglicht es, Gleichungen zu entwickeln, die den zeitlichen Verlauf der Arzneistoffkonzentration in verschiedenen Körperflüssigkeiten als Funktion der Zeit beschreiben und bestimmte pharmakokinetische Parameter zu bestimmen, die das kinetische Verhalten des Arzneistoffes oder der Metaboliten charakterisieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Gleichungen sind im folgenden Kapitel beschrieben. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Software-Programms Scientist Microsoft Windows Version 2.0 (MicroMath Scientific Software, Utah, USA) durchgeführt.

Die algorithmische Suche des verwendeten Programms nach einer möglichst optimalen Anpassung der Funktion an die Datenpunkte geschieht nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate zwischen dem gemessenen Wert (C_{obs}) und dem berechneten Wert (C_{calc}). Bei dieser Methode wird der hohe absolute Wert der Abweichung bei hohen Konzentrationen gegenüber dem kleinsten Wert bei kleinen Konzentrationen in der Bedeutung für die Anpassung der Funktion überschätzt. Eine häufig angewendete Strategie der Kurvenanpassung ist es daher, innerhalb des Datensatzes eine Wichtung vorzunehmen, um die Anpassung an die letzten Datenpunkte zu verbessern. Durch die Wichtung mit einem Wichtungsfaktor (WF), gebräuchlich sind Werte zwischen 0 und 2, werden bei der Regressionsanalyse die Fehlerquadrate der Abweichungen der niedrigen Konzentrationen stärker berücksichtigt.

Gleichung 9
$$\text{Wichtung} = \frac{1}{C_{\text{obs}}^{\text{WF}}}$$

Bei einem Wichtungsfaktor 0 werden alle Konzentrationen gleich behandelt, während der Wichtungsfaktor 2 eine starke Anpassung zugunsten der niedrigen Konzentrationen im terminalen Kurvenbereich erzwingt. Das Wichtungsverfahren findet auch Anwendung in der Analytik (Kapitel 4.4). Die gewichtete Summe der Abweichungsquadrate (S) ergibt sich aus der Gleichung 10.

Gleichung 10
$$S = \sum_{i=1}^n \frac{1}{C_{\text{obs}}^{\text{WF}}} \cdot (C_{\text{obs}} - C_{\text{calc}})^2$$

Die Anpassung der Funktion folgt dann der Suche nach der Minimierung der gewichteten Abweichungsquadrate.

4.7.1.1 Lineare Pharmakokinetik im Ein-Kompartiment-Modell

Das einfachste pharmakokinetische Modell ist das Ein-Kompartiment-Modell. Der Organismus wird hier als ein System angesehen, in dem sich nach der Arzneimittelgabe alle Körperflüssigkeiten im Fließgleichgewicht befinden. Die Verteilung des Arzneistoffs erfolgt in einer vernachlässigbar kurzen Zeitspanne.

Die Gewebe- und Blutkonzentrationen können unterschiedlich sein, obwohl der Organismus als ein einziges pharmakokinetisches Modell angesehen wird. Aber verändert sich die Konzentration im Blut, so ändert sich gleichzeitig auch die Arzneistoffkonzentration in allen anderen Körperflüssigkeiten in gleichem Maße.

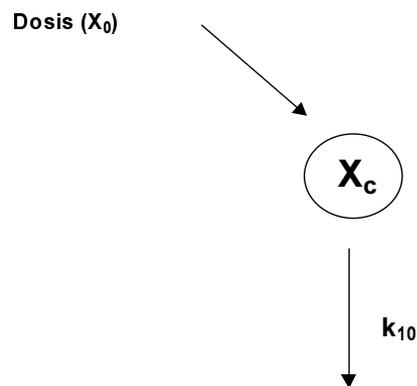


Abb. 18: Ein-Kompartiment-Modell
 X_c stellt die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment dar, k_{10} ist die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante und X_0 die Arzneistoffdosis.

Der einfachste Fall eines pharmakokinetischen Modells ist der, bei dem der Arzneistoff intravenös in den Organismus injiziert wurde. Die Verteilung des Arzneistoffes verläuft so rasch, daß dieser Vorgang zeitlich zu vernachlässigen ist. Die Substanz wird dann mit einer Kinetik erster Ordnung ausgeschieden; die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante für diesen Vorgang ist k_{10} . Bezeichnet man die gegebene Arzneistoffdosis als X_0 , die Arzneistoffmenge im Organismus als X_c , so ergibt sich das in Abbildung 18 dargestellte Modell.

4.7.1.2 Lineare Pharmakokinetik im Zwei-Kompartiment-Modell

Im ersten Modell wurde die Verteilungsphase des Arzneistoffs vernachlässigt.

Im Falle von α -Liponsäure ist dies nicht zulässig, da es eine gewisse Zeit dauert, bis alle Körperflüssigkeiten und Bindungsstellen im Organismus miteinander im Konzentrationsgleichgewicht stehen. Nachdem der Arzneistoff im Körper systemisch verfügbar ist, kann man eine Verteilungsphase beobachten, in der die Plasmakonzentration relativ schnell absinkt. Nach Erreichen des Konzentrationsgleichgewichts nimmt der Plasmaspiegel langsamer ab, man spricht von der Eliminationsphase. Aber auch während der Verteilungsphase findet Elimination und während der Eliminationsphase findet Verteilung statt. Während im Ein-Kompartiment-Modell die Konzentrations-Zeit-Kurven in allen Körperflüssigkeiten zu allen Zeiten parallel verlaufen, ist dies im Mehr-Kompartiment-Modellen anders. Zum Beispiel sinkt die Arzneistoffkonzentration im Plasma nach intravenöser Injektion von der ersten Minute an ab, zur gleichen Zeit aber steigt diese im Gewebe während der Verteilungsphase an. Erst nachdem ein Gleichgewichtszustand erreicht ist, vermindert sich die Arzneistoffkonzentration im Gewebe schließlich mit gleicher Gleichung. Somit kann die Verteilungsphase nicht mehr vernachlässigt werden, sondern muß durch ein Mehr-Kompartiment-Modell zum Ausdruck gebracht werden.

In dieser Arbeit wurden Gleichungen für ein Zwei-Kompartiment-Modell verwendet, die auf verschiedene Applikationsrouten basieren.

Für die Herleitung [Gibaldi und Perrier, 1982; Benet, 1972] der Gleichungen für lineare „Mammillary Compartment model“ ist eine Input- und eine Dispositionsfunktion notwendig. Die Inputfunktion beschreibt den Prozess, wie die Substanz in den Körper gelangt. Die Dispositionsfunktion beschreibt alle Prozesse, die mit der Substanz im Körper ablaufen (Distribution, Metabolismus oder Elimination). Das Produkt dieser zwei Funktionen beschreibt die Laplace-Transformation der Gleichung, die die zeitliche Änderung der Arzneistoffmenge in dem Kompartimentmodell darstellt. Durch die Anwendung der Partialbruchzerlegung erhält man die inverse Laplace-Transformation, also die Gleichung, die die Konzentrations-Zeit-Kurve des Arzneistoffes beschreibt.

Zwei-Kompartiment-Modell nach intravenöser Gabe:

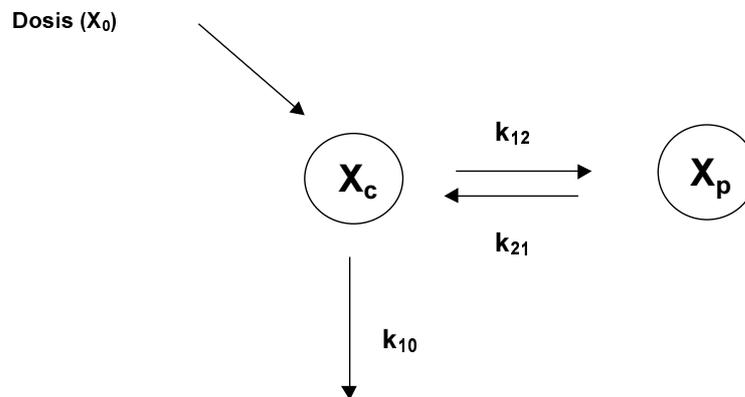


Abb. 19: Zwei-Kompartiment-Modell nach intravenöser Gabe
 X_c stellt die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment, X_p im peripheren Kompartiment dar, k_{10} ist die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante, k_{12} und k_{21} sind die Geschwindigkeitskonstanten des Stoffaustausches zwischen den zwei Kompartimenten und X_0 ist die Arzneistoffdosis.

Konzentration des Arzneistoffs im zentralen Kompartiment:

In Abbildung 19 ist ein Zwei-Kompartiment-Modell nach intravenöser Gabe dargestellt. Die Differentialgleichung (Gleichung 11) beschreibt die Änderung der Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment (X_c) mit der Zeit:

Gleichung 11
$$\frac{dX_c}{dt} = -k_{12} X_c + k_{21} X_p - k_{10} X_c$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich der gegebenen Dosis, also $X_c = X_0$)

Die Differentialgleichung (Gleichung 12) beschreibt die Änderung der Arzneistoffmenge im peripheren Kompartiment (X_p) mit der Zeit:

Gleichung 12
$$\frac{dX_p}{dt} = k_{12} X_c - k_{21} X_p$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich 0, also $X_p = 0$)

Die Inputfunktion für intravenöse Applikation als Bolusgabe beschreibt Gleichung 13:

Gleichung 13
$$in_s = X_0$$

Die Dispositionsfunktion basierend auf dem Modell in Abbildung 19 beschreibt Gleichung 14:

Gleichung 14
$$d_{s,c} = \frac{(s + E_2)}{(s + \alpha)(s + \beta)}$$

($E_1 = k_{10} + k_{12}$ und $E_2 = k_{21}$ basierend auf Modell in Abbildung 19)

(α und β sind Makrokonstanten, die Umrechnung von Mikro- zu Makrokonstanten beschreiben die Gleichungen 68 und 69)

Die Laplace-Transformation zur Beschreibung der Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment als Produkt aus Input- und Dispositionsfunktion stellt Gleichung 15 dar:

Gleichung 15
$$a_{s,c} = \frac{X_0(s + E_2)}{(s + \alpha)(s + \beta)}$$

Gleichung 16 beschreibt die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment als Funktion der Zeit (inverse Laplace-Transformation):

Gleichung 16
$$X_c = \frac{X_0(E_2 - \alpha)}{(\beta - \alpha)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{X_0(E_2 - \beta)}{(\alpha - \beta)} \cdot e^{-\beta t}$$

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment (V_c), das die Arzneistoffmenge zur gemessenen Arzneistoffkonzentration in Beziehung setzt, ermöglicht die Umformung der Gleichung 16. Man erhält die Gleichung 17 zur Beschreibung der Konzentration des Arzneistoffes im zentralen Kompartiment als Funktion der Zeit:

Gleichung 17
$$\frac{X_c}{V_c} = \frac{X_0(E_2 - \alpha)}{V_c(\beta - \alpha)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{X_0(E_2 - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)} \cdot e^{-\beta t}$$

Gleichung 20 zeigt die vereinfachte Form der Gleichung 17, die Konstanten A und B werden in Gleichung 18 und 19 beschrieben.

Gleichung 18
$$A = \frac{X_0(E_2 - \alpha)}{V_c(\beta - \alpha)}$$

Gleichung 19
$$B = \frac{X_0(E_2 - \beta)}{V_c(\alpha - \beta)}$$

Gleichung 20
$$C_c = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

Zwei-Kompartiment-Modell nach Infusion:

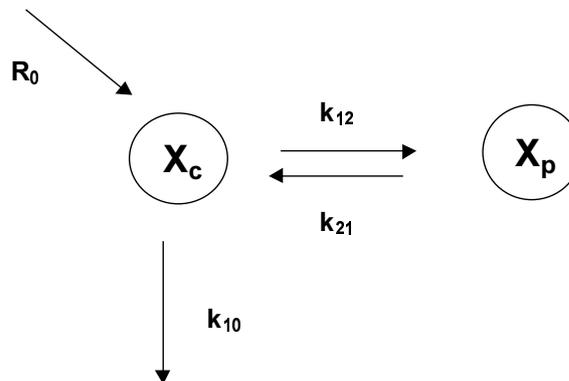


Abb. 20: Zwei-Kompartiment-Modell nach Infusion

R_0 stellt die Infusionsrate, also die Stoffmenge pro Zeiteinheit, dar, die in das zentrale Kompartiment gelangt, X_c oder X_p stellen die Stoffmenge im zentralen oder im peripherem Kompartiment dar, k_{10} ist die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante, k_{12} und k_{21} sind die Geschwindigkeitskonstanten des Stoffaustausches zwischen den zwei Kompartimenten.

Konzentration des Arzneistoffs im zentralen Kompartiment:

Abbildung 20 zeigt das Zwei-Kompartiment-Modell nach Infusion. Basierend auf diesem Modell wird die Funktion, die den Konzentrations-Zeitverlauf des Arzneistoffes im zentralen Kompartiment nach Infusion beschreibt, hergeleitet.

Die Differentialgleichung (Gleichung 21) beschreibt die Änderung der Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment (X_c) mit der Zeit:

Gleichung 21
$$\frac{dX_c}{dt} = R_0 - k_{12} X_c + k_{21} X_p - k_{10} X_c$$

 (zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich 0, also $X_c = 0$)

Die Differentialgleichung (Gleichung 22) beschreibt die Änderung der Arzneistoffmenge im peripheren Kompartiment (X_p) mit der Zeit:

Gleichung 22
$$\frac{dX_p}{dt} = k_{12} X_c - E_2 X_p$$

 (zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich 0, also $X_p = 0$,
 $E_1 = k_{10} + k_{12}$ und $E_2 = k_{21}$ basierend auf Modell in Abbildung 20)

Die Inputfunktion für Infusion (Kinetik nullter Ordnung) ist in Gleichung 23 beschrieben:

Gleichung 23
$$in_s = \frac{R_0(1 - e^{-Ts})}{s}$$

 (R_0 = Infusionsrate, T = Dauer der Infusion)

Gleichung 14 beschreibt die Dispositionsfunktion:

Gleichung 14
$$d_{s,c} = \frac{(s + E_2)}{(s + \alpha)(s + \beta)}$$

 (α und β sind Makrokonstanten, die Umrechnung von Mikro- zu Makrokonstanten beschreiben die Gleichungen 68 und 69)

Die Laplace-Transformation zur Beschreibung der Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment als Produkt aus Input und Dispositionsfunktion beschreibt Gleichung 24:

Gleichung 24
$$a_{s,c} = \frac{R_0(1 - e^{-Ts})}{s} \cdot \frac{(s + E_2)}{(s + \alpha)(s + \beta)}$$

Gleichung 25 beschreibt die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment als Funktion der Zeit (inverse Laplace-Transformation):

Gleichung 25
$$X_c = \frac{R_0(1 - e^{-T\alpha})(E_2 - \alpha)}{-\alpha(\beta - \alpha)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{R_0(1 - e^{-T\beta})(E_2 - \alpha)}{-\beta(\alpha - \beta)} \cdot e^{-\beta t}$$

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment (V_c), das die Arzneistoffmenge zur gemessenen Arzneistoffkonzentration in Beziehung setzt, ermöglicht die Umformung der Gleichung 25. Man erhält die Gleichung 26 zur Beschreibung der Konzentration des Arzneistoffes im zentralen Kompartiment als Funktion der Zeit:

Gleichung 26
$$\frac{X_c}{V_c} = \frac{R_0(1-e^{-T\alpha})(E_2-\alpha)}{V_c\alpha(\alpha-\beta)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{R_0(1-e^{-T\beta})(E_2-\beta)}{V_c\beta(\beta-\alpha)} \cdot e^{-\beta t}$$

Gleichung 27, 28 und 29 stellen Gleichung 26 in einfacher Form dar.

Gleichung 27
$$A = \frac{R_0(1-e^{-T\alpha})(E_2-\alpha)}{V_c\alpha(\alpha-\beta)}$$

Gleichung 28
$$B = \frac{R_0(1-e^{-T\beta})(E_2-\beta)}{V_c\beta(\beta-\alpha)}$$

Gleichung 29
$$C_c = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

Konzentration des Arzneistoffs im peripheren Kompartiment:

Die Differentialgleichung (Gleichung 30) beschreibt die Änderung der Arzneistoffmenge im peripheren Kompartiment (X_p) mit der Zeit:

Gleichung 30
$$\frac{dX_p}{dt} = k_{12} X_c - E_2 X_p$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich 0, also $X_p = 0$,

$E_1 = k_{10} + k_{12}$ und $E_2 = k_{21}$ basierend auf Modell in Abbildung 8)

Die Laplace-Transformation $a_{s,c}$ beschreibt die zeitliche Änderung in zentralen Kompartiment, die Laplace-Transformation $a_{s,p}$ beschreibt die zeitliche Änderung in peripheren Kompartiment. Die Umformung ergibt Gleichung 31:

Gleichung 31
$$s(a_{s,p}) = k_{12}(a_{s,c}) - E_2(a_{s,p})$$

Durch Umformen ergibt sich Gleichung 32:

Gleichung 32
$$a_{s,p} = \frac{k_{12}(a_{s,c})}{(E_2 + s)}$$

Durch Einsetzen der Gleichung 24 in die Gleichung 33 ergibt sich:

Gleichung 33
$$a_{s,p} = \frac{k_{12} R_0(1-e^{-Ts})}{s(s+\alpha)(s+\beta)}$$

(R_0 = Infusionsrate, T = Dauer der Infusion)

(α und β sind Makrokonstanten, die Umrechnung von Mikro- zu Makrokonstanten beschreiben die Gleichungen 68 und 69)

Gleichung 34 beschreibt die Arzneistoffmenge im peripheren Kompartiment (inverse Laplace-Transformation) als Funktion der Zeit:

Gleichung 34
$$X_p = \frac{k_{12} R_0(1-e^{-T\alpha})}{-\alpha(\beta-\alpha)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{k_{12} R_0(1-e^{-T\beta})}{-\beta(\alpha-\beta)} \cdot e^{-\beta t}$$

Das Verteilungsvolumen des peripheren Kompartiment (V_p), das die Arzneistoffmenge zur gemessenen Arzneistoffkonzentration in Beziehung setzt, ermöglicht die Umformung der Gleichung 34.

Man erhält die Gleichung 35 zur Beschreibung der Arzneimittel-Konzentration im peripheren Kompartiment als Funktion der Zeit:

$$\text{Gleichung 35} \quad \frac{X_p}{V_p} = \frac{k_{12} R_0 (1 - e^{-T\alpha})}{V_p \alpha (\alpha - \beta)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{k_{12} R_0 (1 - e^{-T\beta})}{V_p \beta (\beta - \alpha)} \cdot e^{-\beta t}$$

Gleichung 36, 37 und 38 vereinfachen Gleichung 35:

$$\text{Gleichung 36} \quad A_p = \frac{k_{12} R_0 (1 - e^{-T\alpha})}{V_p \alpha (\alpha - \beta)}$$

$$\text{Gleichung 37} \quad B_p = \frac{k_{12} R_0 (1 - e^{-T\beta})}{V_p \beta (\beta - \alpha)}$$

$$\text{Gleichung 38} \quad C_p = A_p \cdot e^{-\alpha t} + B_p \cdot e^{-\beta t}$$

Unter dem Begriff Konzentration eines Arzneistoffs ist in dieser Arbeit die Gesamtkonzentration beschrieben. Man versteht darunter die Konzentration, die sich aus dem an Proteine oder an Gewebe gebundenen Anteil und aus dem ungebunden freien Arzneistoffanteil in den verschiedenen Kompartimenten zusammensetzt.

Freie Konzentration des Arzneistoffs im zentralen Kompartiment:

Die Gesamtkonzentration des Arzneistoffs im zentralen Kompartiment wird durch Gleichung 39 beschrieben:

$$\text{Gleichung 39} \quad C_c = \frac{X_c}{V_c}$$

Der Anteil der freien Fraktion des Arzneistoffs, errechnet sich mit Gleichung 40:

$$\text{Gleichung 40} \quad C_{c(\text{free})} = C_c f_{pl}$$

($1 - f_{pl}$ = an Plasmaproteine gebundene Fraktion, f_{pl} = freie ungebundene Fraktion)

Freie Konzentration des Arzneistoffs im peripheren Kompartiment:

Die Gesamtkonzentration des Arzneistoffs im peripheren Kompartiment wird durch Gleichung 41 beschrieben:

$$\text{Gleichung 41} \quad C_p = \frac{X_p}{V_p}$$

Vergleichbar mit Gleichung 40, beschreibt Gleichung 42 den freien Anteil des Arzneistoffes im peripheren Kompartiment:

$$\text{Gleichung 42} \quad C_{p(\text{free})} = C_p f_t$$

($1 - f_t$ = an Gewebe gebundene Fraktion, f_t = freie ungebundene Fraktion)

Der Gleichgewichtszustand ist dann erreicht, wenn sich der Arzneistofftransport zwischen peripherem und zentralem Kompartiment kompensiert. Dieser Zustand liegt dann vor, wenn ein konstanter Plasmaspiegel über ein längeres Plateau beibehalten wird (z.B. bei lang andauernden Infusionen). Die Situation kann so beschrieben werden, daß der Arzneistoff aus dem zentralen Kompartiment eliminiert wird, dadurch die Konzentration im zentralen Kompartiment absinkt, und der entstandene Konzentrationsgradient zwischen zentralem und peripherem Kompartiment die antreibende Kraft für eine Rückverteilung aus dem peripheren ins zentrale Kompartiment darstellt.

$$\text{Gleichung 43} \quad k_{12} X_c = k_{21} X_p$$

Die Gesamtmenge des Arzneistoffes, die sich im Gleichgewichtszustand (steady state) im Organismus befindet (X_{ss}) ist daher:

$$\text{Gleichung 44} \quad X_{ss} = X_c + X_p$$

Das Verteilungsvolumen im Gleichgewichtszustand errechnet sich aus der Gesamtmenge Arzneistoff (X_{ss}) und der Konzentration im Gleichgewichtszustand (C_{ss}) (steady state):

$$\text{Gleichung 45} \quad V_{ss} = \frac{X_{ss}}{C_{ss}}$$

$$\text{Gleichung 46} \quad C_{ss} = \frac{X_c + X_p}{V_{ss}}$$

Unter Gleichgewichtsbedingungen (steady state) basierend auf Abbildung 20, muß gelten (Gleichung 45 und 43)

$$\text{Gleichung 47} \quad V_{ss} = \frac{X_c + \frac{k_{12}}{k_{21}} X_c}{C_{ss}}$$

Durch Umformen ergibt sich Gleichung 48:

$$\text{Gleichung 48} \quad V_{ss} = \frac{X_c \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}} \right)}{C_{ss}}$$

Das Verteilungsvolumen des zentralen Kompartiments errechnet sich:

$$\text{Gleichung 49} \quad V_c = \frac{X_c}{C_{ss}}$$

Durch Umformen ergibt sich:

$$\text{Gleichung 50} \quad V_{ss} = V_c \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}} \right)$$

Das Verhältnis des freien Anteils der Arzneistoffmenge (f_{pl}), die nicht an Plasmaproteine gebunden ist, und des freien Anteils der Arzneistoffmenge (f_t), die nicht an Gewebe gebunden ist, kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

Gleichung 51
$$\frac{V_{ss} - V_c}{V_p} = \frac{f_{pl}}{f_t}$$

Gleichung 52
$$\frac{V_p}{f_t} = \frac{(V_{ss} - V_c)}{f_{pl}}$$

Zwei-Kompartiment-Modell nach oraler Gabe:

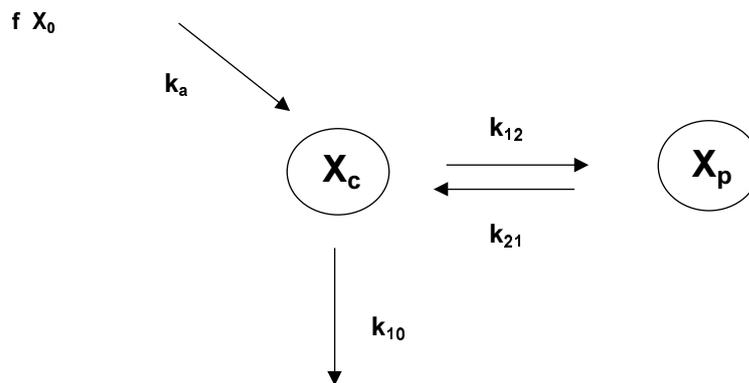


Abb. 21: Zwei-Kompartiment-Modell nach oraler oder intraperitonealer Gabe
 X_c stellt die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment, X_p im peripheren Kompartiment dar, k_{10} ist die Eliminationsgeschwindigkeitskonstante, k_{12} und k_{21} sind die Geschwindigkeitskonstanten des Stoffaustauschs zwischen den zwei Kompartimenten und X_0 ist die Arzneistoffdosis, f beschreibt den Anteil der systemisch verfügbaren Dosis, und k_a beschreibt die Resorption.

Konzentration des Arzneistoffs im zentralen Kompartiment:

In Abbildung 21 ist ein Zwei-Kompartiment-Modell nach oraler oder intraperitonealer Gabe dargestellt. Die Differentialgleichung (Gleichung 53) beschreibt die Änderung der Menge des Arzneistoffs im zentralen Kompartiment (X_c) mit der Zeit:

Gleichung 53
$$\frac{dX_c}{dt} = k_a X_a - k_{12} X_c - k_{10} X_c + k_{21} X_p$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment gleich 0, also $X_c = 0$, aber $X_a = f X_0$, also die absorbierbare Arzneistoffmenge oder die Arzneistoffmenge, die systemisch verfügbar ist)

Die Differentialgleichung (Gleichung 54) beschreibt hingegen die Änderung der Menge des Arzneistoffes im peripheren Kompartiment (X_p) mit der Zeit:

Gleichung 54
$$\frac{dX_p}{dt} = k_{12} X_c - E_2 X_p$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich 0, also $X_p = 0$,
 $E_1 = k_{10} + k_{12}$ und $E_2 = k_{21}$ basierend auf Modell in Abbildung 21)

Die Inputfunktion als Absorptionsprozeß (Kinetik erster Ordnung) ins zentrale Kompartiment lautet:

$$\text{Gleichung 55} \quad \text{in}_s = \frac{k_a \cdot f \cdot X_0}{(s + k_a)}$$

Die Dispositionsfunktion im zentralen Kompartiment lautet:

$$\text{Gleichung 56} \quad \text{d}_{s,c} = \frac{(s + E_2)}{(s + \alpha)(s + \beta)}$$

($E_1 = k_{10} + k_{12}$ und $E_2 = k_{21}$ basierend auf Modell in Abbildung 21)

(α und β sind Makrokonstanten, die Umrechnung von Mikro- zu Makrokonstanten beschreiben die Gleichungen 68 und 69)

Laplace-Transformation für die Beschreibung der Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment als das Produkt aus Input- und Dispositionsfunktion:

$$\text{Gleichung 57} \quad \text{a}_{s,c} = \frac{k_a \cdot f \cdot X_0 \cdot (s + E_2)}{(s + k_a)(s + \alpha)(s + \beta)}$$

Die Gleichung 58 beschreibt die Menge des Arzneistoffes im zentralen Kompartiment als Funktion der Zeit (inverse Laplace-Transformation):

$$\text{Gleichung 58} \quad X_c = \frac{k_a \cdot f \cdot X_0 (E_2 - k_a)}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)} \cdot e^{-k_a t} + \frac{k_a \cdot f \cdot X_0 (E_2 - \alpha)}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{k_a \cdot f \cdot X_0 (E_2 - \beta)}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)} \cdot e^{-\beta t}$$

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment (V_c), das die Arzneistoffmenge zur gemessenen Arzneistoffkonzentration in Beziehung setzt, ermöglicht die Umformung der Gleichung 58. Man erhält die Gleichung 59 zur Beschreibung der Konzentration des Arzneistoffes im zentralen Kompartiment als Funktion der Zeit:

$$\text{Gleichung 59} \quad \frac{X_c}{V_c} = \frac{k_a \cdot f \cdot X_0 (E_2 - k_a)}{V_c (\alpha - k_a)(\beta - k_a)} \cdot e^{-k_a t} + \frac{k_a \cdot f \cdot X_0 (E_2 - \alpha)}{V_c (k_a - \alpha)(\beta - \alpha)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{k_a \cdot f \cdot X_0 (E_2 - \beta)}{V_c (k_a - \beta)(\alpha - \beta)} \cdot e^{-\beta t}$$

$$\text{Gleichung 60} \quad A = \frac{f \cdot X_0}{V_c} \cdot \frac{k_a (E_2 - \alpha)}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)}$$

$$\text{Gleichung 61} \quad B = \frac{f \cdot X_0}{V_c} \cdot \frac{k_a (E_2 - \beta)}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)}$$

$$\text{Gleichung 62} \quad C = A + B$$

$$\text{Gleichung 63} \quad C_c = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} - C \cdot e^{-k_a t}$$

Ein Sonderfall ergibt sich, wenn die orale Gabe uneinheitlich zerfällt und zu unterschiedlichen Zeiten resorbiert wird. Man erkennt dies an mehrfachen Peaks im Konzentrations-Zeitverlauf. Die Arzneistoffdosis (X_0) teilt sich in unterschiedliche Dosierungen, $X_1, X_2, X_3, \dots, X_N$. Die Arzneistoffmenge, die zur Resorption zur Verfügung steht, stellt sich demzufolge so dar, $X_{1a}, X_{2a}, X_{3a}, \dots, X_{Na}$.

Die Differentialgleichung (Gleichung 64) beschreibt die Änderung der Menge des Arzneistoffs im zentralen Kompartiment (X_c) mit der Zeit

Gleichung 64

$$\text{für } t \geq t_1 \quad \frac{dX_c}{dt} = k_a X_{1a} - k_{12} X_c - k_{10} X_c + k_{21} X_p$$

$$\text{für } t \geq t_2 \quad \frac{dX_c}{dt} = k_a X_{1a} + k_a X_{2a} - k_{12} X_c - k_{10} X_c + k_{21} X_p$$

$$\text{für } t \geq t_N \quad \frac{dX_c}{dt} = k_a X_{1a} + k_a X_{2a} + \dots + k_a X_{Na} - k_{12} X_c - k_{10} X_c + k_{21} X_p$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment gleich 0, also $X_c = 0$; die absorbierbare Arzneistoffmenge zu den verschiedenen Zeitpunkten ist $X_{1a} = f \cdot X_1, X_{2a} = f \cdot X_2$ und $X_{Na} = f \cdot X_N$)

Gleichung 65
$$X_0 = X_1 + X_2 + \dots + X_N$$

(f und k_a ist für alle Teildosierungen gleich)

Umrechnung der Mikrokonstanten in Makrokonstanten:

In dem gewählten Zwei-Kompartiment-Modell (Abbildung 19 – 21) findet unabhängig von der Applikationsart die Elimination aus dem zentralen Kompartiment statt. Für die Summe der Austrittsgeschwindigkeitskonstanten aus dem 1. Kompartiment (zentrales Kompartiment) und aus dem 2. Kompartiment (peripheres Kompartiment) gilt:

Gleichung 66
$$E_1 = k_{10} + k_{12}$$

Gleichung 67
$$E_2 = k_{21}$$

Für die Umrechnung gilt:

Gleichung 68
$$\alpha = \frac{1}{2} \left[(k_{12} + k_{21} + k_{10}) + \sqrt{(k_{12} + k_{21} + k_{10})^2 - 4k_{21}k_{10}} \right]$$

Gleichung 69
$$\beta = \frac{1}{2} \left[(k_{12} + k_{21} + k_{10}) - \sqrt{(k_{12} + k_{21} + k_{10})^2 - 4k_{21}k_{10}} \right]$$

Konzentrationen der Muttersubstanz und einiger Metaboliten nach oraler Gabe des Arzneistoffes:

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen zwei mögliche Modelle, wie die Ausscheidung der Muttersubstanz erfolgen könnte. In Modell I sind zwei Metaboliten mit einbezogen worden. Die nachstehenden Gleichungen ermöglichen die mathematische Beschreibung der zeitlichen Änderung der Muttersubstanz- oder Metabolitenmenge im Körper. In nachstehenden Modell II wurde das Modell I um drei weitere Metaboliten erweitert und entsprechend die Gleichungen basierend auf Modell II verändert.

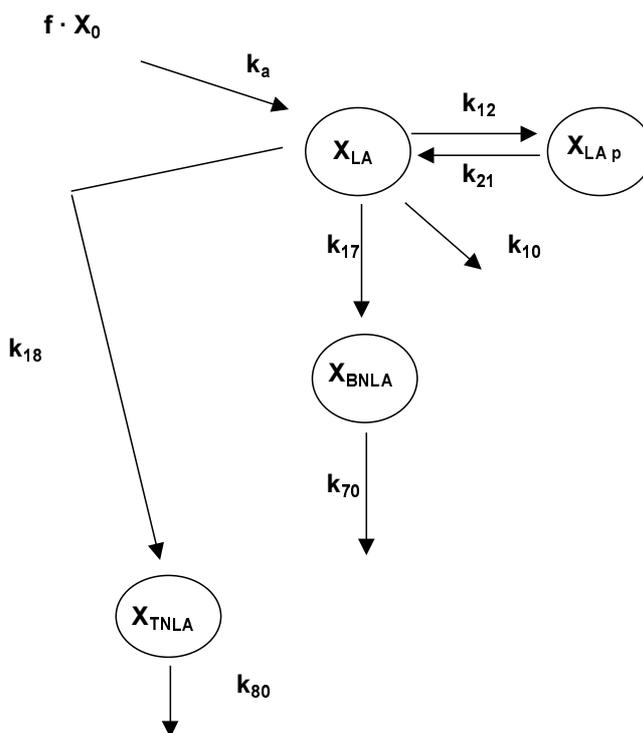


Abb. 22: Zwei-Kompartiment-Modell I nach oraler Gabe und Ausscheidung in Form von verschiedene Metaboliten:

k_{ij} stellt die Transfer-Geschwindigkeitskonstante zwischen dem i-ten und dem j-ten Kompartiment (Mikrokonstante) dar. X_{LA} stellt die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment (1), X_{LA_p} im peripheren Kompartiment (2), X_{BNLA} stellt die Menge des 1. Metaboliten im zentralen (7), und X_{TNLA} stellt die Menge des 2. Metaboliten im zentralen Kompartiment (8) dar. X_0 beschreibt die Arzneistoffdosis, f den Anteil der systemisch verfügbaren Dosis, und k_a die Resorption.

Der mögliche Bildungsweg der Metaboliten ist in Abbildung 22 dargestellt. Die Differentialgleichung (Gleichung 70) beschreibt die Änderung der Menge der Muttersubstanz im zentralen Kompartiment (X_{LA}) mit der Zeit:

$$\text{Gleichung 70} \quad \frac{dX_{LA}}{dt} = k_a X_a - k_{12} X_{LA} - k_{10} X_{LA} + k_{21} X_{LA_p} - k_{18} X_{LA} - k_{17} X_{LA}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die absorbierbare Arzneistoffmenge $X_a = f X_0$ und die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment gleich 0, also $X_{LA} = 0$)

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment (V_c) setzt die α -Liponsäure-Menge zur gemessenen Konzentration in Beziehung.

Gleichung 71
$$C_{LA} = \frac{X_{LA}}{V_c}$$

Die Differentialgleichung (Gleichung 72) beschreibt die Änderung der Menge der Muttersubstanz im peripheren Kompartiment (X_p) mit der Zeit:

Gleichung 72
$$\frac{dX_p}{dt} = k_{12} X_{LA} - k_{21} X_{LAp}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich 0, also $X_p = 0$)

Die Differentialgleichung (Gleichung 73) beschreibt die Änderung der Menge des ersten Metaboliten (BNLA) im zentralen Kompartiment (X_{BNLA}) mit der Zeit:

Gleichung 73
$$\frac{dX_{BNLA}}{dt} = k_{17} X_{LA} - k_{70} X_{BNLA}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Metaboliten-Menge gleich 0, also $X_{BNLA} = 0$)

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment des Metaboliten BNLA (V_{BNLA}) setzt die Metaboliten-Menge zur gemessenen BNLA-Konzentration in Beziehung.

Gleichung 74
$$C_{BNLA} = \frac{X_{BNLA}}{V_{BNLA}}$$

Die Differentialgleichung (Gleichung 75) beschreibt die Änderung der Menge des fünften Metaboliten (TNLA) im zentralen Kompartiment (X_{TNLA}) mit der Zeit

Gleichung 75
$$\frac{dX_{TNLA}}{dt} = k_{18} X_{LA} - k_{80} X_{TNLA}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Metaboliten-Menge gleich 0, also $X_{TNLA} = 0$)

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment des Metaboliten TNLA (V_{TNLA}) setzt die Metaboliten-Menge zur gemessenen TNLA-Konzentration in Beziehung.

Gleichung 76
$$C_{TNLA} = \frac{X_{TNLA}}{V_{TNLA}}$$

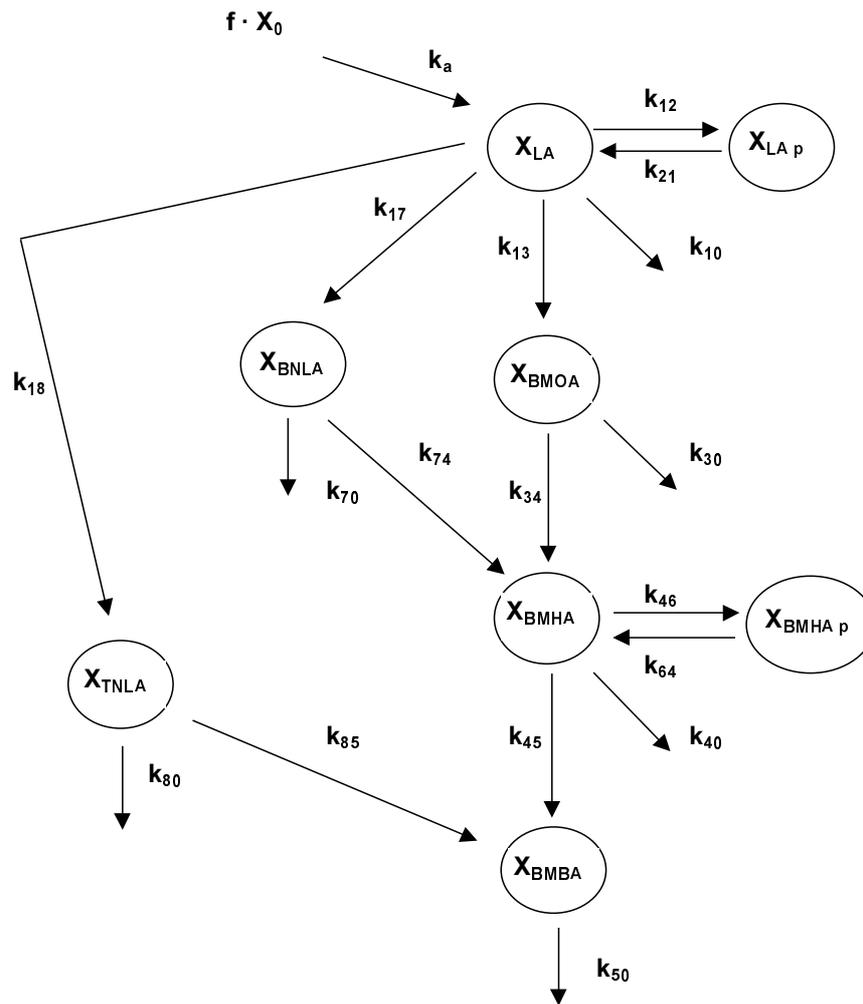


Abb. 23: Zwei-Kompartiment-Modell II nach oraler Gabe und Ausscheidung in Form von verschiedene Metaboliten:

k_{ij} stellt die Transfer-Geschwindigkeitskonstante zwischen dem i-ten und dem j-ten Kompartiment (Mikrokonstante) dar. X_{LA} stellt die Arzneistoffmenge im zentralen Kompartiment (1), $X_{LA p}$ im peripheren Kompartiment (2), X_{BMOA} stellt die Menge des 1. Metaboliten im zentralen (3), X_{BMHA} stellt die Menge des 2. Metaboliten im zentralen (4), $X_{BMHA p}$ stellt die Menge des 2. Metaboliten im peripheren Kompartiment (6), X_{BMBA} stellt die Menge des 3. Metaboliten im zentralen (5), X_{BNLA} stellt die Menge des 4. Metaboliten im zentralen (7), und X_{TNLA} stellt die Menge des 5. Metaboliten im zentralen Kompartiment (8) dar. X_0 beschreibt die Arzneistoffdosis, f den Anteil der systemisch verfügbaren Dosis, und k_a die Resorption

Der mögliche Bildungsweg der Metaboliten ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Differentialgleichung (Gleichung 77) beschreibt die Änderung der Menge der Muttersubstanz im zentralen Kompartiment (X_{LA}) mit der Zeit basierend auf Abbildung 23:

$$\text{Gleichung 77} \quad \frac{dX_{LA}}{dt} = k_a X_a - k_{12} X_{LA} - k_{10} X_{LA} + k_{21} X_{LAp} - k_{18} X_{LA} - k_{17} X_{LA} - k_{13} X_{LA}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die absorbierbare Arzneistoffmenge $X_a = f X_0$)

Vereinfachte Form:

$$\text{Gleichung 78} \quad \frac{dX_{LA}}{dt} = k_a X_a - k_{12} X_{LA} - k_{1x} X_{LA} + k_{21} X_{LAp}$$

$$\text{Gleichung 79} \quad k_{1x} = k_{10} + k_{13} + k_{17} + k_{18}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich 0, also $X_{LA} = 0$)

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment (V_c) setzt die α -Liponsäure-Menge zur gemessenen Konzentration in Beziehung.

$$\text{Gleichung 80} \quad C_{LA} = \frac{X_{LA}}{V_c}$$

Die Differentialgleichung (Gleichung 81) beschreibt die Änderung der Menge der Muttersubstanz im peripheren Kompartiment (X_p) mit der Zeit:

$$\text{Gleichung 81} \quad \frac{dX_p}{dt} = k_{12} X_{LA} - k_{21} X_{LAp}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich 0, also $X_p = 0$)

Die Differentialgleichung (Gleichung 82) beschreibt die Änderung der Menge des ersten Metaboliten (BMOA) im zentralen Kompartiment (X_{BMOA}) mit der Zeit:

$$\text{Gleichung 82} \quad \frac{dX_{BMOA}}{dt} = k_{13} X_{LA} - k_{30} X_{BMOA} - k_{34} X_{BMOA}$$

Vereinfachte Form:

$$\text{Gleichung 83} \quad \frac{dX_{BMOA}}{dt} = k_{13} X_{LA} - k_{3x} X_{BMOA}$$

$$\text{Gleichung 84} \quad k_{3x} = k_{30} + k_{34}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Metaboliten-Menge gleich 0, also $X_{BMOA} = 0$)

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment des Metaboliten BMOA (V_{BMOA}) setzt die Metaboliten-Menge zur gemessenen BMOA-Konzentration in Beziehung:

$$\text{Gleichung 85} \quad C_{BMOA} = \frac{X_{BMOA}}{V_{BMOA}}$$

Die Differentialgleichung (Gleichung 86) beschreibt die Änderung der Menge des zweiten Metaboliten (BMHA) im zentralen Kompartiment (X_{BMHA}) mit der Zeit:

$$\text{Gleichung 86} \quad \frac{dX_{BMHA}}{dt} = k_{34} X_{BMOA} - k_{40} X_{BMHA} - k_{45} X_{BMHA} + k_{74} X_{BNLA} + k_{64} X_{BMHAp} - k_{46} X_{BMHA}$$

Vereinfachte Form:

$$\text{Gleichung 87} \quad \frac{dX_{BMHA}}{dt} = k_{34} X_{BMOA} - k_{4x} X_{BMHA} + k_{74} X_{BNLA} + k_{64} X_{BMHAp} - k_{46} X_{BMHA}$$

Gleichung 88 $k_{4x} = k_{40} + k_{45}$
(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Metaboliten-Menge gleich 0, also $X_{BMHA} = 0$)

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment des Metaboliten BMHA (V_{BMHA}) setzt die Metaboliten-Menge zur gemessenen BMHA-Konzentration in Beziehung.

Gleichung 89
$$C_{BMHA} = \frac{X_{BMHA}}{V_{BMHA}}$$

Die Differentialgleichung (Gleichung 90) beschreibt die Änderung der Menge des Metaboliten BMHA im peripheren Kompartiment (X_{BMHAp}) mit der Zeit:

Gleichung 90
$$\frac{dX_{BMHAp}}{dt} = k_{46} X_{BMHA} - k_{64} X_{BMHAp}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Arzneistoffmenge gleich 0, also $X_{BMHAp} = 0$)

Die Differentialgleichung (Gleichung 91) beschreibt die Änderung der Menge des dritten Metaboliten (BMBA) im zentralen Kompartiment (X_{BMBA}) mit der Zeit:

Gleichung 91
$$\frac{dX_{BMBA}}{dt} = k_{45} X_{BMHA} - k_{50} X_{BMBA} + k_{85} X_{TNLA}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Metaboliten-Menge gleich 0, also $X_{BMBA} = 0$)

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment des Metaboliten BMBA (V_{BMBA}) setzt die Metaboliten-Menge zur gemessenen BMBA-Konzentration in Beziehung.

Gleichung 92
$$C_{BMBA} = \frac{X_{BMBA}}{V_{BMBA}}$$

Die Differentialgleichung (Gleichung 93) beschreibt die Änderung der Menge des vierten Metaboliten (BNLA) im zentralen Kompartiment (X_{BNLA}) mit der Zeit:

Gleichung 93
$$\frac{dX_{BNLA}}{dt} = k_{17} X_{LA} - k_{70} X_{BNLA} - k_{74} X_{BNLA}$$

Vereinfachte Form:

Gleichung 94
$$\frac{dX_{BNLA}}{dt} = k_{17} X_{LA} - k_{7x} X_{BNLA}$$

Gleichung 95 $k_{7x} = k_{70} + k_{74}$
(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Metaboliten-Menge gleich 0, also $X_{BNLA} = 0$)

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment des Metaboliten BNLA (V_{BNLA}) setzt die Metaboliten-Menge zur gemessenen BNLA-Konzentration in Beziehung.

Gleichung 96
$$C_{BNLA} = \frac{X_{BNLA}}{V_{BNLA}}$$

Die Differentialgleichung (Gleichung 97) beschreibt die Änderung der Menge des fünften Metaboliten (TNLA) im zentralen Kompartiment (X_{TNLA}) mit der Zeit:

Gleichung 97
$$\frac{dX_{TNLA}}{dt} = k_{18} X_{LA} - k_{80} X_{TNLA} - k_{85} X_{TNLA}$$

Vereinfachte Form:

Gleichung 98
$$\frac{dX_{TNLA}}{dt} = k_{18}X_{LA} - k_{8x} X_{TNLA}$$

Gleichung 99
$$k_{8x} = k_{80} + k_{85}$$

(zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Metaboliten-Menge gleich 0, also $X_{TNLA} = 0$)

Das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment des Metaboliten TNLA (V_{TNLA}) setzt die Metaboliten-Menge zur gemessenen TNLA-Konzentration in Beziehung.

Gleichung 100
$$C_{TNLA} = \frac{X_{TNLA}}{V_{TNLA}}$$

4.7.2 Nicht kompartimentelle Auswertung

Ein anderer Ansatz ermöglicht die Betrachtung pharmakokinetischer Eigenschaften von Arzneistoffen, bei dem keine bestimmte Anzahl von kinetischen Kompartimenten vorausgesetzt werden muß. Voraussetzung für die Anwendung eines Nicht-Kompartiment-Modells ist allerdings, daß lineare Pharmakokinetik vorliegt.

Die Zeitkurve der Arzneistoff-Konzentrationen wird als statistische Verteilungskurve angesehen. Unabhängig von der Applikationsroute können verschiedene pharmakokinetische Parameter bestimmt werden. Im folgenden werden die pharmakokinetischen Parameter, die in der Arbeit verwendet wurden, aufgeführt [Cawello, 1998; Gibaldi und Perrier 1982]. Die Berechnungen dieser pharmakokinetischen Parameter wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Funcalc, Microsoft EXCEL 7.0 (Microsoft Corporation, Seattle, USA) durchgeführt.

Pharmakokinetische Auswertung der Plasmadaten:

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Formeln zusammengefaßt:

Gleichung 101	Fläche unter der Plasma-Konzentration-Zeitkurve (AUC) vom Intervall 0 bis zur letzten messbaren Konzentration \geq LOQ	$AUC_{0-t_{last}} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{2} \cdot (C_i + C_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)$
Gleichung 102	Fläche unter der Plasma-Konzentration-Zeitkurve (AUC) vom Intervall 0 bis unendlich, kalkuliert durch Extrapolation der terminalen Phase	$AUC = AUC_{0-t_{last}} + \frac{C_{last,calc}}{\lambda_z}$
Gleichung 103	AUC bezogen auf die freie ungebundene Plasma-Konzentration ($1-f_{pl}$ = Proteinbindung)	$AUC_{free} = AUC \cdot f_{pl}$
Gleichung 104	Fläche unter der Plasma-Konzentration-Zeitkurve (AUC) vom Intervall t_{last} bis zu t^* in % bezogen auf die Gesamt-AUC	$AUC_{t_{last}-inf} \% = \frac{AUC - AUC_{0-t_{last}}}{AUC} \cdot 100$
Gleichung 105	Fläche unter der Kurve $t \cdot C(t)$ (AUMC, Area under the first moment plasma concentration-time curve) vom Intervall 0 bis zur letzten messbaren Konzentration \geq LOQ (C_{last})	$AUMC_{0-t_{last}} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{2} \cdot (C_i \cdot t_i + C_{i+1} \cdot t_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)$
Gleichung 106	Fläche unter der Kurve $t \cdot C(t)$ vom Intervall 0 bis unendlich kalkuliert durch Extrapolation der terminalen Phase	$AUMC = AUMC_{0-t_{last}} + \frac{t_{last} \cdot C_{last,calc}}{\lambda_z} + \frac{C_{last,calc}}{\lambda_z^2}$

Gleichung 107	Fläche unter der Kurve $t C(t)$ („Area under the first moment plasma concentration-time curve“) vom Intervall t_{last} bis zu t_{∞} in % bezogen auf die Gesamt-AUMC	$AUMC_{\text{last-inf}} \% = \frac{AUMC - AUMC_{0\text{-last}}}{AUMC} \cdot 100$
Gleichung 108	Konzentration im steady state, der Mittelwert aus den gemessenen Plasmakonzentrationen im steady state Zustand (Infusion).	$C_{ss} = \frac{\sum C_{\text{obs (steady state)}}}{n}$
Gleichung 109	Freie ungebundenen Konzentration im Gleichgewichtszustand (steady state)	$C_{\text{ss,free}} = C_{\text{ss}} \cdot f_{\text{pl}}$
Gleichung 110	Gesamtkörper-Clearance des Arzneimittels aus dem Plasma	nach i.v. $CL = \frac{X_{0\text{ iv}}}{AUC}$
Gleichung 111	Nach oraler oder intraperitonealer Gabe konnte nur der Quotient CL/f bestimmt werden, wenn f nicht bekannt ist.	nach extravasaler Applikation (p.o. oder i.p.) $CL = \frac{X_{0\text{ p.o./i.p.}}}{AUC} \cdot f$
Gleichung 112	Sonderfall bei Infusionen	nach Infusion $CL = \frac{R_0}{C_{\text{ss}}}$
Gleichung 113	Fraktion der verabreichten Dosis nach extravaskularer Applikation, die systemisch verfügbar war (Absolute Bioverfügbarkeit).	$f = \frac{AUC_{\text{p.o./i.p.}} \cdot X_{0\text{ i.v.}}}{AUC_{\text{i.v.}} \cdot X_{0\text{ p.o./i.p.}}}$
Gleichung 114	Fraktion der verabreichten Dosis in Prozent (Absolute Bioverfügbarkeit)	$F = f \cdot 100$
Gleichung 115	Die mittlere Verweildauer (MRT, „Mean residence time“) berechnete sich aus der AUC und der AUMC.	nach i.v. $MRT_{\text{i.v.}} = \frac{AUMC}{AUC}$
Gleichung 116	Sonderfall bei Infusionen	nach Infusion $MRT_{\text{i.v.}} = \frac{AUMC}{AUC} - \frac{T}{2}$
Gleichung 117	Sonderfall bei extravasaler Applikation	nach extravasaler Applikation (p.o. oder i.p.) $MRT_{\text{p.o./i.p.}} = \frac{AUMC}{AUC}$
Gleichung 118	Mittlere Zeit, die benötigt wird ins System zu gelangen („Mean input time“) nach oraler oder intraperitonealer Gabe	nach extravasaler Applikation (p.o. oder i.p.) $MIT_{\text{p.o./i.p.}} = MRT_{\text{p.o./i.p.}} - MRT_{\text{i.v.}}$
Gleichung 119	für Infusionen: R_0 ist die Infusionsrate, und T ist die Infusionsdauer	nach Infusion $R_0 = \frac{X_{0\text{ iv}}}{T}$
Gleichung 120	Geschwindigkeitskonstante der terminalen Phase k wurde durch lineare Regression der logarithmischen Konzentrationswerte gegen die linearen Zeitwerte im terminalen Abschnitt der Konzentrationskurve bestimmt (mono-exponentiell abfallender Ast), durch Umformen erhält man die Halbwertszeit.	$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$
Gleichung 121	Scheinbares Verteilungsvolumen im steady-state	nach i.v. $V_{\text{ss}} = \frac{X_{0\text{ iv}} \cdot AUMC}{(AUC)^2}$
Gleichung 122	Sonderfall bei Infusionen, T = Infusionsdauer [Lee et al; 1980]	nach Infusion $V_{\text{ss}} = \frac{X_{0\text{ iv}} \cdot AUMC}{(AUC)^2} - \frac{T \cdot X_{0\text{ iv}}}{2 \cdot AUC}$
Gleichung 123	Scheinbares Verteilungsvolumen in der terminalen Phase	nach i.v. $V_z = \frac{X_{0\text{ iv}}}{AUC \cdot k}$
Gleichung 124	Sonderfall bei extravasaler Applikation	nach extravasaler Applikation (p.o. oder i.p.) $V_z = \frac{X_{0\text{ p.o./i.p.}}}{AUC \cdot k} \cdot f$

Untersuchungen zur linearen Pharmakokinetik:

Lineare Pharmakokinetik beschreibt, daß zwischen der gegebenen Dosis X_0 und der gemessenen Plasmakonzentration C ein linearer Zusammenhang besteht. Streng genommen gilt in linearen pharmakokinetischen Systemen das Superpositionsprinzip, also bei Vervielfachung der Dosis zeigt die beobachtete Konzentrations-Zeitkurve eine Vervielfachung der Konzentration $C(t)$ zu jedem Zeitpunkt t . Es werden im Normalfall mindestens drei verschiedene Dosisstufen untersucht, und die gewonnenen pharmakokinetischen Parameter C_{max} und AUC werden in Abhängigkeit zu applizierten Dosis über lineare Regression untersucht. Im einfachsten Fall der Dosisproportionalität führt eine Verdopplung der Dosis zu einer Verdopplung von C_{max} und AUC.

Pharmakokinetische Auswertung der Gewebedaten:

In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Formeln zusammengefaßt:

Die gemessene Gewebekonzentration entspricht der extrazellulären freien ungebundenen Konzentration.

Gleichung 125	Fläche unter der Gewebe-Konzentration-Zeitkurve (AUC) vom Intervall 0 bis zur letzten messbaren Konzentration $\geq LOQ$	$AUC_{0-t_{last}} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{2} \cdot (C_i + C_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)$
Gleichung 126	Fläche unter der Gewebe-Konzentration-Zeitkurve (AUC) vom Intervall 0 bis unendlich, kalkuliert durch Extrapolation der terminalen Phase	$AUC = AUC_{0-t_{last}} + \frac{C_{last,calc}}{\lambda_z}$
Gleichung 127	Fläche unter der Gewebe-Konzentration-Zeitkurve (AUC) vom Intervall t_{last} bis zu t_{∞} in % bezogen auf die Gesamt-AUC	$AUC_{t_{last}-inf} \% = \frac{AUC - AUC_{0-t_{last}}}{AUC} \cdot 100$
Gleichung 128	Geschwindigkeitskonstante der terminalen Phase k wurde durch lineare Regression der logarithmischen Konzentrationswerte gegen die linearen Zeitwerte im terminalen Abschnitt der Konzentrationskurve bestimmt (mono-exponentiell abfallender Ast), durch Umformen erhält man die Halbwertszeit.	$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$

Pharmakokinetische Auswertung der Urindaten:

Die Berechnung der Halbwertszeit eines Arzneistoffs ist nicht notwendigerweise an das Vorhandensein von Plasmakonzentrationen gebunden. Im Prinzip kann dazu jede Größe, die zur Plasmakonzentration in einem festen Verhältnis steht, herangezogen werden. Derartige Größen sind zum einen die Ausscheidungsrate des Arzneistoffs im Urin und zum anderen die verbleibende Arzneistoffmenge im Organismus, die renal ausgeschieden wird.

Zwei verschiedene Methoden für die pharmakokinetische Auswertung der Urinkonzentrationen finden in dieser Arbeit ihre Anwendung [Gibaldi und Perrier, 1982].

A Semilogarithmische Darstellung der Ausscheidungsgeschwindigkeit gegen die Zeit (Urin-Ausscheidungsgeschwindigkeits-Plot-Methode)

Gleichung 129	Die Menge an Arzneistoff (ΔU) oder an Metaboliten im Urin errechnet sich durch Multiplikation der gemessenen Urinkonzentration und des gesammelten Urinvolumens im definierten Sammelintervall.	$\Delta U = \text{Urinvolumen} \cdot C_{\text{urin}}$
	Die Urinausscheidungsgeschwindigkeit ($\Delta U/\Delta t$) errechnet sich aus der Menge an ausgeschiedenem Analyten und der Zeit des Sammelintervalls.	$\frac{\Delta U}{\Delta t}$
Gleichung 130	Zeit des Sammelintervalls	$\Delta t = t_2 - t_1$
Gleichung 131	Mittlere Zeit im Urinsammelintervall	$t_{\text{mid}} = \frac{(t_1 + t_2)}{2}$
Gleichung 132	Durch lineare Regression der logarithmischen Ausscheidungsgeschwindigkeiten gegen die linearen Zeitwerte (t_{mid}) im terminalen Abschnitt der Urinausscheidungskurve konnte die Geschwindigkeitskonstante k bestimmt werden. Die Halbwertszeit aus der terminalen Steigung k einer semilogarithmischen Ausscheidungsgeschwindigkeits-Zeitkurve konnte errechnet werden.	$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$

B Semilogarithmische Darstellung der im Körper verbleibenden Menge an Arzneistoff gegen die Zeit (Sigma-minus-Plot Methode)

Gleichung 124	Die Menge an Arzneistoff (ΔU) oder an Metaboliten im Urin errechnet sich durch Multiplikation der gemessenen Urinkonzentration und des gesammelten Urinvolumens im definierten Sammelintervall.	$\Delta U = \text{Urinvolumen} \cdot C_{\text{urin}}$
Gleichung 133	Die renale Clearance errechnet sich aus der gesamten ausgeschiedenen Menge im Urin und der AUC.	$CL_R = \frac{U_{0-\infty}}{AUC}$
Gleichung 134	Zeit des Sammelintervalls	$\Delta t = t_2 - t_1$
Gleichung 135	Die kumulative Urinausscheidung (U_{0-t}) bis zu einem definierten Zeitpunkt t errechnet sich aus der Summe der ausgeschiedenen Arzneistoff-Mengen pro Sammelintervall.	$U_{0-t} = \sum_{i=1}^{n-t} \Delta U$
Gleichung 136	Die kumulative Gesamt-Urinausscheidung ($U_{0-t_{\text{last}}}$) errechnet sich aus der Summe der ausgeschiedenen Arzneistoff-Mengen pro Sammelintervall, bis zum letzten Sammelzeitpunkt. $U_{0-t_{\text{last}}}$ = kumulative Gesamt-Urinausscheidung errechnet bis zum letzten Sammelintervall.	$U_{0-t_{\text{last}}} = \sum_{i=1}^{t_{\text{last}}} \Delta U$
Gleichung 137	Kumulative Urinausscheidung vom Intervall $t_{\text{mid } 0}$ bis zu $t_{\text{mid } \text{last}}$ in % bezogen auf die verabreichte Dosis	$U_{0-t_{\text{last}}} [\%] = \frac{U_{0-t_{\text{last}}}}{D} \cdot 100$
Gleichung 138	Die kumulative Gesamt-Urinausscheidung ($U_{0-\infty}$) errechnet sich aus der Summe der ausgeschiedenen Arzneistoff-Mengen pro Sammelintervall.	$U_{0-\infty} = \sum_{i=1}^{\infty} \Delta U$
	Auf Basis der ermittelten Parameter konnte nun die Menge an Arzneistoff oder an Metaboliten, die im Körper verbleibt und später renal ausgeschieden wird ($U_{0-\infty} - U_{0-t}$), errechnet und für die Sigma-Minus-Methode verwendet werden.	$U_{0-\infty} - U_{0-t}$
Gleichung 139	Zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten k wurden die im Körper verbleibende Menge an Arzneistoff gegen die Zeit semilogarithmisch dargestellt. Liegen die Meßpunkte im terminalen Bereich der Kurve in guter Übereinstimmung auf einer Geraden, so kann die Steigung dieser bestimmt und die Halbwertszeit errechnet werden.	$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$

4.7.3 Statistische Auswertung

Folgende statistische Berechnungen wurden in Abhängigkeit von der Fallzahl für die gemessenen Konzentrationen in Plasma, Urin oder Mikrodialysate und den kalkulierten pharmakokinetischen Parametern durchgeführt:

Gleichung 140	Arithmetischer Mittelwert	$\text{Mittel}_{\text{arith}} = \frac{\sum x}{n}$
Gleichung 141	Standardabweichung (SD)	$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum (\text{Mittel}_{\text{arith}} - x)^2}{(n-1)}}$
Gleichung 142	Variationskoeffizient	$\text{CV} = \frac{\text{SD}}{\text{Mittel}_{\text{arith}}} \cdot 100$
Gleichung 143	Median	<p>Median = $x_{\frac{1}{2}(n-1)+1}$ wenn n ungerade</p> <p>Median = $\frac{1}{2} \left(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1} \right)$ wenn n gerade</p>
Gleichung 144	Geometrisches Mittel	$\text{Mittel}_{\text{geo}} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \dots \cdot x_n}$
Gleichung 145	Konfidenzintervall	<p>Confid LN = $t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$</p> <p>t: Faktor der Standardnormalverteilung, der von der Größe der Stichprobe und vom Konfidenzniveau (bzw. von der Irrtumswahrscheinlichkeit α) abhängt.</p> <p>s: Standardabweichung der ln-transformierten Originalwerte der Stichprobe</p>
Gleichung 146	Obere und untere Grenze des Konfidenzintervalls	<p>$\text{Mittel}_{\text{arith}} \pm t \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$</p> <p>Für die Berechnung der oberen und unteren Grenze des Konfidenzbereiches wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der ln-transformierten Werte verwendet, anschließend wurden diese Werte rücktransformiert, um die obere und untere Grenze des Konfidenzbereiches zu erhalten.</p>
Gleichung 147	Lineare Regression	$y = m \cdot x + b$
Gleichung 148	Bestimmtheitsmaß (r^2)	$r^2 = \frac{\text{SSY} - \text{SSQ}}{\text{SSY}}$
Gleichung 149	Bei der Regressionsanalyse wird für jeden Punkt das Quadrat der Differenz, die zwischen dem für diesen Punkt berechneten y-Wert (C_{calc}) und dessen tatsächlichen y-Wert (C_{obs}) liegt, berechnet. Die Summe dieser quadrierten Differenzen wird Residual-Quadratsumme genannt (SSQ).	$\text{SSQ} = \sum_{i=1}^n (C_{i,\text{obs}} - C_{i,\text{calc}})^2$
Gleichung 150	Zusätzlich wird die Summe der quadrierten Differenzen, die zwischen den tatsächlichen y-Werten (C_{obs}) und dem Mittelwert der y-Werte liegen, berechnet. Diese Summe wird als Gesamtsumme der Abweichungsquadrate bezeichnet (SSY = Regressions-Quadratsumme + Residual-Quadratsumme).	$\text{SSY} = \left(\sum_{i=1}^n C_{i,\text{obs}}^2 \right) - \frac{\left(\sum_{i=1}^n C_{i,\text{obs}} \right)^2}{n}$
Gleichung 151	Variationskoeffizient der Lognormalverteilung (CV_{ln}) in %	$\text{CV}_{\text{ln}} = \left(\sqrt{e^{\text{SD}^2} - 1} \right) \cdot 100$

Bei den Untersuchungen an der Ratte wurden aus Tierschutzgründen nur kleine Gruppen, also kleine Stichproben, untersucht. Es wurde jeweils der Mittelwert der gemessenen Konzentrationen und der pharmakokinetischen Parameter bestimmt. Durch die Angabe von Minimum und Maximum wurde die Streuung innerhalb der Untersuchungsgruppe dargestellt.

In den Untersuchungen an Menschen hingegen wurde eine genügend große Anzahl an Probanden (mindestens $n=6$) ausgewählt. Zur Darstellung der Konzentrations-Zeitverläufe wurde der Median gewählt. Der Median eignet sich im Falle einer Stichprobe mit extremen Ausreißern, da diese dann geringer für die Gesamtbetrachtung gewertet werden. Dazu ist aber eine genügend große Anzahl an Werten notwendig. Sind keine Ausreißer vorhanden, liegt der Median nahe beim arithmetischen Mittelwert.

Für die pharmakokinetischen Parameter t_{\max} und $t_{1/2}$ (Dimension ist ein Zeitwert) wurde als statistische Größe der Median mit Minimum und Maximum verwendet.

Die Verteilung der konzentrationsabhängigen Meßwerte und die daraus berechneten pharmakokinetischen Parameter innerhalb der Grundgesamtheit ist gegen den Nullwert begrenzt, während gegen Unendlich keine Limitation besteht. Das entspricht einer schiefen, links steilen Verteilung mit langem rechten Auslauf. Aufgrund dieser Annahme wurde das geometrische Mittel zusammen mit der unteren und oberen Grenze des 95 %-Konfidenzintervalls der logarithmisch transformierten Daten für die statistische Darstellung der pharmakokinetischen Parameter gewählt, die von der Konzentration abhängig sind.

5. ERGEBNISSE

5.1 Untersuchungsmodell Ratte

In früheren Untersuchungen zeigte rac- α -Liponsäure nach Substanzgabe nur sehr kurz meßbare Plasmaspiegel, die pharmakologische Wirkung war aber im Gegensatz dazu noch Tage nach Substanzgabe meßbar. Diese zeitliche Diskrepanz zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dazu wurden im ersten Schritt Untersuchungen zur Plasma- und Gewebekonzentrationen nach Gabe von Dexlipotam an der Ratte durchgeführt. Die pharmakokinetische Auswertung dieser Untersuchungen sollte dazu dienen, mögliche physiologische Modelle, die dieses Phänomen erklären könnten, anhand der gemessenen Daten zu überprüfen.

Der Begriff Plasmakonzentration beschreibt in dieser Arbeit die gesamte Konzentration eines Arzneistoffes oder dessen Metaboliten, die sowohl reversibel an Proteine gebunden als auch frei und damit ungebunden im Plasma vorliegen. Im gleichen Sinne wird der Begriff Gewebekonzentration verwendet. Die Gesamtkonzentration des Arzneistoffes oder dessen Metaboliten umfaßt den freien und den an das Gewebe gebundenen Anteil sowohl im Interstitium als auch in der Zelle. Der freie, ungebundene Anteil der Gesamtkonzentration im Gewebe oder im Plasma wird entsprechend als freie Gewebekonzentration oder freie Plasmakonzentration bezeichnet.

Die kovalent gebundene α -Liponsäure (Kapitel 2.2.1) konnte mit den in dieser Arbeit beschriebenen Methoden nicht erfaßt werden.

5.1.1 Absolute Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik

Ausgangspunkt für die Betrachtung der Pharmakokinetik von R(+)- α -Liponsäure war die Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit der unterschiedlichen Applikationsformen. Zum einen war die orale Gabe, die die gewünschte Applikation für den Menschen darstellte und zum anderen die intraperitoneale Gabe, die ihre Anwendung in den pharmakodynamischen Versuchen fand, von Interesse.

Der Vergleich der pharmakokinetischen Parameter nach intravenöser Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure) mit denen nach oraler oder intraperitonealer Gabe ermöglichte, den vom Organismus resorbierten Anteil der extravaskular injizierten Dosis zu bestimmen.

Dexlipotam als Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure wurde in einer Dosierung von 20 mg/kg (bezogen auf die freie Säure) in den drei verschiedenen Applikationsformen verabreicht. Der genaue Versuchsablauf ist in Tabelle 4 dargestellt. Die gewählte Dosierung hatte sich in pharmakologischen Untersuchungen am Tier als wirksam und unbedenklich erwiesen.

Tab. 4: Studiendesign zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik / Ratte
 Studiendesign zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von R(+)- α -Liponsäure in männlichen Ratten nach intravenöser, oraler oder intraperitonealer Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure).

Testsubstanz:	Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure)		
Applikationsroute (4.6.1.1):	p.o.	i.v.	i.p.
Dosis (mg/kg) bezogen auf die freie Säure:	20		
Häufigkeit der Applikation:	Einfachgabe		
Formulierung:	gelöst in Trinkwasser	gelöst in physiol. Kochsalzlösung	gelöst in physiol. Kochsalzlösung
Konzentration der Testsubstanz (mg/ml):	6,35	31,74	6,35
Appliziertes Volumen (ml/kg):	5	1	5
Gesamtzahl der Tiere:	♂ : 50	♂ : 60	♂ : 60
Tier Nr.: ♂ (siehe Anhang)	1-50	51-110	111-170
Zeitpunkte der Blutentnahme:	10; 20; 30; 40 min; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6 h	2; 5; 10; 30 min; 1 h; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10 h	5; 10; 20; 30 min; 1 h; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10 h
	Blutentnahme durch Herzpunktion (4.6.1.1)		
Analytische Meßmethode:	Kapitel 4.4.1		

Pro untersuchten Zeitpunkt wurden jeweils 5 Tiere getötet, um eine ausreichende Menge an Plasma für die Konzentrationsbestimmung zu erhalten. Das Blut wurde für jedes Tier gesammelt und die R(+)- α -Liponsäure-Konzentration in jeder Probe bestimmt.

Die so ermittelte Plasmakonzentration entsprach der Gesamtmenge an R(+)- α -Liponsäure, also sowohl die an Protein gebundene als auch die ungebundene Fraktion. Ein Cross-Over-Design, in dem alle drei Applikationsrouten sequentiell an identischen Individuen getestet werden, konnte an Ratten nicht durchgeführt werden. Es ist daher nicht möglich, interindividuelle Schwankungen als Ursache für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Behandlungsgruppen auszuschließen.

Die Darstellung der Mittelwertkonzentrationen in Abbildung 24 mit der jeweiligen minimalen und maximalen Konzentration einer Gruppe (n = 5) zeigt deutlich die hohe Streuung nach oraler und intraperitonealer Gabe.

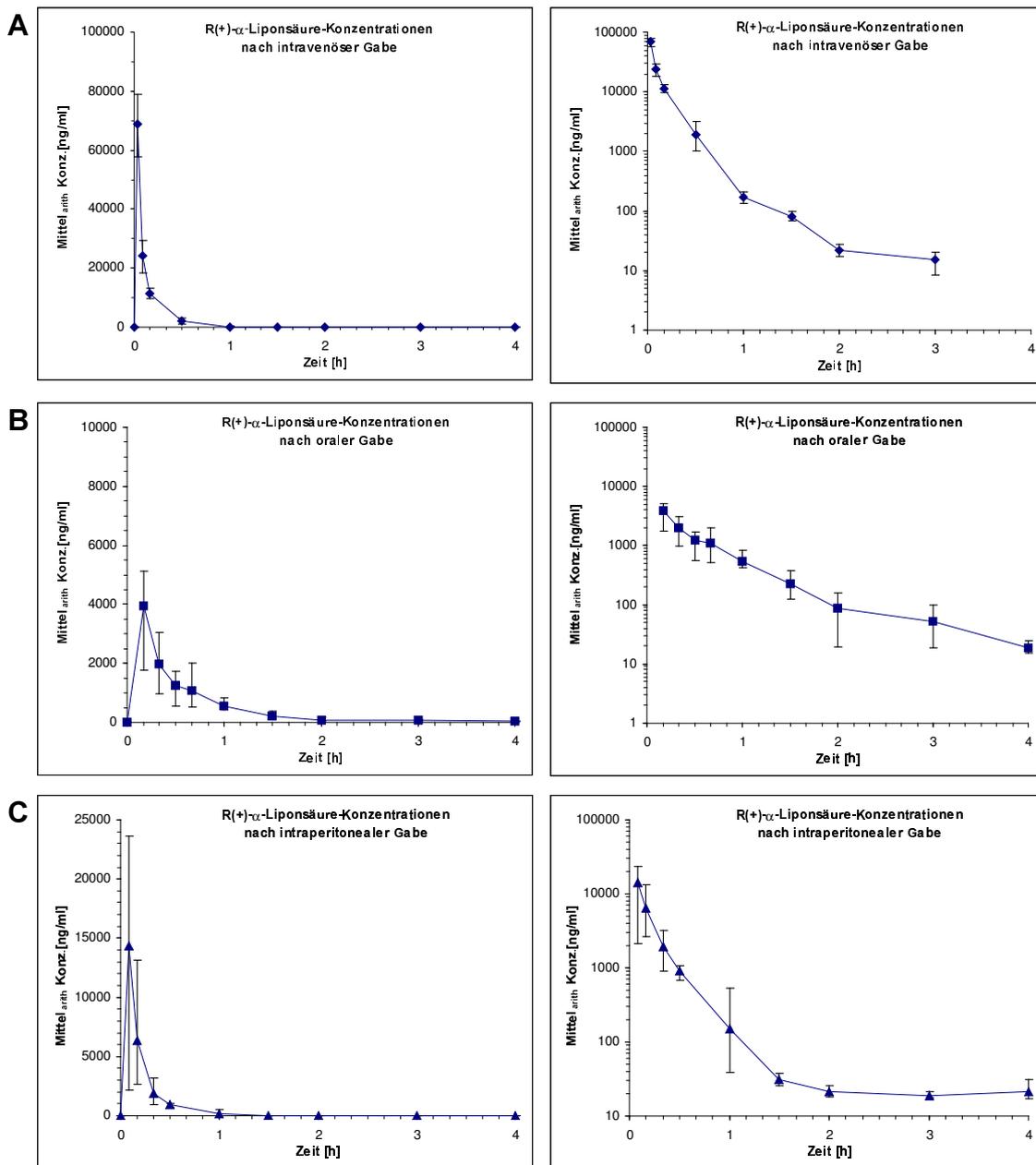


Abb. 24: PlasmaKonzentrations-Zeitverläufe / R(+)- α -Liponsäure / i.p., p.o., i.v. / Ratte
 Lineare (links) und semilogarithmische (rechts) Darstellung der mittleren PlasmaKonzentrations-Zeitverläufe in Ratten (Mittel_{arith} \pm Min und Max) nach intravenöser (A), oraler (B) oder intraperitonealer (C) Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 20 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Für jeden Blutentnahmezeitpunkt wurde der arithmetische Mittelwert der gemessenen α -Liponsäure-Konzentrationen errechnet. Die pharmakokinetische Auswertung basierte auf den Mittelwert-Konzentrationen, die individuellen Plasmakonzentrationen sind im Anhang A.1 – A.3 zusammengefaßt.

Nicht kompartmentelle Auswertung der Daten:

Tabelle 5 faßt die pharmakokinetischen Parameter der nicht kompartmentellen Auswertung zusammen (siehe Anhang, graphische Darstellung: A.4 / Tabelle: A.5).

Tab. 5: Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartmentelle Auswertung) / Plasma / Ratte
 Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartmentelle Auswertung, Kapitel 4.7.2) berechnet aus den mittleren **R(+)- α -Liponsäure**-Plasmakonzentrationen bestimmt in männlichen Ratten nach einfacher intravenöser, oraler oder intraperitonealer Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 20 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Pharmakokinetik Parameter (Plasmakonzentration)											
Appl.	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-tlast} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]	CL [ml/min/kg]	V _z [l/kg]	V _{ss} [l/kg]	MRT [h]	MIT [h]	F _{abs} [%]
i.v.	68697	0,03	0,58	7774	7784	42,82	2,09	0,42	0,16	–	100
p.o.	3931	0,17	0,76	1929	1950	–	–	–	0,68	0,52	25
i.p.	14367	0,08	5,58	2750	2905	–	–	–	0,89	0,73	37

Nach allen drei Applikationsrouten wurde die maximale Plasmakonzentration jeweils bei dem ersten Blutentnahmezeitpunkt beobachtet, 2 min nach intravenöser, 5 min nach intraperitonealer und 10 min nach oraler Gabe. Dexlipotam zeigt demnach sowohl nach intraperitonealer als auch nach oraler Gabe ein sehr schnelles Absorptionsverhalten.

Die absolute Bioverfügbarkeit im Vergleich zur intravenösen Route war jedoch in beiden Fällen deutlich geringer. Nach oraler Gabe waren nur ein Viertel der applizierten Dosis im Organismus verfügbar. Die intraperitoneale Gabe zeigte eine höhere absolute Bioverfügbarkeit, sie lag bei 37 % der applizierten Dosis. Die terminale Halbwertszeit betrug 0,6 – 0,8 h nach oraler und intravenöser Gabe, hingegen 5,6 h nach intraperitonealer Gabe.

Durch die noch nicht abgeschlossene Absorption nach intraperitonealer Gabe wurde die Eliminationshalbwertszeit durch die Absorption überlagert (Flip-Flop), so daß die ermittelte Halbwertszeit der Absorptionshalbwertszeit und nicht der Eliminationshalbwertszeit entsprach. Die ermittelte Gesamtkörper-Clearance als Maß für die Elimination des Arzneistoffs war vergleichbar mit dem hepatischen Blutfluß in Ratten [Davies und Morris, 1993; 55,2 ml/min/kg].

Die hohe und mit dem Leberblutfluß vergleichbare Clearance und die limitierte Bioverfügbarkeit nach oraler und intraperitonealer Dosierung geben den Hinweis für einen First-Pass Effekt. Der First-Pass Effekt bezeichnet einen verstärkten metabolischen Abbau des Arzneistoffes während des ersten Leberdurchganges des Arzneistoffs bevor dieser im Blutkreislauf verteilt wird.

Eine weitere bemerkenswerte pharmakokinetische Eigenschaft ist das sehr hohe Verteilungsvolumen während der terminalen Phase der Konzentrations-Zeitkurve. Das ermittelte V_z entspricht ca. dem dreifachen Volumen des Gesamt-Körperwassers einer Ratte [Davies und Morris, 1993; 0,7 l/kg]. Die Testsubstanz muß sich also sehr stark im Gewebe verteilen und sich in großem Umfang daran binden.

Kompartimentelle Auswertung der Daten:

Den Konzentrations-Zeitverlauf für die jeweilige Applikationsform konnte durch mathematische Gleichungen (Kapitel 4.7.1.2, Gleichung 20 für i.v. und Gleichung 63 für p.o. und i.p.) basierend auf einem Zwei-Kompartiment-Modell gut beschrieben werden. In Tabelle 6 sind die Parameter zusammengefaßt, Abbildung 25 zeigt die Kurvenanpassung für die drei Applikationsrouten.

Tab. 6: Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung) / Plasma / i.v., p.o., i.p. / Ratte
 Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.1.2) berechnet aus den mittleren **R(+)- α -Liponsäure**-Plasmakonzentrationen nach einfacher intravenöser, oraler oder intraperitonealer Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 20 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Parameter zur Beschreibung der Konzentration/Zeit Kurve im Plasma												
Appl.	V_c [l/kg]	k_a [1/h]	k_{10} [1/h]	k_{12} [1/h]	k_{21} [1/h]	A [ng/ml]	B [ng/ml]	C [ng/ml]	α [1/h]	β [1/h]	$t_{1/2} (\alpha)$ [h]	$t_{1/2} (\beta)$ [h]
i.v.	0,072	-	7,48	0,025	0,61	276658	88	-	7,51	0,61	0,09	1,13
p.o.	0,327	206,2	2,22	0,284	0,82	14473	1017	15490	2,63	0,69	0,26	1,00
i.p.	0,068	214,0	4,45	1,001	0,02	111733	74	111806	5,46	0,016	0,13	42,51

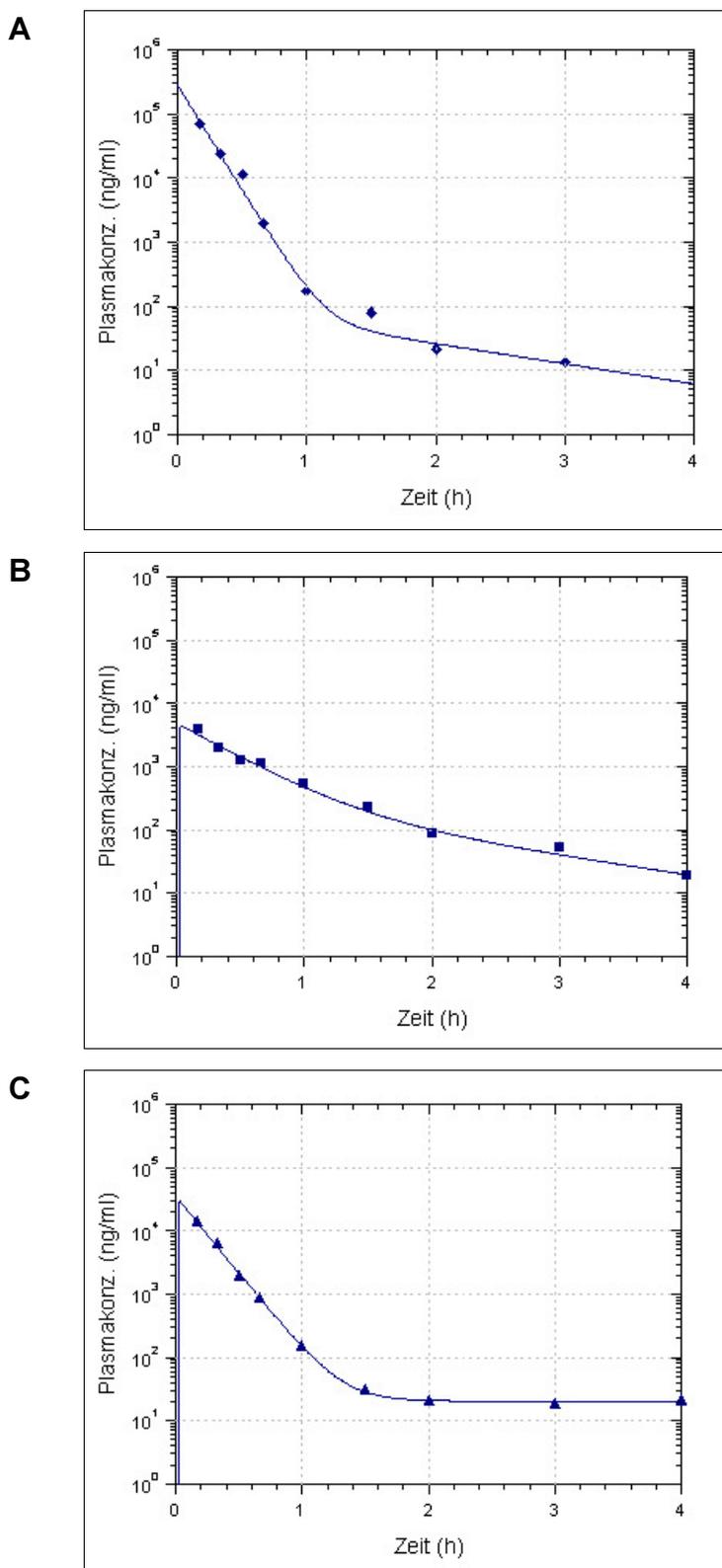


Abb. 25: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / R(+)- α -Liponsäure / Fit / i.v., p.o., i.p. / Ratte
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten mittleren Plasmakonzentrations-Zeitverläufe in Ratten (Mittel_{arith} / **R(+)- α -Liponsäure**) nach intravenöser (A), oraler (B) oder intraperitonealer (C) Gabe von Dextlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 20 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

5.1.2 Untersuchung der Dosislinearität im Plasma

Die Voraussetzung für die nicht kompartmentelle Auswertung und die Anwendung der Kompartiment-Modellen ist eine lineare Pharmakokinetik. Um dies zu untersuchen, wurde Dexlipotam in unterschiedlichen Dosierungen männlichen Ratten verabreicht und die Pharmakokinetik untersucht. Die Dosierungen wurden so gewählt, daß die mittlere Dosisstufe der pharmakologisch wirksamen Dosierung entspricht – in unserem Fall 20 mg/kg. Die höchste Dosierung wurde so gewählt, daß eine toxische Wirkung bei Einfachgabe ausgeschlossen werden konnten. Die Dosierung 20 mg/kg wurde in dem Tierexperiment zur Bestimmung der absoluten Bioverfügbarkeit verwendet (Kapitel 5.1.1). Diese Ergebnisse wurden für die Dosislinearitätsuntersuchungen mit einbezogen, so daß 4 Dosisstufen zur Verfügung standen. Der genaue Versuchsablauf ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tab. 7: Studiendesign zur Bestimmung der Dosislinearität / Ratte
 Studiendesign zur Bestimmung der Dosislinearität und Pharmakokinetik von R(+)- α -Liponsäure in männlichen Ratten nach oraler Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure) in unterschiedlichen Dosierungen, 10, 30 und 100 mg/kg bezogen auf die freie Säure.

Testsubstanz:	Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure)		
Applikationsroute (4.6.1.1):	p.o.		
Dosis (mg/kg) bezogen auf die freie Säure:	10	30	100
Häufigkeit der Applikation:	Einfachgabe		
Formulierung:	gelöst in Trinkwasser		
Konzentration der Testsubstanz (mg/ml):	2	6	20
Appliziertes Volumen (ml/kg):	5		
Gesamtzahl der Tiere:	♂ : 45	♂ : 50	♂ : 60
Tier Nr.: ♂ (siehe Anhang)	1-45	46-116	111-170
Zeitpunkte der Blutentnahme:	10; 20; 30; 40 min; 1; 1,5; 2; 3; 4 h	10; 20; 30; 40 min; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6 h	10; 20; 30; 40 min; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10 h
	Blutentnahme durch Herzpunktion (4.6.1.1)		
Analytische Meßmethode:	Kapitel 4.4.1		

Pro untersuchten Zeitpunkt wurden jeweils 5 Tiere getötet, um eine ausreichende Menge an Plasma für die Konzentrationsbestimmung zu erhalten. Das Blut wurde für jedes Tier gesammelt und die R(+)- α -Liponsäure-Konzentration in jeder Probe bestimmt. Die so ermittelte Plasmakonzentration entsprach der Gesamtmenge an R(+)- α -Liponsäure, also sowohl die an Protein gebundene als auch die ungebundene Fraktion.

Die Mittelwertkonzentrations-Zeitkurven für alle drei Dosierungen sind in Abbildung 26 dargestellt. Im Anhang sind die individuellen Plasmakonzentrationen mit Statistik und dem jeweiligen minimalen und maximalen Konzentrationswert einer Gruppe (n = 5) dargestellt. Auch in diesen Untersuchungen zeigte sich die hohe Streuung nach oraler Gabe (individuelle Konzentrationen in Anhang A.6 – A.8).

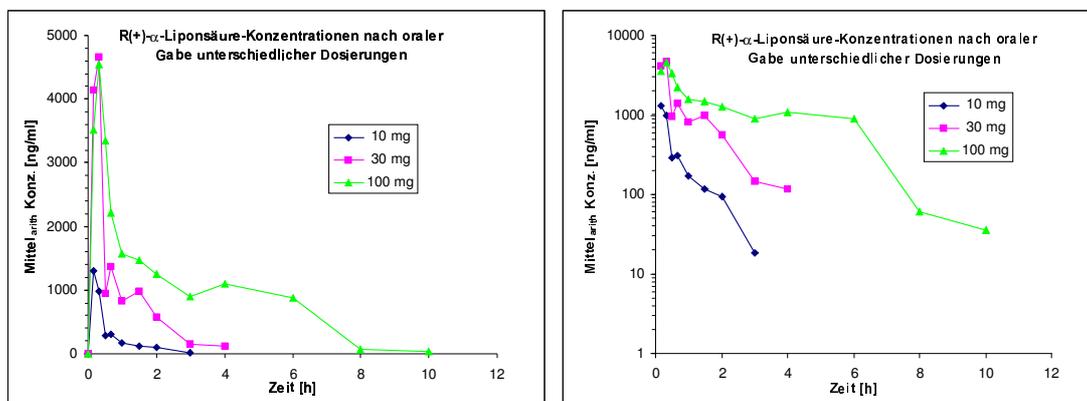


Abb. 26: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / R(+)- α -Liponsäure / p.o. / Ratte
Lineare (links) und semilogarithmische (rechts) Darstellung der mittleren Plasmakonzentrations-Zeitverläufe in Ratten (Mittel_{arith} \pm Min und Max) nach oraler Gabe von 10, 30 oder 100 mg/kg Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosierungen sind bezogen auf die freie Säure).

Für jeden Blutentnahmezeitpunkt wurde der arithmetische Mittelwert der gemessenen R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen errechnet. Die pharmakokinetische Auswertung basierte auf den Mittelwertkonzentrationen, die individuellen Plasmakonzentrationen sind im Anhang A.6 – A.8 zusammengefaßt.

Nicht kompartimentelle Auswertung der Daten:

Die Ergebnisse der nicht kompartimentellen Auswertung (siehe Kapitel 4.7.2 und Anhang, graphische Darstellung: A.9 / Tabelle: A.10) sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tab. 8: Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartimentelle Auswertung) / Plasma / p.o. / Ratte
Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.2) berechnet aus den mittleren **R(+)- α -Liponsäure**-Plasmakonzentrationen in männlichen Ratten nach einfacher oraler Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 10, 30 und 100 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Pharmakokinetik Parameter (Plasmakonzentration)						
Dosis [mg/kg]	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-tlast} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]	MRT [h]
10	1299	0,17	0,61	715	736	0,79
20*	3931	0,17	0,76	1929	1950	0,68
30	4656	0,33	0,78	3426	3528	1,08
100	4552	0,33	1,55	9246	9348	2,90

*Ergebnisse aus Kapitel 5.1.1.

Nach oraler Gabe unterschiedlicher Dosierungen zeigte sich das schnelle Resorptionsverhalten von Dexlipotam, 5 min nach Substanzgabe bei niedrigen Dosierungen und 10 min bei höheren Dosierungen wurde die maximale Plasmakonzentration erreicht. Auffällig ist, daß nicht nur t_{max} sondern auch $t_{1/2}$ und MRT mit steigender Dosierung ansteigt.

Abbildung 27 (linke Darstellung) verdeutlicht den linearen Zusammenhang zwischen der applizierten Dosis und der AUC. Es liegt Dosisproportionalität vor, denn eine Dosis Null führt zu einer AUC von Null. Bei einer Vervielfachung der Dosis zeigt die beobachtete Konzentrations-Zeit-Kurve eine Vervielfachung der Konzentrationen $C(t)$ zu jedem Zeitpunkt t (Kapitel 4.7.2, Superpositionsprinzip). Demnach müßte auch zwischen der applizierten Dosis und der maximalen Plasmakonzentration ein linearer Zusammenhang bestehen, das in unserem Fall nur bis zur Dosis 30 mg/kg zutrifft, im höheren Dosisbereich (> 30 mg/kg) nicht mehr. Daraus läßt sich schließen, daß die Resorptionsgeschwindigkeit in höheren Dosierungen einer Limitierung unterliegt.

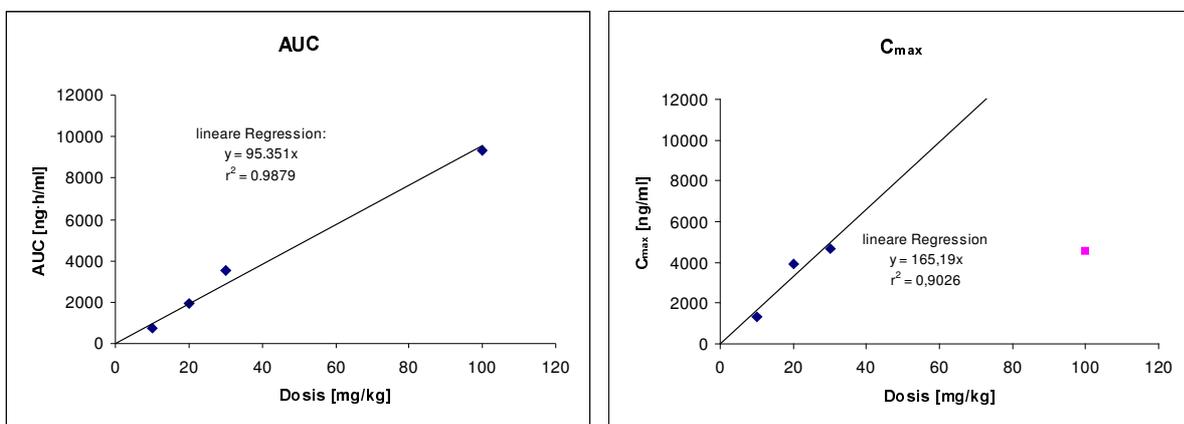


Abb. 27: Dosisproportionalität / R(+)- α -Liponsäure / p.o. / Ratte
 Die linke Darstellung zeigt den linearen Zusammenhang zwischen der applizierten Dosis nach oraler Gabe von 10, 20, 30 und 100 mg/kg Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosierungen sind bezogen auf die freie Säure) und den ermittelten AUC-Werten; die rechte Darstellung zeigt den linearen Zusammenhang zwischen der applizierten Dosis und den gemessenen maximalen Plasmakonzentrationen bis zur Dosierung 30 mg/kg, (Die Dosierung 100 mg/kg ist nicht in die lineare Regression mit einbezogen)

Kompartimentelle Auswertung der Daten:

Der Konzentrations-Zeitverlauf für die jeweilige Dosierung konnte durch die mathematische Gleichung (Kapitel 4.7.1.2, Gleichung 62) basierend auf einem Zwei-Kompartiment-Modell gut beschrieben werden. In Tabelle 9 sind die Parameter zusammengefaßt; Abbildung 28 zeigt die Kurvenanpassungen für die mittleren Plasmakonzentrationen der unterschiedlichen Dosierungen.

Tab. 9: Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung) / Plasma / p.o. / Ratte
 Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.1.2) berechnet aus den mittleren **R(+)- α -Liponsäure**-Plasmakonzentrationen nach einfacher oraler Gabe von Dexlipotam (Trometamol Salz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 10, 30 und 100 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Parameter zur Beschreibung der Konzentration/Zeit Kurve (Plasmakonzentration)												
Dosis [mg/kg]	V_c [l/kg]	k_a [1/h]	k_{10} [1/h]	k_{12} [1/h]	k_{21} [1/h]	A [ng/ml]	B [ng/ml]	C [ng/ml]	α [1/h]	β [1/h]	$t_{1/2 (\alpha)}$ [h]	$t_{1/2 (\beta)}$ [h]
10	0,207	255,6	3,099	1,630	1,436	21416	3248	24664	5,33	0,83	0,13	0,83
30	0,243	221,2	2,346	2,335	1,513	17370	3674	21044	5,56	0,64	0,12	1,08
100	0,556	356,3	0,622	0,734	1,395	4442	4588	9031	2,39	0,36	0,29	1,91

Für die absolute Bioverfügbarkeit f wurde für alle Dosierungen der Faktor 0,25 angenommen, da Dosisproportionalität in dem untersuchten Dosisbereich vorlag.

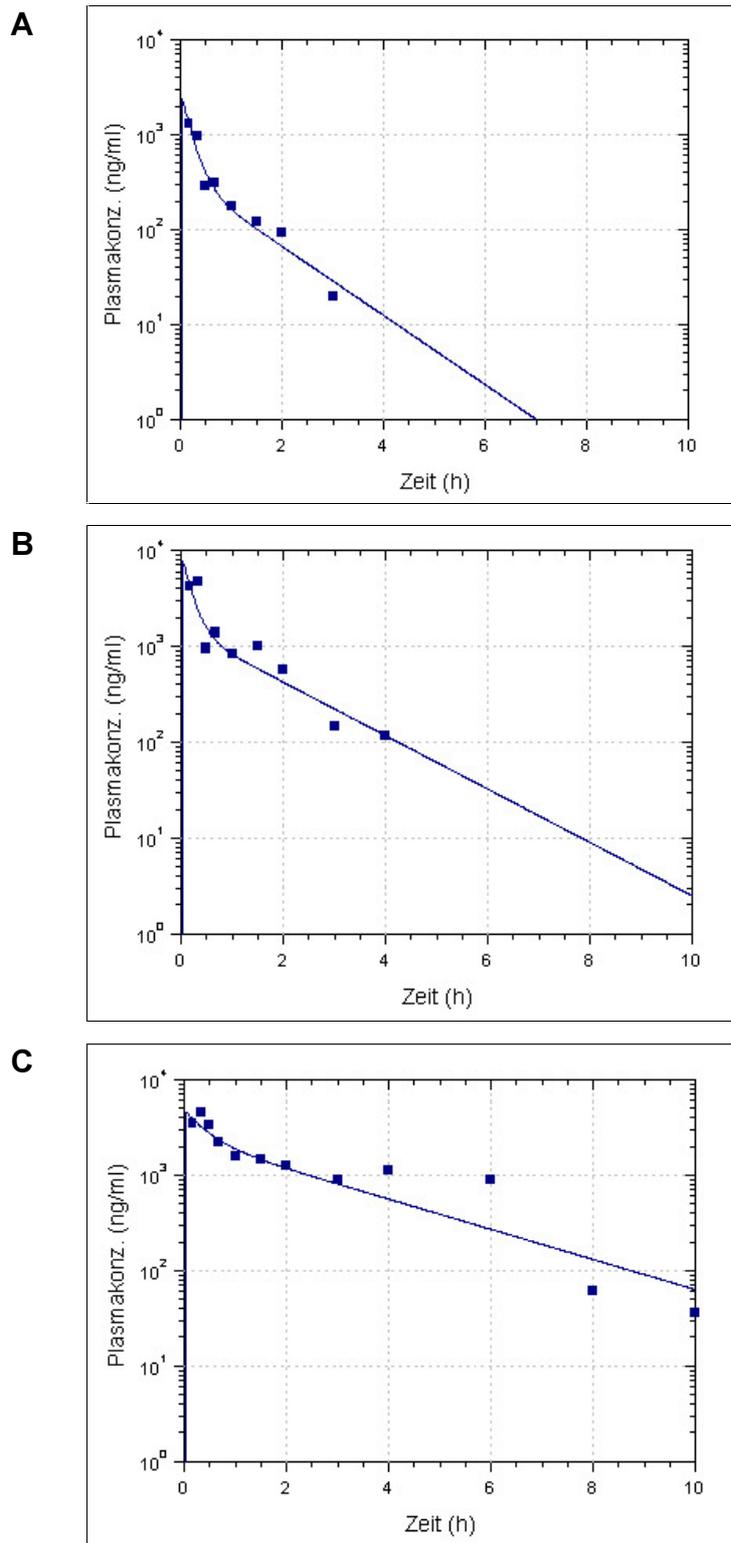


Abb. 28: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / R(+)- α -Liponsäure / Fit / p.o. / Ratte
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten mittleren Plasmakonzentrations-Zeitverläufe in Ratten (Mittel_{arith} / **R(+)- α -Liponsäure**) nach oraler Gabe von 10 (A), 30 (B) oder 100 mg/kg (C) Dexlipotam (Trometamol Salz der R(+)- α -Liponsäure, Dosierungen sind bezogen auf die freie Säure).

5.1.3 α -Liponsäure-Konzentrationen im Gewebe

Eine mögliche Erklärung für die zeitliche Diskrepanz zwischen Plasmaspiegel und Wirkung wäre, daß nicht die Plasmakonzentrationen, sondern die Gewebekonzentrationen mit der Wirkung in Zusammenhang stehen. Aus diesem Grund wurden Experimente durchgeführt, die das Ziel hatten, die Konzentration der α -Liponsäure in unterschiedlichen Geweben zu untersuchen. Bei den ersten Studien wurden das Gewebe zunächst zerkleinert und anschließend wurden in einem weiteren Schritt auch die Zellverbände aufgeschlossen und die Konzentration von α -Liponsäure in der so gewonnenen Lösung bestimmt (Kapitel 4.4.2). Die gemessene Gewebekonzentration stellte die Summe aus der extrazellulären und intrazellulären α -Liponsäure-Konzentrationen dar.

5.1.3.1 Nach oraler Einfach- und Mehrfachgabe

Der erste Versuch sollte dazu dienen, die Gewebekonzentration der Testsubstanz nach oraler Gabe zu bestimmen. Die orale Gabe wurde gewählt, da diese die gewünschte Applikation für den Menschen darstellte. Männlichen Ratten wurde Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure) über 22 Tage einmal täglich in einer Dosierung von 30 mg/kg (bezogen auf die freie Säure) verabreicht. Gewebe- (Nerven, Gefäßmaterial, Herz, Muskel, Leber und Niere) und Plasmakonzentrationen wurden nach Einmal- und Mehrfachgabe bestimmt, um mögliche Kumulation der Testsubstanz im Blut oder im Gewebe zu untersuchen. Kontrolltiere wurden in der gleichen Art und Weise wie die mit Wirkstoff behandelten Tiere (Verumtiere) einmal täglich mit Trinkwasser ohne Testsubstanz behandelt.

In Tabelle 10 ist der genaue Studienablauf dargestellt. Pro untersuchten Zeitpunkt wurden jeweils 3 Tiere getötet und das Plasma und die zu untersuchenden Organe entnommen. In jedem Tier wurde dann die R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen sowohl im Plasma als auch im Gewebe untersucht.

Die individuellen Plasma- und Gewebekonzentrationen sind im Anhang A.11 und A.12 dargestellt.

ERGEBNISSE

Tab. 10: Studiendesign zur Bestimmung der Gewebekonzentration / p.o. / Ratte
 Studiendesign zur Bestimmung der Gewebekonzentration von R(+)- α -Liponsäure in männlichen Ratten nach oraler Einfach- und Mehrfachgabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure).

Testsubstanz:	Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure)		
Applikationsroute:	Oral (siehe Kapitel 4.6.1.1)		
Dosis (mg/kg/Tag):	30 (bezogen auf R(+)- α -Liponsäure)		
Häufigkeit der Applikation:	22 x 30 mg/kg/Tag		
Formulierung:	In Trinkwasser gelöst		
Konzentration der Formulierung (mg/ml):	9.54 (bezogen auf die freie Säure)		
Appliziertes Volumen (ml/kg):	5		
Gesamtzahl der Tiere:	♂ : 33		
Kontrolltiere:	3		
Tier Nr. (siehe Anhang):	♂	Verumtiere: 1 - 30	Kontrolltiere: 31-33
Zeitpunkte der Blut und Gewebeentnahme: (Kapitel 4.6.1.1)	Am 2., 8. und 15. Tag jeweils vor der nächsten Applikation		Am 22. Tag: 1 h nach der letzten Applikation
	Am 22. Tag: 1, 24, 48, 96, 168, 216 und 264 h nach der letzten Applikation		
Blutentnahme durch Herzpunktion			
Entnommenes Gewebe:	Muskel, Leber, Herz, Niere, Nerven und Aorta (siehe Kapitel 4.6.1.1)		
Analytische Meßmethode:	Plasma: Kapitel 4.4.1 Gewebe: Kapitel 4.4.2		

Nach Mehrfachgabe von Dexlipotam über 3 Wochen wurden 1 h nach der letzten Substanzgabe am Tag 22 in allen drei untersuchten Tieren R(+)- α -Liponsäure-Plasmakonzentrationen im Bereich von 160 – 250 ng/ml gefunden (siehe Anhang A.11). Hingegen lagen alle Plasmakonzentrationen, die direkt vor der nächsten täglichen Gabe entnommen wurden, also circa 24 h nach Applikation, unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 2 ng/ml), sowohl am Tag 8 als auch an den Tagen 15 und 23. Somit fand bei einer einmal täglich verabreichten Mehrfachdosierung über 22 Tage im gewählten Dosierbereich keine Anreicherung im Plasma statt.

In den meisten entnommenen Geweben konnte nur eine sehr niedrige oder keine R(+)- α -Liponsäure-Konzentration quantifiziert werden. In **Muskel**, **Herz** und **Niere** lagen die R(+)- α -Liponsäure-Konzentration in den meisten Fällen unterhalb der Nachweisgrenze oder in einzelnen Fällen unterhalb der Bestimmungsgrenze (siehe Anhang A.12 und Abbildung 29).

Abbildung 29 zeigt die Gewebe und Plasmakonzentrationen 1 h nach der letzten Substanzgabe am Tag 22 als Balkendiagramm.

In der **Leber** konnten am 22. Tag 1 h nach Substanzgabe Konzentrationen zwischen 160 – 240 ng/g bestimmt werden. Die gemessenen Konzentrationen lagen in dem Größenordnungsbereich der Plasmakonzentrationen, die zum selben Zeitpunkt untersucht wurden. Es gab aber keine Hinweise auf eine stattfindende Kumulation in diesem Organ, da 24 h nach Substanzgabe die Konzentrationen in den meisten Tieren wieder unterhalb der Nachweisgrenze abgefallen waren. Die hohen Konzentrationen kurz nach Substanzgabe geben aber Hinweise, daß die Leber vermutlich eine Hauptrolle in der Elimination der R(+)- α -Liponsäure spielt.

In den **Nerven** konnte nur in einzelnen Tiere, 1 h nach Substanzgabe am Tag 22, und 24 h nach Substanzgabe am Tag 8 und Tag 15, R(+)- α -Liponsäure-Konzentration gemessen werden (Abbildung 29). Damit zeigte das Nervengewebe ein uneinheitliches Bild. Einzelne Tiere zeigten eine deutliche Anreicherung von R(+)- α -Liponsäure im Gewebe und eine langsame Elimination der Substanz. Ein Grund für das uneinheitliche Ergebnis ist sicher die limitierte Verfügbarkeit an Organgewebe, die einen wesentlichen Einfluß auf die Quantifizierung hatte.

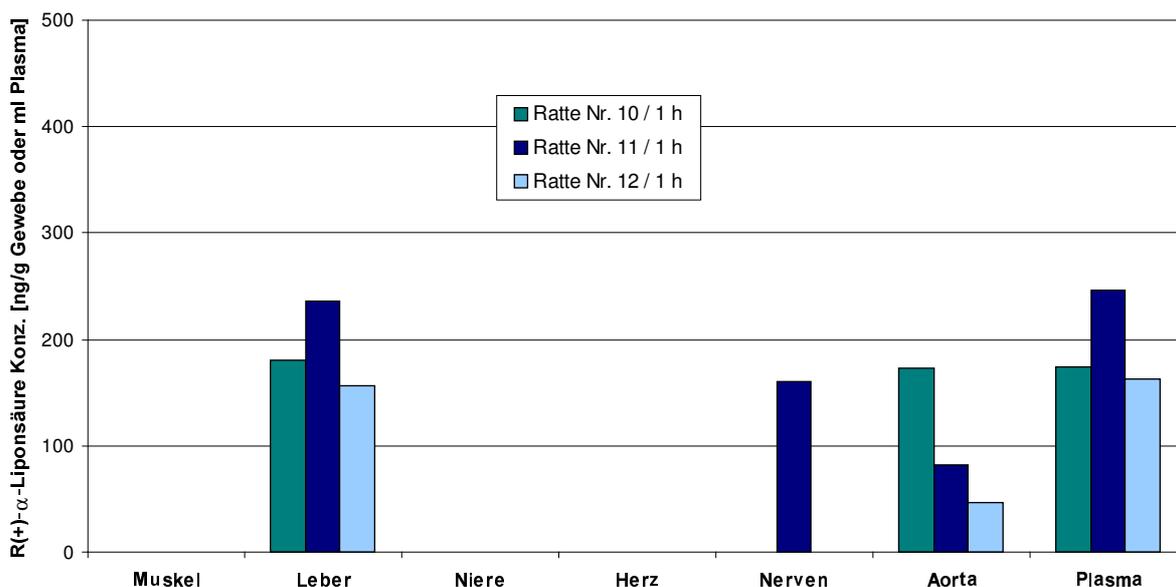


Abb. 29: Gewebekonzentration / R(+)- α -Liponsäure / p.o. / Mehrfachgabe / Ratte
 Darstellung der **R(+)- α -Liponsäure**-Gewebekonzentrationen als Balkendiagramm, gemessen 1 h nach oraler Gabe von Dexlipotam am Tag 22 (Trometamol Salz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 30 mg/kg bezogen auf die freie Säure, einmal täglich über 22 Tage).

In der **Aorta** lagen die R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen bis zum Tag 15 unterhalb der Nachweisgrenze, eine Ausnahme bildete das Tier Nr. 7 am Tag 15 (siehe Anhang A.12). Hingegen am Tag 22 konnten in allen drei untersuchten Tieren 1, 24 und 48 h nach der letzten Substanzgabe R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen bestimmt werden. Die Konzentrationen lagen im Bereich von 40 – 420 ng/g mit starker interindividueller Streuung.

Die Aorta zeigte damit als einziges Gewebe Hinweise auf Kumulation nach Mehrfachgabe. Nach einer 3-wöchigen Behandlung wurden, sowohl nach 24 h als auch nach 48 h nach der 22. Gabe, in allen 3 untersuchten Tieren R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen gemessen. Es scheint, daß eine Häufung der Testsubstanz in spezifischen Geweberegionen, z.B. in Gefäßmaterial, nach 3-wöchiger oraler Gabe stattfand, diese aber nicht im Plasma oder in andere Geweben messbar war.

Die niedrige Bioverfügbarkeit im Plasma nach oraler Gabe in Ratten (Kapitel 5.1.1) könnte eine Erklärung liefern, warum nur sehr geringe R(+)- α -Liponsäure-Mengen in den untersuchten Geweben gefunden wurden. Außerdem war die Empfindlichkeit der analytischen Methode nicht ausreichend, um auch Spuren in Geweben nachzuweisen.

5.1.3.2 Nach intravenöser Mehrfachgabe

Basierend auf den Ergebnissen aus den Gewebeuntersuchungen nach oraler Gabe wurde während einer toxikologischen Studie, welche im Rahmen der Entwicklung durchgeführt wurden, Gewebematerial von 3 Tieren (2 Tiere nach 1 h und ein Tier nach 24 h) nach intravenöser Gabe entnommen. Da das verwendete Analysenverfahren (Kapitel 4.4.2) ein unspezifisches Verfahren darstellt (keine enantioselektive Quantifizierung) entsprechen die gemessenen Gewebekonzentrationen der Summe aus R- und S-Enantiomer. Somit konnte keine Aussage zu einer möglicherweise unterschiedlichen Gewebeverteilung der Enantiomere gemacht werden.

Männlichen Ratten wurde rac- α -Liponsäure (Trometamolsalz der rac- α -Liponsäure) über 29 Tage einmal täglich in einer Dosierung von 25 mg/kg (bezogen auf die freie Säure) intravenös verabreicht. Die Gewebekonzentrationen in Nerven, Herz, Muskel, Leber und Niere wurden nach intravenöser Mehrfachgabe untersucht und mit den Konzentrationen nach oraler Mehrfachgabe verglichen. Insgesamt wurden jeweils 3 Tiere getötet und die zu untersuchenden Organe entnommen. Für den Zeitpunkt 1 h nach Applikation standen zwei Tiere, für den Zeitpunkt 24 h nach Applikation nur ein Tier zur Verfügung. Wegen der geringen Tierzahl können die Ergebnisse nur orientierend betrachtet werden.

Der genaue Versuchsablauf ist in Tabelle 11 aufgelistet.

Tab. 11: Studiendesign zur Bestimmung der Gewebekonzentration / i.v. / Ratte
 Studiendesign zur Bestimmung der Gewebekonzentration von α -Liponsäure in männlichen Ratten nach intravenöser Mehrfachgabe von rac- α -Liponsäure (als Trometamolsalz).

Testsubstanz:	rac- α -Liponsäure (als Trometamolsalz – Ampullenformulierung 250 mg rac- α -Liponsäure / 10 ml)	
Applikationsroute:	Intravenös als Bolusinjektion (siehe 4.6.1.1)	
Dosis (mg/kg/Tag)	25 (bezogen auf rac- α -Liponsäure)	
Häufigkeit der Applikation:	29 x 25 mg/kg/Tag (die Applikation erfolgte täglich am Morgen)	
Formulierung	Die Ampullenlösung wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt	
Konzentration der Formulierung (mg/ml)	8,57 (bezogen auf rac- α -Liponsäure)	
Appliziertes Volumen (ml/kg)	4,64	
Gesamtzahl der Tiere	♂ : 3	
Kontrolltiere:	-	
Tier Nr. (siehe Anhang)	♂	6, 7 (Gewebe) 8 (Gewebe) 1, 2, 3, 4, 5 (Plasma)
Zeitpunkte der Gewebeentnahme	Am 29. Tag 1 h nach der letzten Applikation	Am 29. Tag 24 h nach der letzten Applikation
Entnommenes Gewebe:	Muskel, Leber, Herz, Niere und Nerven (siehe 4.6.1.1)	
Zeitpunkte der Blutentnahme	Am 29. Tag 24 h nach der letzten Applikation Blutentnahme retroorbital (siehe 4.6.1.1)	
Analytische Meßmethode:	Gewebe: Kapitel 4.4.2 / Plasma: Kapitel 4.4.1	

Zwei Tiere wurden 1 h nach der letzten intravenösen Gabe untersucht. In allen Gewebeproben konnte α -Liponsäure quantifiziert werden (Abbildung 30, Anhang A.13). Die höchste Konzentration wurde in dem Nervengewebe gemessen.

Ein Tier wurde 24 h nach der letzten Applikation untersucht. In Herz-, Muskel- und Nervengewebe konnte α -Liponsäure bestimmt werden. Die Konzentrationen lagen in vergleichbarer Größenordnungen zu den Gewebekonzentrationen, die 1 h nach der letzten Gabe gemessen wurden (Abbildung 30, Anhang A.13).

In diesem Experiment wurden Plasmaproben von 5 weiteren Tieren 24 h nach Substanzgabe entnommen und untersucht. In allen Proben lagen die gemessenen Konzentrationen unter der Nachweisgrenze (durch geringeres Volumen: LOD = 4 ng/ml). Die geschätzten α -Liponsäure-Plasmakonzentration basierend auf dem Applikationsschema dieser Studie müßten 1 h nach Substanzgabe in der Größenordnung von ca. 200 – 300 ng/ml liegen und wären demnach vergleichbar mit den Leber- und Nierenkonzentrationen zum selben Zeitpunkt.

Die hohen Gewebekonzentrationen meßbar 24 h nach der letzten Applikation geben einen Hinweis, daß eine Kumulation der α -Liponsäure nach mehrfacher intravenöser Gabe in bestimmten Geweberegionen (Nerven, Muskel und Herz) stattfindet. Im Gegensatz dazu fand keine Kumulation im Plasma statt. Die Studienergebnisse basieren aber nur auf einer sehr kleinen Anzahl von untersuchten Tieren und können aus diesem Grund nur als orientierend angesehen werden.

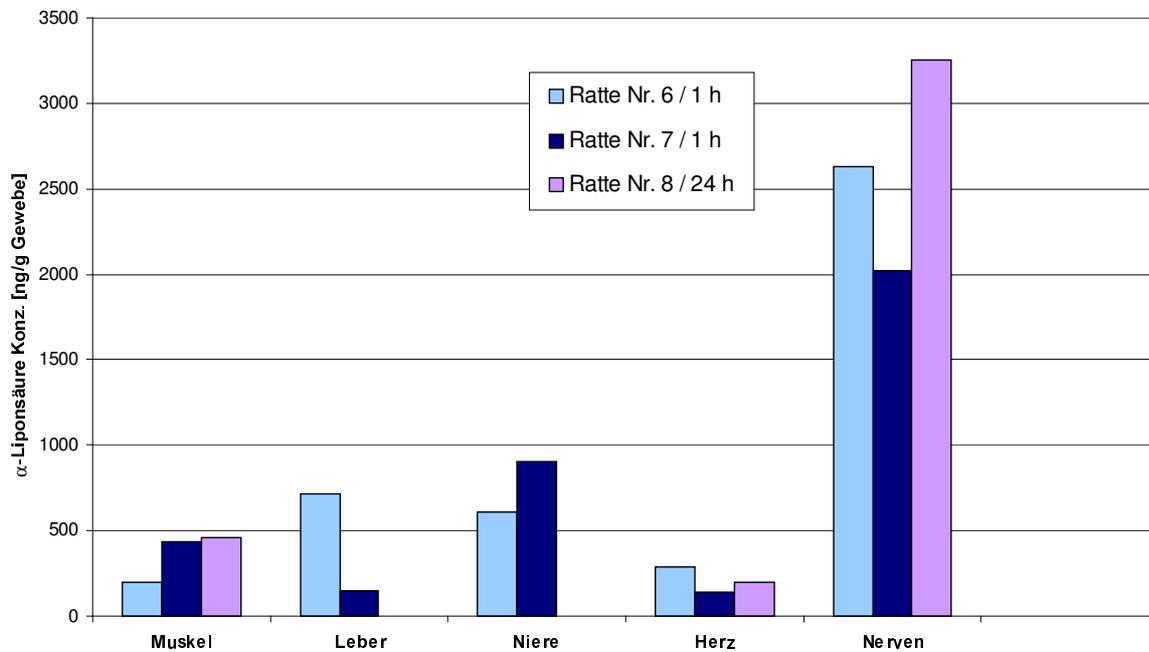


Abb. 30: Gewebekonzentration / α -Liponsäure / i.v. / Mehrfachgabe / Ratte
 Darstellung der α -Liponsäure-Konzentrationen als Balkendiagramm, gemessen 1 h und 24 h nach intravenöser Mehrfachgabe von rac- α -Liponsäure (als Trometamolsalz, Dosis 25 mg/kg bezogen auf die freie Säure, einmal täglich über 29 Tage) am Tag 29.

5.1.4 Bestimmung der Plasmakonzentration und der freien Gewebekonzentration von R(+)- α -Liponsäure und ihrer Metaboliten im Muskel

In den vorherigen Gewebeuntersuchungen (siehe Kapitel 5.1.3) wurde sowohl der extrazelluläre als auch der intrazelluläre Anteil der α -Liponsäure im Gewebe erfaßt. Dabei bestand bei der Messung keine Möglichkeit zwischen dem reversibel an Gewebe gebundenen und dem freien ungebundenen Anteil zu unterscheiden. Mit Hilfe der Mikrodialysetechnik (siehe Kapitel 4.5) versuchte man nun den freien ungebundenen Anteil der α -Liponsäure und ihrer Metaboliten im Interstitium, also die extrazelluläre Konzentration, zu erfassen, um genauere Informationen zu erhalten, wie diese sich im Gewebe verteilen. Als zu untersuchendes Gewebe wurde der Muskel gewählt, weil zum einen der Muskel aus methodischen Gründen für die Mikrodialyse leicht zugänglich war und zum anderen dieses Gewebe als eines der Zielorgane angesehen werden konnte. In Vorversuchen (Kapitel 5.1.3.2) hatte man erste Hinweise erhalten, daß nach intravenöser Mehrfachgabe von α -Liponsäure eine Anreicherung der Muttersubstanz im Muskelgewebe stattfand. Um die niedrige Bioverfügbarkeit nach oraler oder intraperitonealer Gabe zu umgehen, wurde für diesen Versuch als Applikationsroute die Infusion gewählt. Die Substanzgabe erstreckte sich über 1 h, so daß sich ein Gleichgewichtszustand im Organismus auch nach Einfachgabe auf Grund der kurzen Halbwertszeiten einstellen konnte.

Die extrazellulären und ungebundenen α -Liponsäure-, und Tetranorliponsäure- und Bisnorliponsäure-Konzentrationen im Gewebe konnte über die Zeit bestimmt werden. Die zwei ausgewählten Metaboliten entstehen durch β -Oxidation und verfügen, wie die Muttersubstanz, über den intakten Dithiolan-Ring, der vermutlich für die Wirkung im Organismus notwendig ist. Diese sind deshalb von Interesse.

In diesem Versuch wurde an narkotisierten Ratten die Plasma- und Gewebekonzentrationen während und nach einer Infusion über 1 h quantifiziert. In den ersten fünf Tieren (Ratte Nr. 2, 3, 5, 6 und 7) wurde der individuelle Plasmakonzentrations- und der freie Gewebekonzentrations-Zeitverlauf der R(+)- α -Liponsäure bestimmt. Zusätzlich wurde in den Gewebeproben die Konzentration der Metaboliten Tetranorliponsäure und Bisnorliponsäure zu verschiedenen Zeiten bestimmt. Durch das geringe Blutvolumen, das der Ratte während des Versuches entnommen werden konnte, war die Konzentrationsbestimmung der Metaboliten im Plasma nicht möglich.

Zwei weitere Tiere (Ratte Nr. 7 und 8) wurden in das Experiment mit eingeschlossen, um an zwei ausgewählten Zeitpunkten eine größere Blutmenge zu entnehmen. Auf Grund des höheren Probenvolumens konnte in diesen Proben zusätzlich zur Muttersubstanz die Konzentrationen der Metaboliten im Plasma bestimmt werden.

Die zusätzlich in die Studie eingeschlossenen Tiere wurden genauso behandelt, wie die vorherigen. Die Unterschiede bestanden nur darin, daß mehr Blut, aber nur an einer geringeren Anzahl an Zeitpunkten (1 und 2 h nach Applikationsstart), entnommen und keine Mikrodialyse vorgenommen wurde. Die Dosierung und die Narkose waren gleich. In Tabelle 12 ist der Versuchsablauf im Detail dargestellt.

Tab. 12: Studiendesign zur Bestimmung der Gewebe- und Plasmakonzentration / Infusion / Ratte
 Studiendesign zur Bestimmung der Gewebe- und Plasmakonzentration von R(+)- α -Liponsäure in männlichen Ratten nach Infusion von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure).

Testsubstanz:	Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure)	
Applikationsroute:	Infusion über 1 h (siehe Kapitel 4.6.1.2)	
Dosis (mg/kg):	40 (bezogen auf R(+)- α -Liponsäure) tatsächliche Dosis betrug 40,0 – 43,1 (siehe Anhang A.14)	
Häufigkeit der Applikation:	Einfachgabe	
Formulierung:	Dexlipotam (R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz) in physiol. Kochsalzlösung	
Infusionsrate (ml/min):	0,1	
Gesamtzahl der verwendeten Tiere:	♂ : 7	
Tier Nr.:	♂	1 - 7
Zeitpunkte für Blutentnahmen:	Tier 2: 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 90, 110 min Tier 3: 5, 10, 20, 40, 50, 60, 70, 90, 110, 120 min Tier 5: 5, 10, 20, 40, 60, 70, 90, 110, 120 min Tier 6 + 7: 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 110, 120 min nach Infusionsstart (Blutentnahme über Katheter in der Arteria carotis, 4.6.1.2) Tier 8 + 9: 60, 120 min (Blutentnahme retroorbital und Herzpunktion, 4.6.1.1) Tier 1 und Tier 4 starben nach oder während der Infusion	
Sammelintervalle für Mikrodialysat:	10 min (Tier 2, 3, 5, 6 und 7) bis 5 h nach Infusion für Tier 8 und 9 wurde keine Mikrodialyse vorgenommen	
Analytische Meßmethode:	Plasma:	Kapitel 4.4.1 LA (Tier Nr. 2, 3, 5, 6 und 7) Kapitel 4.4.5 LA, TNLA und BNLA (Tier Nr. 8 und 9)
	Mikrodialysat:	Kapitel 4.4.3 (Tier Nr. 2, 3, 5, 6 und 7)

In dem nachstehenden Diagramm (Abbildung 31) sind die Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der Muttersubstanz als Mittelwerte mit den individuellen Verläufen der ersten fünf Tiere dargestellt. Die individuellen Plasmakonzentrationen sind im Anhang (A.15 mit den individuellen Dosierungen A.14) dargestellt.

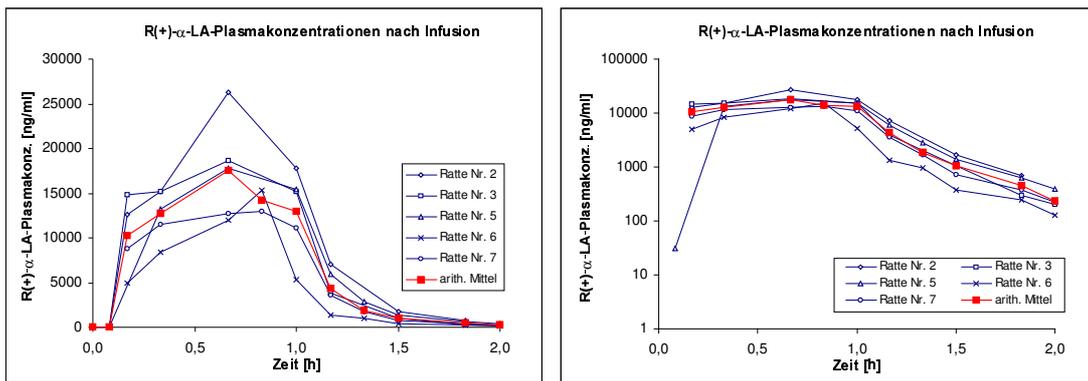


Abb. 31: Plasmakonzentrations-Zeitverlauf / R(+)-α-Liponsäure / Infusion / Ratte
 Lineare (links) und semilogarithmische (rechts) Darstellung der mittleren und individuellen Plasmakonzentrations-Zeitverläufe in Ratten (Mittel_{arith.}, Individuelle Verläufe, Tier 2, 3, 5, 6, und 7) nach Infusion von Dexlipotam (Trometamsalz der R(+)-α-Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Um den ungebundenen Anteil der R(+)-α-Liponsäure-Konzentration im Plasma bestimmen zu können, wurde die Plasmaproteinbindung in einem in-vitro Testmodell bestimmt (Kapitel 4.4.6 und Anhang A.16). Im Mittel betrug die in-vitro Plasmaproteinbindung unabhängig von der eingesetzten Konzentration 80 %. Basierend auf diesem Ergebnis konnte nun der freie ungebundene Anteil der R(+)-α-Liponsäure-Konzentration im Plasma, nämlich 20 % der ermittelten Gesamt-Plasmakonzentration, bestimmt werden.

Die freie ungebundene Plasmakonzentration steht in direktem Gleichgewicht mit der freien ungebundenen Gewebekonzentration. Nur die ungebundene Wirkstoffkonzentration hat die Möglichkeit an den Wirkort zu gelangen. Das heißt nur diese Konzentration kann über mögliche Transportmechanismen an den Wirkort gelangen. Mit Hilfe der Mikro dialysetechnik (Kapitel 4.5) basierend auf dem Dialyse-Prinzip kann diese extrazelluläre ungebundene Gewebekonzentration bestimmt werden. Eine kleine Sonde mit einer semipermeablen Membran (Kapitel 4.6.1.2) wurde in den Muskel narkotisierter Ratten implantiert.

Auf Grund von Diffusion und dem vorherrschenden Konzentrationsunterschied als treibende Kraft zwischen Gewebe und Innenraum der Sonde wurden die im interzellulären Gewebe zu messende Substanzen durch die semipermeable Membran hindurch in die Perfusionslösung transportiert. Der kontinuierliche Fluß der Lösung durch die Sonde, die im Muskelgewebe plaziert war, beförderte die zu untersuchenden Substanzen zur Probenentnahme. Ein Equilibrium zwischen Perfusionsflüssigkeit und Gewebe kann auf Grund des kontinuierlichen Flusses der Perfusionsflüssigkeit nicht erzielt werden. Es ist deshalb notwendig, die Sonde zu kalibrieren. Mit Hilfe der in-vivo Wiederfindungsrate (Kapitel 4.5.3) durch die Retrodialysentechnik kann die tatsächliche Gewebekonzentration (Anhang A.18 und A.21), aus den gemessenen Dialysatkonzentrationen (Anhang A.17, A.19 und A.20) errechnet werden.

Für die Metaboliten und für die Muttersubstanz wurde eine vergleichbare in-vitro Wiederfindungsrate bestimmt (Kapitel 4.5.3 und Anhang A.22), diese lag bei 20 %.

Die in-vivo Wiederfindungsrate für R(+)- α -Liponsäure wurde mittels Retrodialyse bestimmt und war geringer als unter in-vitro Bedingungen, nur 7 % (Anhang A.23). Auf Grund des ähnlichen Dialyseverhaltens der Muttersubstanz und der Metaboliten unter in-vitro Bedingungen wurde für die Kalkulation der Tetranorliponsäure-Gewebekonzentrationen die gleiche in-vivo Wiederfindungsrate von 7 % angenommen. Die gemessenen Dialysatkonzentrationen des Metabolits Bisnorliponsäure lagen in den meisten Fällen unterhalb der Nachweisgrenze. Demnach wurden nur die Gewebekonzentrationen der Muttersubstanz und deren Metabolit Tetranorliponsäure in Abbildung 32 als Konzentrations-Zeit-Profile dargestellt und pharmakokinetisch ausgewertet.

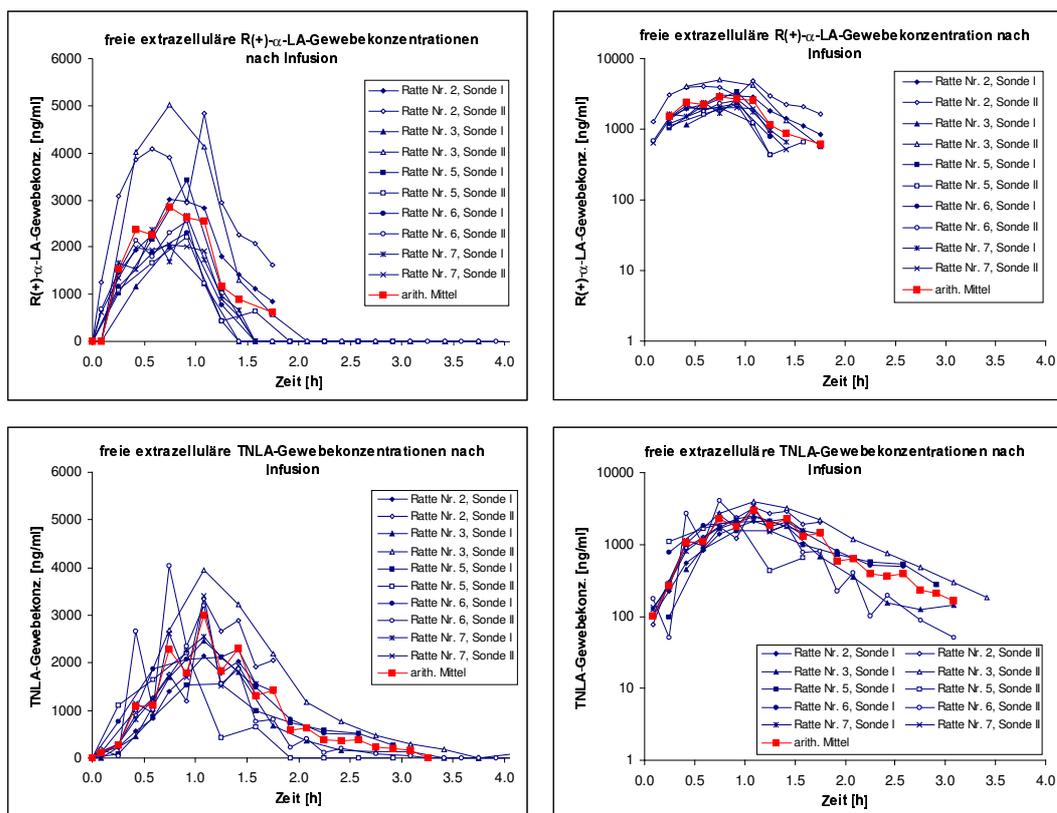


Abb. 32: Gewebekonzentrations-Zeitverlauf / R(+)- α -Liponsäure + Tetranorliponsäure / Infusion / Ratte
Lineare (links) und semilogarithmische (rechts) Darstellung der mittleren Gewebekonzentrations-Zeitverläufe von R(+)- α -Liponsäure und Tetranorliponsäure in Ratten (Mittelarith, Individuelle Verläufe, Tier 2, 3, 5, 6, und 7) nach Infusion von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Nicht kompartmentelle Auswertung der Daten:

Die Ergebnisse der nicht kompartmentelle Auswertung der individuellen Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der R(+)- α -Liponsäure sind in Tabelle 13 zusammengefaßt (siehe Anhang, graphische Darstellung: A.24 / Tabelle: A.27).

Die konzentrationsabhängigen pharmakokinetischen Parameter ($C_{max,free}$, AUC_{free} und $C_{ss,free}$) konnten mit Hilfe der Proteinbindung (siehe Kapitel 4.4.6) errechnet werden. Die zeitabhängigen pharmakokinetische Parameter ($t_{1/2}$ und t_{max}) blieben unverändert.

Tab. 13: Pharmakokinetische Parameter im Plasma (nicht kompart. Auswertung) / Plasma / Infusion / Ratte
Pharmakokinetische Parameter dargestellt als Mittelwerte mit Minimum und Maximum (nicht kompartmentelle Auswertung, Kapitel 4.7.2) berechnet aus den individuellen **R(+)- α -Liponsäure**-Plasmakonzentrationen bestimmt in männlichen Ratten (n = 5) nach einfacher Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) als Infusion über 1 h.

Pharmakokinetik Parameter (Plasmakonzentration)										
Substanz	C_{max}	t_{max}	C_{ss}	$t_{1/2}$	$AUC_{0-tlast}$	AUC	CL	V_z	V_{ss}	MRT
R(+)- α -LA	[ng/ml]	[h]	[ng/ml]	[h]	[ng·h/ml]	[ng·h/ml]	[ml/min/kg]	[l/kg]	[l/kg]	[h]
Mittel _{arith}	18210	0,73	16304	0,22	15267	15359	48,60	0,93	0,57	0,30
Min	12977	0,67	12302	0,19	9903	9950	32,91	0,57	0,41	0,17
Max	26342	0,83	22048	0,25	21040	21220	72,20	1,57	0,75	0,76

Pharmakokinetik Parameter (freie Plasmakonzentration)				
Substanz	$C_{max, free}$	$t_{max, free}$	$C_{ss, free}$	AUC_{free}
R(+)- α -LA	[ng/ml]	[h]	[ng/ml]	[ng·h/ml]
Mittel _{arith}	3642	0,73	3261	3072
Min	2595	0,67	2460	1990
Max	5268	0,83	4410	4244

Die pharmakokinetischen Parameter der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe nach Infusion zeigen gute Übereinstimmung mit den Parametern nach intravenöser Gabe als Bolusinjektion (Kapitel 5.1.1). Die charakteristische kurze $t_{1/2}$, die mit dem hepatischen Blutfuß vergleichbare Gesamtkörper-Clearance und das sehr große Verteilungsvolumen wurde auch nach Infusionsgabe bestätigt.

Die Konzentrationsbestimmungen von der Muttersubstanz und ihrer Metaboliten im Plasma an zwei ausgewählten Zeitpunkten sind in Tabelle 14 aufgelistet. Die Werte erlaubten keine pharmakokinetische Auswertung.

Es zeigte sich in beiden Tieren, daß auch im Plasma deutliche Konzentrationen des Metaboliten Tetranorliponsäure gefunden wurden. Die α -Liponsäure-Konzentrationen lagen in der Größenordnung, wie es sich schon in den vorherigen Tieren zeigte. Der Metabolit BNLA war nur in geringen Mengen zu finden.

Tab. 14: Plasmakonzentrationen / Muttersubstanz und Metaboliten / Infusion / Ratte
 Individuelle Plasmakonzentrationen von R(+)- α -Liponsäure, Tetranorliponsäure und Bisnorliponsäure bestimmt in zwei männlichen Ratten nach einfacher Gabe von Dexlipotam (Trometamol Salz der R(+)- α -Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) als Infusion über 1 h.

Plasmakonzentrationen [ng/ml]				
Ratte Nr.	Zeit [h]	R(+)- α -LA	TNLA	BNLA
7	1	14148,1	4469,0	914,9
	2	185,9	2311,0	336,4
8	1	13143,8	3708,7	681,7
	2	136,0	588,6	192,1

Die pharmakokinetischen Parameter der freien ungebundenen Gewebekonzentration der Muttersubstanz und ihrer Metaboliten (siehe Anhang, graphische Darstellung: A.25 und A.26 / Tabellen: A.28 und A.29) wurden für jedes Tier individuell und für jede Sonde getrennt ausgewertet. Die Ergebnisse der nicht kompartmentellen Auswertung sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tab. 15: Pharmakokinetische Parameter (nicht kompart. Auswertung) / Muskelgewebe / Infusion / Ratte
 Pharmakokinetische Parameter, dargestellt als Mittelwerte mit Min und Max (nicht kompartmentelle Auswertung, Kapitel 4.7.2) berechnet aus den individuellen Gewebekonzentrationen (**R(+)-Liponsäure** und **TNLA**) bestimmt in männlichen Ratten nach einfacher Gabe von Dexlipotam (Trometamol Salz der R(+)- α -Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) als Infusion über 1 h.

Pharmakokinetik Parameter (freie extrazelluläre Gewebekonzentration)						
Substanz		C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-tlast} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]
LA	n	9	9	5	9	5
	Mittel _{arith}	3118	0,88	0,35	2861	4070
	Min	2044	0,75	0,18	1856	2270
	Max	5020	1,08	0,62	5289	6760
TNLA	n	9	9	8	9	5
	Mittel _{arith}	2730	1,06	0,57	2888	3416
	Min	1478	0,75	0,31	1951	2034
	Max	4037	1,25	0,89	5388	5446

Trotz der schnellen Verteilung in das Muskelgewebe unterscheidet sich der Konzentrations-Zeitverlauf im Muskelgewebe vom Plasma. In der Phase, in der die Verteilung des Wirkstoffs im Organismus vorherrscht, fällt die Konzentration im Plasma ab, während die Konzentration im Gewebe weiter ansteigt. Erst wenn ein Gleichgewichtszustand erreicht ist, also wenn zwischen dem zentralen und dem peripheren Kompartiment kein Konzentrationsgefälle mehr besteht, müssen die Konzentrationen in den beiden Kompartimenten gleich sein.

In der vorliegenden Studie ist die freie maximale Konzentration der Muttersubstanz im Gewebe (Tabelle 15, C_{max} ist 3118 ng/ml) vergleichbar mit der freien Plasmakonzentration im Gleichgewichtszustand (Tabelle 13, $C_{ss,free}$ ist 3261 ng/ml), also am Ende der Infusion.

Die Plasmakonzentrationen (Tabelle 14, Konzentration bei 1 h ist 3709 - 4469 ng/ml), also die freie und gebundene Fraktion, des Metaboliten TNLA liegt etwas über den gemessenen freien Gewebekonzentration (Tabelle 15, C_{max} ist 2730 ng/ml). Die freie Plasmakonzentration konnte nicht errechnet werden.

In diesem Gleichgewichtszustand vermindern sich die Arzneistoff-Konzentrationen in den unterschiedlichen Kompartimenten mit der gleichen Geschwindigkeit, vorausgesetzt die Elimination findet im zentralen Kompartiment statt. Die ermittelten Eliminationshalbwertszeiten der Muttersubstanz müssen in einem Zwei-Kompartiment-Modell (siehe Kapitel 4.7.1.2) sowohl im peripheren Kompartiment, abgebildet durch das Gewebe (Tabelle 15, $t_{1/2}$ ist 0,35 h), als auch im zentralen Kompartiment, dargestellt durch das Plasma (Tabelle 13, $t_{1/2}$ ist 0,22 h), gleich sein. Der gemessene Metabolit im Gewebe, Tetranorliponsäure, zeigte eine höhere Halbwertszeit (Tabelle 13, $t_{1/2}$ ist 0,57 h). Diese Halbwertszeit setzte sich zum einen aus der Metabolisierung und damit Bildung des Metaboliten und der Elimination des Metaboliten aus dem Körper zusammen.

Kompartimentelle Auswertung der Daten:

Die kompartimentelle Auswertung basierend auf ein Zwei-Kompartiment-Modell (siehe 4.7.1.2, Gleichung 29) wurde nur für die Muttersubstanz durchgeführt. Die zwei Kompartimente dieses Modells sollten einer physiologischen Grundlage zugeordnet werden.

Im ersten Schritt wurden nur die Plasmakonzentrationen als zeitliche Änderung der Arzneistoffkonzentration im zentralen Kompartiment kompartimentell ausgewertet. Die nachstehenden Kurven (Abbildung 33) stellen die gemessenen individuellen Plasmakonzentrationen mit der Kurvenanpassung dar, in Tabelle 16 sind die Parameter für die mathematische Beschreibung der Kurven zusammengefaßt.

Tab. 16: Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung) / Plasma / Infusion / Ratte
 Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.1.2) berechnet aus den individuellen **R(+)- α -Liponsäure**-Plasmakonzentrationen nach einfacher Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) als Infusion über 1 h.

Parameter zur Beschreibung der Konzentration/Zeit Kurve (Individuelle Plasmakonzentration)											
Tier Nr.	V_c [l/kg]	V_{ss} [l/kg]	k_{10} [1/h]	k_{12} [1/h]	k_{21} [1/h]	A [μ g/ml]	B [μ g/ml]	α [1/h]	β [1/h]	$t_{1/2} (\alpha)$ [h]	$t_{1/2} (\beta)$ [h]
Ratte 2	0,27	0,38	7,36	1,89	4,50	127,74	28,84	10,63	3,11	0,07	0,22
Ratte 3	0,18	0,32	13,43	3,54	4,55	215,97	18,81	18,15	3,37	0,04	0,21
Ratte 5	0,39	0,51	6,57	0,93	2,94	94,72	9,94	8,03	2,40	0,09	0,29
Ratte 6	0,51	0,87	11,69	2,01	2,84	81,20	3,60	14,20	2,34	0,05	0,30
Ratte 7	0,41	0,56	7,82	0,90	2,52	94,82	5,02	9,07	2,17	0,08	0,32

Bemerkung: für den Zeitpunkt 0 h wurde die Konzentration 0 ng/ml angenommen

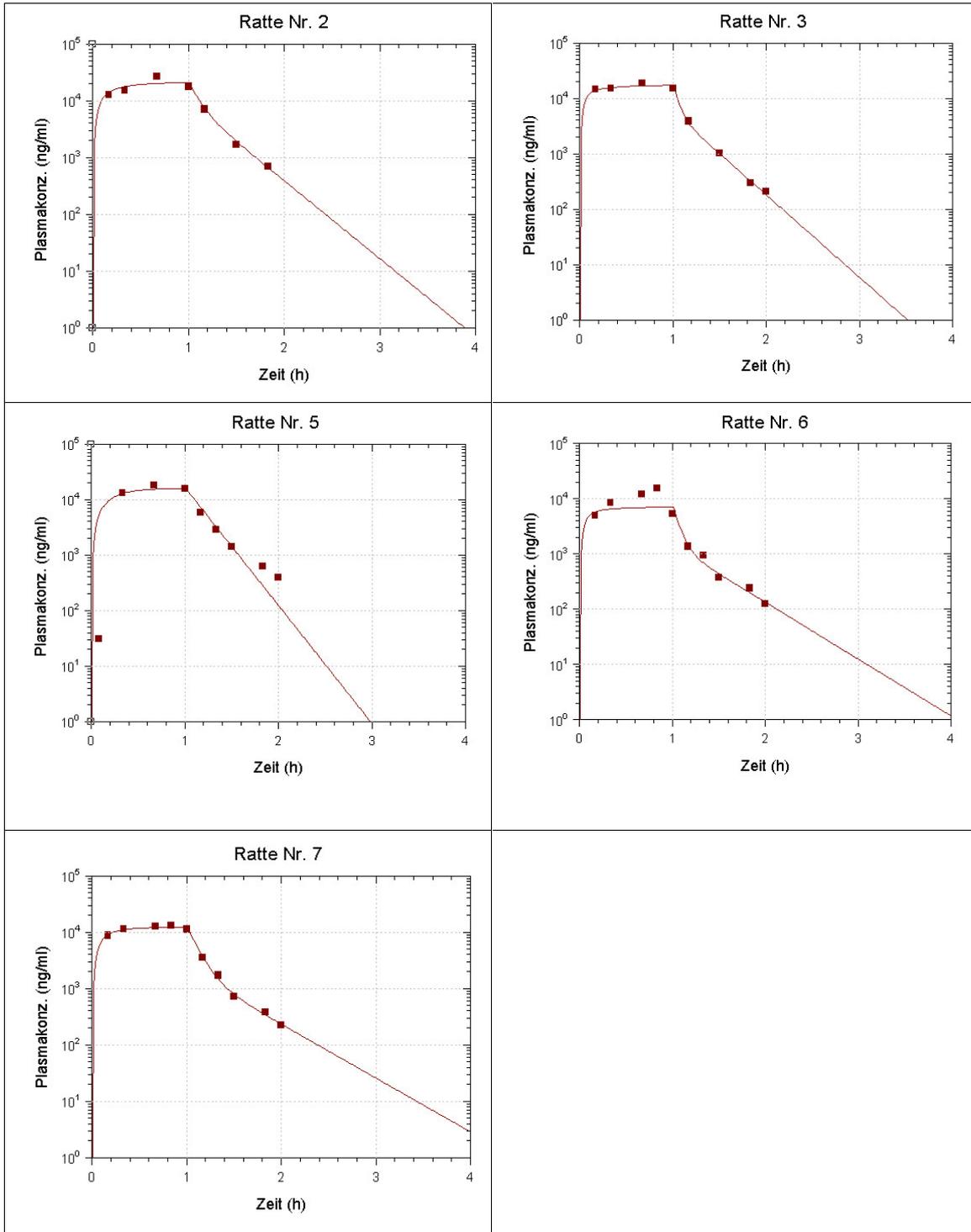


Abb. 33: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / R(+)- α -Liponsäure / Fit / Infusion / Ratte
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten individuellen **R(+)- α -Liponsäure**-Konzentrations-Zeitverläufe in Rattenplasma nach einfacher Gabe von Dexlipotam (Trometamol-salz der R(+)- α -Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die Säure) als Infusion über 1 h.

Im zweiten Schritt wurde die gleiche mathematische Beschreibung basierend auf einem Zwei-Kompartiment-Modell zu Grunde gelegt. Diesmal wurde aber die Kurvenanpassung sowohl auf die Gesamt-Plasmakonzentration, auf die freie Plasmakonzentration als auch auf die freie Gewebekonzentration der Muttersubstanz erweitert (Kapitel 4.7.1.2 Gleichung 29 und 38 für die freie Konzentration). In Tabelle 17 sind die Parameter für die Kurvenanpassung zusammengefaßt. Die rote Linie stellt die Gesamtkonzentration im zentralen Kompartiment, die grüne gestrichelte Linie die errechnete freie Konzentration im zentralen Kompartiment, und die blaue Linie die freie Konzentration im peripheren Kompartiment dar (Abbildung 34). Für jedes Tier wurden zwei Sonden verwendet, die einzeln pharmakokinetisch ausgewertet wurden.

Tab. 17: Pharmakokinetische Parameter (komp. Auswertung) / Gewebe und Plasma / Infusion / Ratte
 Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.1.2) berechnet aus den individuellen **R(+)- α -Liponsäure**-Plasma- und Gewebekonzentrationen nach einfacher Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) als Infusion über 1 h.

Parameter zur Beschreibung der Konzentration/Zeit Kurve (Individuelle Gewebe- und Plasmakonzentration)													
Tier Nr. / Sonde	V_c [l/kg]	V_{ss} [l/kg]	k_{10} [1/h]	k_{12} [1/h]	k_{21} [1/h]	V_p/f_t [l/kg]	A [μ g/ml]	B [μ g/ml]	α [1/h]	β [1/h]	$t_{1/2}(\alpha)$ [h]	$t_{1/2}(\beta)$ [h]	
Ratte 2	I	0,25	0,39	7,87	1,79	3,22	0,70	149,71	16,54	10,46	2,42	0,07	0,29
	II	0,25	0,36	7,73	1,26	3,04	0,53	150,94	13,54	9,57	2,46	0,07	0,28
Ratte 3	I	0,31	0,44	8,17	1,97	4,55	0,67	113,87	21,47	11,43	3,25	0,06	0,21
	II	0,21	0,31	11,6	1,84	3,76	0,50	190,81	12,42	14,06	3,09	0,05	0,22
Ratte 5	I	0,40	0,53	6,37	0,90	2,73	0,66	93,14	9,05	7,76	2,24	0,09	0,31
	II	0,37	0,49	6,57	0,93	2,94	0,58	100,09	10,50	8,03	2,40	0,09	0,29
Ratte 6	I	0,32	0,57	13,3	5,65	7,17	1,26	113,00	21,50	21,77	4,40	0,03	0,16
	II	0,42	0,56	10,2	2,96	8,62	0,72	72,60	30,28	16,45	5,36	0,04	0,13
Ratte 7	I	0,06	0,45	53,3	43,7	6,84	1,96	651,74	22,36	100,2	3,64	0,01	0,19
	II	0,07	0,46	43,9	37,6	7,70	1,91	529,63	24,17	85,25	3,97	0,01	0,17

In den meisten Fällen konnten die gemessenen Plasma- und Gewebekonzentration mathematisch gut beschrieben werden. Auch lagen die pharmakokinetischen Parameter für die Beschreibung der zeitlichen Änderung der Plasmakonzentrationen alleine oder für die Beschreibung der zeitlichen Änderung der Plasma- und Gewebekonzentration (vergleiche Tabelle 13 und 14) in vergleichbaren Größenordnungen. In dem verwendeten Zwei-Kompartiment-Modell wurde das zentrale Kompartiment durch den Blutkreislauf, das periphere Kompartiment durch die extrazelluläre Umgebung im Muskel repräsentiert.

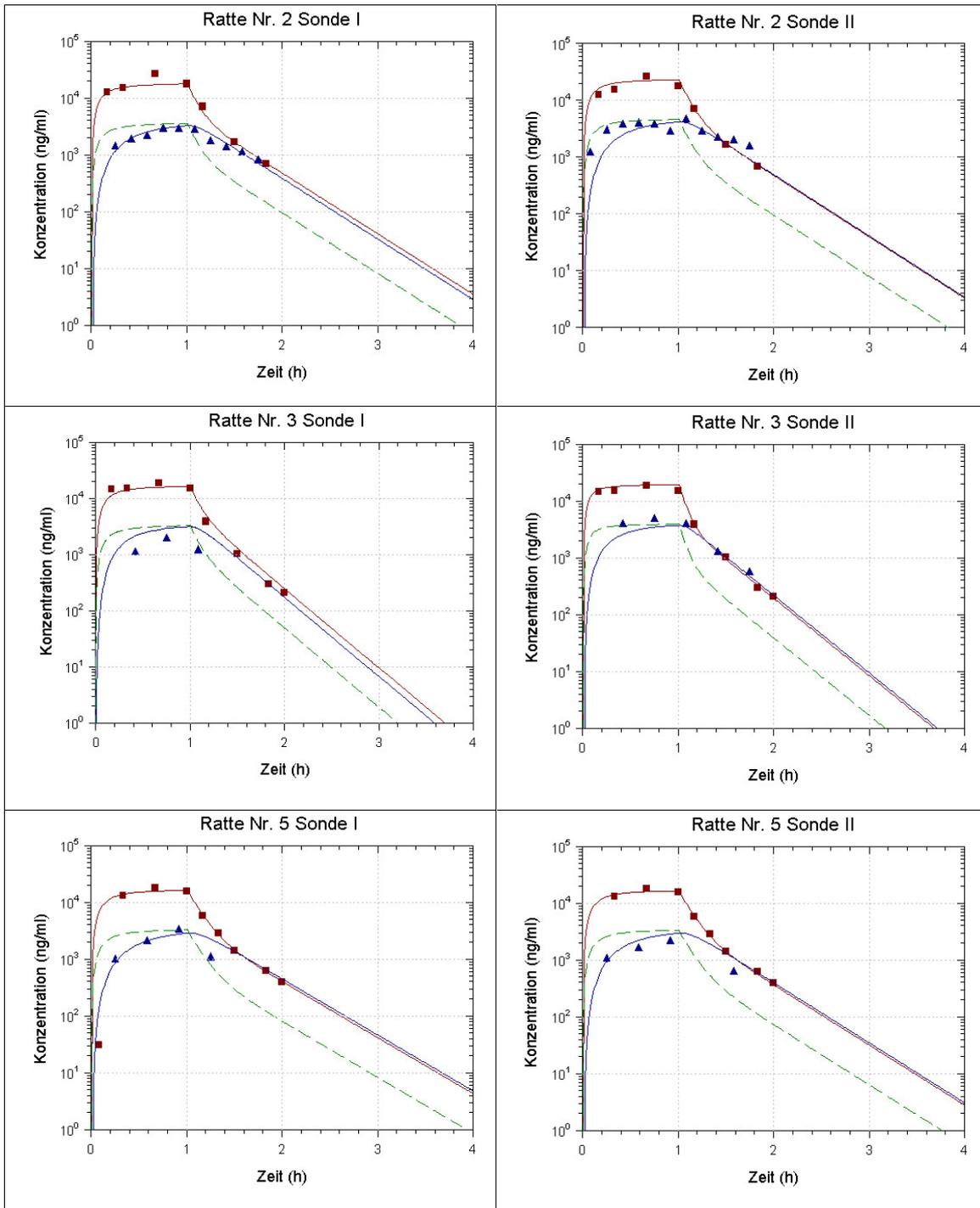


Abb. 34a: Plasma- und Gewebekonzentrations-Zeitverläufe / R(+)- α -Liponsäure / Fit / Infusion / Ratte
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten individuellen **R(+)- α -Liponsäure**-Konzentrations-Zeitverläufe in Rattenplasma und im Muskel nach einfacher Gabe von Dexlipotam (Trometamsalz der R(+)- α -Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) als Infusion über 1 h. Die rote Linie stellt die Gesamt-Plasmakonzentrationen (zentrales Kompartiment), die grüne gestrichelte Linie die errechneten freien Plasmakonzentrationen und die blaue Linie die freien Gewebekonzentrationen im Muskel (peripheres Kompartiment) dar.

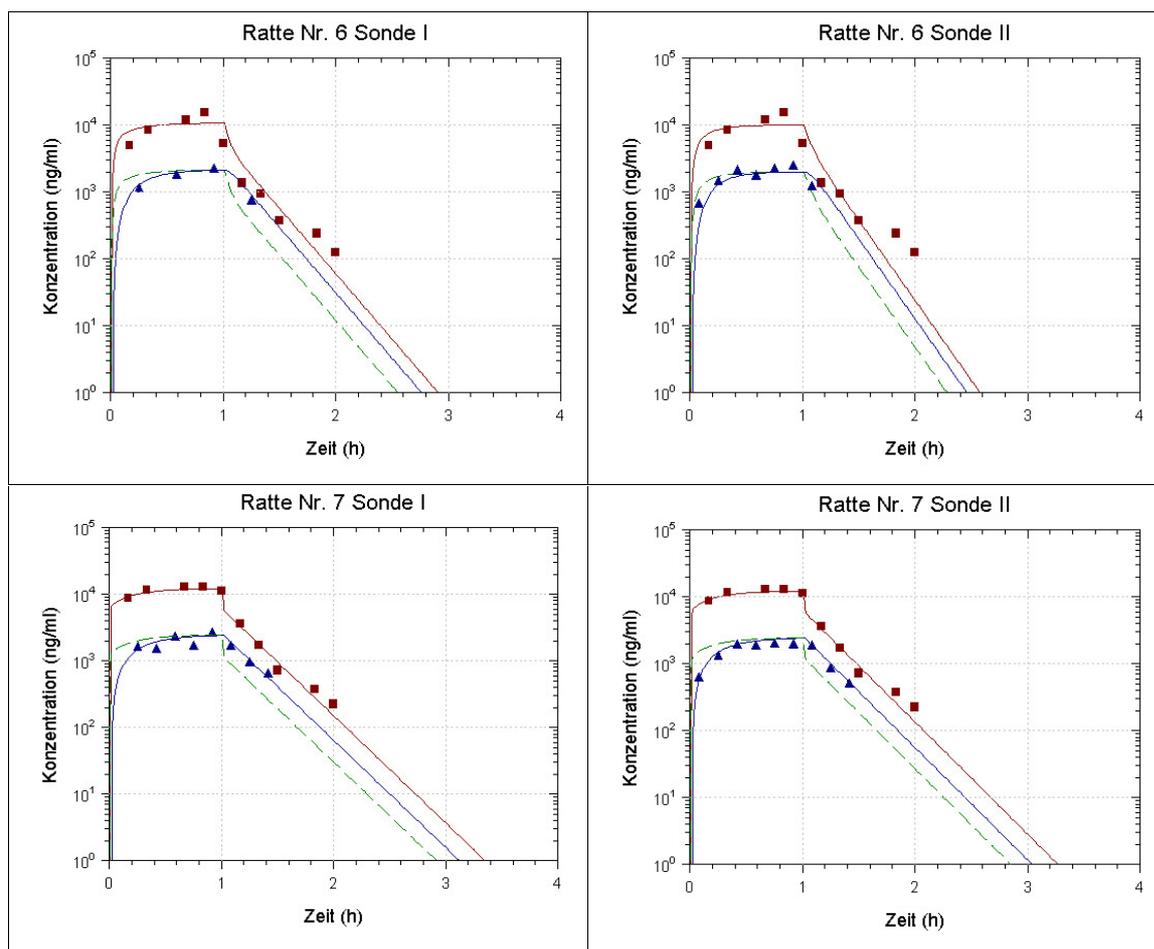


Abb. 34b: Plasma- und Gewebekonzentrations-Zeitverläufe / R(+)- α -Liponsäure / Fit / Infusion / Ratte
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten individuellen **R(+)- α -Liponsäure**-Konzentrations-Zeitverläufe in Rattenplasma und im Muskel nach einfacher Gabe von Dexlipotam (Trometamol Salz der R(+)- α -Liponsäure, nominale Dosis 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) als Infusion über 1 h. Die rote Linie stellt die Gesamt-Plasmakonzentrationen (zentrales Kompartiment), die grüne gestrichelte Linie die errechneten freien Plasmakonzentrationen und die blaue Linie die freien Gewebekonzentrationen im Muskel (peripheres Kompartiment) dar.

5.1.5 Bestimmung der intrazellulären R(+)- α -Liponsäure-Konzentration in Hepatozyten und im Zellüberstand

Falls der Wirkort von α -Liponsäure in dem Zellinneren wäre, gibt die extrazelluläre freie Arzneistoffkonzentration nur einen Hinweis, was von dort aus in die Zelle diffundiert oder transportiert werden kann. Die intrazelluläre Arzneistoffmenge aber könnte ein weiteres Kompartiment darstellen, welches mit der Dynamik der Substanz in Zusammenhang stehen könnte.

In einem in-vitro Experiment wurden Hepatozyten aus der Leber nüchternen Ratten entnommen und die Pyruvat-Decarboxylierung, die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes, die Produktion von Glukose zu Pyruvat und das Ausmaß der Fettsäureoxidation unter dem Einfluß von Dexlipotam (R(+)- α -Liponsäure) in einem Konzentrationsbereich von 0 – 200 nmol/ml über 3 h Inkubationszeit untersucht [Walgren et al, 2002].

In einem separaten Experiment ($n = 3$), das von Walgren und Buse an der Universität Charleston durchgeführt wurde, wurden Proben der Zellüberstände und des Zellmaterials gewonnen, um die Konzentration von R(+)- α -Liponsäure und der Metaboliten BNLA und TNLA zu bestimmen.

Die Zellen wurden mit dem Wirkstoff zu unterschiedlichen Konzentrationen und zu unterschiedlichen Zeiten inkubiert (siehe Kapitel 4.4.7). Das Zellmedium wurde entnommen und die Zellen mehrmals gewaschen. Nach den Waschvorgängen wurden die Zellen mit Lysepuffer aufgeschlossen und eingefroren. Die so erhaltene Zellfragmentsuspension und das Zellmedium wurden mit Acetonitril gefällt und in dem so gewonnenen Protein freien Überstand die Konzentrationen von TNLA, BNLA und R(+)- α -Liponsäure mit Hilfe der ECD-HPLC-Methode für Dialysate (Kapitel 4.4.3) bestimmt.

Im Anhang A.30 - A.32 sind die gemessenen Konzentrationen von R(+)- α -Liponsäure, TNLA und BNLA im Zellmedium zu unterschiedlichen Zeiten aufgelistet. Die gemessenen extrazelluläre R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen sind vergleichbar mit den theoretischen Inkubationskonzentrationen. Über die Zeit zeigte sich aber eine geringe Abnahme der R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen. Hingegen stiegen die TNLA und BNLA-Konzentrationen über die Zeit und in Abhängigkeit der eingesetzten Inkubationskonzentration an. In den meisten Zellmedien zeigte sich nach 0,5 h Inkubation mit R(+)- α -Liponsäure zu unterschiedlichen Konzentrationen die ersten meßbaren extrazellulären TNLA- und BNLA-Konzentrationen (A.31 und A.32 im Anhang). Die gemessenen Konzentrationen zeigen eine hohe Variabilität und lassen nur orientierende Rückschlüsse zu. Tendenziell liegen die extrazellulären BNLA-Konzentrationen höher als die TNLA-Konzentrationen.

Im Anhang A.33 – A.35 sind die gemessenen Konzentrationen von R(+)- α -Liponsäure, TNLA und BNLA im Inneren der Zellen aufgelistet. Die Konzentrationen sind im Anhang in der Einheit ng/mg Protein angegeben. Nach Inkubation über 0,5 – 3 h mit der einer Inkubationskonzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ R(+)- α -Liponsäure waren deutliche intrazelluläre Konzentrationen der Muttersubstanz und der Metaboliten meßbar, der Konzentrationsbereich lag bei 4 – 53 ng/mg. Es waren aber keine deutlichen Unterschiede in den gemessenen intrazellulären Konzentrationen in Abhängigkeit zur Inkubationszeit erkennbar. Höhere eingesetzte R(+)- α -Liponsäure-Konzentration im Zellmedium führten zu höheren intrazellulären Konzentrationen, der Anstieg der intrazellulären Konzentrationen war aber viel geringer ausgeprägt als durch die Erhöhung der eingesetzten Konzentration im Zellmedium zu erwarten gewesen wäre. Längere Inkubationszeiten führten zu keiner Kumulation der Muttersubstanz oder der Metaboliten.

Es zeigte sich, daß Hepatozyten in der Lage sind, R(+)- α -Liponsäure aufzunehmen und die Metaboliten TNLA und BNLA zu bilden. Die Zelle ist außerdem in der Lage, die gebildeten Metaboliten TNLA und BNLA aus dem Zellinneren heraus zu transportieren. Der intrazellulär gemessene Anteil beträgt aber nur $< 0,3 \%$ bezogen auf die eingesetzten extrazellulären Konzentration in diesem in-vitro Experiment.

5.2 Untersuchungsmodell Mensch

Auch im Untersuchungsmodell Mensch wurde nach Gabe von rac- α -Liponsäure die Wirkung auf den Pyruvat-Dehydrogenase-Enzymkomplex untersucht. Wie im Rattenmodell zeigten sich auch hier nach Substanzgabe nur sehr kurz meßbare Plasmaspiegel, die pharmakologische Wirkung war aber im Gegensatz dazu noch Tage nach Substanzgabe meßbar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, diese zeitliche Diskrepanz aufzuklären, und die beobachtete Substanzwirkung einer messbaren Konzentration des Wirkstoffes oder eines wirksamen Metaboliten in einer Körperflüssigkeit zuzuschreiben. Konzentrationen der Muttersubstanz und zwei ihrer Metaboliten konnten im Rattenmodell im Plasma, im Gewebe, im Zellüberstand und in Zellen bestimmt werden. Erste Metabolismusuntersuchungen nach Gabe von rac- α -Liponsäure in verschiedenen Spezies gaben den Hinweis, daß der Metabolismus in der Ratte qualitativ dem Menschen ähnlich ist [Schupke et al, 2001]. Ein Vergleich der Pharmakokinetik im Menschen und in der Ratte wurde noch nicht durchgeführt.

Der Begriff Plasmakonzentration beschreibt in diesem Kapitel die gesamte Konzentration eines Arzneistoffes oder dessen Metaboliten, die sowohl reversibel an Proteine gebunden als auch frei und ungebunden im Plasma gemessen wurden.

5.2.1 *Pharmakokinetik der α -Liponsäure und ihrer Metaboliten im Plasma und Urin nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure*

In der ersten klinischen Studie wurde α -Liponsäure als Razemat in Form einer Tablette verabreicht. Plasma und Urin wurden nach der oralen Gabe gesammelt und die Muttersubstanz und mehrere Metaboliten gemessen. Ausscheidungsuntersuchungen am Tier nach Gabe der radioaktiv markierten Substanz hatten ergeben, daß die renale Elimination die Hauptausscheidungsroute der Radioaktivität, also bestehend aus der radioaktiven Muttersubstanz und / oder radioaktiven Stoffwechselprodukte, darstellte [Schupke et al, 2001]. Mit der von Teichert und Mitarbeitern entwickelten HPLC-Methode konnten die Muttersubstanz α -Liponsäure und die Metaboliten 6,8-Bis(methylmercapto)octansäure (BMOA), 2,4-Bis(methylmercapto)butansäure (BMBA), 4,6-Bis(methylmercapto)hexansäure (BMHA), Tetranor-liponsäure (TNLA) und Bisnorliponsäure (BNLA) im Urin und im Plasma quantifiziert werden [Teichert und Preiß, 2000]. Die Proben dieser Studie wurden an der Universität Leipzig gemessen. Das verwendete Analysenverfahren erlaubte keine selektive Trennung der Enantiomere, somit stellen die gemessenen Konzentrationen im Urin und im Plasma die Summe aus R- und S-Form dar. Die Konzentrations-Zeitwerte wurden uns für die pharmakokinetische Auswertung zur Verfügung gestellt. Der genaue Studienablauf ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: Studiendesign zur Bestimmung der Pharmakokinetik der rac- α -Liponsäure / p.o. / Mensch
 Studiendesign zur Bestimmung der Plasma- und Urinkonzentration und der Pharmakokinetik von α -Liponsäure und den Metaboliten BMOA, BMBA, BMHA, BNLA, TNLA in männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure als Tablette.

Testsubstanz:	rac- α -Liponsäure			
Applikationsroute:	Oral			
Dosis (mg):	600 (bezogen auf rac- α -Liponsäure)			
Häufigkeit der Applikation:	Einfachgabe			
Formulierung:	rac- α -Liponsäure als Filmtablette je 300 mg (siehe Kapitel 4.3.2)			
Gesamtzahl der Probanden:	♂	6	♀	3
Probanden Nr.:	♂	21, 22, 24, 26, 38, 29	♀	23, 25, 27
Zeitpunkte für Blutentnahmen:	0 h vor Applikation, 10, 15, 20, 30, 40, 50 min, 1 h, 1 h 15 min, 1 h 30 min, 1 h 45 min, 2 h, 2 h 15 min, 2 h 30 min, 2 h 45 min, 3 h, 3 h 15 min, 3 h 30 min, 4 h, 4 h 30 min, 5 h, 6 h nach Applikation (akzeptierte Zeitabweichungen <2 h: \pm 1 min; 2-6 h: \pm 3 min) (siehe Kapitel 4.6.2.1)			
Sammelzeiten für Urin:	0 h vor Applikation, 0-1 h, 1-2 h, 2-3 h, 3-4 h, 4-6 h, 6-8 h, 8-12 h, 12-24 h nach Applikation (siehe Kapitel 4.6.2.1)			
Analytische Meßmethode:	Plasma: Kapitel 4.4.4 Urin: Kapitel 4.4.4			

Die individuellen Plasmakonzentrationen der Muttersubstanz und ihrer Metaboliten sind in Anhang B.1 für LA, B.2 für BMOA, B.3 für BMHA, B.4 für BMBA, B.5 für TNLA und B.6 für BNLA jeweils in den Einheiten nmol/ml und ng/ml aufgeführt.

In den nachstehenden Kurvendiagrammen (Abbildung 35) sind die gemessenen Plasmakonzentrationen der Muttersubstanz und ihrer Metaboliten als Median-Werte dargestellt.

Die zeitliche Abfolge der entstehenden Metaboliten stellte sich wie folgt dar: Zunächst erschien die Muttersubstanz α -Liponsäure im Plasma, zeitnah wurden die Metaboliten BMOA und TNLA gebildet, zeitlich versetzt bildete sich dann in sehr großen Mengen der Metabolit BMHA und später der Metabolit BMBA. Der Metabolit BNLA war nur in geringen Mengen zwischen 0,2 und 1 h nach oraler Gabe messbar. Damit ist der Zeitpunkt, bei dem die maximale BNLA-Konzentration erreicht wurde, vergleichbar mit dem der Metaboliten TNLA und BMOA.

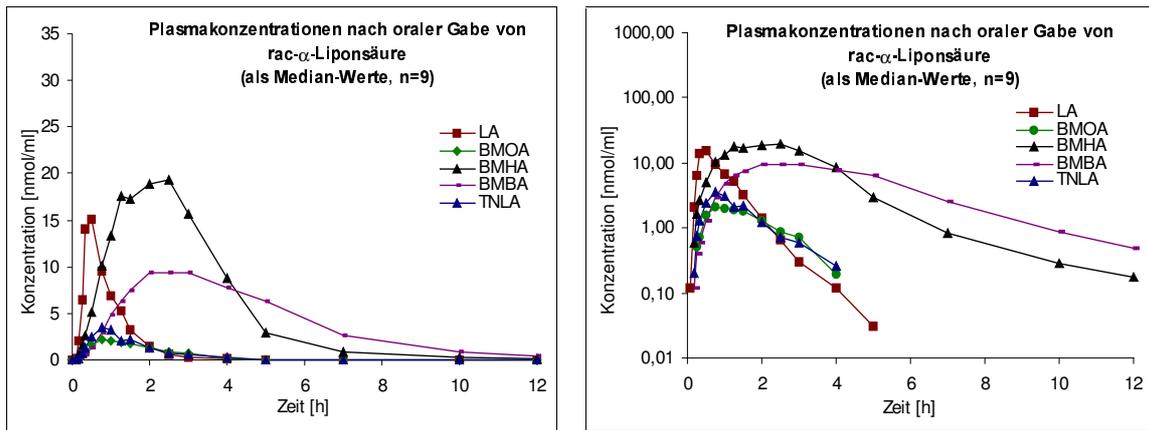


Abb. 35: Plasmakonzentrations-Zeitverlauf / LA, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA / p.o. / Mensch
 Linear (links) und semilogarithmische (rechts) Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der α -Liponsäure und ihrer Metaboliten als Mediane (LA, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA) nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (Dosis 600 mg).

In Anhang B.7 sind die gesammelten Urinvolumina, und in B.8 – B.12 die gemessenen Urinkonzentrationen der Muttersubstanz und der Metaboliten aufgelistet. Die berechneten individuellen kumulativen Urinausscheidungsmengen sind in B.13 – B.17 tabellarisch zusammengefaßt. In Abbildung 36 sind die kumulativen Urinausscheidungsmengen der Muttersubstanz und der Metaboliten als Median-Werte zusammen dargestellt.

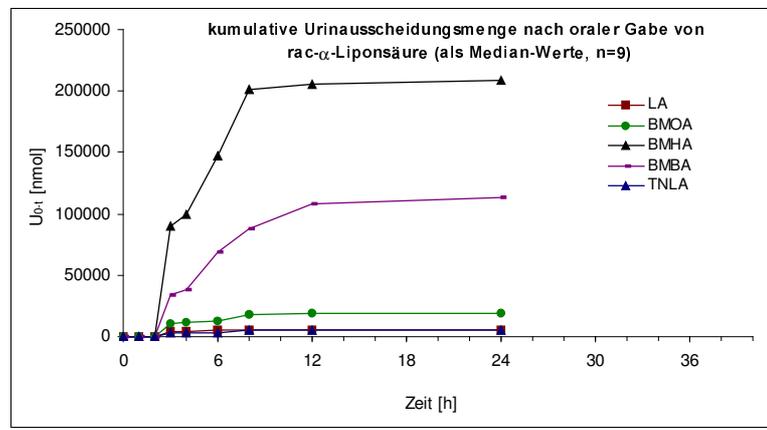


Abb. 36: Urinausscheidungsmengen-Zeitverlauf / LA, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA / p.o. / Mensch
 Lineare Darstellung der kumulativen Ausscheidungsmengen-Zeitverläufe der α -Liponsäure und ihrer Metaboliten als Mediane in Urin (LA, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA) nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (Dosis 600 mg).

Auch im Urin wurde der Metabolit BMHA in sehr großen Mengen gefunden, gefolgt von BMBA in geringeren Mengen, gefolgt von BMOA und der Muttersubstanz sowie TNLA in vergleichbarer Ausscheidungsmenge.

Nicht kompartmentelle Auswertung der Daten:

Die im Plasma gemessenen α -Liponsäure-Konzentrationen in der Einheit von ng/ml wurden zunächst nicht kompartmentell ausgewertet, die ermittelten Parameter sind in Tabelle 19 zusammengefaßt (graphische Darstellung: B.18 mit Einzelwerten in B.28). Die ermittelten Parameter zeigen mit der Literatur vergleichbare Werte [Hermann und Niebch, 1997]. Durch den Vergleich mit Daten aus einer klinischen Studie und die Ermittlung der AUC nach 600 mg rac- α -Liponsäure als intravenöse Gabe konnte die mittlere Bioverfügbarkeit und damit die Gesamtkörper-Clearance abgeschätzt werden. Im Vergleich dazu spielte die aus den Urindaten ermittelte renale Clearance der Muttersubstanz eine untergeordnete Rolle im Eliminationsprozeß. Die renale Clearance betrug weniger als 1 % bezogen auf die Gesamtkörper-Clearance.

Tab. 19: Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartmentelle Auswertung) / orale Gabe / Mensch
 Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartmentelle Auswertung, Kapitel 4.7.2) berechnet aus den individuellen Plasmakonzentrations-Zeitverläufen der α -Liponsäure bestimmt in männlichen und weiblichen Probanden nach einfacher oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (Dosis 600 mg).

Pharmakokinetische Parameter α -Liponsäure nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure							
Mittel _{geo} mit 95% CI _{in} (n=9)						Median mit Min - Max (n=9)	
C _{max} [ng/ml]	AUC [ng·h/ml]	U _{0-∞} [#] [mg]	CL [*] [ml/min·kg]	CL _R [#] [ml/min·kg]	MRT _{oral} [h]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]
3949 (3065–5087)	3098 (2513–3817)	1,107 (0,907 – 1,350)	9,26 (8,32 – 10,29)	0,08 (0,06 – 0,10)	0,97 (0,62 – 1,52)	0,50 (0,17 – 0,75)	0,58 (0,48 – 1,97)

* Die Bioverfügbarkeit wurde über die AUC, als Mittel_{geo} 13888 ng h/ml, nach intravenöser Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure errechnet und die Gesamtkörper-Clearance errechnet.

Die Parameter wurden mit Hilfe der α -Liponsäure-Ausscheidungsmenge im Urin errechnet.

Die im Plasma gemessenen Metaboliten-Konzentrationen wurden zusätzlich nicht kompartmentell ausgewertet (graphische Darstellung: B.19 - B.22 / Tabellen: B.29 – B.32 im Anhang). Um die ermittelten Konzentrationen und pharmakokinetischen Parameter besser zu vergleichen, wurden die Daten in der Einheit nmol/ml ausgewertet. Tabelle 20 faßt die Ergebnisse der Muttersubstanz und der Metaboliten zusammen. Die Metaboliten BMHA und BMBA waren in hohen Mengen im Plasma messbar, die ermittelte AUC lag deutlich über der AUC der Muttersubstanz. Die Metaboliten TNLA und BMOA kamen nur in sehr geringen Mengen vor. Der Metabolit BNLA wurde nicht pharmakokinetisch ausgewertet, da nur in einzelnen Probanden vereinzelt Konzentrationen über den Beobachtungszeitraum gemessen wurden (Anhang B.6).

Tab. 20: Pharmakokinetische Parameter (nicht kompart. Auswertung) / Plasma / orale Gabe / Mensch
 Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.2) berechnet aus den individuellen Plasmakonzentrations-Zeitverläufen der α -Liponsäure, **BMOA**, **BMHA**, **BMBA** und **TNLA** bestimmt in männlichen und weiblichen Probanden nach einfacher oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (Dosis 600 mg).

Substanz	Pharmakokinetische Parameter (Plasmakonzentration)			
	Mittel _{geo} mit 95% CI _{In} (n=12)		Median mit Min und Max (n=12)	
	C _{max} [nmol/ml]	AUC [nmol·h/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]
LA	19,1 (14,9 – 24,7)	15,1 (12,3 – 18,6)	0,50 (0,17 – 0,75)	0,58 (0,48 – 1,97)
BMOA	2,60 (1,82 – 3,71)	4,67 (3,27 – 6,68)	1,00 (0,50 – 1,25)	0,74 (0,63 – 1,11)
BMHA	21,1 (17,4 – 25,5)	67,2 (56,0 – 80,5)	2,00 (1,50 – 2,50)	2,03 (1,30 – 2,76)
BMBA	11,0 (9,09 – 13,3)	53,3 (45,6 – 62,2)	2,50 (1,50 – 4,00)	1,94 (1,43 – 2,77)
TNLA	4,78 (2,97 – 7,69)	6,35 (4,41 – 9,13)	0,75 (0,33 – 1,00)	0,72 (0,59 – 1,25)

Zusätzlich wurden die Urinkonzentrationen der Muttersubstanz und der messbaren Metaboliten basierend auf dem Sigma-minus-Plot- und der Urinausscheidungsgeschwindigkeits-Plot-Methode nicht kompartimentell ausgewertet (graphische Darstellung: B.23 – B.27 / Tabellen: B.33 – B.37 im Anhang). Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengefaßt.

Tab. 21: Pharmakokinetische Parameter (nicht kompart. Auswertung) / Urin / orale Gabe / Mensch
 Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.2) berechnet aus den individuellen Urinkonzentrationen der α -Liponsäure, **BMOA**, **BMHA**, **BMBA** und **TNLA** bestimmt in männlichen und weiblichen Probanden nach einfacher oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (Dosis 600 mg).

Substanz	Pharmakokinetische Parameter (Urinkonzentrationen)				
	Mittel _{geo} mit 95% CI _{In} (n=9)		Median mit Min und Max (n=9)		
	R _{max} [nmol/ml]	U _{0-∞} [nmol]	t _{mid, max} [h]	t _{1/2} ¹ [h]	t _{1/2} ² [h]
LA	3668 (2846 – 4728)	5364 (4397 – 6543)	2,50 (0,50 – 2,50)	0,76* (0,48 – 1,97)	0,85* (0,48 – 1,97)
BMOA	10943 (6824 – 17547)	19742 (13598 – 28662)	2,50 (1,50 – 2,50)	1,33* (0,68 – 1,90)	1,48** (0,76 – 1,99)
BMHA	85801 (58206 – 126476)	175622 (119264 – 258614)	2,50 (2,50 – 7,00)	1,62* (1,22 – 1,84)	1,83*** (1,18 – 2,70)
BMBA	34376 (27075 – 43647)	-	2,50 (1,50 – 4,00)	-	2,20 (1,69 – 2,83)
TNLA	3006 (2176 – 4153)	4374 (3092 – 6187)	0,75 (0,33 – 1,00)	1,20**	-

¹ Methode: Sigma-minus-Plot

² Methode: Uringeschwindigkeit

* n=5, ** n=6, ***n=7, + n=8, **n=3

Die Urinsammlung erstreckte sich nur über den Zeitraum von 24 h. Für die Anwendung der Sigma-minus-Plot-Methode (siehe Kapitel 4.7.2) ist es aber erforderlich, die Gesamtmenge des Analyten, die in den Urin ausgeschieden wurde, exakt zu kennen. Für den Metaboliten BMBA, der sehr spät in der zeitlichen Abfolge gebildet wurde, konnte die Gesamtmenge, die in den Urin ausgeschieden wurde, nicht bestimmt werden. Aus diesem Grund fand die Sigma-minus-Plot-Methode keine Anwendung. Außerdem konnte nur in einer geringen Anzahl der Probanden die terminalen Halbwertszeiten für beide angewandten Methoden mit geeigneter Fitgüte ($r^2 > 0,72$, siehe B.33 – B.37 und B.23 – B.27) bestimmt werden.

Dennoch zeigten die ermittelten terminalen Halbwertszeiten, sowohl basierend auf den Plasmapdaten als auch auf den Urindaten, sehr gute Übereinstimmung (Tabelle 20 und 21).

Die Gesamtmenge an renal ausgeschiedener Arzneistoffmenge nach oraler Gabe, die sich aus der im Urin gemessenen Muttersubstanz und den Metaboliten zusammensetzt, ist sehr gering, sie beträgt nur 12 % der applizierten Dosis.

Kompartimentelle Auswertung der Daten:

Abbildung 37 zeigt ein mögliches Schema, über welchen Weg α -Liponsäure metabolisiert werden könnte. Zum einen könnte sich erst die S-Methylierung ereignen und dann anschließend die β -Oxidation, oder aber es könnte sich zuerst eine einmalige β -Oxidation mit anschließender S-Methylierung oder eine zweimalige β -Oxidation mit anschließende S-Methylierung ereignen. Es sind also verschiedene Wege möglich.

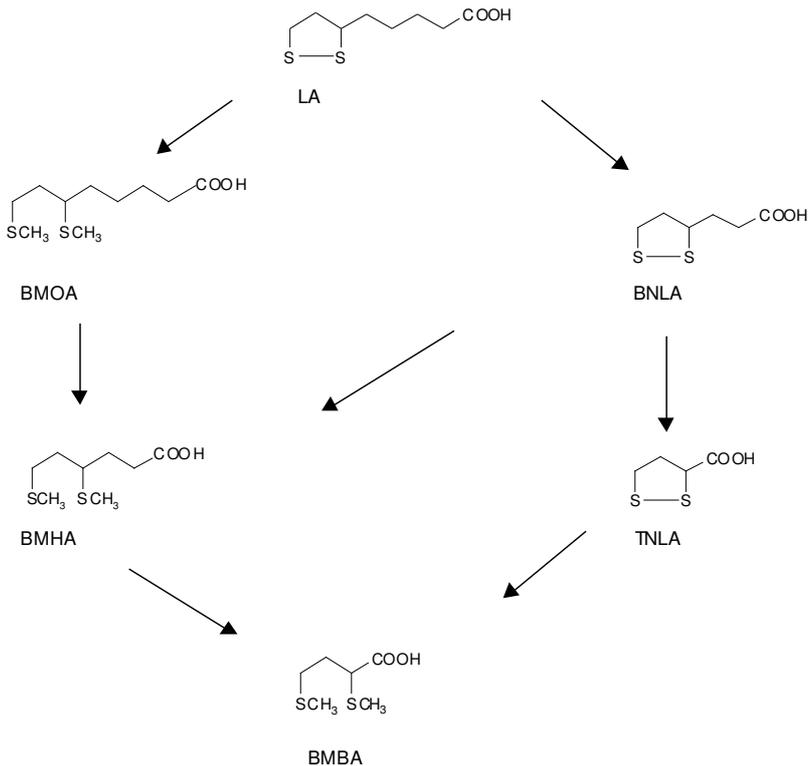


Abb. 37: Mögliches Metabolisierungsschema der α -Liponsäure im Menschen

Auf Grundlage des abgebildeten Metabolisierungsschemas wurde nun eine mathematische Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der Muttersubstanz und ihrer Metaboliten hergeleitet (Kapitel 4.7.1.2). Abbildung 38 zeigt die schon erläuterten Metabolisierungswege mit den jeweiligen Mikrokonstanten. Eine Ausnahme bildete der Metabolit TNLA. Für die Kurvenanpassung wurde angenommen, daß die Bildung dieses Metaboliten auch sofort aus der Muttersubstanz durch zweimaligen β -Oxidationsprozeß stattfinden kann. Es zeigte sich, daß BMOA, BNLA und TNLA im Plasma gleichzeitig meßbar waren ohne zeitliche Verzögerung. Somit mußten alle drei Metaboliten aus der Muttersubstanz gebildet werden. Der Bildungsweg des Metaboliten TNLA über die Bildung des Metaboliten BNLA, wie es in Abbildung 37 dargestellt ist, wurde als zusätzlicher Bildungsweg in der mathematischen Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe mit berücksichtigt, zeigte aber keine Relevanz, so daß das zugrundeliegende Model ohne die Konstante k_{78} (der Bildungsweg ist in gestrichelter Form in Abbildung 38 dargestellt) angewandt wurde.

Die gemessenen Urinkonzentrationen der Muttersubstanz und der Metaboliten wurde in diesem Modell nicht berücksichtigt, da die Urinausscheidung nur eine untergeordnete Rolle in der Gesamtausscheidung spielte und vermutlich nur einen geringen Einfluß auf die Plasmakonzentrationen ausübte.

Die Parameter, die zur Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe notwendig waren, sind in Tabelle 22 für jeden untersuchten Probanden zusammengefaßt. Die daraus errechneten Kurvenverläufe sind in den Abbildungen 39a und 39b dargestellt.

Um die kompartmentelle Auswertung zu vereinfachen, wurden alle Austrittskonstanten eines Kompartiments zu einer Mikrokonstanten (z.B. $k_{1x} = k_{18} + k_{10} + k_{13} + k_{17}$, ohne die Austrittskonstanten in ein peripheres Kompartiment) zusammengefaßt. Außerdem waren die Verteilungsvolumina der unterschiedlichen Metaboliten unbekannt. Aus dieser Notlage heraus wurde deshalb für die Kurvenanpassung das Verteilungsvolumen der Muttersubstanz für alle Metaboliten gleichgesetzt.

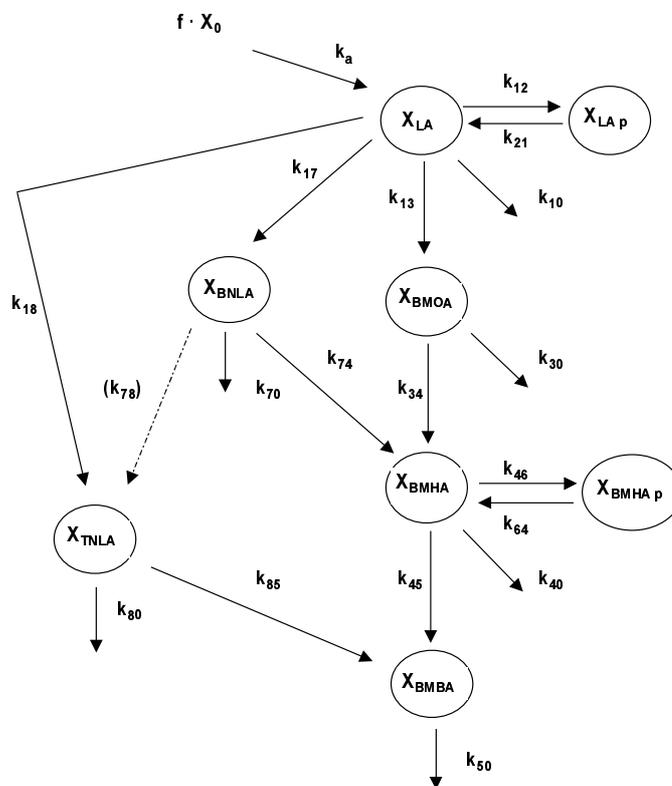


Abb. 38: Zwei-Kompartiment-Modell nach oraler Gabe und Ausscheidung in unveränderter Form und in Form von Metaboliten als Grundlage zur mathematischen Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe

Die in den meisten Fällen gute Kurvenanpassung an die gemessenen Konzentrationen der Muttersubstanz und der Metaboliten im Plasma beweist, daß das zugrunde gelegte Schema den Abbauweg der Muttersubstanz nach oraler Gabe beschreibt (siehe Abbildung 38 und Kapitel 4.7.1.2, Gleichungen 77 - 100).

Tab. 22: Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung) / Plasma / orale Gabe / Mensch
 Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.1.2) berechnet aus den individuellen Plasmakonzentrations-Zeitverläufen der verschiedenen Analyten (α -Liponsäure, BMOA, BMHA, BMBA, TNLA) nach einfacher oraler Gabe von rac- α -Liponsäure, Dosis 600 mg).

Kompartimentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter zur Beschreibung der Plasma-Konz.-Zeit-Kurve nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure										
Parameter	Subjekt Nr.									Mittel _{arith}
	21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST	
k_a [1/h]	13,940	2,044	2,038	14,916	7,769	11,679	4,968	7,018	50,102	12,719
k_{1X} [1/h]	3,612	12,857	3,366	5,076	3,193	2,852	2,761	2,496	3,255	4,385
k_{12} [1/h]	0,331	0,976	1,373	9,095	0,519	1,056	3,169	9,817	1,071	3,045
k_{13} [1/h]	0,927	1,004	1,151	1,357	1,038	1,679	1,031	1,152	0,729	1,119
k_{17} [1/h]	0,820	1,060	1,027	1,161	0,463	1,996	1,332	1,147	0,915	1,102
k_{18} [1/h]	1,353	0,558	1,264	1,307	1,962	2,095	1,352	1,378	4,426	1,744
k_{21} [1/h]	1,166	0,858	1,827	6,324	1,926	1,198	1,843	17,632	0,703	3,720
k_{3X} [1/h]	2,305	2,201	3,227	2,526	6,153	2,562	2,716	2,190	5,363	3,249
k_{34} [1/h]	2,649	1,949	3,459	2,109	1,680	1,474	2,130	2,900	2,034	2,265
k_{4X} [1/h]	0,789	1,178	1,148	1,048	0,632	1,093	1,084	0,879	0,786	0,960
k_{45} [1/h]	1,260	1,375	1,309	1,014	1,251	1,255	0,969	1,048	1,215	1,188
k_{46} [1/h]	0,797	1,325	1,754	1,103	1,108	0,913	1,042	1,180	1,252	1,164
k_{5X} [1/h]	1,800	2,253	2,523	3,513	2,053	2,471	2,518	4,090	1,478	2,522
k_{74} [1/h]	6,914	6,615	8,286	5,779	6,125	4,983	5,192	7,750	6,400	6,449
k_{7X} [1/h]	1,416	2,187	2,861	1,362	1,173	1,039	1,405	2,747	1,747	1,771
k_{64} [1/h]	4,160	2,732	3,518	1,919	4,976	2,458	2,837	3,574	8,275	3,828
k_{85} [1/h]	0,831	1,684	1,561	1,058	0,023	1,206	0,495	1,589	0,185	0,959
k_{8X} [1/h]	3,809	2,596	7,059	5,607	4,437	2,881	5,583	8,618	6,691	5,254
f	0,1796	0,2059	0,2700	0,2832	0,2628	0,1232	0,2360	0,2796	0,2316	0,230
X_1 [μ g]	543270	538418	479893	399672	109171	475792	317366	572573	600000	448462
X_2 [μ g]	56730	61582	120107	200328	490829	124208	282634	27427	0	151538
t_1 [h]	0,125	0,221	0,104	0,100	0,080	0,177	0,212	0,184	0,224	0,159
t_2 [h]	1,465	1,940	1,465	0,490	0,451	0,924	0,461	0,680	0	0,875
V_C [l]	13,927	3,377	14,000	8,963	14,182	17,985	16,891	20,060	14,845	13,803
V_{BMOA} [l]	13,927	3,377	14,000	8,960	14,182	17,985	16,891	20,060	14,845	13,803
V_{BMHA} [l]	13,927	3,377	14,000	8,960	14,182	17,985	16,891	20,060	14,845	13,803
V_{BMBA} [l]	13,927	3,377	14,000	8,960	14,182	17,985	16,891	20,060	14,845	13,803
V_{BNLA} [l]	13,927	3,377	14,000	8,960	14,182	17,985	16,891	20,060	14,845	13,803
V_{TNLA} [l]	13,927	3,377	14,000	8,960	14,182	17,985	16,891	20,060	14,845	13,803

Bemerkung: Die Bioverfügbarkeit wurde über die AUC, Mittel_{geo} 67,32 ng·h/ml, nach intravenöser Gabe von 600 rac- α -Liponsäure errechnet.

Die Distributionsvolumina der unterschiedlichen Metabolite wurde mit dem Verteilungsvolumen der Muttersubstanz gleichgesetzt.

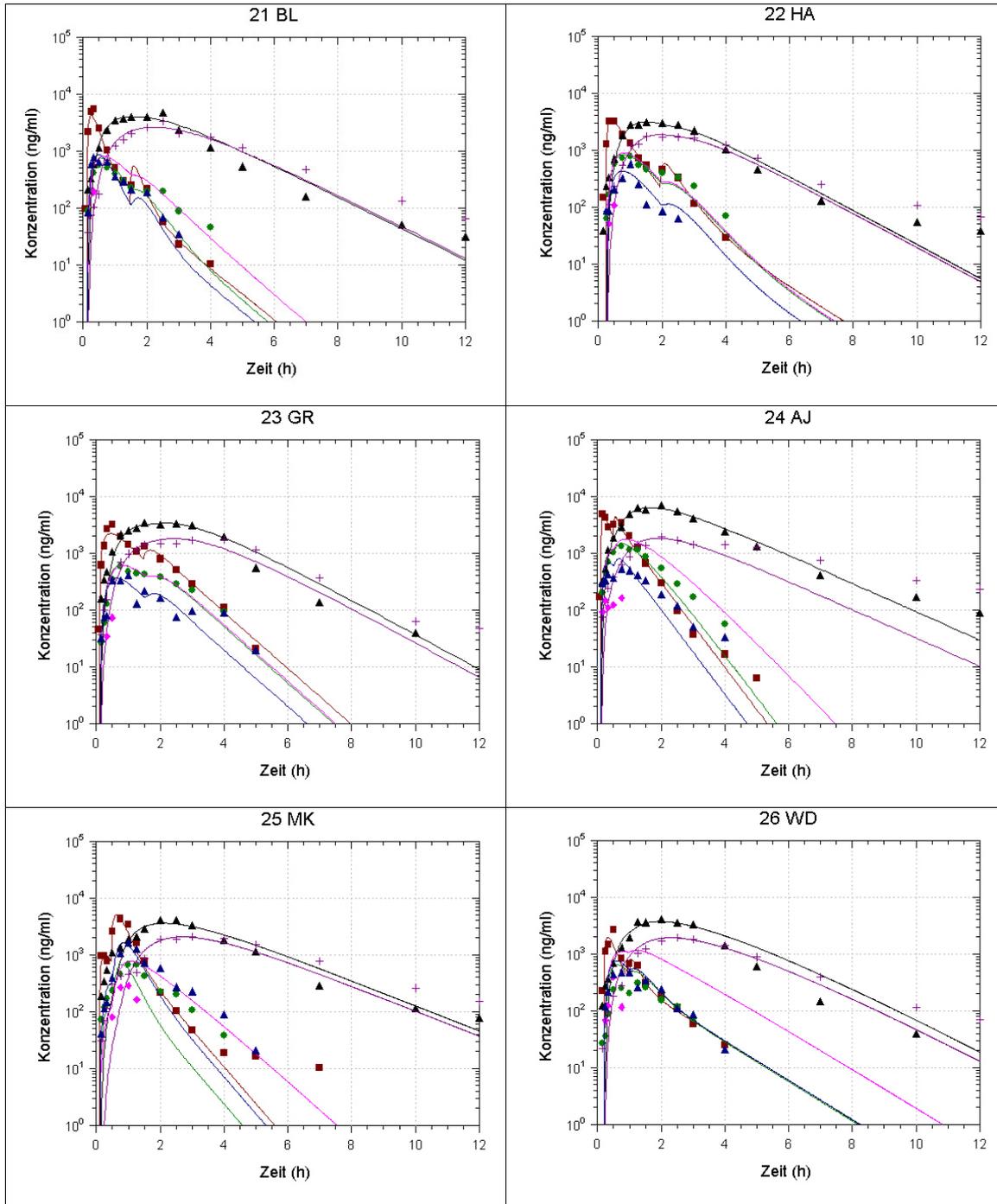


Abb. 39a: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / LA und Metaboliten / Fit / p.o. / Mensch
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten Konzentrations-Zeitverläufe der verschiedenen Analyten im Plasma der verschiedenen Analyten (LA, BMOA, BMHA, BMBA, BNLA, TNLA) nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure, Dosis 600 mg, Proband 21 BL, 22 HA, 23 GR, 24 AJ, 25 MK und 26 WD.

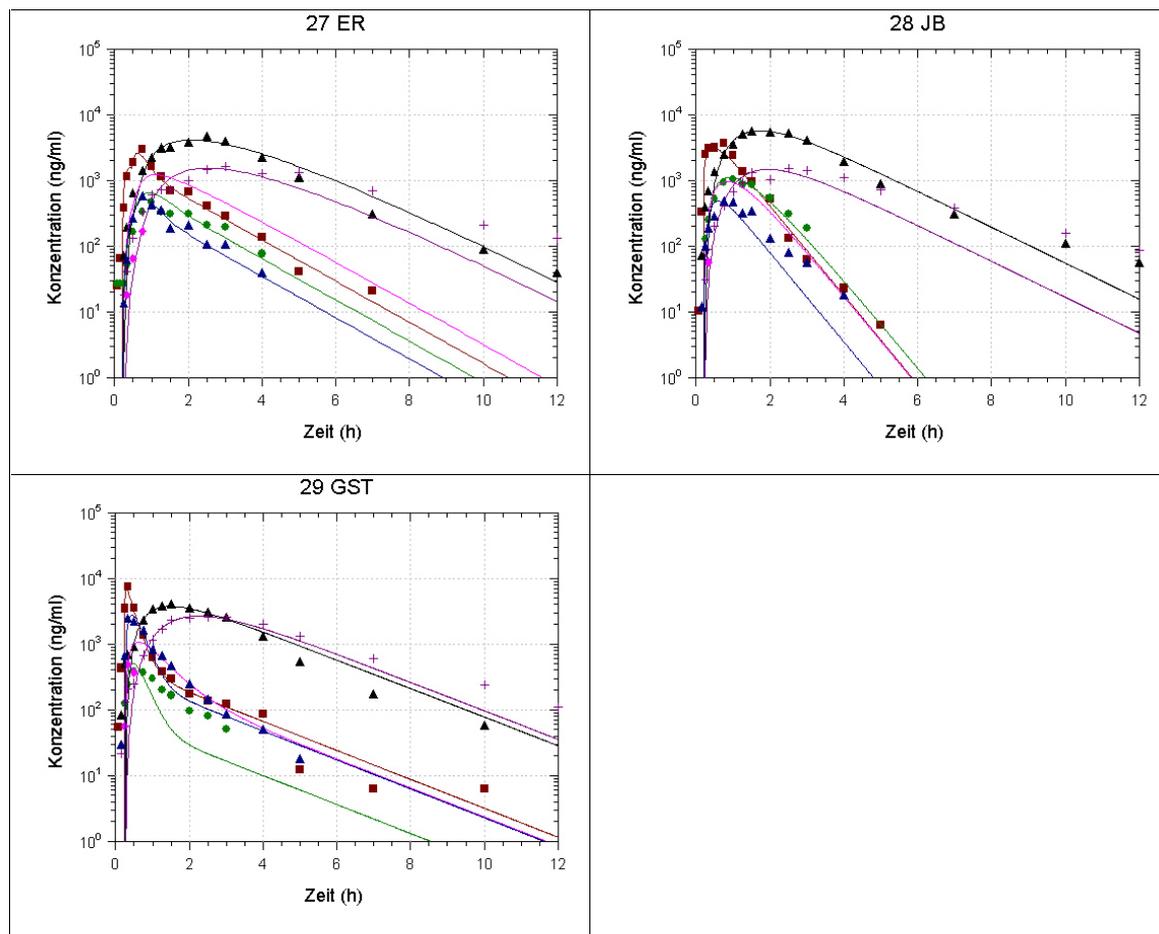


Abb. 39b: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / LA und Metaboliten / Fit / p.o. / Mensch
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten Konzentrations-Zeitverläufe der verschiedenen Analyten im Plasma (LA, BMOA, BMHA, BMBA, BNLA, TNLA) nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure, Dosis 600 mg, Proband 27 ER, 28 JB und 29 GST.

5.2.2 Pharmakokinetik der R(+)- α -Liponsäure im Plasma nach oraler Gabe von Dexlipotam

Die folgende Studie liefert Informationen, wie sich die Pharmakokinetik der α -Liponsäure im Menschen ändert, wenn nur R(+)- α -Liponsäure und nicht mehr eine 1 zu 1 Mischung aus R- und S-Enantiomer verabreicht wird. Mit der Möglichkeit die Metaboliten TNLA und BNLA im Plasma einzelner Probanden zu messen, konnte zusätzlich die Pharmakokinetik der Metaboliten nach Gabe von Dexlipotam bestimmt und mit der Pharmakokinetik nach Gabe von rac- α -Liponsäure verglichen werden.

Der Wirkstoff R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz wurde einmal täglich als Tablette gegeben. Mit der enantioselektiven HPLC-Methode (Kapitel 4.4.1) wurde R(+)- α -Liponsäure im Plasma quantifiziert, die S-Form wurde als interner Standard zugegeben. Dies war zulässig, weil die Konversion von der R- zur S-Form im Organismus ausgeschlossen werden konnte. Eine weitere nicht enantioselektive HPLC-Methode ermöglichte die Messung der Muttersubstanz und der Metaboliten TNLA und BNLA (Kapitel 4.4.5) im Plasma.

Weitere Informationen über das Studiendesign sind in Tabelle 23 zusammengefaßt.

Tab. 23: Studiendesign zur Bestimmung der Pharmakokinetik der R(+)- α -Liponsäure / p.o. / Mensch
Studiendesign zur Bestimmung der Plasmakonzentration und der Pharmakokinetik von R(+)- α -Liponsäure in männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure) als Tablette.

Testsubstanz:	Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure)			
Applikationsroute:	Oral			
Dosis (mg):	604,8 (bezogen auf R(+)- α -Liponsäure)			
Häufigkeit der Applikation:	Einfachgabe			
Formulierung:	R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz als Filmtablette je 302,4 mg (siehe Kapitel 4.3.2)			
Gesamtzahl der Probanden:	♂	12	♀	12
Probanden Nr.:	♂	1 - 12	♀	13 - 24
Zeitpunkte für Blutentnahmen:	0 h vor Applikation, 10, 15, 20, 30, 40, 50 min, 1 h, 1 h 15 min, 1 h 30 min, 1 h 45 min, 2 h, 2 h 15 min, 2 h 30 min, 2 h 45 min, 3 h, 3 h 15 min, 3 h 30 min, 4 h, 4 h 30 min, 5 h, 6 h nach Applikation (akzeptierte Zeitabweichungen <2 h: \pm 1 min; 2-6 h: \pm 3 min) (siehe Kapitel 4.6.2.1)			
Analytische Meßmethode:	Plasma: Kapitel 4.4.1 und 4.4.5			

Die individuellen Plasmakonzentrationen der Muttersubstanz sind im Anhang B.38 aufgeführt.

In den nachstehenden Kurvendiagrammen sind die gemessenen Plasmakonzentrationen für Männer und Frauen getrennt als Median-Werte dargestellt.

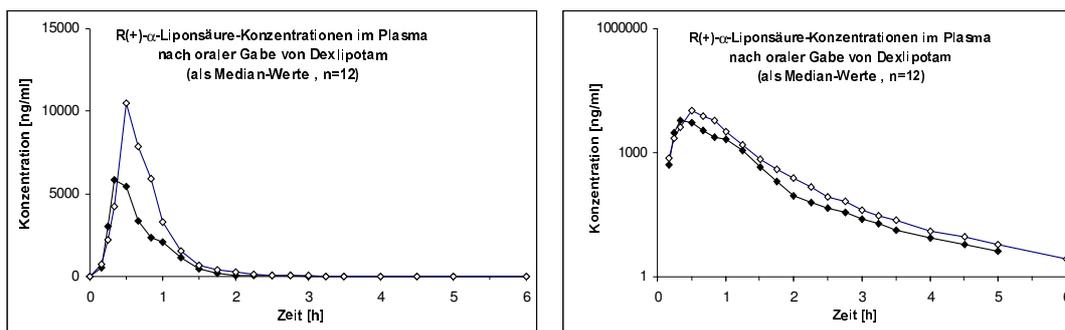


Abb. 40: Plasmakonzentrations-Zeitverlauf / R(+)- α -Liponsäure / orale Gabe als Tablette / Mensch
Lineare (links) und semilogarithmische (rechts) Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der **R(+)- α -Liponsäure** als Mediane nach oraler Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure). Die ausgefüllten Symbole stellen die männlichen Probanden, die nicht ausgefüllten Symbole die weiblichen Probanden dar.

In einer ausgewählten Anzahl an Probanden wurden mit Hilfe einer weiteren Analysenmethode (Kapitel 4.4.5) die R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen und zusätzlich die BNLA- und TNLA-Konzentrationen im Plasma bestimmt (Anhang B.42 – B.44).

Abbildung 41 zeigt die Konzentrations-Zeitverläufe der Muttersubstanz und ihrer Metaboliten als Median-Werte.

Die zeitliche Abfolge der entstehenden Metaboliten stellte sich wie folgt dar: Zunächst war die Muttersubstanz α -Liponsäure im Plasma meßbar, zeitnah gefolgt bildeten sich die Metaboliten BNLA und TNLA.

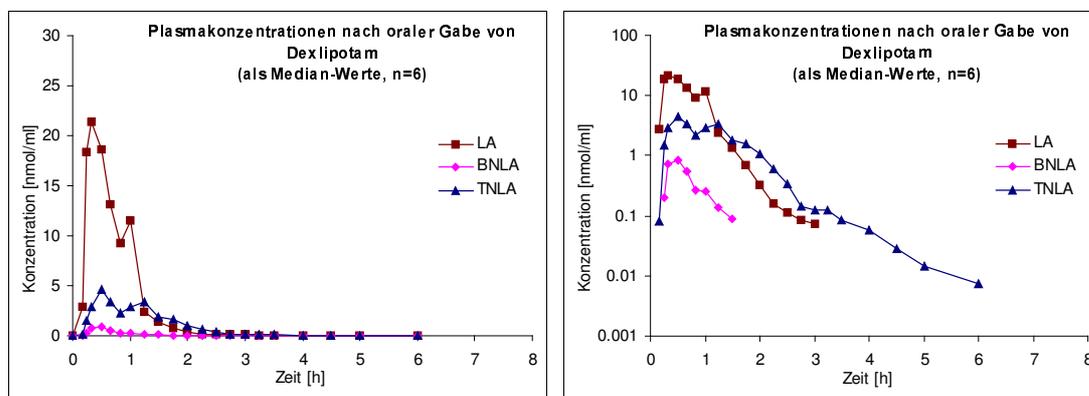


Abb. 41: Plasmakonzentrations-Zeitverlauf / LA, TNLA, BNLA / p.o. / Mensch
Lineare (links) und semilogarithmische (rechts) Darstellung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der **R(+)- α -Liponsäure** und ihrer Metaboliten (**LA**, **TNLA**, **BNLA**) als Mediane nach oraler Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure).

Nicht kompartmentelle Auswertung der Daten:

Die im Plasma gemessenen R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen wurden zunächst nicht kompartmentell ausgewertet, die ermittelten Parameter sind in Tabelle 24 zusammengefaßt (graphische Darstellung: B.45 mit Einzelwerten in B.48). Die ermittelte Halbwertszeit zeigte gute Übereinstimmung zu den nach Gabe von rac- α -Liponsäure ermittelten Halbwertszeiten für die R- und S-Form (siehe Tabelle 11, Kapitel 2.2.3) [Hermann und Niebch, 1997]. Die in dieser Arbeit veröffentlichten AUC und C_{max} -Werte wurden getrennt für die R- und die S- Form nach Gabe von 200 mg rac- α -Liponsäure bestimmt, d.h. nach Gabe von 100 mg R(+)- und 100 mg S(-)- α -Liponsäure. Es war auffällig, daß bei vergleichbarer Dosierung die Parameter AUC und C_{max} nach Gabe des Razemats (siehe Tabelle 19) deutlich niedriger lagen als die Parameter nach Gabe von der R-Form alleine.

Tab. 24: Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartmentelle Auswertung) / Plasma / p.o. / Mensch
 Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartmentelle Auswertung, Kapitel 4.7.2) berechnet aus den individuellen Plasmakonzentrations-Zeitverläufen der **R(+)- α -Liponsäure** bestimmt in männlichen und weiblichen Probanden nach einfacher oraler Gabe von Dexlipotam (Trometamol Salz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure)

	Pharmakokinetische Parameter (Plasmakonzentration)				
	Mittel _{geo} mit 95% CI _{ln}			Median mit Min und Max	
	C_{max} [ng/ml]	AUC [ng·h/ml]	MRT _{oral} [h]	$t_{1/2}$ [h]	t_{max} [h]
♂ (n=12)	7235 (5099 – 10267)	4690 (3956 - 5560)	0,76 (0,63 – 0,92)	0,83 (0,47 – 1,45)	0,50 (0,33 – 1,00)
♀ (n=12)	11357 (9161 - 14080)	7304 (6146 - 8680)	0,78 (0,66 – 0,91)	0,88 (0,52 – 1,24)	0,50 (0,33 – 0,83)
alle (n=12)	9065 (7331 - 11209)	5852 (5053 - 6778)	0,77 (0,69 – 0,86)	0,87 (0,47 – 1,45)	0,50 (0,33 – 1,00)

Die im Plasma gemessenen Metaboliten- und die Muttersubstanz-Konzentrationen einzelner Probanden aus dieser Studie wurden zusätzlich nicht kompartmentell ausgewertet (graphische Darstellung: B.45 - B.47 / Tabellen: B.48 – B.50 im Anhang). Um die ermittelten Konzentrationen und pharmakokinetischen Parameter besser zu vergleichen, wurden die Daten in der Einheit nmol/ml ausgewertet. Tabelle 25 faßt die Ergebnisse der Muttersubstanz und der Metaboliten zusammen.

Tab. 25: Pharmakokinetische Parameter (nicht kompart. Auswertung) / Plasma / orale Gabe / Mensch
 Pharmakokinetische Parameter (nicht kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.2) berechnet aus den individuellen Plasmakonzentrations-Zeitverläufen der α -Liponsäure, BNLA und TNLA bestimmt in männlichen und weiblichen Probanden nach einfacher oraler Gabe von Dexlipotam (Trometamolsalz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure).

Pharmakokinetische Parameter (Plasmakonzentration)				
Mittel _{geo} mit 95% CI _{ln} (n=6)		Median mit Min und Max (n=6)		
Substanz	C _{max} [nmol/ml]	AUC [nmol·h/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]
LA	32,45 (15,60 – 67,51)	19,85 (12,86 – 30,65)	0,33 (0,33 – 0,50)	0,40 (0,27 – 0,57)
BNLA	0,90 (0,31 – 2,58)	0,55 (0,27 – 1,15)	0,50 (0,33 – 1,25)	0,23 (0,10 – 0,53)
TNLA	5,33 (2,65 – 10,72)	5,15 (2,64 – 10,05)	0,58 (0,50 – 1,25)	0,65 (0,37 – 0,98)

Kompartimentelle Auswertung der Daten:

Der Konzentrations-Zeitverlauf der R(+)- α -Liponsäure konnte durch mathematische Gleichungen (Kapitel 4.7.1.2, Gleichung 58) basierend auf einem Zwei-Kompartiment-Modell nach oraler Gabe gut beschrieben werden. Für die Kalkulationen wurde die absolute Bioverfügbarkeit auf 0,5 gesetzt, da noch keine Studie zur Bestimmung dieser durchgeführt wurde. In Tabelle 26 sind die Parameter für jeden untersuchten Probanden zusammengefaßt. Die Abbildungen 42a - d zeigen die jeweilige Kurvenanpassung.

ERGEBNISSE

Tab. 26: Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung) / Plasma / orale Gabe / Mensch
 Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.1.2) berechnet aus den individuellen R(+)- α -Liponsäure-Plasma-Gesamtkonzentrationen nach einfacher oraler Gabe von Dexlipotam (Trometamol Salz der R(+)- α -Liponsäure, Dosis 604,8 mg).

Kompartimentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter zur Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve nach oraler Gabe von 604,8 mg Dexlipotam (Dosis bezogen auf die freie Säure)													
Subjekt Nr. (männlich)													
Parameter	1 MPI	2 LJ	03 BR	04 NP	05 CV	06 FMT	07 BJ	08 SL	09 AM	10 KRA	11 PA	12 FC	Mittel _{arith}
k _a [1/h]	20,495	6,525	3,513	7,604	7,689	10,257	10,669	19,321	11,138	14,546	12,211	21,752	12,143
k ₁₀ [1/h]	5,767	3,068	3,060	4,319	4,431	4,472	2,267	5,062	5,381	4,363	5,729	3,943	4,322
k ₁₂ [1/h]	1,863	0,094	0,043	0,086	1,050	0,151	0,028	0,171	0,527	0,097	0,199	0,088	0,366
k ₂₁ [1/h]	0,900	1,086	0,575	0,607	1,727	0,871	0,504	1,020	1,020	0,728	1,193	0,795	0,919
f	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
X ₁ [µg]	490786	346429	244834	528936	72484	400327	172025	303836	317960	263372	373700	454136	330735
X ₂ [µg]	114014	258371	359966	75864	532316	204473	140764	300964	286840	341428	231100	150664	274065
X ₃ [µg]	-	-	-	-	-	-	292011	-	-	-	-	-	-
X ₄ [µg]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
t ₁ [h]	0,234	0,212	0,136	0,219	0,209	0,229	0,190	0,124	0,209	0,229	0,228	0,227	0,204
t ₂ [h]	0,990	0,847	0,902	0,863	0,488	0,529	0,603	0,320	0,323	0,489	0,468	0,974	0,650
t ₃ [h]	-	-	-	-	-	-	0,804	-	-	-	-	-	-
t ₄ [h]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V _c [l]	12,293	25,093	31,074	20,165	15,475	13,853	31,425	9,543	8,043	12,199	14,829	23,527	18,127
α [1/h]	7,870	3,209	3,114	4,419	5,914	4,657	2,304	5,274	6,016	4,479	5,978	4,052	4,774
β [1/h]	0,659	1,038	0,565	0,594	1,294	0,836	0,496	0,979	0,912	0,709	1,144	0,774	0,833
t _{1/2 (α)} [h]	0,088	0,216	0,223	0,157	0,117	0,149	0,301	0,131	0,115	0,155	0,116	0,171	0,162
t _{1/2 (β)} [h]	1,051	0,668	1,227	1,168	0,536	0,829	1,396	0,708	0,760	0,977	0,606	0,896	0,902
Subjekt Nr. (weiblich)													
Parameter	13 SK	14 BA	15 LP	16 FS	17 BIU	18 GHK	19 MMI	20 RP	21 FSA	22 CCL	23 FG	24 KUT	Mittel _{arith}
k _a [1/h]	2,895	6,879	14,734	12,774	13,667	7,476	9,641	12,946	14,191	12,212	17,315	19,546	12,023
k ₁₀ [1/h]	2,158	5,099	3,006	2,724	4,529	4,426	3,289	4,891	3,860	4,458	3,806	3,020	3,772
k ₁₂ [1/h]	0,025	0,195	0,078	0,051	0,119	0,160	0,139	0,227	0,069	0,239	0,081	0,085	0,122
k ₂₁ [1/h]	0,596	1,182	0,849	1,013	1,014	0,757	1,028	1,337	0,694	0,841	1,166	0,676	0,929
f	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500
X ₁ [µg]	604800	97492	218122	235287	64790	99211	139068	604800	517505	360398	118696	137548	266476
X ₂ [µg]	-	457551	386678	369513	260429	502817	441378	-	87295	244402	280318	467252	338324
X ₃ [µg]	-	49757	-	-	131750	2772	15725	-	-	-	198034	-	-
X ₄ [µg]	-	-	-	-	147830	-	8629	-	-	-	7753	-	-
t ₁ [h]	0,157	0,213	0,208	0,209	0,204	0,132	0,145	0,147	0,201	0,147	0,323	0,190	0,190
t ₂ [h]	-	0,448	0,471	0,471	0,451	0,311	0,382	-	0,745	0,362	0,690	0,406	0,474
t ₃ [h]	-	1,700	-	-	0,961	1,740	2,440	-	-	-	0,990	-	-
t ₄ [h]	-	-	-	-	1,489	-	2,873	-	-	-	2,012	-	-
V _c [l]	31,566	9,002	15,025	20,160	9,545	10,230	17,229	13,737	19,347	8,139	8,800	14,927	14,809
α [1/h]	2,192	5,349	3,114	2,804	4,680	4,617	3,486	5,196	3,944	4,749	3,920	3,128	3,932
β [1/h]	0,587	1,126	0,820	0,984	0,981	0,726	0,970	1,259	0,679	0,790	1,132	0,653	0,892
t _{1/2 (α)} [h]	0,316	0,130	0,223	0,247	0,148	0,150	0,199	0,133	0,176	0,146	0,177	0,222	0,189
t _{1/2 (β)} [h]	1,180	0,615	0,846	0,704	0,706	0,955	0,715	0,551	1,021	0,878	0,613	1,061	0,820

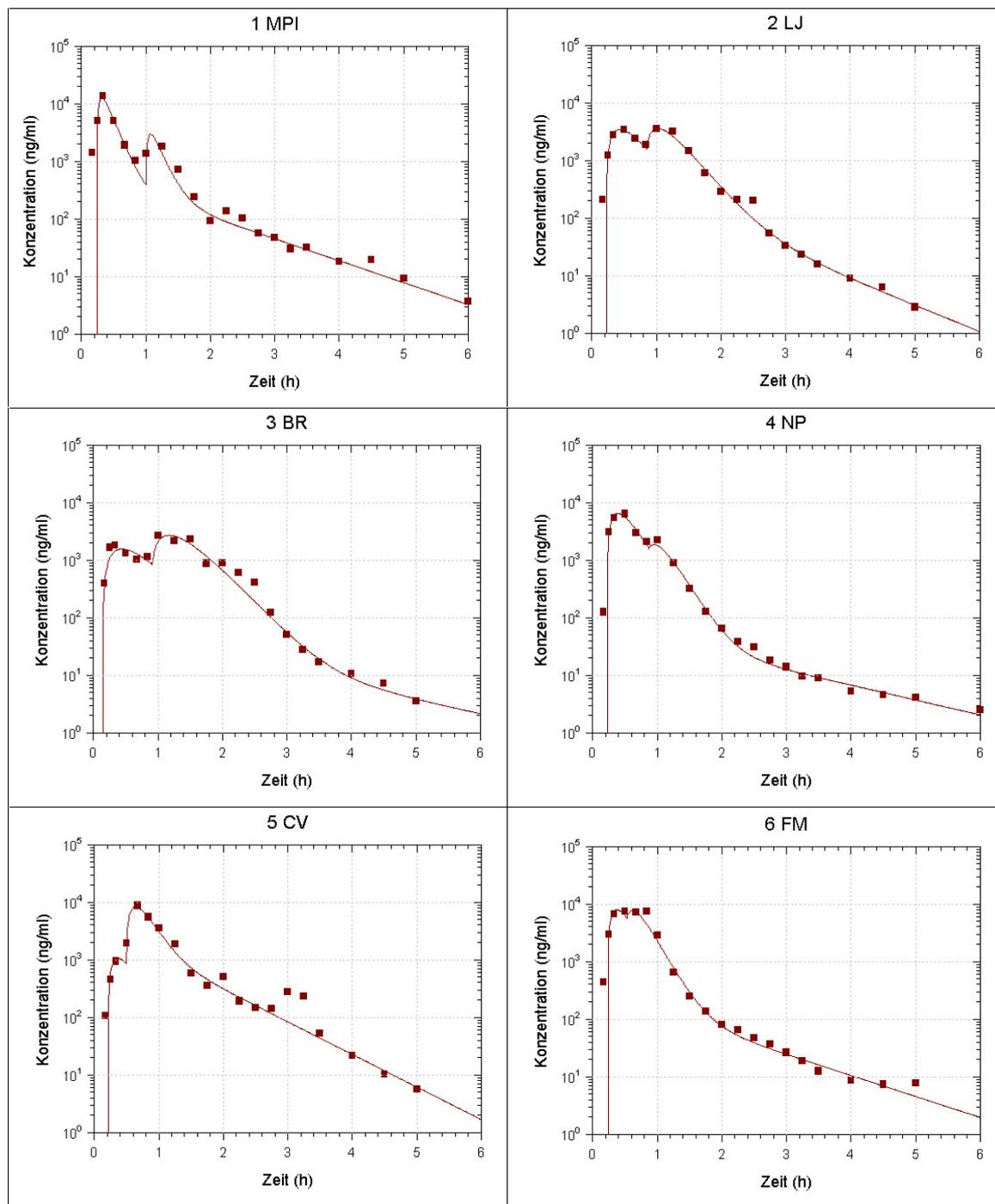


Abb. 42a: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / LA / Fit / p.o. / Mensch / männliche
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der R(+)- α -Liponsäure (LA) nach oraler Gabe von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure (Proband Nr. 1 – 6).

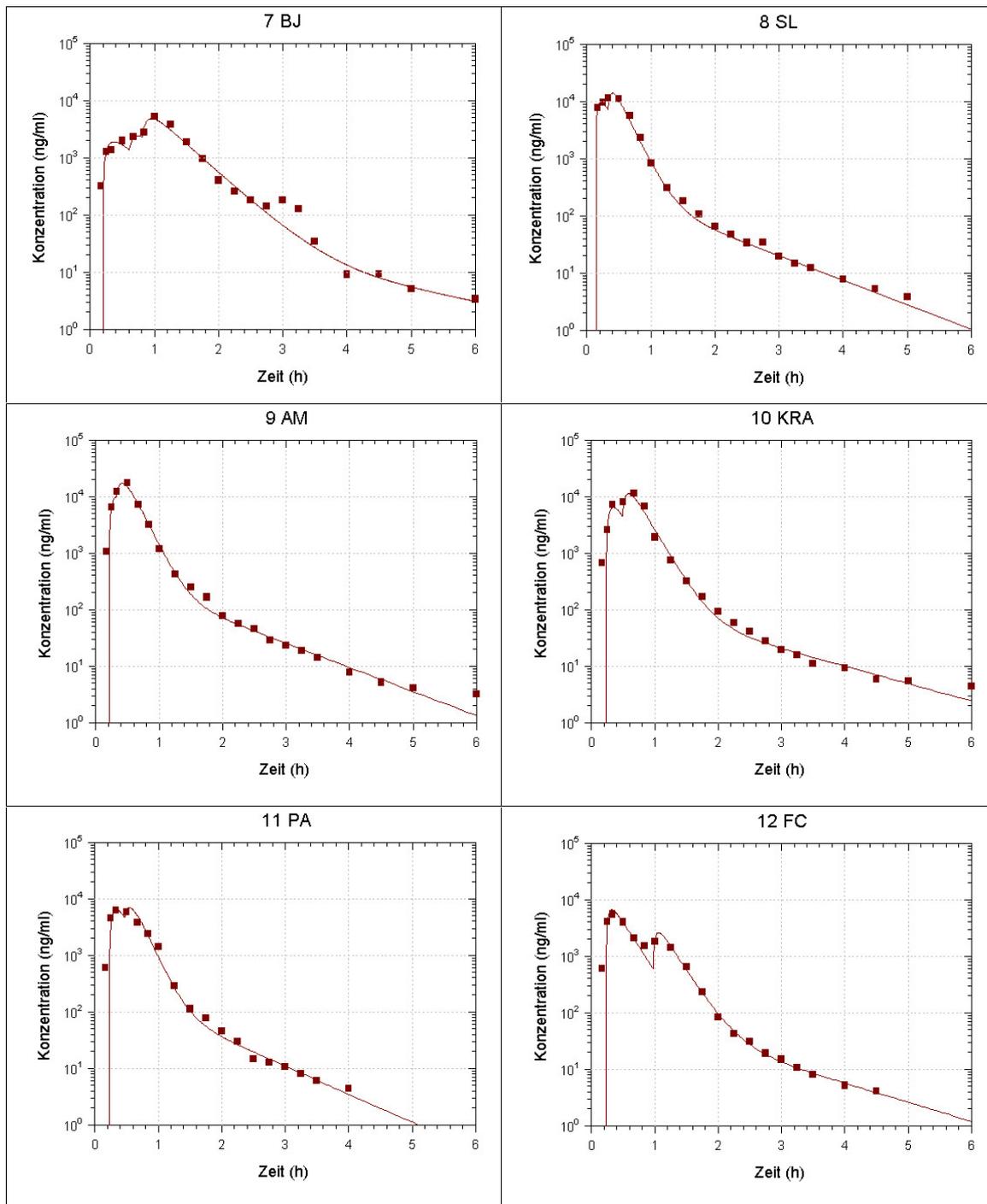


Abb. 42b: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / LA / Fit / p.o. / Mensch / männliche
 Semilogarithmische Darstellung der gefetteten Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der R(+)- α -Liponsäure (LA) nach oraler Gabe von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure (Proband Nr. 7 – 12).

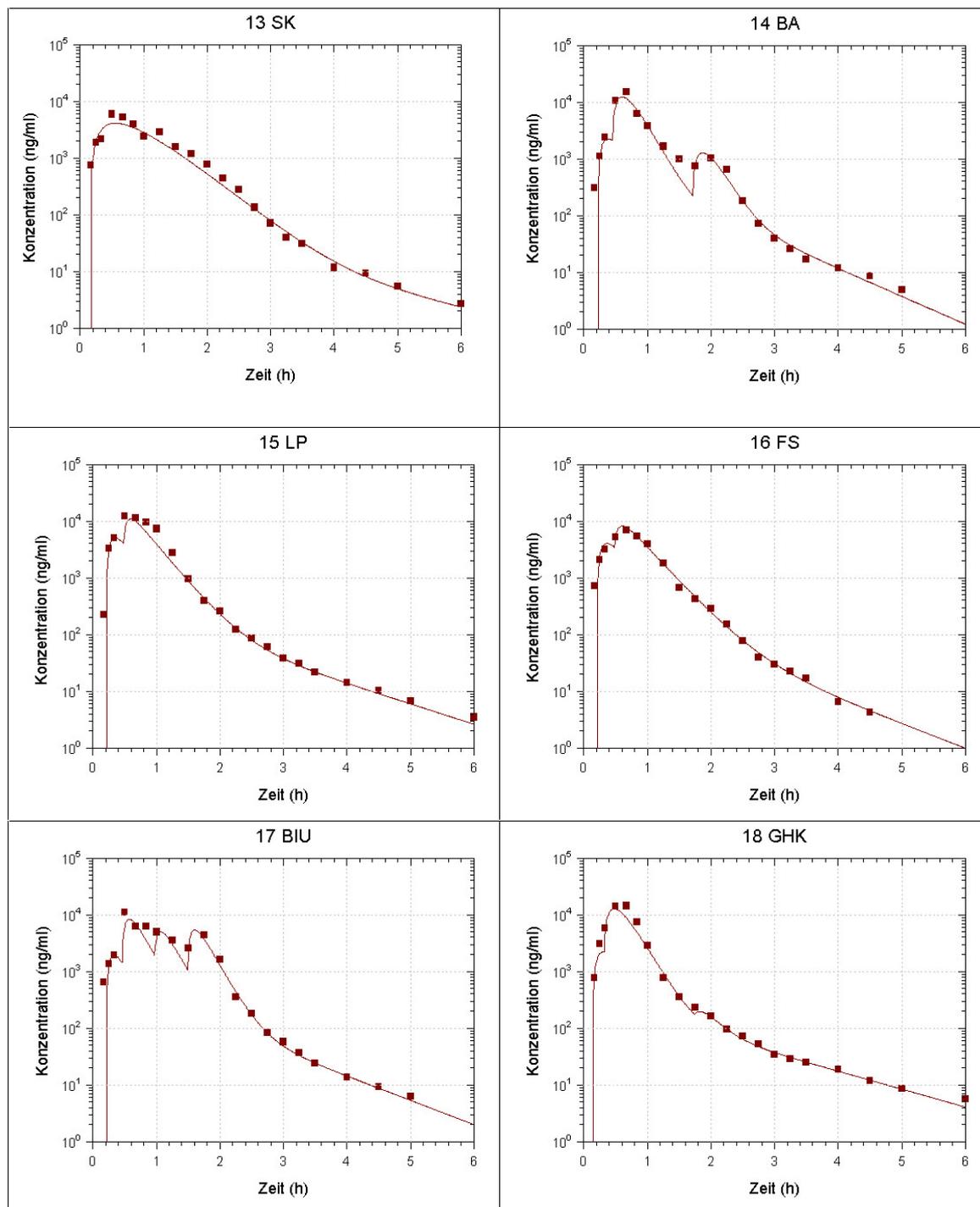


Abb. 42c: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / LA / Fit / p.o. / Mensch / weiblich

Semilogarithmische Darstellung der gefitteten Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der R(+)-α-Liponsäure (LA) nach oraler Gabe von R(+)-α-Liponsäure als Trometamolsalz, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure(Proband Nr. 13 – 18).

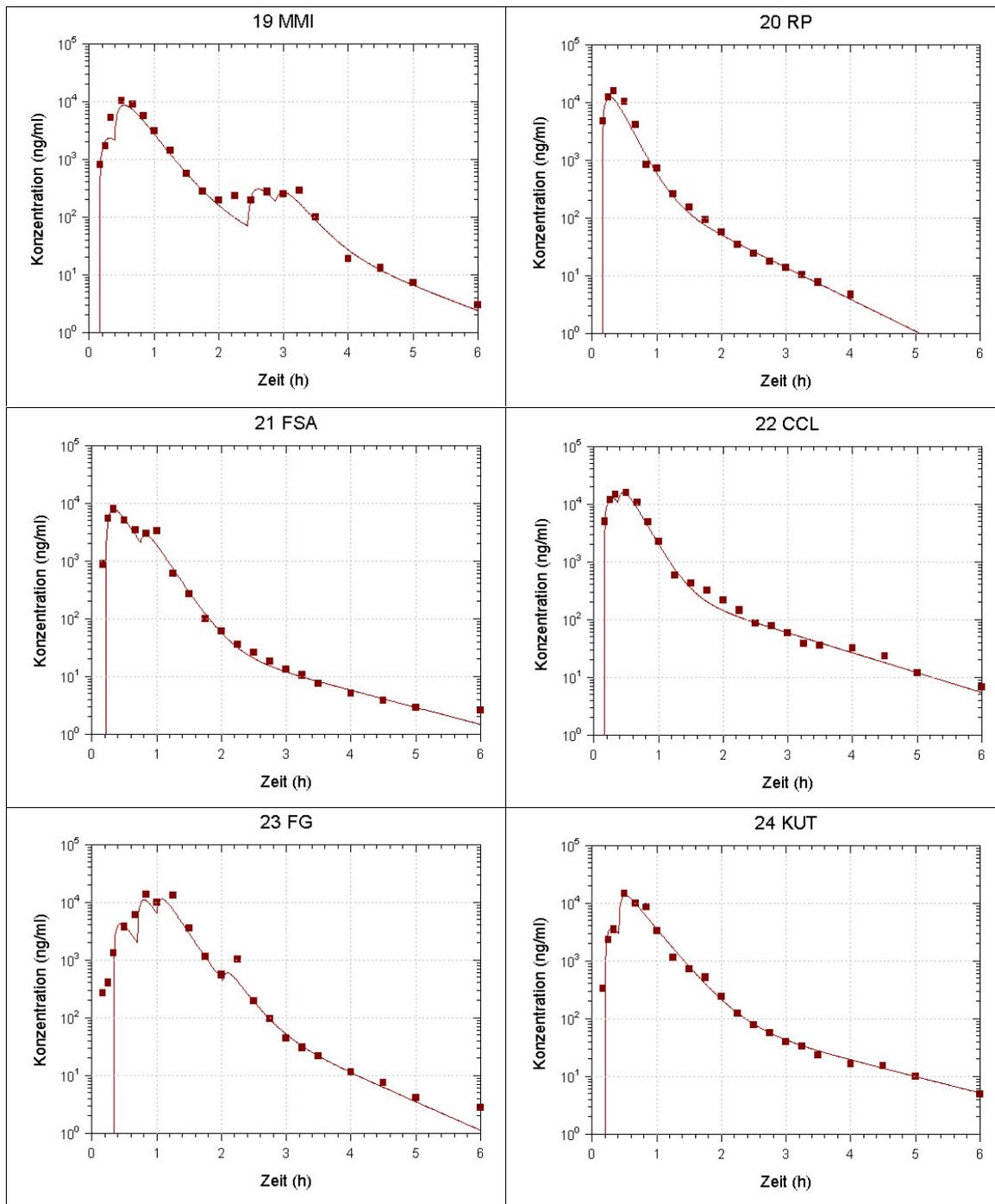


Abb. 42d: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / LA / Fit / p.o. / Mensch / weiblich
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der R(+)- α -Liponsäure (LA) nach oraler Gabe von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure (Proband Nr. 19 – 24).

Abbildung 37 (Kapitel 4.7.1.2) zeigt ein Schema, in welcher Art und Weise α -Liponsäure metabolisiert werden könnte.

In der beschriebenen Studie wurden nur die zwei Metaboliten BNLA und TNLA quantifiziert. Diese Metaboliten verfügen wie auch die Muttersubstanz über den intakten Dithiolan-Ring, der vermutlich für die Wirkung im Organismus notwendig ist. Auch hier wurde der Bildungsweg (als gestrichelte Linie dargestellt) des Metaboliten TNLA über die Bildung des Metaboliten BNLA, wie in Abbildung 43 dargestellt ist, außer Acht gelassen, da dieser Parameter keine Relevanz für die Kurvenanpassung zeigte.

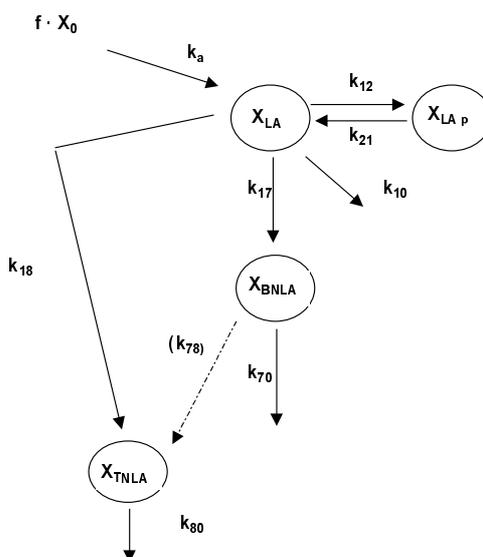


Abb. 43: Zwei-Kompartiment-Modell nach oraler Gabe und Ausscheidung in unveränderter Form und in Form von Metaboliten als Grundlage zur mathematischen Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe

Auf Grundlage des in Abbildung 43 dargestellten Zwei-Kompartiment-Modells wurde eine mathematische Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der Muttersubstanz und ihrer Metaboliten hergeleitet (Kapitel 4.7.1.2).

Die Parameter zur Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe sind in Tabelle 27 für jeden untersuchten Probanden zusammengefaßt. Die daraus errechneten Kurvenverläufe sind in den Abbildung 44 dargestellt.

Die gute Kurvenanpassung an die gemessenen Konzentrationen der Muttersubstanz und der Metaboliten im Plasma zeigt, daß das zugrunde gelegte Schema den Abbauweg der Muttersubstanz nach oraler Gabe beschreibt (siehe Abbildung 44).

Tab. 27: Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung) / Plasma / orale Gabe / Mensch
 Pharmakokinetische Parameter (kompartimentelle Auswertung, Kapitel 4.7.1.2) berechnet aus den individuellen Plasmakonzentrationen der verschiedenen Analyten (R(+)- α -Liponsäure, BNLA, TNLA) nach oraler Gabe von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure.

Kompartimentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter zur Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve nach oraler Gabe von 604,8 mg Dexlipotam (Dosis bezogen auf die freie Säure)							
Parameter	Subjekt Nr.						Mittel _{arith}
	männlich			weiblich			
	2 LJ	11 PA	12 FA	18 GHK	20 RP	21 FSA	
k_a [1/h]	6.525	12.211	21.752	7.476	12.946	14.191	12.517
k_{10} [1/h]	2.794	5.812	3.237	4.200	7.367	3.405	4.469
k_{12} [1/h]	0.094	0.199	0.088	0.160	2.957	0.048	0.591
k_{17} [1/h]	0.096	0.584	0.689	0.230	0.268	0.363	0.371
k_{18} [1/h]	0.474	0.451	0.596	0.722	1.007	0.137	0.565
k_{21} [1/h]	1.086	1.193	0.795	0.757	2.654	0.487	1.162
k_{70} [1/h]	16.557	14.779	37.331	6.690	6.222	16.414	16.332
k_{80} [1/h]	2.549	3.048	2.450	3.221	3.773	2.247	2.881
f	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
X_1 [μ g]	346429	373700	454136	99211	604800	517505	399297
X_2 [μ g]	258371	231100	150664	502817	-	87295	205503
X_3 [μ g]	-	-	-	2772	-	-	-
X_4 [μ g]	-	-	-	-	-	-	-
t_1 [h]	0.212	0.228	0.227	0.132	0.147	0.201	0.191
t_2 [h]	0.847	0.468	0.974	0.311	-	0.745	0.669
t_3 [h]	-	-	-	1.740	-	-	1.740
t_4 [h]	-	-	-	-	-	-	-
V_c [l]	25.093	14.829	23.527	10.230	15.418	19.347	18.074
V_{BNLA} [l]	25.093	14.829	23.527	10.230	15.418	19.347	18.074
V_{TNLA} [l]	25.093	14.829	23.527	10.230	15.418	19.347	18.074
α [1/h]	2.94	6.06	3.35	4.39	11.24	3.46	5.241
β [1/h]	1.03	1.14	0.77	0.72	1.74	0.48	0.981
$t_{1/2(\alpha)}$ [h]	0.24	0.11	0.21	0.16	0.06	0.20	0.163
$t_{1/2(\beta)}$ [h]	0.67	0.61	0.90	0.96	0.40	1.45	0.830

Die Bioverfügbarkeit wurde 0,5 gesetzt.

Distributionsvolumina der unterschiedlichen Metabolite wurde mit dem Verteilungsvolumen der Muttersubstanz gleichgesetzt.

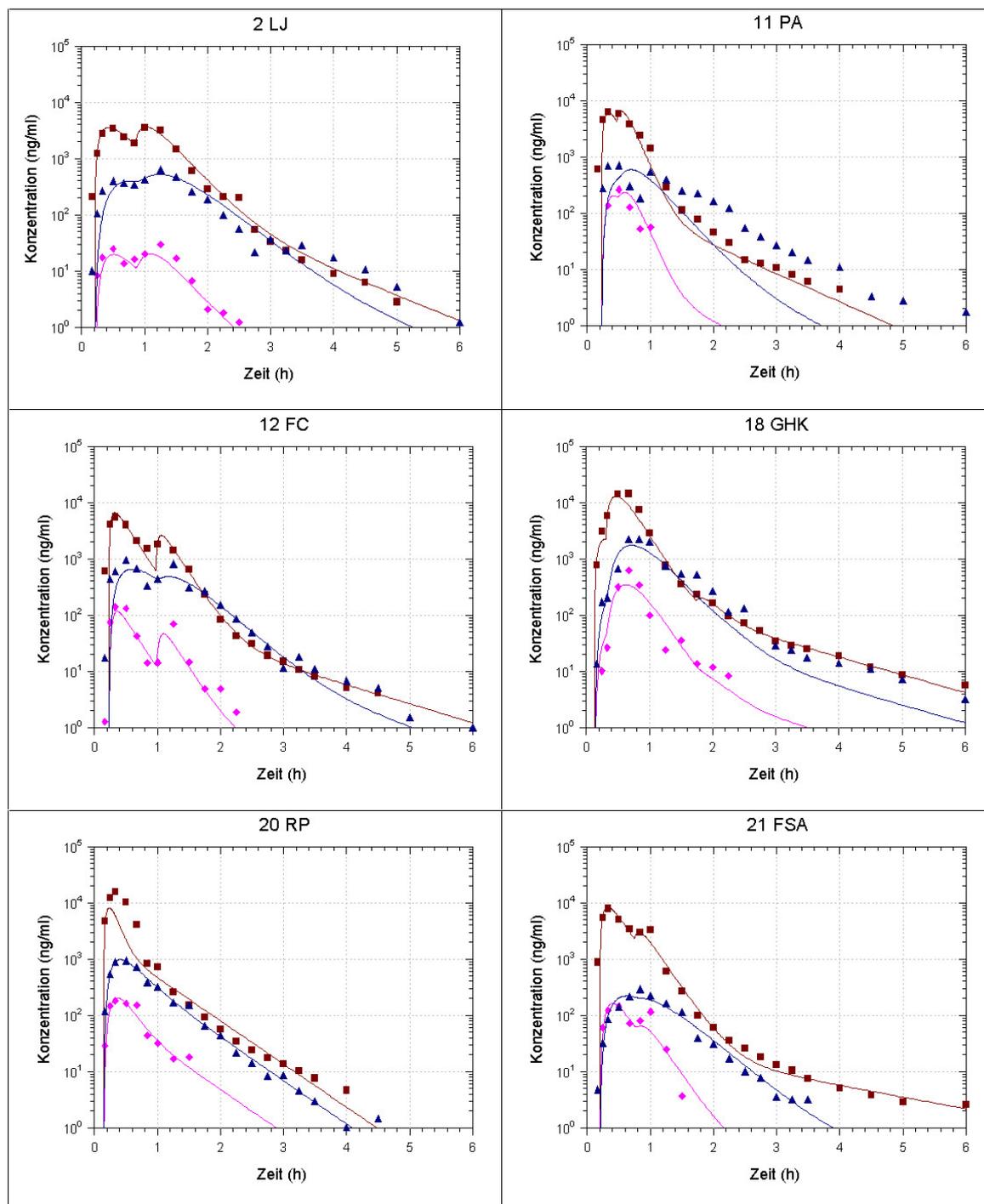


Abb. 44: Plasmakonzentrations-Zeitverläufe / LA und Metaboliten / Fit / p.o. / Mensch
 Semilogarithmische Darstellung der gefitteten Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der Muttersubstanz und ihrer Metaboliten (LA, BNLA, TNLA) nach oraler Gabe von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz, Dosis 604,8 mg bezogen auf die freie Säure.

6. DISKUSSION

Wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, ist das R(+)-Enantiomer der rac- α -Liponsäure die biologisch bedeutende Form und ist als Coenzym wichtiger Multienzymkomplexe (Pyruvat- und α -Ketoglutarat-Dehydrogenase) essentiell für die Zell- und Stoffwechselfunktion. Gerade in den wichtigen Prozessen der Zelle, die Substrate für die Atmungskette bereitstellen (Glykolyse, Citratcyclus), spielt die R(+)- α -Liponsäure eine entscheidende Rolle. Daher werden die beobachteten positiven Wirkungen auf die akuten Krankheitsbilder im Diabetes mellitus nach Gabe von rac- α -Liponsäure dem R(+)-Enantiomer zugeschrieben.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die in der Literatur beobachteten lang anhaltenden Wirkungen der R(+)- α -Liponsäure mit meßbaren Konzentrationen dieser Substanz in Zusammenhang zu bringen, um erste Ansätze für die Korrelation zwischen der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik, also für die Konzentrations-(Dosis)-Wirkungsbeziehung, zu geben. Die Grundlage dazu ist die genaue Kenntnis der Pharmakokinetik der Wirksubstanz und ihrer wichtigsten Metaboliten. Da bisher nur die Pharmakokinetik der beiden Enantiomeren nach Gabe des Razemates bekannt ist, lag der Schwerpunkt der Arbeit auf der Untersuchung der Pharmakokinetik des R-Enantiomers und der Metaboliten nach einmaliger und mehrfacher Gabe von Dexlipotam am Tier und nach einmaliger Gabe am Menschen.

6.1 Pharmakokinetik der R(+)- α -Liponsäure

Die Pharmakokinetik der R(+)- α -Liponsäure wurde sowohl im Gewebe als auch im Plasma nach Gabe von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz (Dexlipotam) an der Ratte untersucht. Im Menschen wurde die Plasma-Pharmakokinetik der R(+)- α -Liponsäure nach Gabe von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz und von rac- α -Liponsäure untersucht und verglichen.

6.1.1 *Resorption*

Untersuchungsmodell Ratte

Aufgrund der guten Löslichkeit des Trometamolsalzes der R(+)- α -Liponsäure (Dexlipotam) konnte der Wirkstoff den Tieren als wässrige Lösung verabreicht werden. Es wurden drei verschiedene Applikationsformen untersucht, die orale, die intraperitoneale und die intravenöse Gabe (Dosis 20 mg/kg). Nach intraperitonealer und nach oraler Gabe zeigte Dexlipotam ein sehr schnelles Resorptionsverhalten. Innerhalb von 5 min nach intraperitonealer, und 10 min nach oraler Substanzgabe (jeweils der erste Meßpunkt) zeigte sich die maximale Plasmakonzentration (Kapitel 5.1.1, Tabelle 5). Mit Hilfe der nach den verschiedenen Applikationsrouten ermittelte MRT, der mittleren Verweildauer eines Arzneistoffmoleküls im Organismus, konnte die MIT, die mittlere Inputzeit, der oralen und intraperitonealen Gabe errechnet werden (Kapitel 5.1.1, Tabelle 5).

Die MIT beschreibt die Zeitdauer, die im Durchschnitt vergehen muß, bevor ein Arzneistoffmolekül im zentralen Kompartiment erscheint. Nach oraler Gabe betrug die MIT 0,52 h, nach intraperitonealer Gabe 0,72 h.

Die schnelle Resorption nach oraler Gabe gibt den Hinweis, daß die Aufnahme größtenteils im Magen und im vorderen Teil des Dünndarms stattfand. Der pH-Wert einer nüchternen Ratte im Magen liegt bei ca. 1, somit liegt die vorher in der Applikationslösung als Salz vorliegende R(+)- α -Liponsäure dann in nicht ionisierter Form vor und kann die Membran sehr leicht durchdringen. Der pH-Wert im Dünndarm wie auch im Bauchraum, der Applikationsort der intraperitonealen Gabe, beträgt aber 6 – 8. In diesem Umfeld liegt die R(+)- α -Liponsäure in ihrer dissoziierten und geladenen Form vor. Die Diffusion durch die gastrointestinalen Membranen ist dadurch erschwert und dauert länger. Dies könnte auch die beobachtete nicht abgeschlossene Absorption nach intraperitonealer Gabe erklären. Es zeigte sich eine verlängerte terminale Halbwertszeit, die die Resorption beschreibt und die Elimination überlagert (Flip-Flop, Kapitel 5.1.1, Tabelle 5).

In Untersuchungen nach oraler Gabe in einem Dosierbereich von 10 – 100 mg/kg (Kapitel 5.1.2, Tabelle 8) ist die schnelle Resorptionseigenschaft von Dexlipotam erkennbar. Maximale Plasmakonzentrationen wurden im Bereich von 10 bis 20 min nach der Gabe erreicht. Bei höheren Dosierungen (100 mg/kg, Kapitel 5.1.2, Abbildung 27) zeigte sich aber, daß die Resorptionsgeschwindigkeit einer Limitierung unterliegt. Die maximale Plasmakonzentration zeigte nur im Bereich von 10 – 30 mg/kg einen zur Dosis proportionalen Anstieg. Im Gegensatz dazu war die ermittelte AUC über den ganzen Dosierbereich proportional zur applizierten Dosis. Demnach ist nicht das Ausmaß der Resorption beeinträchtigt, die Resorptionsgeschwindigkeit wird aber mit steigender Dosierung verlangsamt. Es sind nicht nur Diffusionsmechanismen für die Resorption verantwortlich. Die durch hohe Dosierungen hervorgerufene Verzögerung gibt einen Hinweis, daß sättigbare aktive Transportmechanismen (Fettsäure-Transportsysteme im Dün- und Dickdarm) zusätzlich eine Rolle bei der Resorption von Dexlipotam spielen müssen.

Untersuchungsmodell Mensch

Dexlipotam (Kapitel 5.2.2) oder rac- α -Liponsäure (Kapitel 5.2.1) wurde gesunden Menschen in Tablettenform oral verabreicht. Bevor der Wirkstoff resorbiert werden konnte, mußte die Tablette in kleine Partikel zerfallen und sich in der gastrointestinalen Flüssigkeit auflösen. Das uneinheitliche Zerfallen der Tablette war anhand der Mehrfach-Peaks in den Plasmakonzentrations-Zeit-Profilen gut erkennbar (individuelle Plasmakonzentrations-Zeitverläufe: Kapitel 5.2.1, Abbildung 39 und Kapitel 5.2.2, Abbildung 42). Die Tablettenstücke wurden zeitlich verzögert resorbiert. Der Beginn der Absorption war um 0,1 – 0,3 h nach Substanzgabe verschoben ($t_1 = 0,13 - 0,32$, Kapitel 5.2.2, Tabelle 26 und $t_1 = 0,08 - 0,22$, Kapitel 5.2.1, Tabelle 22).

Trotzdem zeigte sowohl rac- α -Liponsäure als auch Dexlipotam ein schnelles Resorptionsverhalten, innerhalb von 30 min nach Substanzgabe waren maximale Plasmakonzentrationen (Kapitel 5.2.1, Tabelle 19 und Kapitel 5.2.2, Tabelle 24) bestimmbar.

6.1.2 Bioverfügbarkeit

Untersuchungsmodell Ratte

Die absolute Bioverfügbarkeit von Dexlipotam betrug nach oraler Gabe 25 % und nach intraperitonealer Gabe 37 % (Kapitel 5.1.1, Tabelle 5). Dexlipotam wurde auf Grund der guten Löslichkeit als wässrige Lösung verabreicht. Aus früheren Studien ist bekannt, daß rac- α -Liponsäure als orale Gabe eine weitaus geringere absolute Bioverfügbarkeit (10 %) erreichte [Niebch et al, 1996]. In diesen Studien wurde das Razemat als freie Säure (20 mg/ml) in Trispuffer (96,8 mmol/l) gelöst. Das damit resultierende Molverhältnis zwischen α -Liponsäure Molekül und Trometamol-Molekül (1+1) in der Applikationslösung war vergleichbar mit der in den Dexlipotamstudien verwendete Applikationslösung. Der Unterschied in der ermittelten absoluten Bioverfügbarkeit könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Aufnahme der R-Form in Abwesenheit von der S-Form begünstigt ist.

Untersuchungsmodell Mensch

Die absolute Bioverfügbarkeit von Dexlipotam nach oraler Gabe konnte bis jetzt noch nicht untersucht werden. Die pharmakokinetischen Untersuchungen am Menschen nach Gabe von rac- α -Liponsäure (Kapitel 2.2.3) zeigten eine deutlich höhere absolute Bioverfügbarkeit für das R-Enantiomer verglichen mit dem S-Enantiomer [Hermann und Niebch, 1997]. Außerdem lassen die Daten aus den Rattenstudien die Vermutung zu, daß auch beim Menschen eine höhere Bioverfügbarkeit nach Gabe von Dexlipotam zu erwarten wäre.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß nach Gabe von rac- α -Liponsäure das S-Enantiomer regelmäßig niedrigere AUC- und C_{\max} -Werte als das R-Enantiomer zeigte (Kapitel 2.2.3). Generell waren die ermittelten AUC- und C_{\max} -Werte der α -Liponsäure nach Gabe von Dexlipotam (nur R-Enantiomer) deutlich höher als nach Gabe des Razemats (Summe aus R- und S-Form) (siehe Tabelle 28). Zum einen könnte die höhere Gesamtkörper-Clearance des S-Enantiomers und die daraus resultierenden niedrigeren Plasmaspiegel diesen Unterschied erklären [Hermann und Niebch, 1997]. Zum anderen führte eine orale Gabe von 200 mg rac- α -Liponsäure (also 100 mg R(+)- α -Liponsäure) zu einem AUC-Wert des R-Enantiomers von circa 0,41 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, der unter der Voraussetzung der Dosislinearität rechnerisch zu einem Wert von 2,46 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ bei einer Dosierung von 600 mg R(+)- α -Liponsäure in Form des Razemats (also 1200 mg rac- α -Liponsäure) führen würde. Im Vergleich dazu führte die Gabe von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz alleine, in Abwesenheit der S-Form, zu einer höheren Exposition (5,85 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, siehe Tabelle 28).

Der deutlich Unterschied in der Exposition könnte so erklärt werden, daß zusätzlich zu der geringeren Gesamtkörper-Clearance, die Aufnahme der R-Form in Abwesenheit der S-Form begünstigt sein könnte und die R-Form als Trometamolsalz gegenüber der freien Säure vom Organismus besser resorbiert werden kann.

Tab. 28: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter nach oraler Gabe von Dexlipotam und von rac- α -Liponsäure im Menschen.

Pharmakokinetische Parameter							
α -Liponsäure-Konzentrationen nach oraler Gabe von ca. 600 mg α -Liponsäure							
Mittel _{geo} mit 95% CI _n				Median mit Min - Max (n=9)			
Razemat* Freie Säure		R(+)-Enantiomer* Trometamol Salz		Razemat* Freie Säure		R(+)-Enantiomer* Trometamol Salz	
C _{max} [ng/ml]	AUC [ng·h/ml]	C _{max} [ng/ml]	AUC [ng·h/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]
3949 (3065–5087)	3098 (2513–3817)	9065 (7331–11209)	5852 (5053–6778)	0,50 (0,17–0,75)	0,58 (0,48–1,97)	0,50 (0,33–1,00)	0,87 (0,47–1,45)

* (n=9)

+ (n=12)

6.1.3 Distribution

Die Verteilung des Wirkstoffs und seiner Metaboliten im Organismus könnte einen Erklärungsansatz liefern, wie die Pharmakokinetik des Wirkstoffs mit der Pharmakodynamik in Zusammenhang gebracht werden könnte.

Untersuchungsmodell Ratte

Aus den Untersuchungen von Peter und Borbe nach Gabe von radioaktiv markierte rac- α -Liponsäure zeigte sich, daß die verabreichte Radioaktivität im Organismus der Ratte sehr gut verteilt wurde. Das ermittelte Verteilungsvolumen der gemessenen Radioaktivität, die sich aus der Muttersubstanz und / oder möglichen Metaboliten zusammensetzte, in der terminalen Phase betrug 12,3 l/kg nach intravenöser Gabe [Peter und Borbe, 1996; Peter, 1991]. Im Verlauf der mehrfachen oralen Gabe der radioaktiven Substanz erfolgte eine Anreicherung der Radioaktivität in allen untersuchten Organen, sowie im Plasma, sehr ausgeprägt war diese aber in den peripheren Nerven, dem Muskelgewebe und dem Cerebellum erkennbar (Tabelle 8, Kapitel 2.2.4) [Peter und Borbe, 1996; Peter, 1994]. In diesen Geweberegionen wurde außerdem eine viel längere terminale Halbwertszeit als nach der Einfachgabe ermittelt (Tabelle 8, Kapitel 2.2.4).

In den Untersuchungen dieser Arbeit bestätigte sich teilweise das hohe Verteilungsvolumen nach intravenöser Gabe von Dexlipotam (Kapitel 5.1.1. Tabelle 5). Die Muttersubstanz wurde sehr stark im Gewebe verteilt und zeigte ein Verteilungsvolumen in der terminalen Phase von ca. 2 l/kg, das entspricht ca. dem dreifachen Volumen des Gesamt-Körperwassers einer Ratte [0,7 l/kg; Davies und Morris, 1993]. Zusätzlich müssten aber Stoffwechselprodukte der Muttersubstanz existieren, die sich ebenfalls weit im Gewebe verteilen und / oder sich stärker daran binden, da das ermittelte Verteilungsvolumen der Radioaktivität um den Faktor 6 größer war als das der R(+)- α -Liponsäure.

Muskel

Der Skelettmuskel wird als das quantitativ wichtigste Organ für die postprandiale Insulin stimulierte Glukoseverwertung angesehen. R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen wurden im Muskelgewebe, das den Wirkort repräsentiert, nach mehrfacher Gabe von Dexlipotam in Ratten untersucht.

Nach oraler Mehrfachgabe von Dexlipotam im wirksamen Dosierbereich über 3 Wochen wurde zu unterschiedlichen Zeiten Muskelgewebe entnommen und die extrazelluläre und intrazelluläre R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen gemessen (Kapitel 5.1.3.1). Die Konzentrationen im Muskel lagen in den meisten Fällen unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 20 ng/g). Es konnte keine Kumulation im Muskel beobachtet werden. 1 h nach einfacher oraler Gabe lagen die gemessenen Konzentrationen unterhalb der Quantifizierungsgrenze (LOQ = 40 ng/g). Zum gleichen Zeitpunkt waren die R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma im Bereich von 160 – 250 ng/ml. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß die verwendete analytische Methode (Kapitel 4.4.2) zu unempfindlich für die Quantifizierung im Gewebe war.

Die Konzentrationen im interstitiellen Raum des Muskelgewebes, das als gut durchblutetes Gewebe angesehen werden kann, sind direkt abhängig von den Plasmakonzentrationen. Diese Vermutung konnte in den Untersuchungen mittels Mikrodialyse bestätigt werden. Diese Technik ermöglichte eine mehrfache Plasma- und Muskel-Konzentrationsbestimmung am selben Tier über einen Zeitraum von 10 h. Die hier bestimmten Gewebekonzentrationen repräsentierten aber nur die freie und ungebundene extrazelluläre Konzentration. Mit Hilfe eines Zwei-Kompartiment-Modells konnten die Plasma- und Muskelkonzentrations-Zeitverläufe nach Infusion über 1 h mathematisch beschrieben werden und die Abhängigkeit gezeigt werden (Kapitel 5.1.4). Das zentrale Kompartiment wurde durch den Blutkreislauf, das periphere Kompartiment durch das Muskelgewebe repräsentiert.

Im Gegensatz dazu gab die mehrfache intravenöse Gabe von rac- α -Liponsäure den Hinweis, daß Kumulation im Muskel, aber nicht im Plasma, stattfand (Kapitel 5.1.3.2) und demnach Unterschiede in den Konzentrationen im Muskel nach einfacher oder mehrfacher Gabe existieren könnten. Dieser Unterschied wird vermutlich erst bei sehr hohen oralen oder bei intravenösen Dosierungen erkennbar. Bei niedriger oraler Dosierung fallen die Gewebe- und Plasmakonzentrationen durch die limitierte Bioverfügbarkeit möglicherweise zu früh auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze, so daß eine mögliche Kumulation nicht sichtbar wird.

Nerven

Die Nerven als Zielgewebe für die Indikation diabetische Polyneuropathie wurden sowohl nach oraler mehrfacher Gabe von Dexlipotam als auch nach intravenöser mehrfacher Gabe von rac- α -Liponsäure in der Ratte untersucht. Nach oraler Gabe zeigte sich ein uneinheitliches Bild, einzelne Tiere zeigten eine deutliche Anreicherung, andere Tiere wiederum nicht. In diesem Fall hatte sicher die limitierte Verfügbarkeit des Nervengewebes einen wesentlichen Einfluß auf die Quantifizierungsgrenze und die geringe Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe einen Einfluß auf die Ergebnisse.

Nach intravenöser Gabe von rac- α -Liponsäure über 29 Tage zeigten sich deutliche α -Liponsäure-Konzentrationen im Bereich von 2000 – 3300 ng/g Gewebe, die über das Dosierintervall von 24 h konstant blieben. Auch hier gab es Hinweise, daß nach mehrfacher intravenöser Gabe im Gewebe eine Kumulation stattfand, die im Plasma nicht beobachtet werden konnte.

In einer von Packer beschriebenen Arbeit wurden zum erstenmal die α -Liponsäure-Konzentrationen im Nervengewebe und im Serum nach intravenöser und oraler Gabe von rac- α -Liponsäure über 14 Tage bei unterschiedlichen Dosierungen in Ratten untersucht [Packer, 1999]. Das Ziel der Untersuchungen war es, zu zeigen, daß exogen zugeführte rac- α -Liponsäure in das Nervengewebe verteilt wird und dort im Krankheitsverlauf der diabetischen Polyneuropathie auch wirken kann.

Das Gewebe und das Serum wurden am 14. Tag nach der letzten Gabe entnommen, und die Konzentrationen in den Proben wurden mit Hilfe einer HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion quantifiziert. In der Publikation wurde keine Angabe über den genauen Zeitpunkt der Probengewinnung gemacht.

Die α -Liponsäure-Konzentration im Nervengewebe lag unterhalb von 10 ng/g für beide untersuchten Applikationsrouten und Dosisstufen (Abbildung 45).

Die α -Liponsäure-Konzentrationen im Serum nach oraler Gabe lagen erwartungsgemäß niedriger als nach intravenöser Gabe. In Abbildung 45 zeigte sich nur in den Nervengeweben ein Dosis abhängiger Anstieg, im Serum dagegen nicht.

Die Autoren führten aus, daß zum ersten Mal freie α -Liponsäure-Konzentration im Nervengewebe (Nervus ischiadicus) nach Mehrfachgabe von rac- α -Liponsäure nachgewiesen werden konnten. Die höchste Konzentration im Nervengewebe konnte nach orale Gabe von rac- α -Liponsäure in der höchsten Dosierung (30 mg/kg) und nicht nach intravenöser Gabe (10 mg/kg) erreicht werden. Damit kamen die Autoren zu dem Entschluß, daß die gemessenen Serumkonzentrationen nicht die gemessenen Nervenkonzentrationen reflektieren. Hohe Serumkonzentrationen führen nicht zwangsläufig zu höheren Konzentrationen im Nervengewebe oder in anderen Geweben.

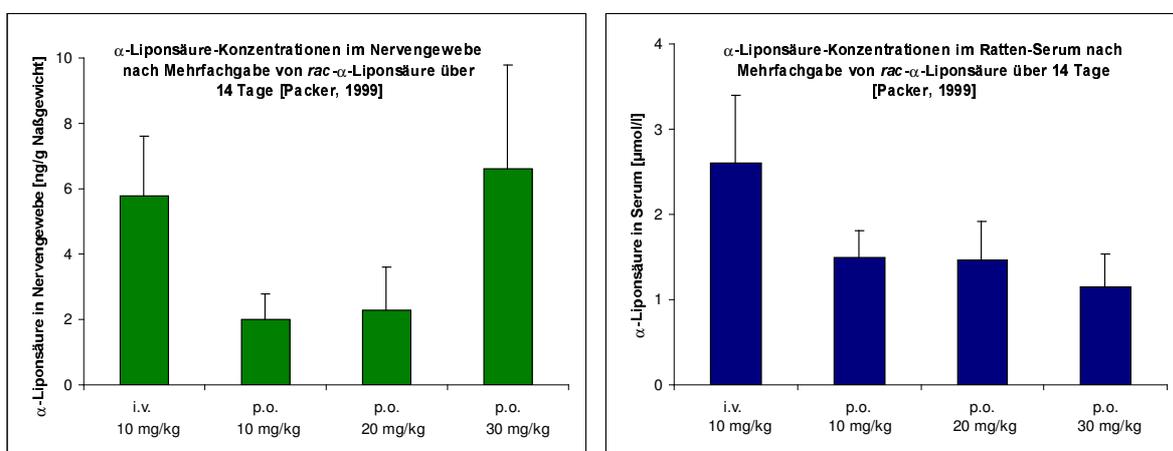


Abb. 45 Darstellung der α -Liponsäure-Konzentrationen gemessen im Nervengewebe und im Serum von Ratten nach mehrfacher Gabe von rac- α -Liponsäure über 14 Tage (n = 24 pro untersuchte Gruppe). Die Organentnahme erfolgte nach der letzten Gabe [Packer, 1999].

Diese Ergebnisse und Rückschlüsse konnten nur teilweise in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Mehrfache, tägliche, intravenöse Gabe von rac- α -Liponsäure (25 mg/kg) führte auch in den Studien dieser Arbeit zu meßbaren Konzentrationen im Nervengewebe (Kapitel 5.1.3.2).

Die gemessenen Nervenkonzentrationen (Nervus ischiadicus und Nervus femoralis) 1 h und 24 h nach der letzten Gabe über 21 Tage lagen aber 200-fach höher als die in der Arbeit von Packer beschriebenen Konzentrationen. Dies konnte nicht nur durch die 2,5-fach höhere Dosierung oder durch die verlängerte Behandlungsdauer erklärt werden. Die Ergebnisse sind trotz der kleinen Anzahl der untersuchten Tiere (n=3) sehr einheitlich.

Nach mehrfacher oraler Gabe über 21 Tage von R(+)- α -Liponsäure (Dexlipotam) und einer Dosis von 30 mg/kg konnten 24 h nach der letzten Gabe nur vereinzelt R(+)- α -Liponsäure-Spiegel im Nervengewebe gemessen werden. Zum gleichen Zeitpunkt lagen die Plasmakonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 2 ng/ml). Die Nachweisgrenze der in dieser Arbeit für die vorliegenden Nervenuntersuchungen verwendeten Analysenmethode lag aber deutlich höher, zwischen 16 - 109 ng/g, abhängig von der einsetzbaren Gewebemenge, als in der von Packer verwendeten Methode. Die beschriebenen Nervenkonzentrationen in den Untersuchungen von Packer hätten mit der in dieser Arbeit verwendeten Analysenmethode somit nicht erfaßt werden können [Packer, 1999].

Abbildung 45 zeigt keinen zur Dosis abhängigen Anstieg der Serumkonzentrationen im Bereich von 10 – 30 mg/kg in den Untersuchungen von Packer.

Dosisproportionalität konnte aber nach oraler Gabe im Dosierbereich von 10 – 30 mg/kg für die R(+)- α -Liponsäure (Kapitel 5.1.2), und auch in früheren Untersuchungen für die rac- α -Liponsäure gezeigt werden [Niebch et al, 1996]. Streng genommen gilt in linearen pharmakokinetischen Systemen das Superpositionsprinzip, also bei Vervielfachung der Dosis zeigt die beobachtete Konzentrations-Zeit-Kurve eine Vervielfachung der Konzentration C(t) zu jedem Zeitpunkt t. Demnach müßte die Plasma- oder auch Serum-Konzentration zu jedem beliebigen Zeitpunkt in Abhängigkeit von der Dosis steigen.

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Packer. Da aber in den Ausführungen von Packer weder genaue Angaben über die analytische Meßmethode noch über die Zeitpunkte der Organ- und Blutentnahme gemacht wurden, lassen sich die Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichen.

Leber

Aus den Untersuchungen von Peter und Borbe nach Gabe von radioaktiv markierter rac- α -Liponsäure zeigte sich im Verlauf der einfachen und der mehrfachen oralen Gabe, daß in der Leber die höchsten Radioaktivitäts-Konzentrationen zu finden waren [Peter und Borbe, 1996; Peter 1991; 1994]. Die terminalen Halbwertszeiten lagen in vergleichbarer Größenordnung wie im Plasma (Tabelle 8, Kapitel 2.2.3).

Sowohl nach oraler Gabe von Dexlipotam über 21 Tage als auch nach intravenöser Gabe von rac- α -Liponsäure über 28 Tage (Kapitel 5.1.3) lagen die in der Leber gemessenen α -Liponsäure-Konzentrationen in dem Größenordnungsbereich der Plasmakonzentrationen zum selben Zeitpunkt.

Es gab aber keine Hinweise auf eine stattfindende Kumulation der Wirksubstanz in diesem Organ, da 24 h nach Substanzgabe die Konzentrationen wieder auf Werte unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 20 ng/g) abgefallen waren.

Die hohen Konzentrationen kurz nach Substanzgabe, die sich auch in den Radioaktivitätsuntersuchungen gezeigt hatten (Kapitel 2.2.3), weisen aber auf die vermutlich bedeutende Rolle der Leber im Eliminationprozeß sowohl der R(+)- α -Liponsäure als auch des Razemates hin.

Aorta

Die R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen der Aorta wurden nach mehrfacher oraler Gabe von Dexlipotam untersucht und zeigten eine deutliche Kumulation, da noch 2 Tage nach der letzten Gabe Gewebespiegel meßbar waren (Kapitel 5.1.3.1). Im Vergleich zu anderen untersuchten Geweberegionen (Leber, Nerven, Niere, Muskel und Herz) trat hier die Kumulation am deutlichsten auf. Es existieren demnach spezifische Geweberegionen, die in der Lage sind, R(+)- α -Liponsäure anzureichern.

6.1.4 Metabolismus

In Kapitel 2.2.4 wurden die Ergebnisse der Arbeiten von Schupke über die Metabolisierung nach Gabe von radioaktiv markierter rac- α -Liponsäure in Ratte, Maus, Hund und Mensch beschrieben [Schupke et al, 2001]. α -Liponsäure unterliegt einem intensiven Metabolismus, mögliche Biotransformationen sind β -Oxidation, S-Methylierung, S-Oxidation und Konjugationsreaktionen mit der Aminosäure Glycin. Der Mensch zeigte qualitativ ein ähnliches Metabolisierungsschema, wie es sich auch in Ratten und Mäusen darstellte. Als Hauptmetaboliten wurden 2,4-Bis(methylmercapto)-butansäure (BMBA) und 4,6-Bis(methylmercapto)-hexansäure (BMHA), in geringeren Mengen 6,8-Bis(methylmercapto)-octansäure (BMOA) im Urin und im Plasma identifiziert.

In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde zum einen das Interesse auf die Metaboliten BMHA, BMBA und BMOA, aber auch auf zwei weitere identifizierte Metaboliten, Tetranorliponsäure (TNLA) und Bisnorliponsäure (BNLA), gerichtet, die wie die Muttersubstanz über einen intakten Dithiolan-Ring verfügen und damit möglicherweise für die Wirkung im Organismus mit verantwortlich gemacht werden könnten.

Untersuchungsmodell Ratte

In der Ratte wurden nach oraler Gabe von radioaktiv markierter rac- α -Liponsäure (10 mg/kg) weder die Metaboliten TNLA noch BNLA im Plasma oder Urin gefunden. Die meisten identifizierten Metaboliten waren aber Derivate der Bisnorliponsäure [Schupke et al, 2001].

In der hier beschriebenen Arbeit wurden die BNLA- und TNLA-Konzentrationen im Plasma und im Muskelgewebe während und nach einer Infusion von Dexlipotam (40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) untersucht (Kapitel 5.1.4). Die gemessenen Plasmakonzentrationen setzten sich aus dem reversibel an Proteine gebundenen und dem freien ungebundenen Anteil zusammen.

Auf Grund des Prinzips der Mikrodialyse (Kapitel 4.5.2) konnte im Muskel nur die freie ungebundene extrazelluläre Konzentration im Muskel bestimmt werden. Der Metabolit TNLA war in vergleichbarem Ausmaß wie die Muttersubstanz im Muskelgewebe vorhanden. Die pharmakokinetischen Parameter AUC und C_{\max} waren vergleichbar.

Im Plasma hingegen waren die maximalen TNLA-Konzentrationen um den Faktor 3 geringer als die Muttersubstanz-Konzentrationen. Der Metabolit BNLA war im Gewebe nur in Spuren und im Plasma im geringen Ausmaß, um den Faktor 15 geringer als die Muttersubstanz, meßbar (Tabelle 14 und 15, Kapitel 5.1.4).

Ein Vergleich der Ergebnisse mit der Arbeit von Schupke deutet auf einen möglicherweise quantitativ unterschiedlichen Metabolismus im Plasma nach Gabe von rac- α -Liponsäure und nach Gabe von R(+)- α -Liponsäure allein. Möglicherweise bildet das R-Enantiomer bevorzugt den Metabolit TNLA. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um mögliche Unterschiede im Metabolismus aufzuklären.

Die Metaboliten TNLA und BNLA werden durch β -Oxidation gebildet. Diese findet nur in der Zelle im Mitochondrium statt. Die Vermutung liegt nahe, daß der Metabolit TNLA direkt in der Muskelzelle gebildet worden ist, aus der Zelle heraus transportiert wird und auf dem Weg ins Plasma durch weitere Reaktionen, wie S-Methylierung und S-Oxidationen, verändert wird.

Weiter geben die Ergebnisse den Hinweis, daß bevorzugt eine zweifache β -Oxidation in der Muskelzelle, also die maximal mögliche Kettenverkürzung im Molekül angestrebt wird, bevor das Molekül die Zelle wieder verläßt.

Untersuchungsmodell Mensch

Nach oraler Gabe, sowohl von rac- α -Liponsäure als auch von R(+)- α -Liponsäure als Trometamolsalz, wurden die Konzentrationen der Muttersubstanz und der Metaboliten untersucht.

In der Studie mit rac- α -Liponsäure wurde das Interesse auf die Muttersubstanz und die Metaboliten BMHA, BMBA, BMOA, TNLA und BNLA im Plasma und im Urin gerichtet, in der Studie mit Dexlipotam wurden nur TNLA und BNLA als mögliche wirksame Metaboliten im Plasma untersucht.

Nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure wurden hohe Mengen von BMHA (Hauptmetabolit) und BMBA im Urin und im Plasma gemessen (Kapitel 5.2.1). Die AUC-Werte der Plasmakonzentrations-Zeitkurve lagen deutlich über der AUC der Muttersubstanz. Die Metaboliten TNLA und BMOA konnten nur in geringen Mengen im Plasma gemessen werden [Teichert und Preiß, 2000]. BNLA wurde nur in vereinzelt Plasmaproben nach Gabe von rac- α -Liponsäure gefunden.

Nach oraler Gabe von Dexlipotam (Kapitel 5.2.2) wurden der Metabolit TNLA im Plasma in vergleichbarer Konzentration wie nach Gabe von rac- α -Liponsäure gefunden. Die BNLA-Konzentrationen lagen nach Gabe von Dexlipotam deutlich höher als nach Gabe des Razemates. Die gemessenen Konzentrationen der beiden Metaboliten ließ eine pharmakokinetische Auswertung zu. Dies könnte auf quantitative Unterschiede im Metabolismus weisen.

Die Metabolisierungswege wurden in dieser Arbeit untersucht und mit Hilfe der kompartmentellen Auswertung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe mathematisch beschrieben.

Die beste Anpassung wurde auf Grundlage des in der nachstehenden Abbildung dargestellten Modells erzielt und gibt Aufschluß über die Wege, wie die Metaboliten aus der Muttersubstanz gebildet werden könnten. Es sind drei Wege möglich. Der erste Weg (linke Darstellung in Abbildung 46) beschreibt die Umwandlung der Muttersubstanz zu dem Metaboliten BMOA durch Ringöffnung und S-Methylierung, dann schließen sich β -Oxidationsreaktionen an, die zu den Metaboliten BMHA und BMBA führen. Eine weitere Möglichkeit beschreibt Weg 2, dargestellt in der Mitte der Abbildung. Die Muttersubstanz wird zuerst durch β -Oxidation zu dem Metaboliten BNLA umgewandelt, danach schließt sich die S-Methylierung des Dithiolan-Rings an. Der letzte Weg (rechte Darstellung in Abbildung 46) beschreibt die Bildung des Metaboliten TNLA aus der Muttersubstanz durch 2-fache β -Oxidation mit anschließender S-Methylierung, die zu dem Metaboliten BMBA führt. Der mögliche Bildungsweg des Metaboliten TNLA über die Bildung des Metaboliten BNLA wurde als zusätzlicher Bildungsweg in der mathematischen Beschreibung der Plasmakonzentrations-Zeitverläufe mit berücksichtigt, zeigte aber keine Relevanz. Die Bildungsrate des Metaboliten TNLA ist demnach nicht abhängig von den Konzentrationen des Metaboliten BNLA im Plasma.

Es ist somit unwahrscheinlich, daß erst der Metabolit BNLA gebildet, aus der Zelle heraus in den Blutkreislauf transportiert und anschließend wieder unverändert in die Zelle hinein transportiert wird, und eine weitere β -Oxidation am Molekül stattfindet. Die Metaboliten TNLA und BNLA werden vermutlich auf dem Weg ins Plasma durch weitere Reaktionen, wie S-Methylierung und S-Oxidation, verändert.

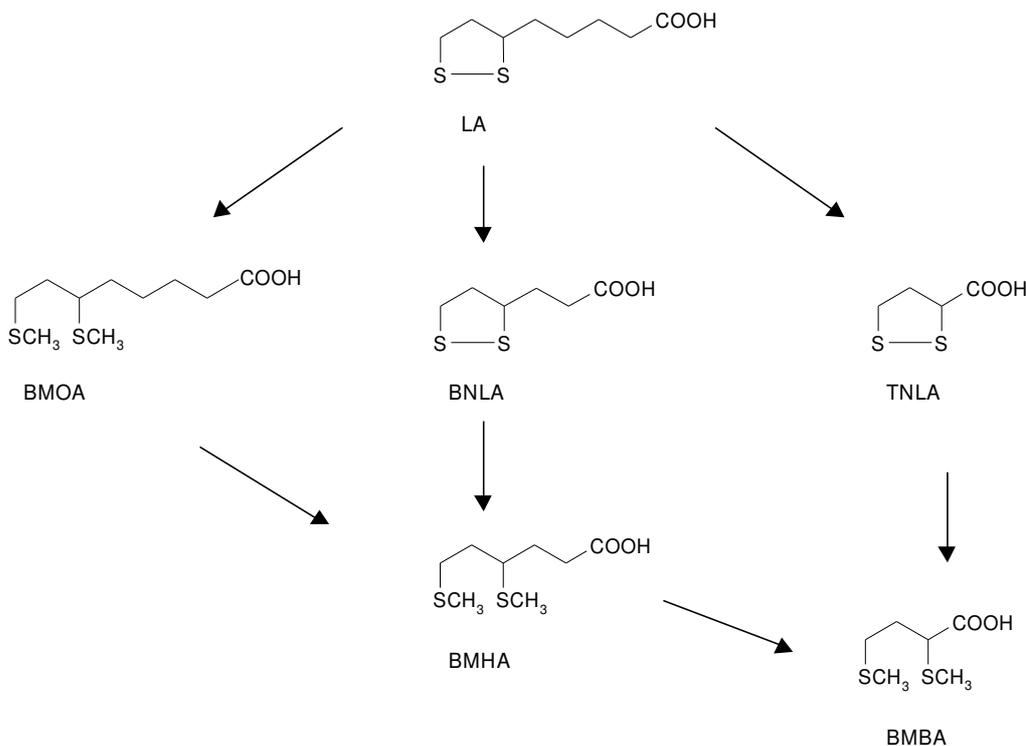


Abb. 46: Vermutetes Metabolisierungsschema der α -Liponsäure im Menschen

Die für die S-Methylierung verantwortlichen Enzyme, die S-Methyltransferasen, finden sich in der Darm-Mukosa, vor allem im Caecum und im Colon, aber auch in der Leber, den Nieren und in den Erythrozyten und Lymphozyten [Stevens und Bakke, 1990]. Die Oxidation des Schwefels ist leicht möglich, da dieser sehr viele unterschiedliche Oxidationsstufen einnehmen kann. Diese Reaktion kann nicht enzymatisch durch reaktive Sauerstoffspezies im Mitochondrium stattfinden aber auch über das Hämoglobin der Erythrozyten oder über das Myoglobin im Muskel vermittelt werden.

Die im Vergleich zu den Metaboliten BMHA und BMBA niedrigen Plasmakonzentrationen der Metaboliten TNLA und BNLA könnten dadurch erklärt werden, daß die Metaboliten im Blutkreislauf sehr schnell weiter metabolisiert werden. Es ist aber auch denkbar, daß nach oraler Gabe durch die hepatische präsystemische Elimination schon größere Teile der Dosis methyliert werden und als Metaboliten BMOA, BMHA und BMBA im Blutkreislauf auftreten.

Der Metabolit TNLA war im Gegensatz zu BNLA in weit höheren Konzentrationen im Plasma meßbar. Das legt die Vermutung nahe, daß auch im Menschen bevorzugt eine zweifache β -Oxidation, also die maximal mögliche Kettenverkürzung im Molekül angestrebt wird, bevor das Molekül die Zelle wieder verläßt.

Auch in den Untersuchungen von Biewenga zeigten sich meßbare Konzentrationen der Metaboliten 3-Ketoliponsäure, ein Zwischenprodukt der β -Oxidation, und BNLA im Plasma bei Gabe von 1 g R(+)- α -Liponsäure [Biewenga et al, 1997b]. In dieser Arbeit wurden aber keine Angaben über weitere Metaboliten gemacht.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse aller Untersuchungen klar, daß α -Liponsäure über den β -Oxidationsweg zu Derivaten abgebaut wird, die durchaus noch Eigenschaften besitzen, die zur Wirksamkeit beitragen können (Kapitel 6.2.2). Weitere Stoffwechselreaktionen am Schwefel, wie S-Methylierung und S-Oxidation, verringern diese Eigenschaften der Metaboliten und führen somit zu deren Inaktivierung.

Außerdem erlaubt das aufgestellte Modell eine Abschätzung der Metaboliten-Konzentrationen im Plasma auf der Grundlage der Muttersubstanz-Konzentrationen.

6.1.5 Halbwertszeiten der Muttersubstanz und der Metaboliten

Untersuchungsmodell Ratte

Im Gegensatz zu der ermittelten langen Plasmahalbwertszeit (60 h nach Einfach- und 80 h nach Mehrfachgabe, Kapitel 2.2.3) auf Basis der gemessenen Radioaktivitätskonzentrationen nach Gabe von radioaktiv markierter rac- α -Liponsäure, zeigte sich sowohl nach Gabe von rac- α -Liponsäure als auch nach Gabe von Dexlipotam, die bekannte kurze Plasmahalbwertszeit für das R-Enantiomers von 0,2 – 1,6 h in der Ratte (Kapitel 5.1, Tabelle 5, 8 und 13). Die Plasma-Halbwertszeiten für die Metaboliten TNLA und BNLA konnten nicht bestimmt werden.

Der Metabolit TNLA zeigte im Muskelgewebe eine Halbwertszeit von 0,3 – 0,9 h, geringfügig länger als die Muttersubstanz, 0,2 – 0,6 h (Kapitel 5.1.4, Tabelle 15). Hingegen war der Metabolit BNLA im Muskelgewebe nicht meßbar.

Das erklärt nicht die beobachtete lange Halbwertszeit nach Gabe von radioaktiver Substanz. Die Erklärung hierfür sind vermutlich noch unbekannte Metaboliten oder Stoffwechselprodukte der α -Liponsäure (Ester, SH-Adukte)

Die kurzen Halbwertszeiten der Muttersubstanz und des Metaboliten TNLA sprechen gegen eine Kumulation im Plasma und im Muskel bei einmaliger täglicher oralen Gabe. Dies konnte auch nach 3-wöchiger oraler Gabe für die Muttersubstanz gezeigt werden (Kapitel 5.1.3).

Untersuchungsmodell Mensch

Die vergleichbaren Halbwertszeiten der Muttersubstanz und der Metaboliten TNLA und BNLA konnten auch im Menschen nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure und Dexlipotam im Plasma bestimmt werden (Kapitel 5.2.1, Tabelle 20 und Kapitel 5.2.2, Tabelle 25).

Die Metaboliten BMHA und BMBA zeigten eine längere Halbwertszeit im Plasma und im Urin, annähernd 2 h, die dadurch zustande kommt, daß sich diese aus den Geschwindigkeitskonstanten der Elimination und der Metabolitenbildung zusammensetzt (Kapitel 5.2.1, Tabelle 20 und 21). Auch die im Vergleich zur Muttersubstanz längeren Halbwertszeiten dieser Metaboliten gaben keinen Hinweis, daß nach einmaliger täglicher Mehrfachgabe eine Kumulation dieser Verbindungen im Plasma stattfinden könnte.

6.1.6 Elimination

Untersuchungsmodell Ratte

Nach intravenöser Gabe von Dexlipotam (Dosis 20 mg/kg) konnte die Gesamtkörper-Clearance im Plasma bestimmt werden. Diese Gesamtkörper-Clearance kann als Maß für die Elimination des Arzneistoffs angesehen werden und war vergleichbar mit dem hepatischen Blutfluß in Ratten [Davies, und Morris, 1993; 55,2 ml/min/kg]. Diese hohe und mit dem Leberblutfluß vergleichbare Clearance und die limitierte Bioverfügbarkeit (Kapitel 5.1.1) nach oraler und intraperitonealer Dosierung geben den Hinweis für einen First-Pass Effekt. Der First-Pass Effekt bezeichnet einen verstärkten metabolischen Abbau des Arzneistoffes während des ersten Leberdurchganges des Arzneistoffs bevor dieser im Blutkreislauf verteilt wird. Auch hier weisen die Ergebnisse auf die vermutlich bedeutende Rolle der Leber im Eliminationsprozeß der R(+)- α -Liponsäure hin.

Untersuchungsmodell Mensch

Im Tier zeigte sich, daß der renale Ausscheidungsweg eine große Bedeutung darstellt, 80 % der applizierten Radioaktivität wurde im Urin wiedergefunden (Kapitel 2.2.3). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde der Urin von gesunden Probanden nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure untersucht, um Erkenntnisse über den Ausscheidungsweg im Menschen zu erhalten. In Kapitel 5.2.1 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Es wurde nur 12 % der applizierten Dosis im Urin als Summe der gemessenen Muttersubstanz und der Metaboliten BMHA, BMBA, BMOA, BNLA und TNLA wiedergefunden. Die renale Clearance bezogen auf die Muttersubstanz betrug nur 1 % der Gesamtkörper-Clearance und spielte im Ausscheidungsprozeß nur eine untergeordnete Rolle (Tabelle 19, Kapitel 5.2.1).

Vermutlich erfolgt die Ausscheidung über einen stark ausgeprägten Metabolismus in der Leber. Die geringe Wiederfindung der oralen Dosis im Urin könnte einmal dadurch erklärt werden, daß sich die Ausscheidungswege des Menschen stark vom Tier unterscheiden oder daß noch weitere, bisher unbekannt, Metaboliten im Urin des Menschen vorkommen.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den genauen Ausscheidungsweg der α -Liponsäure im Menschen aufzuklären. Ein Massen-Bilanzierungs-Versuch mit [¹⁴C]-markierter α -Liponsäure ist aus ethischen und rechtlichen Gründen am Menschen nicht durchführbar, da die Halbwertszeiten in der Ratte sehr hoch sind und auf eine lange Verweildauer der applizierten Radioaktivität im Organismus hinweisen.

6.1.7 Extrazelluläre und intrazelluläre Konzentrationen in Hepatozyten

In Kapitel 5.1.5 wurde die zelluläre Aufnahme von R(+)- α -Liponsäure (eingesetzte Konzentration 0 – 100 $\mu\text{mol/l}$) in einem in-vitro Modell (Hepatozyten-Zellkulturen) untersucht. Es wurden deutliche Konzentrationen der Muttersubstanz und der Metaboliten TNLA und BNLA in den Hepatozyten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten gefunden. Außerdem konnten die Metaboliten TNLA und BNLA, die nur im Inneren der Zelle gebildet werden können, nach circa 0,5 h Inkubationzeit im Zellmedium gemessen werden.

Es zeigte sich, daß Hepatozyten in der Lage sind, R(+)- α -Liponsäure sehr schnell aufzunehmen und die Metaboliten TNLA und BNLA zu bilden. Die Zelle ist außerdem in der Lage, die gebildeten Metaboliten TNLA und BNLA aus dem Zellinneren heraus zu transportieren.

Es waren keine Unterschiede in den gemessenen intrazellulären Konzentrationen in Abhängigkeit zur Inkubationszeit erkennbar.

Höhere eingesetzte R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Zellmedium führten zu höheren intrazellulären Konzentrationen, der Anstieg der intrazellulären Konzentrationen war aber viel geringer ausgeprägt als durch die Erhöhung der eingesetzten Konzentration im Zellmedium zu erwarten gewesen wäre. Längere Inkubationszeiten führten zu keiner Kumulation der Muttersubstanz oder der Metaboliten.

Die nahezu unabhängige intrazelluläre Konzentration der Muttersubstanz und der Metaboliten von der eingesetzten Konzentration im Zellmedium und von der Inkubationszeit lassen den Schluß zu, daß die Muttersubstanz in die Zelle und die Metaboliten durch einen aktiven Carrier-Mechanismus aus der Zelle transportiert wurden.

Mögliche Transportmechanismen wurden von Akerboom und Peinado untersucht [Akerboom, et al, 1989; Peinado, 1989]. Bei höheren Konzentrationen von Lipoat ($>100 \mu\text{mol/l}$) zeigte sich eine nichtsättigbare Transportkomponente. Im Gegensatz dazu wurde im niedrigen Konzentrationsbereich ($< 100 \mu\text{mol/l}$) ein sättigbarer Transportmechanismus beobachtet. Eine selektive Hemmung konnte durch mittelkettige Fettsäuren erreicht werden, langkettige Fettsäuren hatten hingegen keinen Einfluß. Die Autoren kamen zu dem Entschluß, daß bei physiologischen Konzentrationen der Transport in Hepatozyten hauptsächlich Carrier vermittelt ist, bei hohen Konzentrationen überwiegt wahrscheinlich eine passive Diffusion. In den in-vitro Untersuchungen dieser Arbeit wurden physiologisch relevante Konzentrationen von der R(+)- α -Liponsäure eingesetzt und vermutlich überwiegte in diesem Konzentrationsbereich ein sättigbarer Carrier-vermittelter Transport, was die oben beschriebenen relativ konstanten intrazellulären Konzentrationen der Muttersubstanz und der Metaboliten erklären könnte.

6.2 Pharmakodynamik der R(+)- α -Liponsäure

Als Cofaktor von Multienzymkomplexen, die die oxidative Decarboxylierung von α -Ketoglutarat und Pyruvat katalysieren, kommt R(+)- α -Liponsäure eine bedeutende Rolle im Energie-Stoffwechsel zu. Zusätzlich zeigt α -Liponsäure zusammen mit der reduzierten Form Dihydroliponsäure eine starke antioxidative Aktivität. Beide sind in der Lage, als Radikalfänger oder Chelatkomplexbildner zu fungieren. Mit diesen Eigenschaften könnte die R(+)- α -Liponsäure sowohl der eingeschränkten Glukoseverwertung, aber auch dem verstärkten Ausmaß an „oxidativem Stress“ im Krankheitsverlauf des Diabetes mellitus Typ II entgegenwirken.

Die klinischen und präklinischen Studien geben einen Hinweis, daß der Wirkstoff einen positiven Effekt auf die Insulinsensitivität, die Insulin stimulierte Glukoseaufnahme und die Glukoseoxidation hat und außerdem die Glukoneogenese hemmt.

6.2.1 Die wirksame Dosierung und Behandlung

Untersuchungsmodell Ratte

Nach einmaliger intraperitonealer Gabe von R(+)- α -Liponsäure bei einer Dosierung von 100 mg/kg konnte einen Einfluß auf die Glukoseverstoffwechslung im diabetischen Rattenmodell gezeigt werden. Hingegen führte nach mehrmaliger intraperitonealer Gabe über 10 Tage von nur 30 mg/kg zum selben Effekt (Kapitel 2.2.4) [Streeper et al, 1997]. Durch Mehrfachgabe konnte die Dosis von 100 mg/kg auf 30 mg/kg reduziert werden.

Untersuchungsmodell Mensch

Auch beim Menschen fand durch ein chronisches Behandlungsschema eine deutliche Dosisreduktion statt. Nach intravenöser Einmalgabe von rac- α -Liponsäure lag die wirksame Dosierung unter belastungsinduzierten Umständen (Glukose-Toleranz-Test oder Insulin-Clamp-Technik) im Bereich von 600 – 1000 mg. Ein dosisabhängiger Effekt auf die Insulinsensitivität konnte dabei beobachtet werden. Durch intravenöse Mehrfachgabe (über 10 Tage) konnte die Dosierung auf 500 mg gesenkt werden. Bei der oralen Therapie erwiesen sich 600 – 1200 mg pro Tag über 4 Wochen als wirksame Dosis. Es ist noch nicht bekannt, welche Dosierung und welche Behandlungsdauer am Menschen notwendig ist, um eine positive therapeutische Wirkung auf den Krankheitsverlauf des Typ II - Diabetes mellitus unter normalen Lebensumständen zu erreichen. Bislang wurde der Effekt durch belastungsinduzierte Werte meßbar, wie zum Beispiel durch einen oralen Glukose-Toleranz-Test oder durch Infusionsbehandlungen (Insulin-Clamp-Technik) [Jacob et al, 1996b]. Umfangreiche klinische Studien mit langer Behandlungsdauer und einer größeren Studienpopulation sind aber notwendig, um den Effekt auch nach normalen, mit dem täglichen Leben vergleichbaren, Umständen zu messen.

Die Bedeutung der wirksamen Dosierung liegt demnach vor allem in der Behandlungsdauer. Durch chronische Behandlung konnte eine deutliche Absenkung der wirksamen Dosierung im Menschen wie auch im Tier, die nach Einfachgabe erforderlich war, vorgenommen werden.

Im Gegensatz zu den pharmakokinetischen Ergebnissen spricht diese Beobachtung dafür, daß der Wirkstoff sich durch Mehrfachgabe im Zielgewebe anreichert und längere Zeit verfügbar sein muß. Eine andere Erklärung ist, daß ein einmal gesetzter Effekt möglicherweise durch niedrige lokale Konzentrationen aufrecht erhalten werden kann.

Vergleiche zwischen dem Untersuchungsmodellen Ratte und Mensch

In der Abbildung 47 sind die gemessenen Plasmakonzentrationen als AUC-Werte in der Ratte und im Menschen bei vergleichbarer Dosierung dargestellt. Im Menschen führen vergleichsweise geringere Dosierungen zu sehr hohen Plasmakonzentrationen und damit zu hohen AUC-Werten. In der Ratte hingegen nicht. Somit wurden in Tiermodell sehr hohe wirksame Dosierungen verwendet, die im Menschen keine Anwendung finden können. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Rattenstudien auf den Menschen sind somit sehr eingeschränkt.

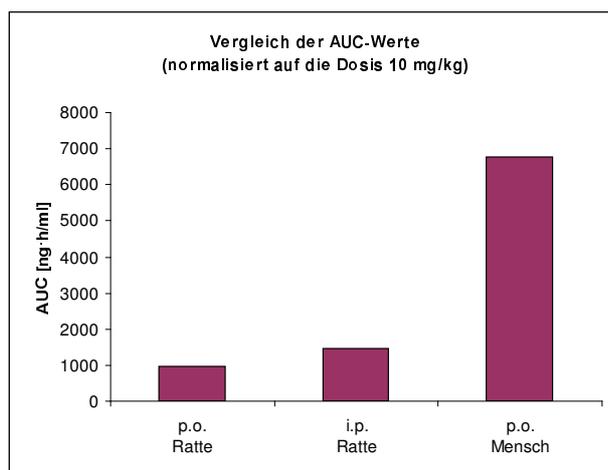


Abb. 47: Darstellung der Plasma-AUC-Werte der R(+)- α -Liponsäure nach Dosisanpassung für Ratte und Mensch.

In-vitro Testmodelle

Nach oraler Gabe von R(+)- α -Liponsäure innerhalb des pharmakologisch wirksamen Dosierbereiches wurden Plasmakonzentrationen im Bereich von 4000 ng/ml in der Ratte (Tabelle 5, Kapitel 5.1.1) und 10 000 ng/ml im Menschen (Tabelle 24, Kapitel 5.2.2.) erreicht. Es konnte in dieser Arbeit in der narkotisierten Ratte nach Infusion gezeigt werden (Kapitel 5.1.4), daß basierend auf einer Proteinbindung von 80 % nur maximal 20 % dieser Plasmakonzentrationen für die Distribution ins Gewebe als freie ungebundene Gewebekonzentration (Kapitel 5.1.4, Muskel) zur Verfügung stand. Das entspricht circa 800 ng/ml (4 μ mol/l) in der Ratte oder 2 000 ng/ml (10 μ mol/l) im Menschen nach oraler Gabe. Nach intravenöser Gabe lagen diese Werte um den Faktor 10 höher. Für in-vitro Versuche sollten Konzentrationen im Bereich von 10 – 100 μ mol/l eingesetzt werden. Wirksame Konzentrationen, die über diesen Bereich liegen, können nur Aufschluß über mögliche Wirkmechanismen geben, haben aber keine therapeutische Relevanz.

6.2.2 Mögliche Wirkungspotentiale der Metaboliten

Im folgenden Kapitel werden mögliche Wirkungspotentiale der Metaboliten diskutiert. Es sollte nicht außer Acht gelassen werden, daß nicht nur die Muttersubstanz sondern auch ein oder mehrere Metaboliten für die Wirkung verantwortlich gemacht werden könnten. Aus diesem Grund wurde in der Arbeit die Pharmakokinetik im Plasma und im Gewebe untersucht, um eine mögliche Korrelation zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik erarbeiten zu können.

Steigerung der Pyruvat-Dehydrogenase-Enzym-Aktivität

E2-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes (Dihydrolipoyl-Transacetylase)

Die Inkorporation der R(+)- α -Liponsäure in die Lipoyl-Domäne der Pyruvat-Dehydrogenase ist sehr spezifisch und unter normalen Umständen würde nur die physiologische R(+)- α -Liponsäure als Cofaktor akzeptiert werden. Der *Escherichia coli* Bakterien-Stamm JRG26 ist nicht in der Lage, α -Liponsäure selbst herzustellen. Um wachsen zu können, muß R(+)- α -Liponsäure exogen zugeführt werden. In den Untersuchungen von Loeffelhardt konnte sowohl unter Zusatz von R(+)- α -Liponsäure, aber auch von S(-)- α -Liponsäure, RS-Dithiolan-3-capronsäure (Homoliponsäure) und RS-Bisnorliponsäure (BNLA) ein Zellwachstum beobachtet werden. Im Gegensatz zum R-Enantiomer waren aber 10^4 bis 10^7 -fach höhere Konzentrationen notwendig. Der Zusatz von RS-Tetranorliponsäure (TNLA) zeigte kein Zellwachstum [Loeffelhardt et al, 1996].

Der *Escherichia coli* Bakterien-Stamm ist demnach auch unter Zufuhr von Liponsäureanaloga mit verschiedenen Kohlenstoffkettenlängen in der Lage, zu wachsen. Es ist möglich, α -Liponsäureanaloga in den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex als wirksame Cofaktoren einzubauen.

Die Inkorporation von RS-Bisnorliponsäure, einem beschriebenen Metaboliten der α -Liponsäure, in den Pyruvat-Dehydrogenase-Enzym-Komplex ist bemerkenswert. Es sind aber 10^7 -fach höhere Konzentrationen im Vergleich zu der R(+)- α -Liponsäure notwendig, und damit ist es sehr unwahrscheinlich, daß dieser Einbau im Organismus für die pharmakologische Aktivität der α -Liponsäure zusätzlich von Relevanz ist.

E3-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes (Dihydrolipoyl-Dehydrogenase)

Die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (aus Rinderherz) bevorzugt die Umsetzung der R(+)- α -Liponsäure. In den Untersuchungen von Loeffelhardt zeigte sich aber, daß auch strukturverwandte Analoga, die S(-)- α -Liponsäure, die RS-Dithiolan-3-capronsäure (Homoliponsäure), die RS-Bisnorliponsäure und die RS-Tetranorliponsäure, als Substrat akzeptiert wurden [Loeffelhardt et al, 1995]. Die Umsetzungsrate war aber deutlich schwächer, um den Faktor 10 – 100, verglichen mit dem R-Enantiomer.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, da nur das razemische Gemisch der verschiedenen Metaboliten und α -Liponsäure-Analoga auf ihre Enzymaktivität untersucht worden ist. Da aber die R-Form der Muttersubstanz gegenüber der S-Form bevorzugt wurde, liegt die Vermutung nahe, daß auch die R-Form der getesteten Analoga bevorzugt umgesetzt werden wird.

Regulation des Blutzuckerspiegels durch Verminderung der Acetyl-Co-Konzentration

Regulation des NADH/NAD⁺- Gleichgewichts

α -Liponsäure ist in der Lage, das Redox-Gleichgewicht in der Zelle und damit das NADH/NAD⁺- und das Laktat/Pyruvat-Verhältnis wieder zu normalisieren (Kapitel 2.2.4). Außerdem vermindert α -Liponsäure die Acetyl-CoA-Konzentrationen, und verhindert dadurch, daß die Glukoneogenese aktiviert und Glukose gebildet wird. Der entscheidende Schritt für diese Regulation findet an der E3-Untereinheit des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes (Dihydrolipoyl-Dehydrogenase) statt – dort wird die α -Liponsäure zur Dihydroliponsäure reduziert. Mit den jetzt freien SH-Gruppen kann die Dihydroliponsäure an Stelle des CoA die Acetyl-Gruppe von der E2-Untereinheit der PDH als Acetylipoat übernehmen [Singh und Bowman, 1970 und Wagh et al, 1987].

Die Metaboliten Tetranorliponsäure und Bisnorliponsäure verfügen wie die Muttersubstanz über einen intakten Dithiolan-Ring und werden als Substrat an der E3-Untereinheit in ihre reduzierte Form überführt. Dadurch stehen auch sie prinzipiell für die Übernahme von Acetylgruppen zur Verfügung.

Ein anderer vermuteter Erklärungsansatz macht die Bildung von Lipoyl-CoA, aber auch Bisnorlipoyl-CoA und Tetranorlipoyl-CoA verantwortlich für das Absenken der Acetyl-CoA-Konzentrationen [Khamaisi et al, 1999; Blumenthal 1984; Singh und Bowman, 1970]. α -Liponsäure oder ihre β -Oxidationsprodukte unterdrücken die Fettsäureoxidation, indem diese über die Carboxylgruppe das HSCoA intramitochondrial abfangen und Lipoyl-CoA, Bisnorlipoyl-CoA oder Tetranorlipoyl-CoA bilden. Damit sind neben der Muttersubstanz auch die Metaboliten TNLA und BNLA in der Lage, in die Regulation der PDH-Aktivität und nachfolgender Stoffwechselreaktionen einzugreifen.

Regulation des Blutzuckerspiegels durch Aktivierung der Glukosetransporter

R(+)- α -Liponsäure stimuliert die Glukoseaufnahme, indem sie zum einen wie das Insulin die verantwortliche Signaltransduktionskette aktiviert und dadurch die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 induziert. Möglicherweise kann sie auch einen direkten Einfluß auf den Glukosetransporter ausüben [Packer 1998, Yaworsky et al, 1998 und 2000]. Untersuchungen mit Octansäure, einem Fettsäure-Analoga der α -Liponsäure, zeigten aber keinerlei Wirkung auf die Glukoseaufnahme. Die Fettsäurestruktur der Wirksubstanz ist demnach nicht die Ursache für die Stimulation [Packer, 1998]. Wie der Mechanismus erklärt werden kann und welche Wirkstruktur notwendig ist, ist noch nicht aufgeklärt.

Es liegen keine weiteren Untersuchungen vor, in denen getestet wurde, ob auch die Metaboliten TNLA, BNLA, BMOA, BMHA und BMBA eine Wirkung auf die Glukoseaufnahme haben, indem sie die Translokation der Glukosetransporter stimulieren oder ob diese Fähigkeit nur der Muttersubstanz zugeschrieben werden kann.

Wirkung als Antioxidans

α -Liponsäure und Dihydroliponsäure als Redoxpaar sind in der Lage als Antioxidantien den Organismus vor Radikale zu schützen (Kapitel 2.2.4). Der Schutzmechanismus der Zelle besteht aus Glutathion, Vitamin C und Vitamin E. Diese Antioxidantien unterliegen einem ständigen Verbrauch und nur Glutathion kann intrazellulär regeneriert werden. Es zeigte sich, daß bei hohem oxidativem Stress der Glutathion-Spiegel drastisch erniedrigt ist. Durch das Redoxpotential des α -Liponsäure / Dihydroliponsäure–Redoxpaares, welches niedriger als das des Glutathion-Systems ist, kann die α -Liponsäure in ihrer reduzierten Form in das Netzwerk der Antioxidantien eingreifen und diese wieder regenerieren. In dieser Art und Weise wird die Reduktionskraft in der Zelle gestärkt [Packer, 1996, 1998 und 1999; Biewenga et al, 1997a]. Das Redoxpotential des Reaktionspaar Dihydroliponsäure / α -Liponsäure beträgt $-0,294$ [Sanadi et al, 1959; pH 7,1; 22 °C] und $-0,325$ V [Reed, 1966; pH 7,0, 25 °C]. Das Redoxpaar GSH / GSSG hat ein Redoxpotential von $-0,25$ V [Scott et al, 1963; pH 6,8; 30 °C]. Auch TNLA und BNLA, die hier beschriebenen Metaboliten der α -Liponsäure, sind in der Lage in das Netzwerk der Antioxidantien im Organismus einzugreifen [Biewenga et al, 1997b].

Wirkung als Radikalfänger

Das Redoxpaar α -Liponsäure und Dihydroliponsäure ist in der Lage Radikale abzufangen (Kapitel 2.4). α -Liponsäure fängt vor allem Hydroxylradikale (HO^\bullet), unterchlorige Säure (HOCl), Peroxinitrit ($\text{NO}_2\text{-O}^\bullet$) und einzelne Sauerstoffatome, die Dihydroliponsäure zusätzlich Superoxid- ($\text{O}_2^{\bullet -}$) und Peroxyl-Radikale (HOO^\bullet) ab [Packer, 1999].

Auch die Metaboliten TNLA und BNLA sind in der Lage als Radikalfänger im Organismus zu fungieren [Biewenga et al 1997b].

Wirkung als Chelatkomplexbildner

Dihydroliponsäure und α -Liponsäure sind in der Lage über ihre Carboxylgruppe oder über die Schwefelatome Chelatkomplexe mit Metallionen einzugehen und können somit als Antioxidantien wirken (Kapitel 2.2.4). Die antioxidante Eigenschaft kommt dadurch zustande, daß entweder ein Komplex gebildet wird, in dem alle Koordinationsstellen für O_2 besetzt sind oder daß die Elektronendichte von dem Metallion zum Chelatkomplexbildner ausgeglichen ist, und dadurch kein Elektron zum O_2 transferiert werden kann [Moini et al, 2002].

Die antioxidante Eigenschaft als Chelatkomplexbildner hat in-vivo eine bedeutende Rolle in dem Entstehungsprozess von freien Radikalen im Organismus. Obwohl der genaue Mechanismus der Entstehung noch nicht bekannt ist, weiß man, daß Chelatkomplex bildende Stoffe Lipidperoxidation verhindern können.

Auch die Metaboliten Tetranorliponsäure und Bisnorliponsäure besitzen die Eigenschaft Metallionen zu komplexieren. Die gebildeten Chelatkomplexe mit Cu^{2+} , Zn^{2+} und Pb^{2+} zeigen sogar eine höhere Stabilität, verglichen mit der Muttersubstanz. Vermutlich erfolgt der Komplex über ein Schwefelatom in Verbindung mit der Carboxylgruppe [Biewenga et al, 1997a].

Die Metaboliten Tetranorliponsäure und Bisnorliponsäure zeigen damit klar ein Wirkungspotential als Chelatkomplexbildner, das sogar höher einzuschätzen ist als das der Muttersubstanz α -Liponsäure.

Regulation des Blutzuckerspiegels durch Regeneration des Vitamin C

Packer beschreibt die mögliche Verbindung zwischen der antioxidanten Wirkung der α -Liponsäure und der Steigerung des Glukosetransportes in die Zelle [Packer, 1998]. Die unter „oxidativem Stress“ verstärkt gebildete Dehydroascorbinsäure konkurriert mit der Glukose um das Transportsystem. Dadurch wird weniger Glukose in die Zelle aufgenommen. α -Liponsäure in der reduzierte Form ist in der Lage, Dehydroascorbinsäure zu reduzieren und kann somit den Transportweg für die Glukose wieder frei machen. Die mögliche antioxidante Wirkung der Metaboliten ist im vorherigen Abschnitt beschrieben. Betrachtet man aber den hohen Blutglukosespiegel beim Typ II – Diabetes, so scheint diese Konkurrenz weniger von Relevanz zu sein.

6.3 Korrelation zwischen der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik

Die Daten dieser Arbeit und die Ergebnisse aus der Literatur zusammengefaßt zeigen, daß die pharmakologische Potenz der α -Liponsäure sehr komplex ist. Angefangen von der direkten Wirkung auf Enzymaktivitäten (PDH) bis hin zu nicht enzymatischen Eigenschaften (als Radikalfänger, Chelatkomplexbildner und Antioxidans) mit den Möglichkeiten unterschiedlicher Angriffspunkte im Organismus (GSH-Regulierung, Vitamin C und Vitamin E-Regulierung, Abfangen von ROS, usw. [Packer, 1998; Biewenga et al, 1997b]). Diese vielfältigen Eigenschaften gestalten es schwierig, die pharmakodynamische Wirkung in ein einziges Modell einzupassen.

Zusätzlich haben die Metaboliten TNLA und BNLA einen Einfluß auf den Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex, wenn auch in geringerem Ausmaß als das R-Enantiomer der α -Liponsäure, und zeigen Eigenschaften als Chelatkomplexbildner und Radikalfänger mit antioxidanter Wirkung.

Für die Korrelation zwischen der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik ist es erforderlich, für beide Bereiche einen aussagekräftigen und messbaren Parameter zu finden. Für die Pharmakodynamik wurden im Menschen bisher nur unter Belastungszuständen (oraler Glukose-Toleranz-Test oder Insulin-Clamp-Technik) Parameter wie Glukose, Laktat, Pyruvat oder Insulin im Blut gemessen. Unter normalen Lebensumständen im diabetischen Krankheitsverlauf konnte die Wirksamkeit der R(+)- α -Liponsäure oder der Metaboliten noch nicht bewiesen werden.

Was bisher auch gefehlt hat, ist eine genaue Beschreibung der Plasma-Pharmakokinetik, nicht nur der Muttersubstanz R(+)- α -Liponsäure, sondern vor allem ihrer Stoffwechselprodukte. Erstmals wurde die Pharmakokinetik der Muttersubstanz im Plasma, im Interstitium des Muskelgewebes, in verschiedenen Geweben und in-vitro in Hepatozyten bestimmt und wenn möglich mit pharmakokinetischen Modellgleichungen beschrieben.

Es war nicht möglich, die ermittelten Plasma- oder Gewebekonzentrationen sowohl der Muttersubstanz als auch der Metaboliten mit der Wirkung direkt zu korrelieren.

Außerdem konnte die Bedeutung der Behandlungsdauer auf die wirksame Dosierung nicht eindeutig erklärt werden. Durch chronische Behandlung konnte eine deutliche Absenkung der wirksamen Dosierung im Menschen wie im Tier vorgenommen werden. Im Gegensatz zu den pharmakokinetischen Ergebnissen spricht diese Beobachtung dafür, daß der Wirkstoff sich im Zielgewebe anreichert und damit längere Zeit verfügbar sein muß. Eine andere Erklärung ist, daß ein einmal gesetzter Effekt möglicherweise durch niedrigere lokale Konzentrationen aufrecht erhalten werden kann.

Lang anhaltende α -Liponsäure-Konzentrationen und damit eine Anreicherung im Gewebe konnte nur in der Aorta nach mehrmaliger oraler Gabe von R(+)- α -Liponsäure (Kapitel 5.1.3.1) und in Nerven nach mehrmaliger intravenöser Gabe von rac- α -Liponsäure (Kapitel 5.1.3.2) gefunden werden.

Es sind möglicherweise nur geringe Menge der R(+)- α -Liponsäure und möglicher wirksamer Metaboliten für die Aufrechterhaltung der Wirkung notwendig. Diese sind über den langen Zeitraum hinweg nicht mehr mit den in dieser Arbeit verwendeten Meßmethoden erfaßbar. Dies erfordert weitaus empfindlichere Meßmethoden, die sowohl die Gewebe- als auch die Plasmakonzentration der Muttersubstanz und der möglicherweise wirksamen Metaboliten in niedrigeren Konzentrationsbereichen nachweisen können.

Es wurden Konzentrationsbestimmungen in verschiedenen Kompartimenten durchgeführt: im zentralen Kompartiment, im peripherem Kompartiment, bis hin in der Zelle selbst. Eine wichtige Erkenntnis war es, daß die Zelle in der Lage ist, R(+)- α -Liponsäure aufzunehmen (Kapitel 5.1.5). Möglicherweise sind diese Konzentrationsbestimmungen aber immer noch zu weit vom Wirkort entfernt, um mit der Wirkung im Zusammenhang gebracht werden zu können. Es sind weitere Konzentrationsbestimmungen direkt am Wirkort notwendig. Zum Beispiel könnte das Mitochondrium in der Zelle, das den Wirkort für verschiedene Multienzymkomplexe darstellt, ein solches relevantes Kompartiment darstellen.

Zusätzlich sind umfangreiche klinische Studien mit langer Behandlungsdauer und einer größeren Studienpopulation notwendig, um die Effekte auch unter normalen mit dem täglichen Leben vergleichbaren Umständen zu beweisen und zu quantifizieren.

Erst dann besteht die Möglichkeit, die Pharmakodynamik mit der Pharmakokinetik der Muttersubstanz und möglicher wirksamer Metaboliten zu korrelieren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

AKERBOOM T.P.M.; PEINADO J.; SIES H.

Lipoattransport in der Leber

In: Borbe H.O.; Ulrich H.; Herausgeber

Thioctsäure „Neue biochemische, pharmakologische und klinische Erkenntnisse zur Thioctsäure“;

Frankfurt am Main: pmi Verlag, 194 - 206, 1989

BENET L.Z.

General Treatment of Linear Mammillary Models with Elimination from Any Compartment as Used in Pharmacokinetics

Journal of Pharmaceutical Sciences, 536 - 541, 1972

BIEWENGA G.P.; GUIDO R.M.M.; BAST, A.

An Overview of Lipoate Chemistry

In: Fuchs, J., Packer, L., Zimmer, G.; Herausgeber

Lipoic Acid in Health and Disease, New York: Marcel Dekker, 1 - 32, 1997a

BIEWENGA G.P.; HAENEN G.R.; BAST, A.

The pharmacology of the antioxidant lipoic acid

Gen. Pharmacol., Nr. 29, 315 - 331, 1997b

BLUMENTHAL S.A.

Inhibition of gluconeogenesis in rat liver by lipoic acid

Biochem. J., Nr. 219, 773 - 780, 1984

CMAMicrodialyse, <http://www.microdialysis.se>, Firma CMA, 2001**CAWELLO W.**

Parameter zur modellunabhängigen Pharmakokinetik

Shaker Verlag, Aachen, 1998

DAVIES B.; MORRIS T.

Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans

Pharmaceutical Research, Vol 10, Nr.7, 1093 – 1095, 1993

DEFRONZO R.A.; TOBIN J.D.; ANDRES R.

Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance

Am. J. Physiol. Vol. 237, Nr. 3, E214 – E223, 1979

DERENDORF H.; GARRETT E.R.

Pharmakokinetik – Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1987

DLUHOLUCKY S.; RAJCANOVA V.; TIMOVA S.; BIELIK E.; GREGOVA E.

Experience with the therapy of Amanita phalloides poisoning in children

Cesk. Pediatr. Vol. 35, Nr. 5 – 6, 276 – 280, 1980

ELMQUIST W.F.; SAWCHUK R.J.

Application of Microdialysis in Pharmacokinetic Studies,

Pharmaceutical Research, Vol. 14, Nr. 3, 267 - 288, 1997

ESTRADA D.E.; EDWART H.S.; TSAKIRIDIS T.; VOLCHUK A.; RAMLAL T.; TRITSCHLER H.; KLIP A.Stimulation of Glucose Uptake by the Natural Coenzyme α -Lipoic Acid/Thioctic Acid

Diabetes, Vol. 45, 1798 - 1804, 1996

EVANS J.L.; GOLDFINE I.D. α -Lipoic Acid: A Multifunctional Antioxidant That Improves Insulin Sensitivity in Patients with Type 2 Diabetes

Diabetes Technology & Therapeutics, Vol. 2, Nr. 3, 401 - 413, 2000

GIBALDI M.; PERRIER D.

Pharmacokinetics

Marcel Dekker, Inc. New York, Basel Hong Kong, 1982

GUIDANCE FOR INDUSTRY –BIOANALYTICAL METHODS VALIDATION

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
Center for Veterinary Medicine (CVM) , Draft Guedance, Mai 2001

GUIDANCE FOR INDUSTRY – BIOANALYTICAL METHODS VALIDATION FOR HUMAN STUDIES

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Draft Guedance, Dezember 1998

HARAMAKI N.; HAN D.; HANDELMAN G.; TRITSCHLER H.J.; PACKER L.

Cytosolic and Mitochondrial Systems for NADH- and NADPH-dependent Reduction of α -lipoic acid
Free Radical Biology & Medicine, Vol 22, Nr. 3, 535 - 542, 1997

HERMANN R.; GLEITER C.H.; NIEBCH G.; RUUS P.; WILDGRUBE H.J.; NOWAK H.

α -Liponsäure (Thioctsäure) – aktueller Stand zur enantioselektiven Pharmakokinetik bei Gesunden und Diabetikern
Diabetes und Stoffwechsel, Suppl. 3, Nr. 5, 5 – 11, 1996

HERMANN R.; NIEBCH G.

Human Pharmacokinetics of α -Lipoic Acid
In: Fuchs J.; Packer L.; Zimmer G. (Herausgeber):
Lipoic Acid in Health and Disease
Marcel Decker, Inc, New York, Basel, Hong Kong, 337 – 360, 1997

JACOB S.; HENRIKSEN E.J.; SCHIEMANN A.L.; SIMON I.; CLANCY D.E.; TRITSCHLER H.J.; JUNG W.I.; AUGUSTIN H.J.; DIETZE G.J.

Enhancement of Glucose Disposal in Patients with Type 2 Diabetes by Alpha-lipoic Acid
Arzneimittel-Forschung (Drug Res.) Vol. 45 (II), Nr. 8, 872 - 874, 1995

JACOB S.; HENRIKSEN E.J.; TRITSCHLER H.J.; AUGUSTIN H.J.; DIETZE G.J.

Short Communications: Improvement of insulin-stimulated glucose-disposal in typ 2 diabetes after repeated parenteral administration of thioctic drug
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes, Vol. 104, 284 - 288, 1996a

JACOB S.; CLANCY DE, SCHIEMANN A.L; SIMON I.; JUNG W.I.; HENRIKSEN E.J.; TRITSCHLER H.J; AUGUSTIN H.J.; DIETZE G.J.

Verbesserung der Glucoseverwertung bei Patienten mit Typ-II-Diabetes mellitus unter α -Liponsäure (Thioctsäure)
Diabetes und Stoffwechsel, Vol. 5, Suppl. (3), 64 - 70, 1996b

JACOB S.; STREEPER R.S.; FOGT D.L.; HOKAMA J.Y.; TRITSCHLER H.J.; DIETZE G.J.; HENRIKSEN E.J.

The Antioxidant α -Lipoic Acid Enhances Insulin-Stimulated Glucose Metabolism in Insulin-Resistant Rat Skeletal Muscle
Diabetes, Vol. 45, 1024 - 1029, 1996c

JACOB S.; RUUS P.; HERMANN R.; TRITSCHLER H.J.; MAERKER E.; RENN E.; AUGUSTIN H.J.; DIETZE G.J.; RETT K.

Oral administration of rac- α -lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo controlled pilot trial
Free Rad. Biol. Med., Nr. 27, 309 – 314, 1999a

JACOB S.; RETT K.; HENRIKSEN E.J.; HÄRING H.-U.

Thioctic acid – effects on insulin sensitivity and glucose-metabolism
BioFactors, Nr. 10, 169 – 174, 1999b

KHAMAISI M.; ASSAF R, POTASHNIK R.; TRITSCHLER H.J.; GUTMANN A; BASHAN N.

Lipoic Acid Acutely Induces Hypoglycemia in Fasting Nondiabetic and Diabetic Rats Metabolism, Vol. 48, Nr. 4, 504 – 510, 1999

KHAMAISI M.; POTASHNIK R.; TIROSH A, DEMSHCHAK E.; RUDICH A.; TRITSCHLER H.J.; WESSEL K.; BASHAN N.

Lipoic Acid Reduces Glycemia and Increases Muscle GLUT4 Content in Streptozotocin-Diabetic Rats
Metabolism, Vol. 45, Nr. 7, 763 – 768, 1997

KLEEMANN A.; BORBE H.O.; ULRICH H.

Thioctsäure: α -Liponsäure
In: Borbe H.O., Ulrich H. Herausgeber: Thioctsäure: neue biochemische, pharmakologische und klinische Erkenntnisse zur Thioctsäure
PMI Verlag, Frankfurt, 11 – 26, 1989

KONRAD T.; BÖHLES H.J.; VICINI P.; SEWELL A.; KUSTERER K.; TRITSCHLER H.J.; HÖFLICH A.; COBELLI C.; ASSADKHANI A.; USADEL K.H.

α -Lipoic Acid Treatment Decreases Serum Lactate and Pyruvate Concentrations and Improves Glucose Effectiveness in Lean and Obese Patients With Type 2 Diabetes
Diabetes Care, Vol. 22, Nr. 2, 280 – 287, 1999

KOVAR A.; DERENDORF H.

Plasma und freie Konzentration, Krankenhaus-Pharmazie,
18. Jahrgang, Nr. 12, 564 - 565, 1997

KOVAR A.; NOLTING A.; DERENDORF H.

Mikrodialyse zur Bestimmung freier Arzneistoffe in Geweben,
Pharmazie in unserer Zeit, 26. Jahrg., 17 - 23, 1997

KRAFT A.

Entwicklung und Validierung eines Testsystems zur Bestimmung von α -Liponsäure und ihrer bekannten Metaboliten aus Mikrodialysat mittels HPLC und elektrochemischer Detektion
Diplomarbeit der Fachhochschule Darmstadt, 2001

LANG G.

In-vitro Metabolisierung von α -Liponsäure unter besonderer Berücksichtigung enantioselektiver Biotransformation
Dissertation, Fachbereich Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 1992

LEE C.; BRANTER D.; GAMBERTOGGIO J.; BENET, L.

Disposition kinetics of ethambutol in man
Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Vol. 8, No. 4, 1980

LOCHER M.; BUSKER E.; BORBE H.O.

Metabolism of α -lipoic acid in human volunteers
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, Nr. 351, R52, 1995

LOEFFELHARDT S.; BORBE H.O.; LOCHER M.; BISSWANGER H.

In vivo incorporation of lipoic acid enantiomers and homologues in the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*
Biochimica et Biophysica Acta, Nr. 1297, 90 - 98, 1996

LOEFFELHARDT S.; BONAVENTURA C.; LOCHER M.; BORBE H.; BISSWANGER H.

Interaction of α -lipoic acid enantiomers and homologues with the enzyme components of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex
Biochemical Pharmacology, Vol. 50, Nr. 5, 637 - 646, 1995

MALIK R.A.

The Pathology of Human Diabetic Neuropathy
Diabetes, Vol. 46, Suppl. 2, S50 – S53, 1997

MARSHALL A.W.; GRAUL R.S.; MORGAN M.Y.; SHERLOCK S.

Treatment of alcohol-related liver disease with thioctic acid: a six month randomised double-blind trial
Gut 23, Nr. 12, 1088 – 1092, 1982

MCCANCE K.L.; HUETHER S.E.

Pathophysiology
The Biologic Basis for Disease in Adults and Children
Third Edition, Mosby, 673 – 694, 1997

MUTSCHLER E.; GEISSLINGER G.; KROEMER H.K.; SCHÄFER-KORTING M.

Mutschler Arzneimittelwirkungen
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 399 – 419, 2001

MÖLLER E.; SCHMITT R.

Ein Beitrag zur Behandlung chronischer Lebererkrankungen
Med. Klein. 71 (43), 1831 – 1835, 1977

MOINI H.; PACKER L.; SARIS N-E. L.

REVIEW Antioxidant und Prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid
Toxicology and Applied Pharmacology, Nr. 182, 84 - 90, 2002

NIEBCH G.; BÜCHELE B.; BLOME J.; GRIEB S.; BRANDT G.; KAMPA P.; RAFFEL H.H.; LOCHER M.; BORBE H.O.; NUBERT I.; FLEISCHHAUER I.

Enantioselective high-Performance Liquid Chromatography Assay of R(+)- and S(-)- α -Lipoic Acid in Human Plasma
Chirality, Nr. 9, 32 - 36, 1997

NIEBCH G.; ELENA P.P.; KÖTTING J.

rac- α -Lipoic acid (D-20557): Studies on the enantioselectivity of pharmacokinetics in male and female rats following single intravenous or oral administration of the racemate (20 mg/kg)
Bericht ASTA Medica AG D-20557/7093130008, nicht publiziert, 1996

OEHRING R.; BISSWANGER H.

Incorporation of enantiomers of lipoic acid into the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli* in vivo,
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, Vol. 373, 333 - 335, 1992

OU P.; TRITSCHLER H.J.; WOLFF S.P.

Thioctic (Lipoic) Acid: A Therapeutic Metal-Chelating Antioxidant?
Biochemical Pharmacology, Vol. 50, 123 – 126, 1995

PACKER L.; WITT E.H.; TRITSCHLER H.J.

α -lipoic acid as a biological antioxidant
Free Radical Biology & Medicine Nr. 19, 227 - 250, 1995

PACKER L.

Oxidative Stress and Antioxidants: The Antioxidant Network, α -Lipoic Acid and Diabetes
In: Packer, L., Rösen, P.; Tritschler, H.J., Kling G.L., Azzi, A. (Herausgeber):
Antioxidants in Diabetes Management
Marcel Decker, Inc, New York, Basel, 1 - 13, 1998

PACKER L.

Oxidative stress, the antioxidant network, and prevention of diabetes complications by α -lipoic acid
Environmental & Nutritional Interactions, Nr. 3, 47 – 76, 1999

PACKER L.

Lipoic acid (Thioctic Acid): Antioxidant Properties and their Clinical Implications
Diabetes und Stoffwechsel, Suppl. 3, Nr. 5, 98 –101, 1996

PEINADO J.; SIES H.; AKERBOOM T.P.M.

Hepatic Lipoate Uptake
Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 273, Nr. 2, 389 - 395, 1989

PETER G.; BORBE H.O.

Untersuchungen zur Absorption und Verteilung der Thioctsäure als Grundlage der klinischen Wirksamkeit bei der Behandlung der diabetischen Polyneuropathie
Diabetes und Stoffwechsel, Suppl. 3, Nr. 5, 12 – 16, 1996

PETER G.

Orientating studies on the pharmacokinetics of racemic [14C] α -lipoic acid in the rat following single intravenous or oral administration
Bericht ASTA Medica AG D-20557/7091050003, nicht publiziert, 1991

PETER G.

[7,8-¹⁴C]rac- α -lipoic acid: Studies on the pharmacokinetics of racemic [7,8-¹⁴C] α -lipoic acid in the rat following multiple oral administration
Bericht ASTA Medica AG D-20557/7091060004, nicht publiziert, 1994

REED L.J.; DEBUSK B.G.; GUNSALUS I.C.; HORNBERGER JR.

Crystalline α -lipoic acid: A catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase
Science, Nr. 114, 93 - 94, 1951

REED L.J.

Chemistry and function of lipoic acid
In: Florkin M.; Stoltz E.H. eds: Comprehensive Biochemistry: Biological Oxidants
Elsevier, Amsterdam, 99 - 127, 1966

RETT K.; WICKLMAYR M.; MAERKER E.; RUUS P.; NERDICH D.; HERMANN R.; STANDL E.

Effect of acute Infusion of thioctic acid on oxidative and non-oxidative metabolism in obese subjects with NIDDM
European Association for the Study of Diabetes, 31st Annual Meeting Stockholm, Nr. 155, 1995

RETT K.; WICKLMAYR M.; RUUS P.; NERDICH D.; HERMANN R.; STANDL E.

Alpha-Liponsäure (Thioctsäure) steigert die Insulinempfindlichkeit übergewichtiger Patienten mit Typ-II-Diabetes
Diabetes und Stoffwechsel, Suppl. 3, Nr. 5, 59 – 63, 1996

SANADI D.R.; LANGLEY M.; SEARLS R.L.

α -Ketoglutaric dehydrogenase: VI. Reversible oxidation of dihydrothioctamide by diphosphopyridine nucleotide
J. Biol. Chem., Nr. 234, 178 - 182, 1959

SCHEMPH H.; ULRICH H.; ELSTNER E.F.

Stereospecific Reduction of R(+)-Thioctic Acid by Porcine Heart Lipoamide Dehydrogenase/Diaphorase
Z. Naturforsch., Nr. 49c, 691 - 692, 1994

SCHUPKE H.; HEMPEL, R.; PETER G.; HERMANN R.; WESSEL K.; ENGEL J.; KRONBACH T.

New Metabolic Pathways of α -Lipoic Acid
Drug Metabolism and Disposition, Vol. 29, Nr. 6, 855 - 862, 2001

SCHWEITZER J.

Deutschland, zuckerkrankes Wohlstandsland
Frankfurter Allgemeine Zeitung, 19. Mai 2002

SCOTT I.; DUNCAN W.; EKSTRAND V.

Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes
J. Biol. Chem., Vol. 238, 3928 – 3939, 1963

SHIGETA Y.; HIRAIZUMI G.; WADA M.; OJI, K.; YOSHIDA T.

Studie on the serum level of thioctic acid in patients with various disease
J. Vitaminol Vol. 7, 48 – 52, 1961

SINGH H.P.P.; BOWMAN R.H.

Effect of DL- α -lipoic acid on the citrate concentration and phosphofructokinase activity of perfused hearts from normal and diabetic rats
Biochem. And Biophys. Research Commu., Vol. 41, Nr. 3, 1970

SNELL E.E.; STRONG F.M.; PETERSON W.H.

Growth factors for bacteria
Biochem J, Nr. 31, 1789 - 1799, 1937

STEVENS J.L.; BAKKE J.E.

S-Methylation

In: Mulder G.J. (Herausgeber):

Conjugation Reaction in Drug Metabolism

Taylor & Francis, London, New York, Philadelphia, 215 - 272, 1990

STREEPER R.S.; HENRIKSEN E.J.; JACOB S.; HOKAMA J.Y.; DONOVAN L.F.; TRITSCHLER H.J.

Differential effects of lipoic acid stereoisomers on glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle

Am. J. Physiol. Nr. 273 (Endocrinol. Metab. 36), E185 – E191, 1997

STRYER L.

Biochemie – völlig neu bearbeitet Auflage

Aus dem amerikanischen übersetzt von Pfeiffer, B. und Guglielmi, J.

Spektrum der Wissenschaft-Verlagsgesellschaft, Heidelberg, 397, 1990

STRYER L.

Biochemie – 4. Auflage

Aus dem amerikanischen übersetzt von Pfeiffer, B. und Guglielmi, J.

Spektrum, Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 535ff, 599ff, 635ff, 819f, 1996

SUMATHI R.; DEVI V. K.; VARALAKSHMI P.

DL- α -lipoic acid protection against Cadmium induced tissue lipid peroxidation

Med. Sci. Res., Nr. 22, 23 – 25, 1994

TEICHERT J.; PREIB R.

Determination of lipoic acid in human plasma by high performance liquid chromatography with electrochemical detection

Journal of Chromatography, B000, 000-000, 1995

TEICHERT J.; PREIB R.

Metabolic behaviour and pharmacokinetics of α -lipoic acid in patients with renal impairment

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, Nr. 361; R126, 2000

TEUTSCH C.; BRENNAN R. W.

Amanita mushroom poisoning with recovery from coma: a case report

Ann. Neurol. 3, Nr. 2, 177 – 179, 1978

VOET D.; VOET J.G.,

Biochemie

VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 504 - 521, 1992

WAGH S.S.; NATRAJ C.V.; MENON K.K.

Mode of action of lipoic acid in diabetes

J. Biosci., Vol. 11, Nr. 1-4, 59 – 74, 1987

WALGREN J.L.E.; AMANI Z.; McMILLAN J.M.; BUSE M.G.

Effect of R-(+)- α -lipoic acid on pyruvate metabolism and fatty acid oxidation in rat hepatocytes

American Diabetes Association, 62nd Annual Meeting & Scientific Sessions, 1427-P, 2002

YAWORSKY K.; SOMWAR R.; KLIP A.

Interrelationship Between Oxidative Stress and Insulin Resistance

In: Packer L.; Rösen P.; Tritschler H.J.; Kling G.L.; Azzi, A. (Herausgeber):

Antioxidants in Diabetes Management

Marcel Decker, Inc, New York, Basel, 275 - 295, 1998

YAWORSKY K.; SOMWAR R.; RAMLAL T.; TRITSCHLER H.J.; KLIP A.

Engagement of the insulin-sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by α -lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes

Diabetologia, Nr. 43, 294 - 303, 2000

ZIEGLER D.; RELJANOVIC M.; MEHNERT H.; GRIES F.A.

α -Lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: Current evidence from clinical trials

Exp. Clin. Endocrinology & Diabetes Vol. 107, 421 - 430, 1999

ANHANG

A Untersuchungsmodell Ratte

B Untersuchungsmodell Mensch

A Untersuchungsmodell Ratte

A. 1 Individuelle R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen mit Statistik für jeweils 5 männliche Ratten nach intravenöser Gabe von 20 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure).

Intravenöse Gabe											
Zeit [h]	R(+)- α -Liponsäurekonzentrationen [ng/ml]					Statistik					
	Tier Nr. 51-110					Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,033	78790,23	60816,35	75838,98	70149,96	57888,57	68696,82	70149,96	5	5	57888,57	78790,23
0,083	29571,40	24721,16	20804,80	18463,74	27317,29	24175,68	24721,16	5	5	18463,74	29571,40
0,167	11757,26	10832,59	13085,92	10926,21	9853,68	11291,13	10926,21	5	5	9853,68	13085,92
0,50	2107,59	2142,10	3139,70	1176,21	1014,12	1915,94	2107,59	5	5	1014,12	3139,70
1,0	182,83	200,58	205,06	134,56	137,23	172,05	182,83	5	5	134,56	205,06
1,5	88,03	99,12	71,33	71,98	68,74	79,84	71,98	5	5	68,74	99,12
2,0	17,85	17,31	28,00	19,59	25,21	21,59	19,59	5	5	17,31	28,00
3,0	*blq	15,38	15,65	16,51	20,36	15,28	15,65	5	4	blq	20,36
4,0	blq	15,60	21,64	blq	blq	nc	nc	2	0	blq	blq
6,0	blq	blq	blq	blq	blq	nc	nc	0	0	blq	blq
8,0	blq	blq	blq	blq	blq	nc	nc	0	0	blq	blq
10,0	nm	nm	nm	nm	nm	nc	nc	0	0	nc	nc

*: blq wurde für die statistische Berechnung auf 8,5 ng/ml gesetzt (LOQ+LOD)/2

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 15 ng/ml)

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq- oder bld-Werte)

n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq- oder bld-Werte)

nm: nicht analysiert

A. 2 Individuelle R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen mit Statistik für jeweils 5 männliche Ratten nach oraler Gabe von 20 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure).

Orale Gabe											
Zeit [h]	R(+)- α -Liponsäurekonzentrationen [ng/ml]					Statistik					
	Tier Nr. 1-50					Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,167	4900,22	3405,77	4465,40	1754,48	5128,53	3930,88	4465,40	5	5	1754,48	5128,53
0,333	3052,20	972,00	1896,19	2274,28	1719,12	1982,76	1896,19	5	5	972,00	3052,20
0,500	566,08	1670,77	1715,27	999,30	1302,80	1250,84	1302,80	5	5	566,08	1715,27
0,667	516,06	578,36	818,17	2015,57	1505,89	1086,81	818,17	5	5	516,06	2015,57
1,0	424,34	440,98	503,88	511,09	822,36	540,53	503,88	5	5	424,34	822,36
1,5	193,53	149,09	383,92	273,72	122,55	224,56	193,53	5	5	122,55	383,92
2,0	122,28	59,04	19,33	158,76	70,11	85,90	70,11	5	5	19,33	158,76
3,0	43,05	28,96	71,23	18,76	99,01	52,20	43,05	5	5	18,76	99,01
4,0	18,24	15,55	15,43	24,83	20,57	18,92	18,24	5	5	15,43	24,83
6,0	blq	15,07	16,97	blq	blq	nc	nc	2	0	blq	16,97

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 15 ng/ml)

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq- oder bld-Werte)

n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq- oder bld-Werte)

A. 3 Individuelle R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen mit Statistik für jeweils 5 männliche Ratten nach intraperitonealer Gabe von 20 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure).

Intraperitoneale Gabe											
Zeit [h]	R(+)- α -Liponsäurekonzentrationen [ng/ml]					Statistik					
	Tier Nr. 111-170					Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,083	19832,77	2120,16	18769,93	7495,80	23617,25	14367,18	18769,93	5	5	2120,16	23617,25
0,167	9858,63	2692,11	3228,38	2890,64	13116,08	6357,17	3228,38	5	5	2692,11	13116,08
0,333	1598,80	919,78	2580,41	3192,99	1269,95	1912,39	1598,80	5	5	919,78	3192,99
0,50	989,44	785,16	694,94	1054,33	995,07	903,79	989,44	5	5	694,94	1054,33
1,0	51,63	39,35	78,20	535,43	58,52	152,63	58,52	5	5	39,35	535,43
1,5	35,00	32,30	26,92	37,74	26,05	31,60	32,30	5	5	26,05	37,74
2,0	18,84	25,85	21,10	20,79	18,38	20,99	20,79	5	5	18,38	25,85
3,0	21,43	18,24	18,99	19,02	17,53	19,04	18,99	5	5	17,53	21,43
4,0	18,54	20,73	17,01	31,47	20,22	21,59	20,22	5	5	17,01	31,47
6,0	blq	blq	blq	blq	blq	nc	nc	0	0	blq	blq
8,0	blq	blq	blq	blq	blq	nc	nc	0	0	blq	blq
10,0	blq	blq	blq	blq	blq	nc	nc	0	0	blq	blq

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 15 ng/ml)

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq-Wert)

n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

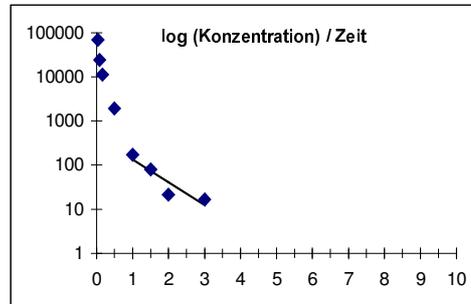
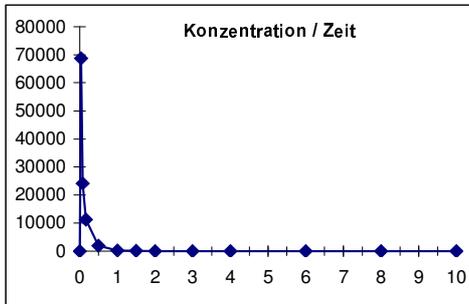
nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq- oder bld-Werte)

A. 4 Nicht kompartimentelle Auswertung: Graphische Darstellung der mittleren R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen (n=5) im Plasma nach intravenöser, oraler und intraperitonealer Applikation von Dexlipotam (20 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

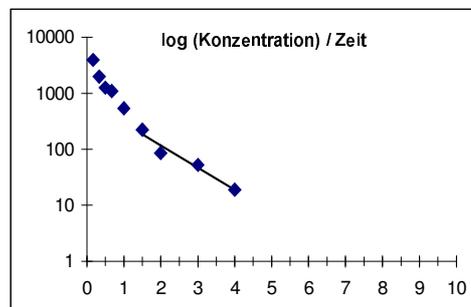
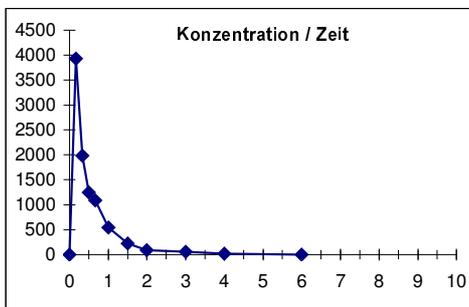
Rechts: Lineare Darstellung

Links: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast

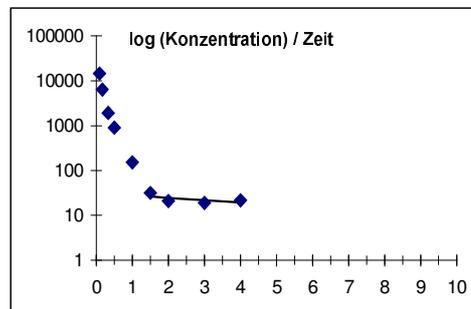
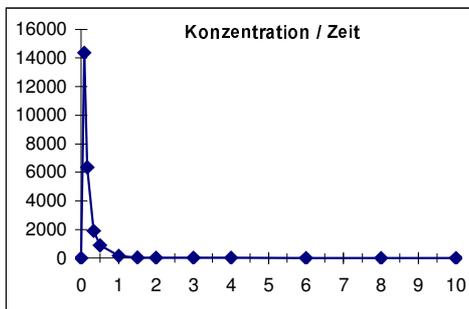
Ratte i.v.



Ratte p.o.



Ratte i.p.



A. 5 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der mittleren R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen (n=5) im Plasma nach intravenöser, oraler und intraperitonealer Applikation von Dexlipotam (20 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Nicht kompartmentelle Auswertung													
Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / R(+)- α -Liponsäure im Plasma (Dosis 20 mg/kg)													
Tier	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-tlast} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	AUMC [ng·h·h/ml]	CL [ml/min/kg]	V _z [l/kg]	V _{ss} [l/kg]	MRT [h]	k [1/h]	r ² (ln)
i.v.	68696,82	0,03	0,56	7774,49	7783,85	0,12	1257,83	42,82	2,09	0,42	0,16	1,23	0,8670
p.o.	3930,88	0,17	0,76	1929,38	1950,26	1,07	1328,20	42,82			0,68	0,91	0,9545
i.p.	14367,18	0,08	5,58	2749,60	2904,76	5,34	2591,00	42,82			0,89	0,12	0,3822

A. 6 Individuelle R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen mit Statistik für jeweils 5 männliche Ratten nach oraler Gabe von 10 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure).

Orale Gabe / Dosis 10 mg/kg											
Zeit [h]	R(+)- α -Liponsäurekonzentrationen [ng/ml]					Statistik					
	Tier Nr. 1-45					Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,167	1122,32	904,68	1660,49	1266,66	1539,35	1298,70	1266,66	5	5	904,68	1660,49
0,333	808,75	342,77	2930,83	412,33	382,95	975,53	412,33	5	5	342,77	2930,83
0,500	391,75	266,34	221,55	328,55	236,48	288,93	266,34	5	5	221,55	391,75
0,667	311,94	177,59	153,93	642,16	259,07	308,94	259,07	5	5	153,93	642,16
1,0	141,04	191,81	229,81	194,41	105,66	172,55	191,81	5	5	105,66	229,81
1,5	167,53	129,87	89,85	81,62	122,70	118,31	122,70	5	5	81,62	167,53
2,0	58,34	99,24	83,39	183,99	42,08	93,41	83,39	5	5	42,08	183,99
3,0	27,20	35,37	blq*	19,75	blq*	19,86	19,75	3	5	blq	35,37
4,0	blq	blq	blq	blq	blq	nc	nc	0	0	blq	blq

*: blq wurde für die statistische Berechnung auf 8,5 ng/ml gesetzt (LOQ+LOD)/2
 blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 15 ng/ml)
 n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq- oder bld-Werte)
 n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung (Median)
 nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq- oder bld-Werte)

A. 7 Individuelle R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen mit Statistik für jeweils 5 männliche Ratten nach oraler Gabe von 30 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure).

Orale Gabe / Dosis 30 mg/kg											
Zeit [h]	R(+)- α -Liponsäurekonzentrationen [ng/ml]					Statistik					
	Tier Nr. 46-116					Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,167	11681,83	2938,12	1055,63	3101,57	1886,43	4132,72	2938,12	5	5	1055,63	11681,83
0,333	11383,00	5731,69	2503,10	1705,95	1954,16	4655,58	2503,10	5	5	1705,95	11383,00
0,500	1739,04	740,35	669,83	718,81	843,71	942,35	740,35	5	5	669,83	1739,04
0,667	1074,62	1409,34	1515,47	2024,31	850,20	1374,79	1409,34	5	5	850,20	2024,31
1,0	1400,28	879,33	771,51	459,97	586,73	819,56	771,51	5	5	459,97	1400,28
1,5	572,83	1165,07	431,74	544,65	2189,46	980,75	572,83	5	5	431,74	2189,46
2,0	645,87	369,90	944,82	413,93	456,29	566,16	456,29	5	5	369,90	944,82
3,0	306,59	44,69	41,90	305,37	26,17	144,94	44,69	5	5	26,17	306,59
4,0	blq*	84,30	130,51	266,52	96,53	117,27	96,53	5	5	blq	266,52
6,0	43,95	blq	21,10	blq	blq	nc	nc	2	2	blq	43,95

*: blq wurde für die statistische Berechnung auf 8,5 ng/ml gesetzt (LOQ+LOD)/2
 blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (< 15 ng/ml)
 n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq- oder bld-Werte)
 n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung (Median)
 nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq- oder bld-Werte)

A. 8 Individuelle R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen mit Statistik für jeweils 5 männliche Ratten nach oraler Gabe von 100 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure).

Orale Gabe / 100 mg/kg											
Zeit [h]	R(+)- α -Liponsäurekonzentrationen [ng/ml]					Statistik					
	Tier Nr. 116-176					Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,167	4687,98	2751,46	3772,25	2676,49	3638,87	3505,41	3638,87	5	5	2676,49	4687,98
0,333	5020,27	3285,26	9595,97	1820,99	3036,40	4551,78	3285,26	5	5	1820,99	9595,97
0,500	2915,20	3998,64	3530,88	2822,96	3462,16	3345,97	3462,16	5	5	2822,96	3998,64
0,667	2294,56	3247,38	954,08	1018,11	3566,93	2216,21	2294,56	5	5	954,08	3566,93
1,0	1116,01	2494,19	950,27	1095,77	2157,13	1562,67	1116,01	5	5	950,27	2494,19
1,5	1902,12	1302,31	1650,31	1302,86	1214,67	1474,45	1302,86	5	5	1214,67	1902,12
2,0	1582,97	561,27	1290,19	1311,25	1490,56	1247,25	1311,25	5	5	561,27	1582,97
3,0	1266,48	1281,50	881,49	815,20	202,32	889,40	881,49	5	5	202,32	1281,50
4,0	1197,29	895,13	1340,87	1414,49	642,98	1098,15	1197,29	5	5	642,98	1414,49
6,0	1324,87	680,41	1042,04	861,10	521,77	886,04	861,10	5	5	521,77	1324,87
8,0	37,17	44,64	119,50	50,07	55,74	61,42	50,07	5	5	37,17	119,50
10,0	28,87	33,96	49,42	18,40	47,86	35,70	33,96	5	5	18,40	49,42

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq- oder bld-Werte)

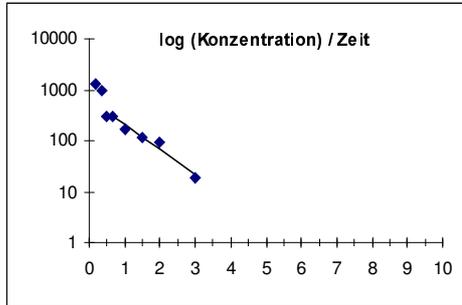
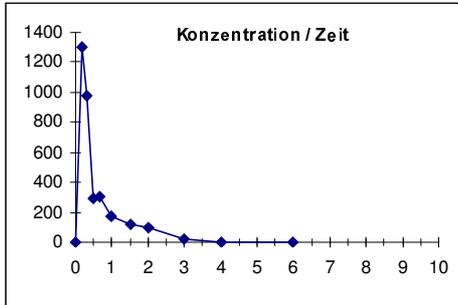
n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq- oder bld-Werte)

**A. 9 Nicht kompartimentelle Auswertung: Graphische Darstellung der mittleren R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen (n=5) im Plasma nach oraler von verschiedener Dosierungen von Dexlipotam (10, 30 und 100 mg/kg bezogen auf die freie Säure).
Links: Lineare Darstellung
Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast**

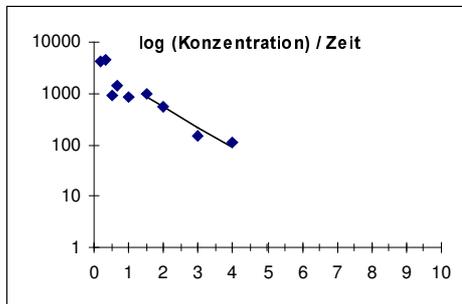
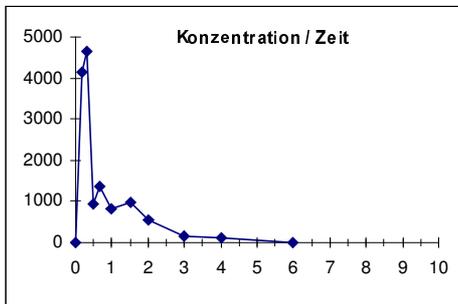
Ratte

10 mg/kg



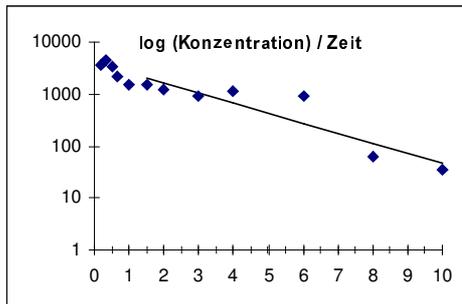
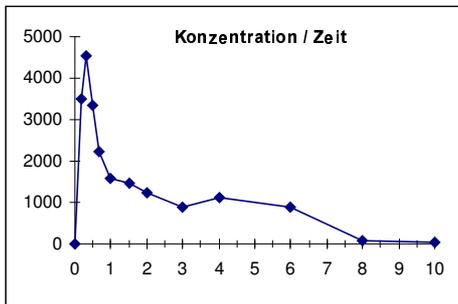
Ratte

30 mg/kg



Ratte

100 mg/kg



A. 10 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der mittleren R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen (n=5) im Plasma nach oraler Applikation von verschiedener Dosierungen von Dexlipotam (10, 30 und 100 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

Nicht kompartmentelle Auswertung										
Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / R(+)- α -Liponsäure im Plasma (Dosis 10, 30 und 100 mg/kg)										
Dosis [mg/kg]	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-tlast} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	AUMC [ng·h·h/ml]	MRT [h]	k [1/h]	r ² (ln)
10	1298,70	0,17	0,63	715,46	736,31	2,83	577,84	0,78	1,10	0,9649
30	4655,58	0,33	0,78	3425,53	3527,70	2,90	3799,84	1,08	0,89	0,9160
100	4551,78	0,33	1,55	9245,61	9347,99	1,10	27107,85	2,90	0,45	0,8451

A. 11 Individuelle Plasmakonzentrationen von R(+)- α -Liponsäure in Ratten nach mehrfacher oraler Applikation (30 mg/kg/Tag Dexlipotam, Dosis bezogen auf die freie Säure).

Plasma		
Zeitpunkt	Tier Nr.	Konzentration [ng/ml]
8. Tag vor Appl.	4	bld
	5	bld
	6	bld
15. Tag vor Appl.	7	bld
	8	bld
	9	bld
22. Tag * 1 h pa	10	174,78
	11	246,81
	12	163,07
23. Tag 24 h pa	13	bld
	14	bld
	15	bld
24. Tag 48 h pa	16	bld
	17	bld
	18	bld

bld: die gemessenen Konzentrationen liegen unterhalb der Detektionsgrenze, LOD = 2 ng/ml

* 22. Tag: letzte Applikation

A. 12 Individuelle Gewebekonzentrationen von R(+)- α -Liponsäure in Ratten nach mehrfacher oraler Applikation (30 mg/kg/Tag R(+)- α -Liponsäure).

Gewebe							
Zeitpunkt	Tier Nr.	ng R(+)- α -Liponsäure / g Gewebe					
		Muskel	Leber	Niere	Herz	Nerven	Aorta
2. Tag vor Appl.	1	< 20	< 20	< 20	< 20	< 58	< 37
	2	< 20	< 20	< 20	< 20	< 53	< 24
	3	< 20	< 20	< 20	< 20	< 58	< 22
8. Tag vor Appl.	4	<40 – 20*	76,48	< 20	< 20	203,0	< 22
	5	< 20	< 20	<40 – 20*	< 20	124,5	< 17
	6	<40 – 20*	< 20	<40 – 20*	< 20	< 109	< 22
15. Tag vor Appl.	7	< 20	< 20	< 20	< 20	348,0	189,6
	8	< 20	< 20	< 20	< 20	< 88	< 30
	9	< 20	< 20	< 20	< 20	< 71	< 37
22. Tag** 1 h pa	10	< 20	180,67	< 20	<40 – 20*	< 37	172,5
	11	< 20	236,04	< 20	<40 – 20*	160,8	81,7
	12	< 20	157,05	< 20	< 20	< 48	46,5
23. Tag 24 h pa	13	< 20	< 20	< 20	< 20	< 36	43,7
	14	< 20	< 20	< 20	< 20	< 41	138,5
	15	< 20	< 20	< 20	< 20	306,6	421,8
24. Tag 48 h pa	16	< 20	< 20	< 20	< 20	< 38	130,0
	17	< 20	< 20	< 20	< 20	< 47	48,6
	18	< 20	< 20	< 20	< 20	<56 – 28*	58,9
26. Tag 96 h pa	19	nm	nm	nm	nm	< 43	< 23
	20	nm	nm	nm	nm	< 29	<32 – 16*
	21	nm	nm	nm	nm	<59 – 29*	< 13
29. Tag 168 h pa	22	nm	nm	nm	nm	< 22	< 14
	23	nm	nm	nm	nm	< 47	< 39 – 19*
	24	nm	nm	nm	nm	< 49 – 25*	< 12
31. Tag 216 h pa	25	nm	nm	nm	nm	< 16	< 9
	26	nm	nm	nm	nm	< 60	< 26
	27	nm	nm	nm	nm	77,1	< 11
36. Tag 336 h pa	28	nm	nm	nm	nm	< 41	< 30 – 15*
	29	nm	nm	nm	nm	< 46	< 15
	30	nm	nm	nm	nm	< 49	< 13
(Kontrolltiere) 22. Tag 1 h pa	31	nm	nm	nm	nm	< 31	< 32
	32	nm	nm	nm	nm	< 24	< 27
	33	nm	nm	nm	nm	< 44	< 21

Bemerkung: Die Nachweisgrenze entspricht 20 ng/g Gewebe (50 mg Probenmaterial in 200 ml Puffer, Muskel, Leber, Herz und Niere) die Quantifizierungsgrenze beträgt 40 ng/g Gewebe
Im Falle von Nerven- und vaskularem Probenmaterial ist die Nachweis- und Bestimmungsgrenze unterschiedlich, da unterschiedliche Mengen eingewogen wurden. Die eingewogenen Mengen schwankten zwischen 8 und 63 mg Nervengewebe und 25 – 112 mg Aortamaterial.

<: die gemessenen Konzentrationen liegen unterhalb der Nachweisgrenze

*: die gemessenen Konz. liegen unterhalb der Bestimmungsgrenze, aber über der Nachweisgrenze

nm: Probe wurde nicht analysiert

** 22. Tag: letzte Applikation

A. 13 Individuelle Gewebekonzentration von α -Liponsäure in Ratten nach mehrfacher intravenöser Applikation (25 mg/kg/Tag rac- α -Liponsäure).

Gewebe / Plasma								
Zeitpunkt	Tier Nr.	ng α -Liponsäure / g Gewebe oder ml Plasma						
		Muskel	Leber	Niere	Herz	Nerven	Aorta	Plasma
29. Tag	6	194,28	716,68	610,32	290,16	2627,75	nm	nm
	7	433,96	151,32	903,80	142,32	2022,50	nm	nm
24 h pa	8	458,76	blq	blq	193,20	3250,50	nm	nm
	1	nm	nm	nm	nm	nm	nm	bld
	2	nm	nm	nm	nm	nm	nm	bld
	3	nm	nm	nm	nm	nm	nm	bld
	4	nm	nm	nm	nm	nm	nm	bld
	5	nm	nm	nm	nm	nm	nm	bld

Bemerkung: Die Nachweisgrenze entspricht 20 ng/g Gewebe (50 mg Probenmaterial in 200 ml Puffer Muskel, Leber, Herz und Niere), die Quantifizierungsgrenze beträgt 40 ng/g Gewebe
 Im Falle von Nervenmaterial wurde nur 40 mg Gewebe zur Untersuchung eingewogen, somit ist die Quantifizierungsgrenze 50 ng/g Gewebe.

nm: Probe wurde nicht analysiert

blq: die gemessene Konzentration liegen unterhalb der Bestimmungsgrenze, LOQ = 20 ng/ml

bld: die gemessene Konzentration liegen unterhalb der Nachweisgrenze, LOD = 4 ng/ml

A. 14 Individuelle Dosierungen und Konzentration der Applikationslösungen der Infusion von nominal 40 mg/kg Dexlipotam (Dosis bezogen auf die freie Säure) gelistet für jede Ratte.

Ratte Nr.		Gewicht [g]	appl. Volumen [ml]	Konz. der Applikationslösung [mg/ml]	Appl. Dosis [mg/Tier]	Appl. Dosis [mg/kg]
1	+	376	-	2,36	-	-
2	+	339	6,67	2,13	14,21	41,9
3		271	6,66	1,70	11,32	41,8
4	+	322	-	2,03	-	-
5		267	6,50	1,68	10,92	40,9
6		295	6,83	1,86	12,70	43,1
7		269	6,57	1,69	11,10	41,3
8		353	6,00	2,35	14,12	40,0
9		310	6,00	2,07	12,72	40,0

+ Tier starb während des Versuchs

A. 15 Individuelle R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma mit Statistik für 5 männliche Ratten nach Infusion von 40 mg/kg Dexlipotam (nominale Dosis bezogen auf die freie Säure).

Infusion											
R(+)- α -Liponsäure im Plasma											
Zeit [h]	Konzentration [ng/ml]					Statistik					
	Tier Nr. 2	Tier Nr. 3	Tier Nr. 5	Tier Nr. 6	Tier Nr. 7	Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0	bld	na	na	na	na	na	na	0	0	na	na
0,083	blq	blq	31,13	nm	nm	nc	nc	1	0	blq	31.13
0,167	12626,80	14784,62	nr	4943,77	8728,03	10270,81	10677,42	4	4	4943,77	14784,62
0,333	15232,21	15191,10	13233,02	8390,42	11460,19	12701,39	13233,02	5	5	8390,42	15232,21
0,667	26342,14	18627,29	17778,49	12014,90	12770,26	17506,62	17778,49	5	5	12014,90	26342,14
0,833	na	na	na	15324,88	12976,50	nc	nc	2	2	12976,50	15324,88
1,000	17754,09	15126,24	15464,05	5284,52	11159,51	12957,68	15126,24	5	5	5284,52	17754,09
1,167	7045,66	3856,67	5866,31	1354,88	3579,14	4340,53	3856,67	5	5	1354,88	7045,66
1,333	na	na	2836,45	939,60	1712,91	1829,65	1712,91	3	3	939,60	2836,45
1,500	1672,11	1027,18	1419,67	369,46	719,21	1041,53	1027,18	5	5	369,46	1672,11
1,833	688,33	293,67	628,65	239,85	375,14	445,13	375,14	5	5	239,85	688,33
2,000	na	206,20	395,55	126,19	223,04	237,75	214,62	4	4	126,19	395,55

Bemerkung: Tier Nr. 1 und Tier Nr. 4 starben während oder am Ende der Infusion, es konnte nur die in-vivo Wiederfindungsrate bestimmt werden

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (< 15 ng/ml)

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq oder bld-Werte)

n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

nc: nicht kalkuliert (in dem Fall, wenn mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen blq- oder bld-Werte waren)

na: keine Probe entnommen

A. 16 Bestimmung der Proteinbindung in Rattenplasma: In der Tabelle sind die gemessenen Konzentrationen im Puffer und im Plasma gelistet.

Pufferlösung mit R(+)-α-LA versetzt nach UF \cong Gesamtplasmakonzentration			
C_{theor} [ng/ml]	C_{obs} [ng/ml]	Mittel _{arith} [ng/ml]	
500	420,92	452,05	
500	483,18		
2000	1699,15	1587,41	
2000	1475,67		
10000	7307,08	7229,92	
10000	7152,75		
Plasma mit R(+)-α-LA versetzt nach UF \cong Konzentration im Proteinfreien Überstand			
C_{theor} [ng/ml]	C_{obs} [ng/ml]	Mittel _{arith} [ng/ml]	Proteinbindung [%]
500	85,38	86,96	80,76
500	88,53		
2000	207,92	216,66	86,35
2000	225,39		
10000	1749,11	1749,11	75,81
10000	1770,56		
500	93,76	93,76	79,26
500	97,94		
2000	303,80	303,80	80,86
2000	461,78		
10000	1919,06	1919,06	73,46
10000	1589,94		
		Mean_{ar}	79,42

A. 17 Gemessene R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Dialysat dargestellt für 5 männliche Ratten nach Infusion von 40 mg/kg Dexlipotam (nominale Dosis bezogen auf die freie Säure).

Infusion										
R(+)- α -Liponsäure Konzentrationen im Dialysat										
Gemessene Konzentration [ng/ml]										
Zeit [h]	Tier Nr. 2		Tier Nr. 3		Tier Nr. 5		Tier Nr. 6		Tier Nr. 7	
	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II
0,00	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
0,08	blq ¹	88,29	bld	blq	+221,57	+bld	+bld	48,15	bld	43,86
0,25	102,15	214,87	+306,21	+311,87	71,48	77,12	81,99	103,85	116,06	94,47
0,42	135,33	268,95	80,80	281,40	+319,37	+294,85	bld	150,91	107,75	139,44
0,58	157,52	285,78	+375,90	+449,21	151,81	115,91	130,31	126,41	166,66	135,10
0,75	210,71	273,70	140,08	351,37	+345,15	+281,36	+bld	160,59	118,64	143,11
0,92	207,52	206,09	+374,05	+481,98	238,84	154,58	160,84	178,99	186,94	140,36
1,08	197,27	339,18	87,00	289,63	+345,97	+272,07	+bld	86,82	121,20	134,78
1,25	126,79	205,84	+217,80	+284,65	77,89	blq ²	53,95	blq	67,41	61,92
1,42	99,30	157,70	bld	90,95	+202,33	+178,51	+bld	blq	46,33	36,21
1,58	78,59	145,43	+bld	+194,84	bld	45,39	bld	bld	blq	blq
1,75	59,11	113,54	bld	40,40	nr	bld	+bld	bld	nm	nm
1,92	++	++	+bld	+bld	bld	bld	bld	bld	nm	nm
2,08	nm	nm	bld	blq	+bld	+bld	+bld	bld	nm	nm
2,25	nm	nm	+bld	+bld	bld	bld	bld	bld	nm	nm
2,42	nm	nm	bld	blq	+bld	+bld	+bld	bld	nm	nm
2,58	nm	nm	+bld	+bld	bld	bld	bld	bld	nm	nm
2,75	nm	nm	bld	blq	+bld	+bld	+bld	bld	nm	nm
2,92	nm	nm	+bld	+bld	bld	bld	nm	bld	nm	nm
3,08	nm	nm	bld	blq	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
3,25	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nm	bld	nm	nm
3,42	nm	nm	bld	blq	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
3,58	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nm	bld	nm	nm
3,75	nm	nm	bld	blq	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
3,92	nm	nm	+bld	+blq	nm	nm	nm	bld	nm	nm
4,08	nm	nm	bld	blq	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
4,25	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nm	bld	nm	nm
4,42	nm	nm	bld	blq	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
4,58	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nm	bld	nm	nm
4,75	nm	nm	bld	blq	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
4,92	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nm	bld	nm	nm

Bemerkung: Tier Nr. 1 und Tier Nr. 4 starben während oder am Ende der Infusion, es konnte nur die in-vivo Wiederfindungsrate bestimmt werden

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 24 ng/ml, Verdünnungsfaktor 2,4)

blq¹: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 48 ng/ml, Verdünnungsfaktor 2,4)

blq²: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 36 ng/ml, Verdünnungsfaktor 2,4)

nm: nicht analysiert

nr: es wurde kein Ergebnis ermittelt

+: Analytischer Lauf wurde nicht akzeptiert

++: Tier starb nach 1,750 h

A. 18 Individuelle freie extrazelluläre R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Muskel mit Statistik für 5 männliche Ratten nach Infusion von 40 mg/kg Dexlipotam (nominale Dosis bezogen auf die freie Säure).

Infusion										
R(+)- α -Liponsäure										
Freie extrazelluläre Konzentration [ng/ml]										
Zeit [h]	Tier Nr. 2		Tier Nr. 3		Tier Nr. 5		Tier Nr. 6		Tier Nr. 7	
	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II
0,00	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
0,08	^b blq	1261,29	bld	blq				687,87	^a blq	626,64
0,25	1459,29	3069,57			1021,17	1101,74	1171,28	1483,61	1658,06	1349,55
0,42	1933,29	3842,14	1154,23	4020,00				2155,89	1539,29	1991,93
0,58	2250,29	4082,57			2168,74	1655,86	1861,53	1805,90	2380,90	1929,98
0,75	3010,14	3910,00	2001,09	5019,63				2294,16	1694,81	2044,46
0,92	2964,57	2944,14			3412,01	2208,31	2297,67	2556,99	2670,62	2005,20
1,08	2818,14	4845,43	1242,79	4137,53				1240,35	1731,50	1925,49
1,25	1811,29	2940,57			1112,71	^c blq	770,70	^c blq	963,05	884,61
1,42	1418,57	2252,86	^a bld	1299,22				^a blq	661,85	517,27
1,58	1122,71	2077,57			bld	648,48	bld	bld	blq	blq
1,75	844,43	1622,00	^a bld	577,13				^a blq		
1,92										

Bemerkung: Tier Nr. 1 und Tier Nr. 4 starben während oder am Ende der Infusion, es konnte nur die in-vivo Wiederfindungsrate bestimmt werden

^abld: unterhalb der Nachweisgrenze (wurde 0 ng/ml gesetzt)

^bblq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (wurde für die Statistik auf 514,3 ng/ml ((LOD+LOQ)/2) gesetzt)

^cblq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (wurde für die Statistik auf 428,6 ng/ml ((LOD+LOQ)/2) gesetzt)

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 685,7 oder 514,3 ng/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 342,9 ng/ml)

zu A. 18

Statistik						
Zeit [h]	Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,00	nc	nc	0	0	bld	bld
0,08	nc	nc	3	3	bld	1263,91
0,25	1539,29	1404,43	8	8	1021,17	3069,63
0,42	2376,98	1991,93	7	7	1154,23	4020,00
0,58	2266,96	2049,36	8	8	1655,86	4082,50
0,75	2853,78	2294,16	7	7	1694,81	5019,63
0,92	2632,45	2613,81	8	8	2005,20	3412,01
1,08	2563,31	1925,49	7	7	1240,35	4847,45
1,25	1167,50	923,83	6	8	blq	2940,58
1,42	878,87	661,85	5	7	bld	2255,25
1,58	nc	nc	3	3	bld	2077,51
1,75	609,22	577,13	3	5	bld	1624,56
1,92	nc	nc	0	0	bld	bld

Bemerkung: Tier Nr. 1 und Tier Nr. 4 starben während oder am Ende der Infusion, es konnte nur die in-vivo Wiederfindungsrate bestimmt werden

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 685,7 oder 514,3 ng/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 342,9 ng/ml)

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq- oder bld-Werte)

n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

A. 19 Gemessene Bisnorliponsäure-Konzentrationen im Dialysat dargestellt für 5 männliche Ratten nach Infusion von 40 mg/kg Dexlipotam (nominale Dosis bezogen auf die freie Säure).

Infusion										
Bisnorliponsäure im Dialysat										
Zeit [h]	Gemessene Konzentration [ng/ml]									
	Tier Nr. 2		Tier Nr. 3		Tier Nr. 5		Tier Nr. 6		Tier Nr. 7	
	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II
0,00	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
0,08	bld	bld	+bld	+blq	+34,53	+35,59	+bld	+54,18	bld	bld
0,25	bld	bld	+bld	+41,99	bld	bld	67,89	bld	bld	bld
0,42	bld	bld	+bld	+bld	+bld	+38,35	+bld	+87,21	bld	bld
0,58	bld	bld	+30,90	+33,16	bld	bld	224,28	bld	bld	38,57
0,75	bld	bld	+bld	+30,36	+36,29	+32,83	+bld	+68,10	bld	105,76
0,92	blq	bld	+bld	+19,32	blq	blq	bld	99,78	37,46	73,30
1,08	30,99	52,70	+bld	+53,07	+35,49	+34,14	+bld	+blq	77,17	85,42
1,25	bld	blq	+32,33	+41,14	blq	bld	217,24	62,29	92,68	blq
1,42	35,54	bld	+bld	+20,14	+94,74	+33,61	+bld	+15,62	84,80	35,32
1,58	bld	bld	+36,03	+43,99	blq	bld	62,97	39,32	30,17	34,32
1,75	bld	bld	+bld	+18,38	+nr	+32,73	+bld	+39,33	nm	nm
1,92	++	++	+39,30	+51,07	27,05	bld	bld	bld	nm	nm
2,08	nm	nm	+bld	+blq	+45,19	+41,87	+bld	+42,70	nm	nm
2,25	nm	nm	+61,67	+61,93	30,11	bld	bld	bld	nm	nm
2,42	nm	nm	+bld	+blq	+33,56	+32,97	+bld	+blq	nm	nm
2,58	nm	nm	+60,13	+88,56	24,14	bld	bld	bld	nm	nm
2,75	nm	nm	+bld	+bld	+31,89	+31,74	+bld	+36,34	nm	nm
2,92	nm	nm	+42,53	+51,09	bld	bld	nr	bld	nm	nm
3,08	nm	nm	+bld	+blq	nm	nm	+bld	+33,35	nm	nm
3,25	nm	nm	+51,72	+58,96	nm	nm	nr	bld	nm	nm
3,42	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	+bld	+47,85	nm	nm
3,58	nm	nm	+36,46	+37,31	nm	nm	nr	bld	nm	nm
3,75	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	+bld	+33,92	nm	nm
3,92	nm	nm	+bld	+34,07	nm	nm	nr	bld	nm	nm
4,08	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	+bld	+39,66	nm	nm
4,25	nm	nm	+33,68	+bld	nm	nm	nr	bld	nm	nm
4,42	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	+bld	+27,02	nm	nm
4,58	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nr	bld	nm	nm
4,75	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	+bld	+27,10	nm	nm
4,92	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nr	bld	nm	nm

Bemerkung: Tier Nr. 1 und Tier Nr. 4 starben während oder am Ende der Infusion, es konnte nur die in-vivo Wiederfindungsrate bestimmt werden

- bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 12 ng/ml, Verdünnungsfaktor 2,4)
- blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 24 ng/ml, Verdünnungsfaktor 2,4)
- nm: nicht analysiert
- +: Analytischer Lauf wurde nicht akzeptiert
- ++: Tier starb nach 1,750 h
- nr: es wurde kein Ergebnis ermittelt

A. 20 Individual Tetranorliponsäure-Konzentrationen im Dialysat mit Statistik für 5 männliche Ratten nach Infusion von 40 mg/kg Dexlipotam (nominale Dosis bezogen auf die freie Säure).

Infusion										
Tetranorliponsäure im Dialysat										
Zeit [h]	Gemessene Konzentration [ng/ml]									
	Tier Nr. 2		Tier Nr. 3		Tier Nr. 5		Tier Nr. 6		Tier Nr. 7	
	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II
0,00	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
0,08	blq ¹	5,40	bld	blq ¹	+bld	+bld	+11,67	12,58	8,81	9,35
0,25	15,74	20,99	+16,98	+23,84	6,82	9,67	53,80	blq ²	19,81	18,38
0,42	38,99	62,58	31,31	70,65	+56,18	+26,61	+101,71	186,59	57,08	80,69
0,58	58,97	88,29	+77,72	+109,02	60,14	59,87	131,28	70,46	86,29	65,99
0,75	97,51	123,90	118,15	187,64	+120,94	+83,03	+227,45	282,58	119,71	182,85
0,92	122,22	84,21	+138,43	+198,30	107,74	103,46	145,07	163,92	158,31	118,83
1,08	149,95	234,19	172,23	276,44	+202,72	+122,52	+263,44	224,40	178,91	238,09
1,25	124,41	185,81	+127,43	+207,07	108,58	95,74	147,90	108,81	147,83	105,66
1,42	142,33	202,35	126,03	226,06	+139,19	+77,43	+140,71	131,12	159,81	135,26
1,58	109,19	134,72	+74,05	+125,51	69,75	57,73	103,55	54,14	109,33	93,40
1,75	97,38	143,44	48,00	152,81	+nr	+66,37	+68,41	57,09	nm	nm
1,92	++	++	+49,89	+84,96	51,55	43,57	56,27	15,50	nm	nm
2,08	nm	nm	24,62	81,76	+57,01	+33,59	+34,96	27,86	nm	nm
2,25	nm	nm	+31,63	+54,72	40,42	25,53	36,65	7,17	nm	nm
2,42	nm	nm	10,80	53,11	+47,98	+19,83	+16,88	13,58	nm	nm
2,58	nm	nm	+18,65	+37,03	36,90	10,28	35,38	bld	nm	nm
2,75	nm	nm	8,89	33,86	+20,82	+16,09	+9,12	6,15	nm	nm
2,92	nm	nm	+7,53	+bld	19,67	9,95	nr	bld	nm	nm
3,08	nm	nm	10,19	21,11	nm	nm	+5,04	blq ²	nm	nm
3,25	nm	nm	+9,69	+15,43	nm	nm	nr	bld	nm	nm
3,42	nm	nm	bld	13,02	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
3,58	nm	nm	+8,00	+11,38	nm	nm	nr	bld	nm	nm
3,75	nm	nm	bld	bld	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
3,92	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nr	bld	nm	nm
4,08	nm	nm	bld	6,27	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
4,25	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nr	bld	nm	nm
4,42	nm	nm	bld	blq ¹	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
4,58	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nr	bld	nm	nm
4,75	nm	nm	bld	blq ¹	nm	nm	+bld	bld	nm	nm
4,92	nm	nm	+bld	+bld	nm	nm	nr	bld	nm	nm

Bemerkung: Tier Nr. 1 und Tier Nr. 4 starben während oder am Ende der Infusion, es konnte nur die in-vivo Wiederfindungsrate bestimmt werden

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 2,4 ng/ml)

blq¹: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 12 ng/ml, Verdünnungsfaktor 2,4)

blq²: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 4,8 ng/ml, Verdünnungsfaktor 2,4)

nm: nicht analysiert

nr: es wurde kein Ergebnis ermittelt

+: Analytischer Lauf wurde nicht akzeptiert

++: Tier starb nach 1,750 h

A. 21 Individuelle freie extrazelluläre Tetranorliponsäure-Konzentrationen im Muskel mit statistischer Berechnung für 5 männliche Ratten nach Infusion von 40 mg/kg Dexlipotam (nominale Dosis bezogen auf die freie Säure).

Infusion										
Tetranorliponsäure im Dialysat										
tatsächliche Konzentration [ng/ml]										
Zeit [h]	Tier Nr. 2		Tier Nr. 3		Tier Nr. 5		Tier Nr. 6		Tier Nr. 7	
	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II
0,00	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
0,08	^b blq	77,07	^a bld	^b blq				179,66	125,86	133,51
0,25	224,88	299,83			97,37	138,21	768,51	^c blq	282,96	262,63
0,42	556,97	894,00	447,22	1009,34				2665,54	815,45	1152,75
0,58	842,47	1261,34			859,13	855,29	1875,37	1006,53	1232,67	942,65
0,75	1393,03	1769,99	1687,89	2680,59				4036,80	1710,21	2612,13
0,92	1745,93	1203,05			1539,15	1478,02	2072,38	2341,78	2261,62	1697,55
1,08	2142,10	3345,63	2460,43	3949,13				3205,68	2555,86	3401,35
1,25	1777,27	2654,43			1551,12	1367,66	2112,92	1554,41	2111,79	1509,43
1,42	2033,25	2890,70	1800,38	3229,47				1873,13	2283,02	1932,34
1,58	1559,90	1924,53			996,45	824,78	1479,23	773,49	1561,85	1334,30
1,75	1391,14	2049,09	685,65	2182,97				815,59		
1,92					736,42	622,49	803,90	221,38		
2,08			351,77	1168,01				397,99		
2,25					577,41	364,77	523,52	102,48		
2,42			154,25	758,71				194,02		
2,58					527,14	146,81	505,42	^a bld		
2,75			126,99	483,70				87,87		
2,92					280,97	142,11		^a bld		
3,08			145,61	301,58				^c blq		
3,25								bld		
3,42			bld	186,00				bld		
3,58								bld		
3,75			bld	bld				bld		
3,92								bld		
4,08			bld	89,55				bld		

^abld: unterhalb der Nachweisgrenze (wurde 0 ng/ml gesetzt)

^bblq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (wurde 103,0 ng/ml ((LOD+LOQ)/2) gesetzt)

^cblq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (wurde 51,4 ng/ml ((LOD+LOQ)/2) gesetzt)

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 171,4 oder 68,6 ng/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 34,3 ng/ml)

zu A. 21

Statistik						
Zeit [h]	Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,00	nc	nc	0	0	bld	bld
0,08	103,16	103,00	4	7	bld	179,66
0,25	265,73	243,75	7	8	blq	768,51
0,42	1077,33	894,00	7	7	447,22	2665,54
0,58	1109,43	974,59	8	8	842,47	1875,37
0,75	2270,09	1769,99	7	7	1393,03	4036,80
0,92	1792,44	1721,74	8	8	1203,05	2341,78
1,08	3008,60	3205,68	7	7	2142,10	3949,13
1,25	1829,88	1665,84	8	8	1367,66	2654,43
1,42	2291,76	2033,25	7	7	1800,38	3229,47
1,58	1306,81	1406,76	8	8	773,49	1924,53
1,75	1424,89	1391,14	5	5	685,65	2182,97
1,92	596,05	679,46	4	4	221,38	803,90
2,08	639,26	397,99	3	3	351,77	1168,01
2,25	392,04	444,14	4	4	102,48	577,41
2,42	368,99	194,02	3	3	154,25	758,71
2,58	294,84	326,11	3	4	bld	527,14
2,75	232,86	126,99	3	3	87,87	483,70
2,92	141,03	142,11	2	3	bld	280,97
3,08	166,21	145,61	2	3	blq	301,58
3,25	nc	nc	0	0	bld	bld
3,42	nc	nc	1	0	bld	186,00
3,58	nc	nc	0	0	bld	bld
3,75	nc	nc	0	0	bld	bld
3,92	nc	nc	0	0	bld	bld
4,08	nc	nc	1	0	bld	89,55

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 171,4 oder 68,6 ng/ml)
 bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 34,3 ng/ml)
 n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq- oder bld-Werte)
 n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

A. 22 Wiederfindungsraten im in-vitro Versuchsmodell für die Muttersubstanz R(+)- α -Liponsäure und deren Metabolite TNLA und BNLA im Mikrodialyseversuch (Flußrate 5 μ l/min).

In-vitro Wiederfindung: LA								
			Sonde I			Sonde II		
C_{in} [ng/ml]	Mittelarith C_{in} [ng/ml]	t_{mid} [min]	C_{out} [ng/ml]	R [%]	Mittelarith R [%]	C_{out} [ng/ml]	R [%]	Mittelarith R [%]
326.54	333.54	5 min	292.22	12.39	17.98	245.16	26.50	25.05
333.70		15 min	287.88	13.69		246.89	25.98	
340.37		25 min	271.56	18.58		257.38	22.83	
		35 min	227.21	31.88		235.28	29.46	
		45 min	289.03	13.34		265.22	20.48	

In-vitro Wiederfindung: TNLA								
			Sonde I			Sonde II		
C_{in} [ng/ml]	Mittelarith C_{in} [ng/ml]	t_{mid} [min]	C_{out} [ng/ml]	R [%]	Mittelarith R [%]	C_{out} [ng/ml]	R [%]	Mittelarith R [%]
268.30	278.36	5 min	243.77	12.43	20.68	177.34	36.29	28.91
283.56		15 min	225.63	18.94		190.78	31.46	
283.22		25 min	231.97	16.67		198.74	28.60	
		35 min	197.27	29.13		200.22	28.07	
		45 min	205.39	26.21		222.40	20.10	

In-vitro Wiederfindung: BNLA								
			Sonde I			Sonde II		
C_{in} [ng/ml]	Mittelarith C_{in} [ng/ml]	t_{mid} [min]	C_{out} [ng/ml]	R [%]	Mittelarith R [%]	C_{out} [ng/ml]	R [%]	Mittelarith R [%]
471.55	470.88	5 min	423.82	9.99	15.83	361.80	23.17	22.11
476.23		15 min	403.54	14.30		374.23	20.52	
464.86		25 min	402.77	14.46		363.70	22.76	
		35 min	333.07	29.27		350.40	25.59	
		45 min	418.42	11.14		383.66	18.52	

A. 23 Wiederfindungsraten im in-vivo Versuchsmodell für die Muttersubstanz R(+)- α -Liponsäure und deren Metaboliten TNLA und BNLA im Mikrodialyseversuch (Flußrate 5 μ l/min).

In-vivo Wiederfindung: LA												
		R(+)- α -Liponsäure Konzentrationen [ng/ml]										
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4		Ratte 5		Ratte 6		Ratte 7	
					Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II	Sonde I	Sonde II
C_{in} [ng/ml]		174.04	227.26	312.71	212.97	212.97	349.49	349.49	292.87	228.22	219.61	169.18
C_{out} [ng/ml]	5 min	163.50	216.75	252.94	189.91	211.61	294.96	310.25	228.12	220.31	198.93	148.79
	15 min	157.01	188.23	258.48	190.46	222.95	299.47	315.13	224.09	212.21	220.09	147.99
	25 min	161.93	226.54	238.44	194.04	214.08	298.44	333.83	189.61	205.92	207.24	149.48
	35 min	159.51	220.82	212.86	203.76	214.38	314.52	326.00	227.81	^a 286.61	180.00	151.92
	45 min	172.43	205.43	230.00	207.61	209.39	271.28	298.23	216.50	^a 280.03	191.14	155.85
Mittel _{arith}		162.88	211.55	238.54	197.15	214.48	295.73	316.69	217.23	212.81	208.75	148.75
SD		5.88	15.16	18.29	8.06	5.15	15.60	13.83	16.13	7.21	10.66	0.75
R [%]		6.41	6.91	(23.72) ^a	7.43	(-0.71) ^a	15.38	9.38	(25.83) ^a	6.75	4.94	12.07
Mittel _{arith} R [%]:		7										

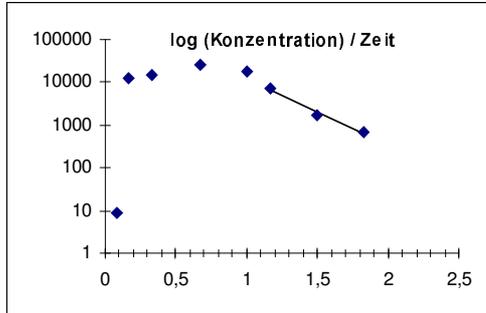
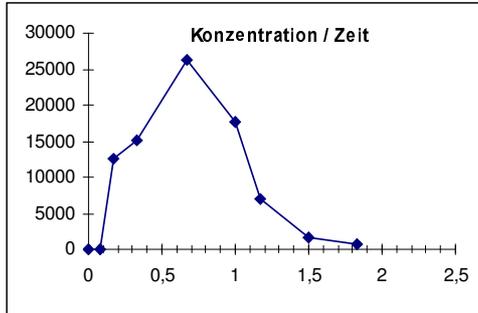
^a implausibler Wert, wurde nicht die die statistische Berechnung miteinbezogen

A. 24 Nicht kompartmenteller Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma nach Infusion von Dexlipotam (nominale Dosis, 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure).

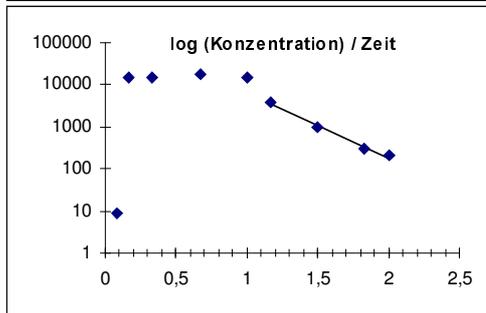
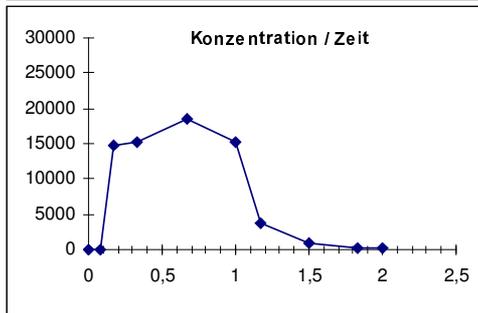
Links: Lineare Darstellung /

Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast

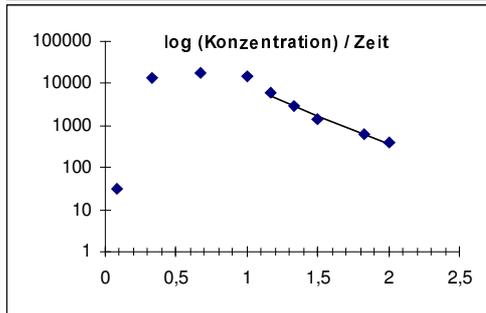
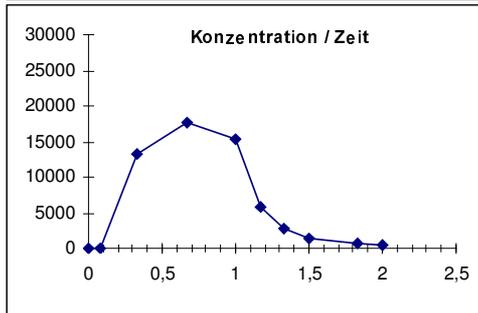
Ratte 2



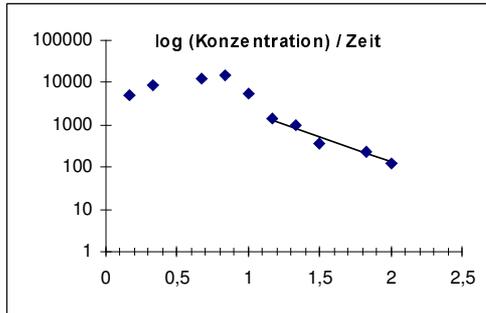
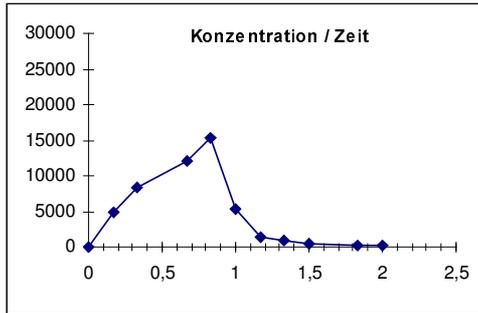
Ratte 3



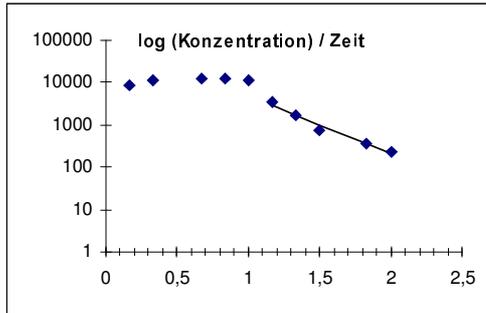
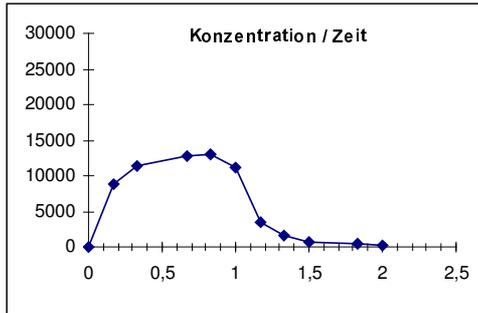
Ratte 5



Ratte 6

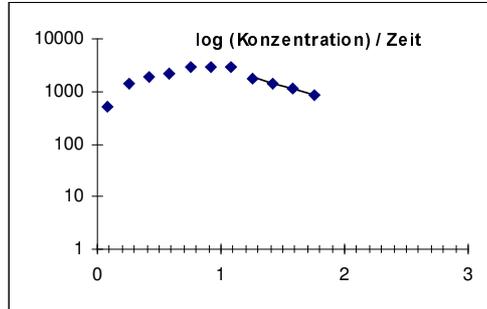
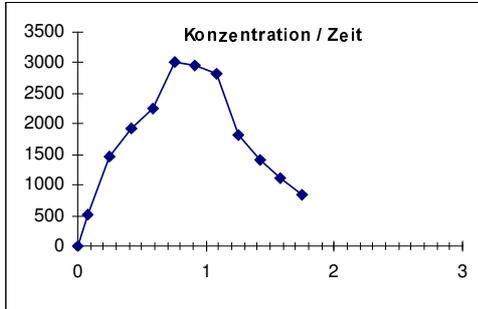


Ratte 7

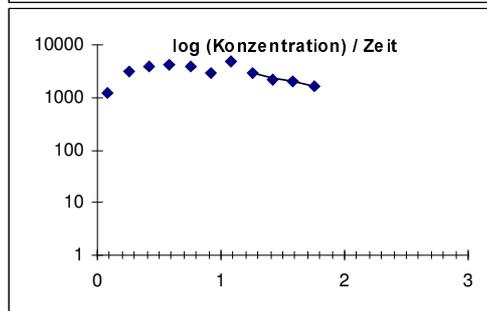
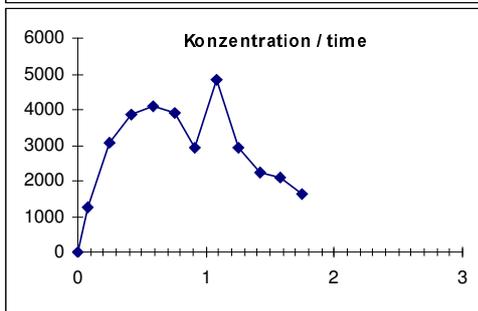


**A. 25 Nicht kompartimentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen freien extrazellulären R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Muskel nach Infusion von Dexlipotam (nominale Dosis, 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure).
Links: Lineare Darstellung
Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast**

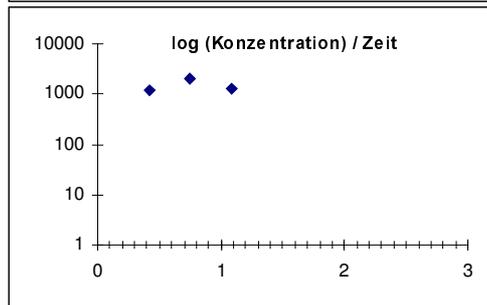
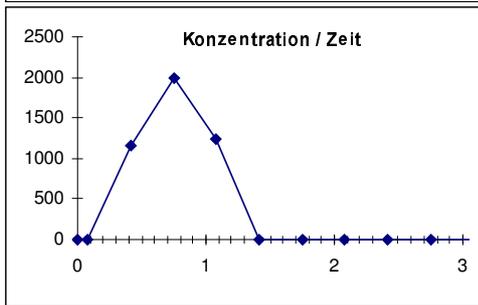
**Ratte 2
Sonde I**



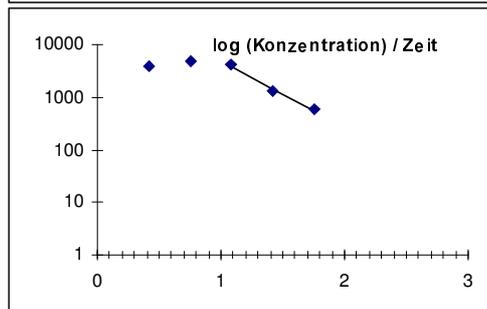
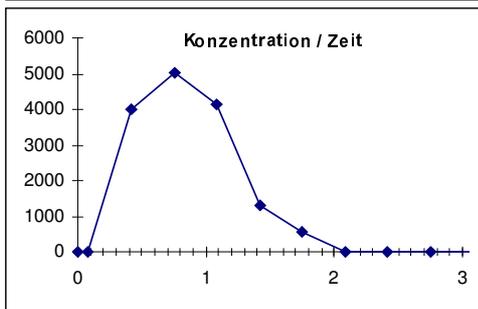
**Ratte 2
Sonde II**



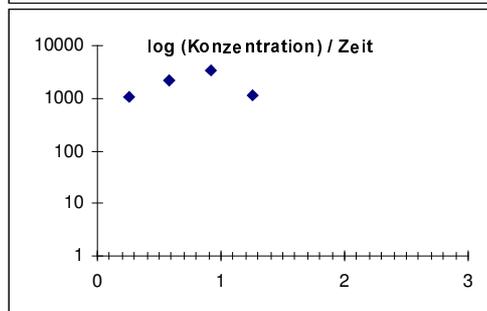
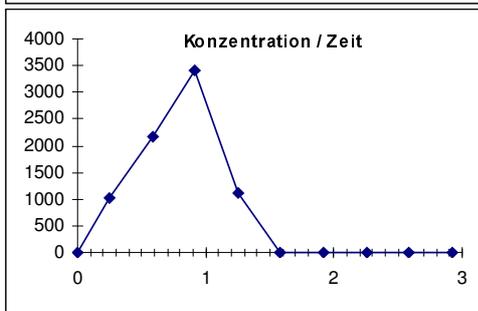
**Ratte 3
Sonde I**



**Ratte 3
Sonde II**

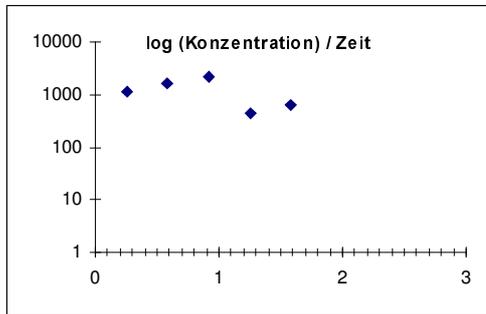
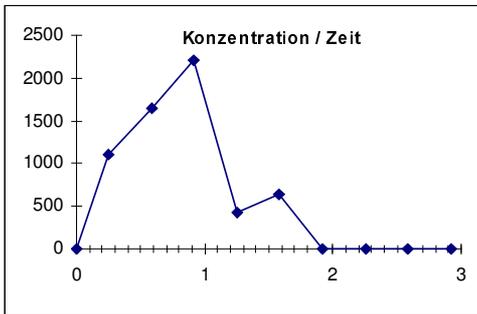


**Ratte 5
Sonde I**

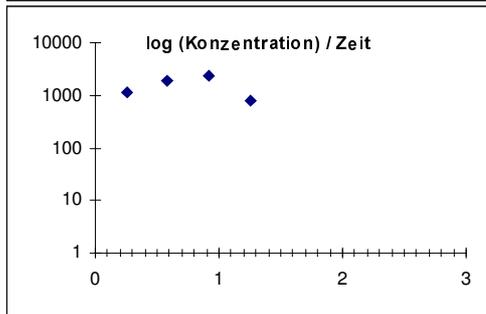
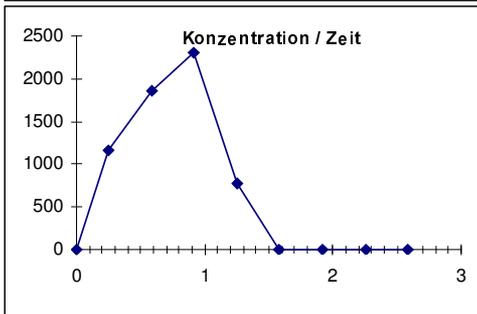


Zu A.25

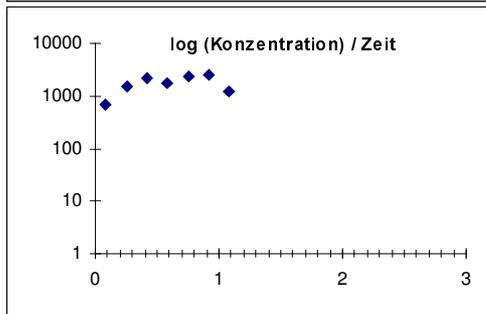
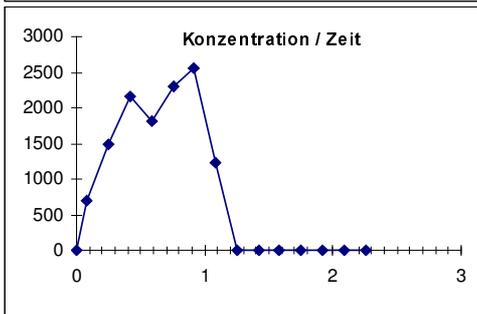
**Ratte 5
Sonde II**



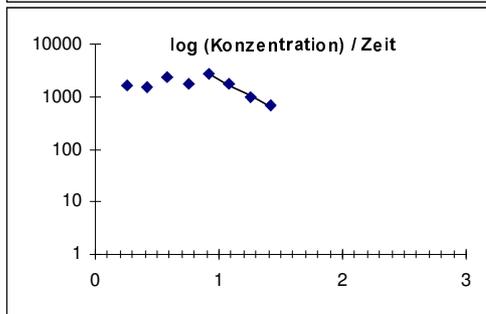
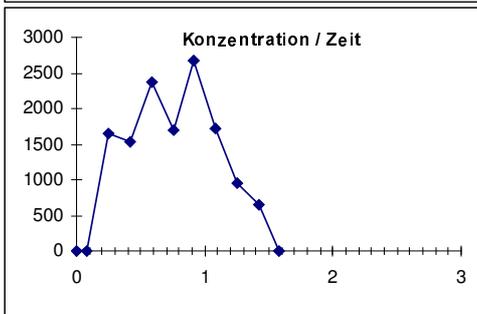
**Ratte 6
Sonde I**



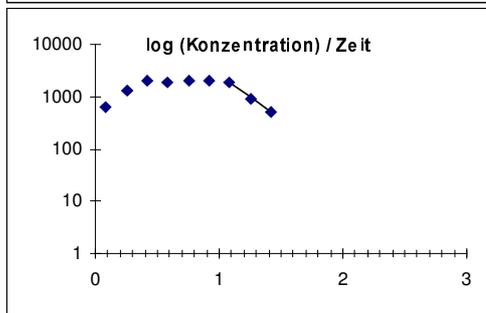
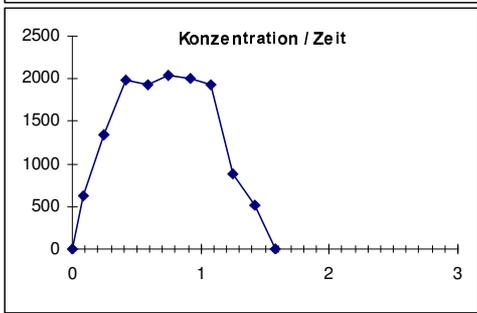
**Ratte 6
Sonde II**



**Ratte 7
Sonde I**

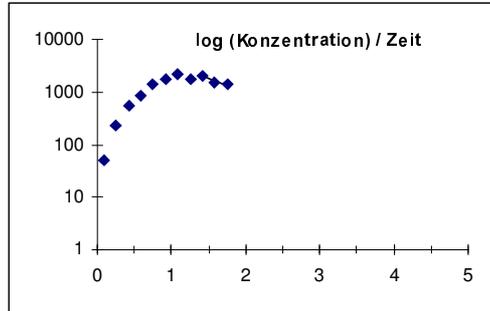
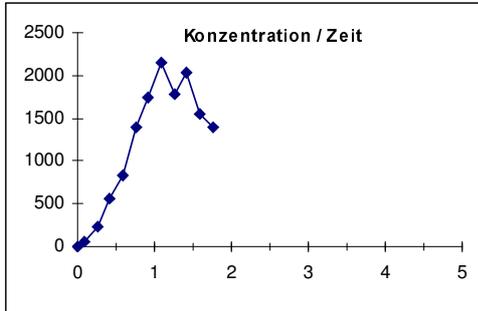


**Ratte 7
Sonde II**

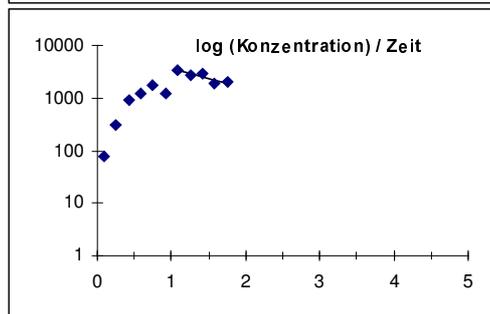
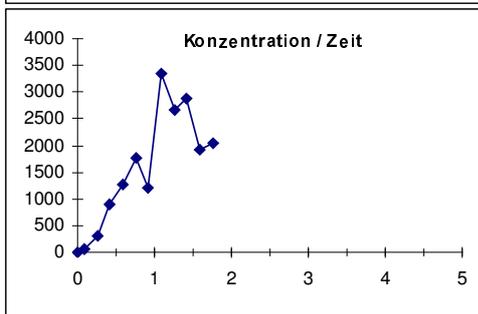


**A. 26 Nicht kompartimentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen freien intrazellulären Tetranorliponsäure-Konzentrationen im Muskel nach Infusion von Dexlipotam (nominale Dosis, 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure).
Links: Lineare Darstellung
Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast**

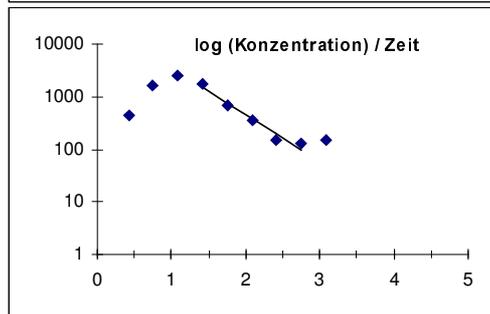
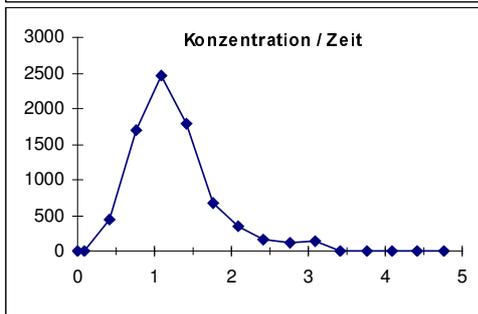
**Ratte 2
Sonde I**



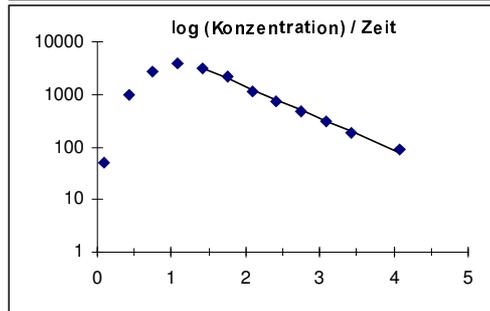
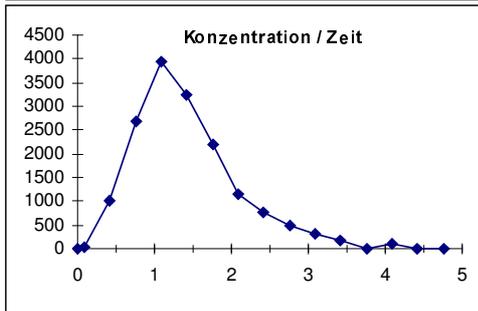
**Ratte 2
Sonde II**



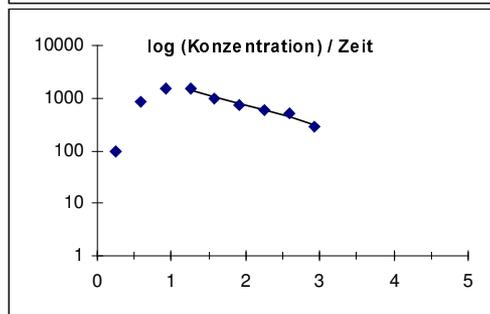
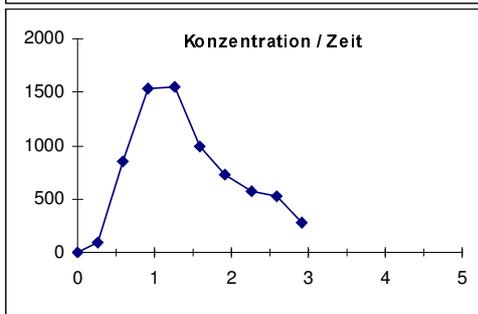
**Ratte 3
Sonde I**



**Ratte 3
Sonde II**

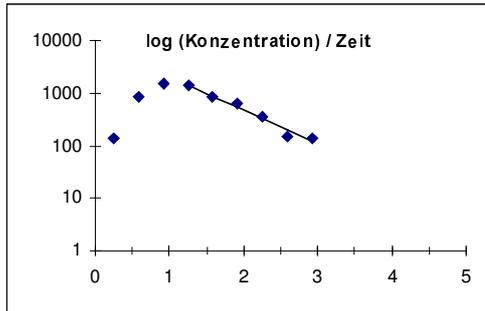
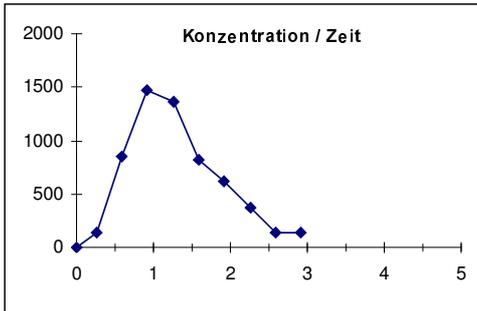


**Ratte 5
Sonde I**

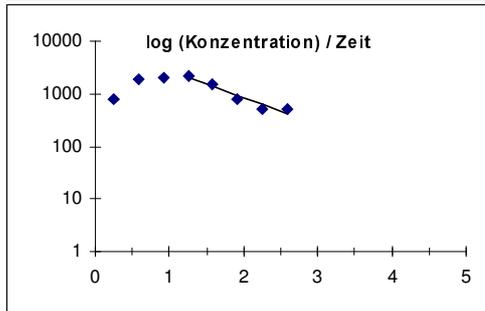
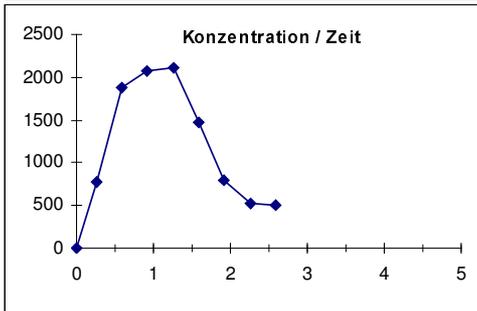


Zu A. 26

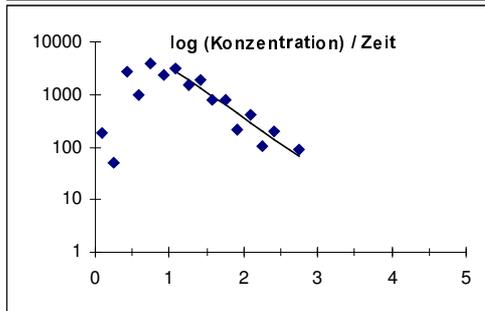
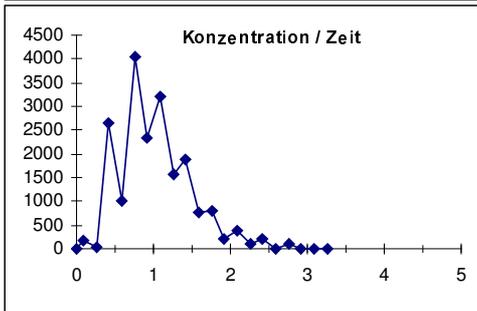
**Ratte 5
Sonde II**



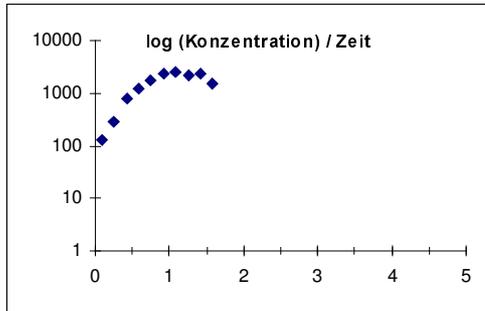
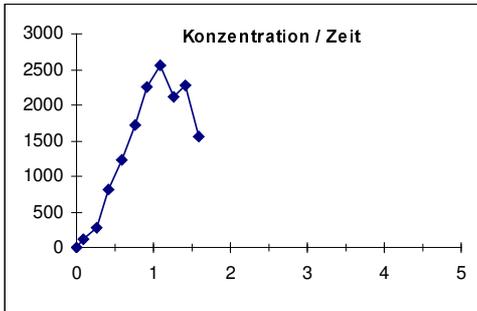
**Ratte 6
Sonde I**



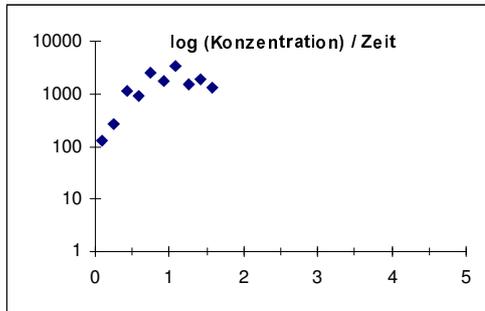
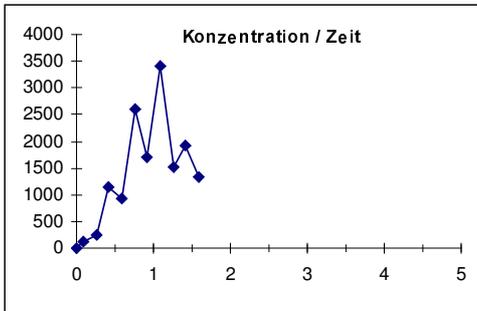
**Ratte 6
Sonde II**



**Ratte 7
Sonde I**



**Ratte 7
Sonde II**



A. 27 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma nach Infusion von Dexlipotam (nominale Dosis, 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / R(+)- α -Liponsäure im Plasma nach Infusion (nominale Dosis 40 mg/kg)															
Tier	Dosis [mg/kg]	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-tlast} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	AUMC ng·h·h/ml	C _{ss} [ng/ml]	CL l/min/l	V _z [l/kg]	V _{ss} [l/kg]	MRT h	k [1/h]	r ² (ln)
Ratte 2	41,9	26342,14	0,67	0,20	21039,85	21219,84	0,85	15307,73	22048,12	32,91	0,57	0,44	0,22	3,49	0,9817
Ratte 3	41,8	18627,29	0,67	0,19	17034,38	17085,23	0,30	11418,25	16876,77	40,78	0,68	0,41	0,17	3,59	0,9929
Ratte 5	40,9	17778,49	0,67	0,22	15651,58	15767,96	0,74	12029,80	16621,27	43,23	0,83	0,68	0,76	3,14	0,9834
Ratte 6	43,1	15324,88	0,83	0,25	9902,75	9949,56	0,47	6698,62	13669,89	72,20	1,57	0,75	0,17	2,76	0,9587
Ratte 7	41,3	12976,50	0,83	0,22	12708,39	12772,67	0,50	8692,77	12302,09	53,89	1,01	0,58	0,18	3,19	0,9665
n		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mittel_{arith}		18209,86	0,73	0,22	15267,39	15359,05	0,57	10829,43	16303,63	48,60	0,93	0,57	0,30	3,23	0,9766
CV [%]		27,76	12,43	10,54	27,77	27,90	38,55	30,44	23,03	31,22	42,30	25,88	85,9	10,08	1,4118
Median		17778,49	0,67	0,22	15651,58	15767,96	0,50	11418,25	16621,27	43,23	0,83	0,58	0,18	3,19	0,9817
Min		12976,50	0,67	0,19	9902,75	9949,56	0,30	6698,62	12302,09	32,91	0,57	0,41	0,17	2,76	0,9587
Max		26342,14	0,83	0,25	21039,85	21219,84	0,85	15307,73	22048,12	72,20	1,57	0,75	0,76	3,59	0,9929
Mittel_{geo}		17694,98	0,73	0,22	14782,73	14867,74	0,54	10413,16	15974,00	46,85	0,87	0,56	0,25	3,22	0,9765
CV_{ln} [%]		26,82	12,25	10,34	29,39	29,50	43,05	32,64	22,70	30,56	40,87	27,03	71,6	10,34	1,4140
Cl_{ln} (95%) LL		12756,44	0,63	0,19	10340,88	10386,81	0,32	7014,46	12093,47	32,33	0,54	0,40	0,11	2,83	0,9595
UL		24545,44	0,85	0,24	21132,53	21281,77	0,89	15458,64	21099,70	67,89	1,42	0,78	0,55	3,66	0,9938

A. 28 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen freien extrazellulären R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Muskel nach Infusion von Dexlipotam (nominale Dosis, 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / R(+)- α -Liponsäure im Muskelgewebe nach Infusion (nominale Dosis 40 mg/kg)										
Tier	Sonde	Dosis [mg/kg]	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-tlast} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	k [1/h]	r ² (ln)
Ratte 2	I	41,9	3010,14	0,75	0,46	3266,17	3831,03	14,74	1,51	0,9982
Ratte 2	II	41,9	4847,45	1,08	0,62	5289,19	6760,29	21,76	1,12	0,9663
Ratte 3	I	41,8	na	na	na	na	na	na	na	na
Ratte 3	II	41,8	5019,63	0,75	0,23	4921,65	5106,01	3,61	2,95	0,9898
Ratte 5	I	40,9	3412,01	0,92	na	2343,54	na	na	na	na
Ratte 5	II	40,9	2208,31	0,92	na	1860,33	na	na	na	na
Ratte 6	I	43,1	2297,67	0,92	na	1856,47	na	na	na	na
Ratte 6	II	43,1	2556,99	0,92	na	1905,44	na	na	na	na
Ratte 7	I	41,3	2670,62	0,92	0,24	2161,69	2385,31	9,38	2,86	0,9935
Ratte 7	II	41,3	2044,46	0,75	0,18	2143,51	2269,77	5,56	3,94	0,9889
n			9	9	5	9	5	5	5	5
Mittel_{arith}			3118,59	0,88	0,35	2860,89	4070,48	11,01	2,48	0,9873
CV [%]			35,62	12,62	53,97	47,06	46,69	66,83	46,37	1,2446
Median			2670,62	0,92	0,24	2161,69	3831,03	9,38	2,86	0,9898
Min			2044,46	0,75	0,18	1856,47	2269,77	3,61	1,12	0,9663
Max			5019,63	1,08	0,62	5289,19	6760,29	21,76	3,94	0,9982
Mittel_{geo}			2964,87	0,87	0,31	2632,69	3723,73	9,04	2,24	0,9873
CV_{in} [%]			33,72	12,68	55,98	43,16	50,22	82,85	55,98	1,2528
CI_{in} (95%) LL			2303,81	0,79	0,16	1916,17	2066,60	3,68	1,17	0,9720
UL			3815,61	0,96	0,59	3617,14	6709,66	22,19	4,28	1,0027

na: kein Ergebnis

A. 29 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen freien Tetranorliponsäure-Konzentrationen im Muskel nach Infusion von Dexlipotam (nominale Dosis, 40 mg/kg bezogen auf die freie Säure) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / Tetranorliponsäure im Muskelgewebe nach Infusion (nominale Dosis 40 mg/kg)										
Tier	Sonde	Dosis [mg/kg]	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-tlast} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	k [1/h]	r ² (ln)
Ratte 2	I	41,9	2142,10	1,08	0,61	2168,32	(3359,93)	(35,47)	1,14	0,9502
Ratte 2	II	41,9	3345,63	1,08	0,89	2887,64	(5371,82)	(46,24)	0,78	0,7802
Ratte 3	I	41,8	na	na	na	na	na	na	na	na
Ratte 3	II	41,8	3949,13	1,08	0,50	5388,07	5446,15	1,07	1,37	0,9963
Ratte 5	I	40,9	1551,12	1,25	0,76	2337,50	2682,11	12,85	0,92	0,9585
Ratte 5	II	40,9	1478,02	0,92	0,47	1950,60	2035,43	4,17	1,46	0,9633
Ratte 6	I	43,1	2112,92	1,25	0,59	3264,16	3625,31	9,96	1,17	0,9435
Ratte 6	II	43,1	4036,80	0,75	0,31	3259,98	3290,50	0,93	2,22	0,8958
Ratte 7	I	41,3	2555,86	1,08	na	2354,82	na	na	na	na
Ratte 7	II	41,3	3401,35	1,08	na	2379,69	na	na	na	na
n			9	9	7	9	5	5	7	7
Mittel_{arith}			2730,33	1,06	0,59	2887,86	3415,90	5,79	1,29	0,9268
CV [%]			36,02	14,52	31,93	36,26	37,68	92,86	36,36	7,6876
Median			2555,86	1,08	0,59	2379,69	3290,50	4,17	1,17	0,9502
Min			1478,02	0,75	0,31	1950,60	2035,43	0,93	0,78	0,7802
Max			4036,80	1,25	0,89	5388,07	5446,15	12,85	2,22	0,9963
Mittel_{geo}			2565,31	1,05	0,56	2755,98	3235,68	3,50	1,23	0,9243
CV_{in} [%]			39,67	15,80	34,87	31,54	37,81	186,36	34,87	8,1339
CI_{in} (95%) LL			1912,17	0,93	0,41	2175,00	2055,27	0,77	0,90	0,8574
UL			3441,54	1,19	0,77	3492,15	5094,06	16,01	1,68	0,9964

na: kein Ergebnis

Die Werte in Klammern wurden nicht in die statistische Berechnung miteinbezogen.

A. 30 R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Zellmedium von Hepatozyten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Konzentrationen von Dexlipotam.

Zellmedium (extrazelluläre Konzentration)																
Zeit		LA Konzentration [ng/ml]														
		0 $\mu\text{mol/l}$					25 $\mu\text{mol/l}$			50 $\mu\text{mol/l}$			100 $\mu\text{mol/l}$			
[h]	Zellansatz I		Zellansatz II		Zell. III	Zellansatz II		Zell. III	Zellansatz II		Zell. III	Zellansatz I		Zellansatz II		Zell. III
	I	II	III	IV	V	III	IV	V	III	IV	V	I	II	III	IV	V
0	bld	na	bld	na	na	4724,6	na	na	9377,9	na	na	28259	na	15030	na	na
0,083	na	na	bld	bld	bld	5049,0	4709,1	4468,3	9168,7	8333,3	9392,1	na	na	16898	17673	18229
0,25	na	na	bld	bld	bld	5120,0	4189,5	na	9187,5	7032,8	na	na	na	15564	17754	na
0,5	bld	bld	bld	bld	bld	4899,5	4253,4	5483,0	8883,6	7737,4	11358,3	35766	19821	15227	16825	34164
1	bld	bld	bld	bld	bld	4801,8	4055,0	6535,3	8656,9	8577,5	10083,2	17593	17526	14902	17617	20028
2	bld	bld	bld	250,6	bld	4186,7	3770,9	4118,2	7642,5	6553,6	8864,9	16243	16722	14084	13818	17748
3	bld	bld	bld	bld	bld	3755,4	3398,3	3893,6	6990,7	6438,3	8317,7	15979	12002	13577	14106	15463

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LA: LOQ = 15 ng/ml)
 bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LA: LOD = 10 ng/ml)
 na: keine Probe

A. 31 Tetranorliponsäure-Konzentrationen im Zellmedium von Hepatozyten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Konzentrationen von Dexlipotam.

Zellmedium (extrazelluläre Konzentration)																
Zeit [h]	TNLA Konzentration [ng/ml]															
	0 µmol/l					25 µmol/l			50 µmol/l			100 µmol/l				
	Zellansatz I		Zellansatz II		Zell. III	Zellansatz II		Zell. III	Zellansatz II		Zell. III	Zellansatz I		Zellansatz II		Zell. III
	I	II	III	IV	V	III	IV	V	III	IV	V	I	II	III	IV	V
0	bld	na	bld	na	na	bld	na	na	bld	na	na	bld	na	bld	na	na
0,083	na	na	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	na	na	bld	bld	bld
0,25	na	na	bld	bld	na	bld	bld	na	bld	bld	na	na	na	16,71	bld	na
0,5	bld	bld	bld	bld	blq	10,93	14,46	blq	18,59	23,31	bld	bld	83,56	28,45	22,74	31,78
1	bld	bld	bld	bld	blq	19,80	16,52	blq	33,97	27,08	17,39	111,81	142,57	52,49	64,20	32,21
2	bld	bld	bld	bld	bld	37,76	28,88	25,58	49,82	55,76	46,88	291,05	270,17	131,55	100,16	111,71
3	bld	bld	bld	bld	bld	47,97	31,77	36,95	53,89	42,80	58,75	308,78	350,85	96,91	132,02	265,54

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (TNLA: LOQ = 5 ng/ml)
 bld: unterhalb der Nachweisgrenze (TNLA: LOD = 1 ng/ml)
 na: keine Probe

A. 32 Bisnorliponsäure-Konzentrationen im Zellmedium von Hepatozyten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Konzentrationen von Dexlipotam.

Zellmedium (extrazelluläre Konzentration)																
Zeit [h]	BNLA Konzentration [ng/ml]															
	0 µmol/l					25 µmol/l			50 µmol/l			100 µmol/l				
	Zellansatz I		Zellansatz II		Zell. III	Zellansatz II		Zell. III	Zellansatz II		Zell. III	Zellansatz I		Zellansatz II		Zell. III
	I	II	III	IV	V	III	IV	V	III	IV	V	I	II	III	IV	V
0	78,76	na	bld	na	na	bld	na	na	bld	na	na	91,84	na	bld	na	na
0,083	na	na	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	na	na	bld	bld	bld
0,25	na	na	bld	bld	na	bld	bld	na	bld	bld	na	na	na	9,89	bld	na
0,5	67,05	33,13	bld	bld	blq	bld	bld	blq	12,36	18,56	66,38	125,80	233,17	77,15	114,86	382,11
1	42,81	35,02	bld	bld	bld	5,96	bld	blq	63,89	151,02	70,94	313,17	320,07	242,79	258,48	284,31
2	blq	blq	bld	bld	bld	36,25	27,86	65,39	134,39	136,47	270,56	504,50	511,10	5,33	545,06	797,03
3	bld	blq	bld	bld	bld	36,78	28,66	109,68	183,44	175,34	289,00	568,05	738,49	651,22	617,53	1809,54

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (BNLA: LOQ = 10 ng/ml)
 bld: unterhalb der Nachweisgrenze (BNLA: LOD = 5 ng/ml)
 na: keine Probe

A. 33 R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen in Hepatozyten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Konzentrationen von Dexlipotam im Zellmedium.

intrazelluläre Konzentration														
Zeit [h]	LA [ng/mg Protein]													
	0 $\mu\text{mol/L}$					25 $\mu\text{mol/l}$		50 $\mu\text{mol/l}$		100 $\mu\text{mol/l}$				
	Zellansatz I			Zell. II	Zell. III	Zell. II	Zell. III	Zell. II	Zell. III	Zellansatz I			Zell. II	Zell. III
	I	II	III	IV	V	IV	V	IV	V	I	II	III	IV	V
0	bld	bld	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
	bld	bld	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
0,083	na	na	na	bld	na	bld	na	blq	na	na	na	na	19,03	na
	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
0,25	na	na	na	bld	na	bld	na	blq	na	na	na	na	blq	na
	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
0,5	bld	bld	bld	bld	bld	bld	blq	blq	blq	12,47	blq	blq	blq	blq
	bld	bld	bld	na	na	na	na	na	na	11,39	blq	blq	na	na
1	bld	bld	bld	bld	bld	blq	blq	15,44	24,80	13,76	21,25	14,91	53,22	44,69
	bld	bld	bld	na	na	na	na	na	na	13,54	18,62	13,55	na	na
2	bld	bld	bld	bld	bld	bld	blq	blq	blq	blq	blq	11,42	blq	51,08
	bld	bld	bld	na	na	na	na	na	na	11,13	8,52	blq	na	na
3	bld	bld	bld	bld	bld	bld	blq	bld	blq	9,46	blq	12,68	17,97	22,25
	bld	bld	bld	na	na	na	na	na	na	blq	blq	blq	na	na

na: keine Probe

Die Konzentrationen in ng/ml wurden mit der Proteinkonzentration verrechnet – die angegebene Konzentration ist in ng/mg

Proteinkonzentration - Zellansatz I: 4,6 – 6,5 mg/ml; Zellansatz II: 2,9 – 4,2 mg/ml; Zellansatz III: 1,4 – 2,9 mg/ml

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LA: LOQ = 15 ng/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LA: LOD = 10 ng/ml)

A. 34 Tetranorliponsäure -Konzentrationen in Hepatozyten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Konzentrationen von Dexlipotam im Zellmedium.

intrazelluläre Konzentration														
Zeit [h]	TNLA [ng/mg Protein]													
	0 µmol/L					25 µmol/l		50 µmol/l		100 µmol/l				
	Zellansatz I			Zell. II	Zell. III	Zell. II	Zell. III	Zell. II	Zell. III	Zellansatz I			Zell. II	Zell. III
	I	II	III	IV	V	IV	V	IV	V	I	II	III	IV	V
0	bld bld	bld bld	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na
0,083	na na	na na	na na	bld na	na na	bld na	na na	5,91 na	na na	na na	na na	na na	5,98 na	na na
0,25	na na	na na	na na	bld na	na na	blq na	na na	6,11 na	na na	na na	na na	na na	6,25 na	na na
0,5	bld bld	bld bld	bld bld	bld na	bld na	3,23 na	blq na	4,19 na	8,28 na	6,69 7,34	6,31 6,77	6,42 5,98	7,10 na	blq na
1	bld bld	bld bld	bld bld	bld na	bld na	5,40 na	blq na	6,01 na	blq na	7,41 12,27	7,24 7,55	7,27 7,98	8,84 na	blq na
2	bld bld	bld bld	bld bld	blq na	bld na	5,61 na	blq na	6,05 na	blq na	9,61 5,66	5,06 5,10	4,86 5,90	6,40 na	blq na
3	bld bld	bld bld	bld bld	blq na	bld na	blq na	blq na	5,40 na	blq na	5,39 10,82	4,42 5,32	4,01 5,04	7,57 na	blq na

na: keine Probe

Die Konzentrationen in ng/ml wurden mit der Proteinkonzentration verrechnet – die angegebene Konzentration ist in ng/mg

Proteinkonzentration - Zellansatz I: 4,6 – 6,5 mg/ml; Zellansatz II: 2,9 – 4,2 mg/ml; Zellansatz III: 1,4 – 2,9 mg/ml

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (TNLA: LOQ = 5 ng/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (TNLA: LOD = 1 ng/ml)

A. 35 Bisnorliponsäure-Konzentrationen in Hepatozyten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und unterschiedlichen Konzentrationen von Dexlipotam im Zellmedium.

intrazelluläre Konzentration														
Zeit [h]	BNLA [ng/mg Protein]													
	0 µmol/L					25 µmol/l		50 µmol/l		100 µmol/l				
	Zellansatz I			Zell. II	Zell. III	Zell. II	Zell. III	Zell. II	Zell. III	Zellansatz I			Zell. II	Zell. III
	I	II	III	IV	V	IV	V	IV	V	I	II	III	IV	V
0	bld bld	bld bld	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na	na na
0,083	na na	na na	na na	bld na	na na	bld na	na na	bld na	na na	na na	na na	na na	bld na	na na
0,25	na na	na na	na na	bld na	na na	bld na	na na	bld na	na na	na na	na na	na na	bld na	na na
0,5	bld bld	bld bld	bld bld	bld na	bld na	bld na	blq na	bld na	blq na	6,66 6,75	6,57 7,24	7,50 6,66	blq na	blq na
1	bld bld	bld bld	bld bld	bld na	bld na	bld na	blq na	bld na	blq na	13,07 17,57	10,28 16,12	13,01 20,66	blq na	14,49 na
2	bld bld	bld bld	bld bld	blq na	bld na	bld na	blq na	bld na	blq na	10,71 12,58	16,91 11,62	13,53 9,76	bld na	30,21 na
3	bld bld	bld bld	bld bld	bld na	bld na	bld na	blq na	bld na	blq na	15,23 20,12	11,70 11,22	18,19 blq	52,44 na	12,95 na

na: keine Probe

Die Konzentrationen in ng/ml wurden mit der Proteinkonzentration verrechnet – die angegebene Konzentration ist in ng/mg

Proteinkonzentration - Zellansatz I: 4,6 – 6,5 mg/ml; Zellansatz II: 2,9 – 4,2 mg/ml; Zellansatz III: 1,4 – 2,9 mg/ml

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (BNLA: LOQ = 10 ng/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (BNLA: LOD = 5 ng/ml)

B Untersuchungsmodell Mensch

B.1 Individuelle α -Liponsäure-Plasmakonzentrationen mit Statistik für 9 gesunde männliche und weibliche Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	0,47	bld**	0,22	0,81	bld**	bld**	0,12	0,05	0,26
	0,167	10,58	0,71	2,97	23,34	4,56	1,07	0,31	1,60	2,08
	0,250	23,29	6,13	6,46	20,13	4,67	5,35	1,82	11,92	16,82
	0,333	26,00	15,52	12,80	14,01	3,73	7,03	5,57	14,91	35,48
	0,500	12,08	15,54	15,26	15,21	12,61	12,74	9,03	15,09	17,11
	0,750	4,92	8,94	9,48	16,45	20,85	4,04	14,43	17,61	6,65
	1,000	2,48	6,31	6,85	9,73	16,67	3,24	7,82	11,73	3,07
	1,250	1,42	3,47	5,21	6,10	7,87	3,04	5,60	6,63	1,86
	1,500	1,21	2,57	6,27	3,18	3,77	1,47	3,39	4,60	1,45
	2,000	1,03	2,19	3,79	1,42	1,06	0,86	3,19	2,54	0,85
	2,500	0,27	1,57	2,44	0,47	0,50	0,56	2,00	0,64	0,66
	3,000	0,11	0,56	1,40	0,18	0,23	0,28	1,38	0,30	0,59
	4,000	0,05	0,14	0,53	0,08	0,09	0,12	0,65	0,11	0,41
	5,000	bld**	blq***	0,10	0,03	0,08	bld**	0,20	0,03	0,06
7,000	bld	bld	bld	bld	0,05	bld	0,10	bld	0,03	
10,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	nr	bld	0,03	
12,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	

α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma [ng/ml]										
Day	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	96,96	bld**	45,39	167,10	bld**	bld**	24,76	10,32	53,64
	0,167	2182,65	146,47	612,71	4815,04	940,73	220,74	63,95	330,08	429,10
	0,250	4804,73	1264,62	1332,70	4152,82	963,42	1103,71	375,47	2459,10	3469,97
	0,333	5363,80	3201,78	2640,64	2890,26	769,50	1450,29	1149,09	3075,93	7319,52
	0,500	2492,10	3205,90	3148,14	3137,82	2601,44	2628,26	1862,89	3113,07	3529,79
	0,750	1015,00	1844,32	1955,72	3393,64	4301,36	833,45	2976,91	3632,94	1371,90
	1,000	511,62	1301,75	1413,16	2007,30	3439,02	668,41	1613,27	2419,90	633,34
	1,250	292,95	715,86	1074,82	1258,43	1623,58	627,15	1155,28	1367,77	383,72
	1,500	249,62	530,19	1293,50	656,03	777,75	303,26	699,36	948,98	299,14
	2,000	212,49	451,80	781,88	292,95	218,68	177,42	658,10	524,00	175,36
	2,500	55,70	323,89	503,37	96,96	103,15	115,53	412,60	132,03	136,16
	3,000	22,69	115,53	288,82	37,13	47,45	57,76	284,69	61,89	121,72
	4,000	10,32	28,88	109,34	16,50	18,57	24,76	134,10	22,69	84,58
	5,000	bld**	blq***	20,63	6,19	16,50	bld**	41,26	6,19	12,38
7,000	bld	bld	bld	bld	10,32	bld	20,63	bld	6,19	
10,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	nr	bld	6,19	
12,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,011 nmol/ml)
 blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,022 nmol/ml)
 nr: kein Ergebnis

** für die statistische Berechnung wurden die bld-Werte 0 nmol/ml gesetzt

*** für die statistische Berechnung wurden die blq-Werte 0,0165 nmol/ml oder 3,40 ng/ml ($\hat{=} (LOD+LOQ)/2$) gesetzt

Zu B. 1

Statistik der α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]							
Tag	Zeit [h]	Mittel _{arith} [nmol/ml]	Median [nmol/ml]	n	n*	Min [nmol/ml]	Max [nmol/ml]
1	0	nc	nc	0	0	bld	bld
	0,083	0,21	0,12	6	9	bld	0,81
	0,167	5,25	2,08	9	9	0,31	23,34
	0,250	10,73	6,46	9	9	1,82	23,29
	0,333	15,01	14,01	9	9	3,73	35,48
	0,500	13,85	15,09	9	9	9,03	17,11
	0,750	11,49	9,48	9	9	4,04	20,85
	1,000	7,54	6,85	9	9	2,48	16,67
	1,250	4,58	5,21	9	9	1,42	7,87
	1,500	3,10	3,18	9	9	1,21	6,27
	2,000	1,88	1,42	9	9	0,85	3,79
	2,500	1,01	0,64	9	9	0,27	2,44
	3,000	0,56	0,30	9	9	0,11	1,40
	4,000	0,24	0,12	9	9	0,05	0,65
	5,000	0,06	0,03	6	9	bld	0,20
7,000	nc	nc	3	0	bld	0,10	
10,000	nc	nc	1	0	bld	0,03	
12,000	nc	nc	0	0	bld	bld	

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq-, bld- oder nr-Wert)
n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung
nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq-Werte)
bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,011 nmol/ml)
blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,022 nmol/ml)

B. 2 Individuelle BMOA-Plasmakonzentrationen mit Statistik für 9 gesunde männliche und weibliche Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

BMOA Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	bld	bld	bld	blq	bld	bld
	0,167	0,37	bld	blq	0,86	0,30	blq	blq	bld	bld
	0,250	0,82	0,26	0,25	1,91	0,50	0,15	blq***	0,53	0,52
	0,333	1,70	0,69	0,54	2,92	0,71	0,37	0,21	1,05	1,00
	0,500	2,36	2,41	1,44	4,32	0,99	0,97	0,69	2,21	1,59
	0,750	2,13	3,07	2,45	5,60	1,94	1,06	1,39	3,85	1,56
	1,000	1,65	3,29	1,99	4,81	2,82	0,84	1,95	4,39	1,25
	1,250	1,26	2,27	1,88	4,86	2,79	1,31	1,40	3,64	0,85
	1,500	0,93	1,95	1,77	3,61	1,79	1,09	1,29	3,58	0,70
	2,000	0,83	1,64	1,59	2,29	0,95	0,65	1,28	2,29	0,41
	2,500	0,82	1,38	1,20	1,21	0,84	0,49	0,89	1,31	0,34
	3,000	0,37	0,97	0,93	0,72	0,45	0,31	0,83	0,78	0,21
	4,000	0,19	0,29	0,39	0,24	0,16	bld**	0,32	blq***	bld**
5,000	bld	blq	blq	blq	blq	bld	blq	bld	bld	
7,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
10,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
12,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	

BMOA Konzentrationen im Plasma [ng/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	bld	bld	bld	blq	bld	bld
	0,167	87,47	bld	blq	203,30	70,92	blq	blq	bld	bld
	0,250	193,85	61,46	59,10	451,52	118,20	35,46	blq***	125,29	122,93
	0,333	401,88	163,12	127,66	690,29	167,84	87,47	49,64	248,22	236,40
	0,500	557,90	569,72	340,42	1021,25	234,04	229,31	163,12	522,44	375,88
	0,750	503,53	725,75	579,18	1323,84	458,62	250,58	328,60	910,14	368,78
	1,000	390,06	777,76	470,44	1137,08	666,65	198,58	460,98	1037,80	295,50
	1,250	297,86	536,63	444,43	1148,90	659,56	309,68	330,96	860,50	200,94
	1,500	219,85	460,98	418,43	853,40	423,16	257,68	304,96	846,31	165,48
	2,000	196,21	387,70	375,88	541,36	224,58	153,66	302,59	541,36	96,92
	2,500	193,85	326,23	283,68	286,04	198,58	115,84	210,40	309,68	80,38
	3,000	87,47	229,31	219,85	170,21	106,38	73,28	196,21	184,39	49,64
	4,000	44,92	68,56	92,20	56,74	37,82	bld**	75,65	blq***	bld**
5,000	bld	blq	blq	blq	blq	bld	blq	bld	bld	
7,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
10,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
12,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,074 nmol/ml)

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,150 nmol/ml)

nr: kein Ergebnis

** für die statistische Berechnung wurden die bld-Werte 0 nmol/ml gesetzt

*** für die statistische Berechnung wurden die blq-Werte 0,112 nmol/ml oder 26,48 ng/ml ($\hat{=}$ (LOD+LOQ)/2) gesetzt

Zu B. 2

Statistik der BMOA-Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]							
Tag	Zeit [h]	Mittel _{arith} [nmol/ml]	Median [nmol/ml]	n	n*	Min [nmol/ml]	Max [nmol/ml]
1	0	nc	nc	0	0	bld	bld
	0,083	nc	nc	0	0	bld	blq
	0,167	nc	nc	3	0	bld	0,86
	0,250	0,56	0,50	8	9	blq	1,91
	0,333	1,02	0,71	9	9	0,21	2,92
	0,500	1,89	1,59	9	9	0,69	4,32
	0,750	2,56	2,13	9	9	1,06	5,60
	1,000	2,55	1,99	9	9	0,84	4,81
	1,250	2,25	1,88	9	9	0,85	4,86
	1,500	1,86	1,77	9	9	0,70	3,61
	2,000	1,33	1,28	9	9	0,41	2,29
	2,500	0,94	0,89	9	9	0,34	1,38
	3,000	0,62	0,72	9	9	0,21	0,97
	4,000	0,19	0,19	6	9	bld	0,39
	5,000	nc	nc	0	0	bld	blq
7,000	nc	nc	0	0	bld	bld	
10,000	nc	nc	0	0	bld	bld	
12,000	nc	nc	0	0	bld	bld	

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq-, bld oder nr-Wert)
n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung
nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq-Werte)
bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,074 nmol/ml)
blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,150 nmol/ml)

B.3 Individuelle BMHA-Plasmakonzentrationen mit Statistik für 9 gesunde männliche und weiblichen Probande nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

BMHA Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	0,15	bld	bld	bld	blq	bld
	0,167	0,99	0,18	0,74	1,54	0,91	0,59	bld**	0,34	0,40
	0,250	1,60	1,10	1,63	2,57	1,66	1,31	0,35	1,90	2,46
	0,333	2,75	1,58	2,22	5,50	2,61	1,77	0,94	3,29	3,38
	0,500	5,42	3,39	5,07	8,96	5,23	3,28	3,08	6,57	4,35
	0,750	11,08	8,73	10,16	13,76	6,26	6,18	6,77	12,05	11,24
	1,000	16,55	13,33	11,88	22,95	8,88	9,37	10,79	17,02	16,26
	1,250	17,73	13,33	13,25	30,31	10,01	17,64	14,98	24,37	18,16
	1,500	18,78	14,69	16,18	28,13	13,72	17,25	15,43	26,74	19,75
	2,000	18,85	14,05	15,45	33,50	19,68	19,79	17,94	26,04	17,10
	2,500	22,74	13,05	15,66	26,12	19,37	17,08	22,22	24,95	14,83
	3,000	10,96	10,50	14,89	19,81	16,02	15,65	18,67	19,74	12,28
	4,000	5,52	4,88	9,17	11,47	8,73	6,86	10,78	9,31	6,34
	5,000	2,55	2,15	2,64	6,32	5,38	2,87	5,35	4,24	2,61
7,000	0,76	0,62	0,66	1,94	1,37	0,69	1,49	1,48	0,84	
10,000	0,24	0,26	0,19	0,80	0,55	0,19	0,43	0,52	0,28	
12,000	0,15	0,18	blq***	0,43	0,37	bld**	0,19	0,27	blq***	

BMHA Konzentrationen im Plasma [ng/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	0,15	bld	bld	bld	blq	bld
	0,167	206,32	37,51	154,22	320,94	189,64	122,96	bld**	70,86	83,36
	0,250	333,44	229,24	339,69	535,59	345,94	273,00	72,94	395,96	512,66
	0,333	573,10	329,27	462,65	1146,20	543,92	368,87	195,90	685,64	704,39
	0,500	1129,53	706,48	1056,59	1867,26	1089,93	683,55	641,87	1369,19	906,54
	0,750	2309,07	1819,33	2117,34	2867,58	1304,58	1287,91	1410,87	2511,22	2342,42
	1,000	3449,02	2777,97	2475,79	4782,78	1850,59	1952,71	2248,64	3546,97	3388,58
	1,250	3694,93	2777,97	2761,30	6316,60	2086,08	3676,18	3121,83	5078,71	3784,54
	1,500	3913,75	3061,40	3371,91	5862,29	2859,25	3594,90	3215,61	5572,62	4115,90
	2,000	3928,34	2928,02	3219,78	6981,40	4101,31	4124,24	3738,70	5426,74	3563,64
	2,500	4739,02	2719,62	3263,54	5443,41	4036,71	3559,47	4630,65	5199,58	3090,57
	3,000	2284,06	2188,20	3103,08	4128,40	3338,57	3261,46	3890,83	4113,82	2559,15
	4,000	1150,37	1016,99	1911,03	2390,35	1819,33	1429,62	2246,55	1940,20	1321,26
	5,000	531,42	448,06	550,18	1317,09	1121,19	598,11	1114,94	883,62	543,92
7,000	158,38	129,21	137,54	404,30	285,51	143,80	310,52	308,43	175,06	
10,000	50,02	54,18	39,60	166,72	114,62	39,60	89,61	108,37	58,35	
12,000	31,26	37,51	blq***	89,61	77,11	bld**	39,60	56,27	blq***	

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,070 nmol/ml)
 blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,150 nmol/ml)
 nr: kein Ergebnis

** für die statistische Berechnung wurden die bld-Werte 0 nmol/ml gesetzt

*** für die statistische Berechnung wurden die blq-Werte 0,110 nmol/ml oder 22,92 ng/ml ($\hat{=}$ (LOD+LOQ)/2) gesetzt

Zu B. 3

Statistik der BMHA-Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]							
Tag	Zeit [h]	Mittel _{arith} [nmol/ml]	Median [nmol/ml]	n	n*	Min [nmol/ml]	Max [nmol/ml]
1	0	nc	nc	0	0	bld	bld
	0,083	nc	nc	1	0	bld	0,15
	0,167	0,63	0,59	8	9	bld	1,54
	0,250	1,62	1,63	9	9	0,35	2,57
	0,333	2,67	2,61	9	9	0,94	5,50
	0,500	5,04	5,07	9	9	3,08	8,96
	0,750	9,58	10,16	9	9	6,18	13,76
	1,000	14,11	13,33	9	9	8,88	22,95
	1,250	17,75	17,64	9	9	10,01	30,31
	1,500	18,96	17,25	9	9	13,72	28,13
	2,000	20,27	18,85	9	9	14,05	33,50
	2,500	19,56	19,37	9	9	13,05	26,12
	3,000	15,39	15,65	9	9	10,50	19,81
	4,000	8,12	8,73	9	9	4,88	11,47
	5,000	3,79	2,87	9	9	2,15	6,32
	7,000	1,09	0,84	9	9	0,62	1,94
10,000	0,38	0,28	9	9	0,19	0,80	
12,000	0,20	0,18	6	9	bld	0,43	

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq-, bld oder nr-Wert)
n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung
nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq-Werte)
bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,070 nmol/ml)
blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,150 nmol/ml)

B. 4 Individual BMBA-Plasmakonzentrationen mit Statistik für 9 gesunde männliche und weibliche Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

BMBA Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	blq
	0,167	0,20	bld**	0,20	0,42	0,17	0,12	bld**	blq***	0,12
	0,250	0,41	0,46	0,55	0,76	0,38	0,39	0,10	0,17	0,74
	0,333	0,57	0,60	0,84	1,32	0,64	0,52	0,23	0,49	1,17
	0,500	0,95	1,30	1,87	2,13	1,70	1,01	0,72	1,10	1,40
	0,750	3,86	2,96	3,88	3,43	2,33	1,53	1,82	2,25	3,77
	1,000	6,77	6,68	5,37	4,83	2,49	2,84	3,33	3,73	6,42
	1,250	8,79	7,13	6,28	7,78	2,73	5,59	3,93	5,05	9,24
	1,500	11,23	9,49	7,82	7,49	4,70	6,74	3,97	7,27	12,74
	2,000	14,28	9,32	8,13	10,69	10,27	9,20	5,42	5,59	13,76
	2,500	18,32	9,38	8,20	9,33	10,29	10,62	8,13	8,24	14,42
	3,000	10,98	8,88	9,30	7,88	11,37	9,96	9,13	7,78	14,44
	4,000	9,60	6,81	9,70	7,68	10,72	7,74	6,92	6,16	11,19
5,000	6,25	4,04	6,30	7,10	8,25	4,84	7,23	3,91	7,28	
7,000	2,60	1,37	2,06	4,11	4,30	2,17	3,82	2,11	3,32	
10,000	0,74	0,58	0,35	1,82	1,45	0,64	1,15	0,87	1,32	
12,000	0,36	0,37	0,26	1,27	0,85	0,38	0,74	0,48	0,60	

BMBA Konzentrationen im Plasma [ng/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	blq
	0,167	36,06	bld**	36,06	75,73	30,65	21,64	bld**	blq***	21,64
	0,250	73,92	82,94	99,17	137,03	68,51	70,32	18,03	30,65	133,42
	0,333	102,77	108,18	151,45	238,00	115,39	93,76	41,47	88,35	210,95
	0,500	171,29	234,39	337,16	384,04	306,51	182,10	129,82	198,33	252,42
	0,750	695,96	533,69	699,56	618,43	420,10	275,86	328,15	405,68	679,73
	1,000	1220,63	1204,40	968,21	870,85	448,95	512,05	600,40	672,52	1157,53
	1,250	1584,84	1285,54	1132,28	1402,73	492,22	1007,88	708,58	910,52	1665,97
	1,500	2024,77	1711,05	1409,95	1350,45	847,41	1215,22	715,79	1310,78	2297,02
	2,000	2574,68	1680,40	1465,84	1927,41	1851,68	1658,76	977,23	1007,88	2480,93
	2,500	3303,10	1691,21	1478,46	1682,20	1855,29	1914,79	1465,84	1485,67	2599,93
	3,000	1979,69	1601,06	1676,79	1420,76	2050,01	1795,79	1646,14	1402,73	2603,53
	4,000	1730,88	1227,84	1748,91	1384,70	1932,82	1395,52	1247,68	1110,65	2017,56
5,000	1126,88	728,41	1135,89	1280,13	1487,48	872,65	1303,57	704,97	1312,58	
7,000	468,78	247,01	371,42	741,03	775,29	391,25	688,75	380,43	598,60	
10,000	133,42	104,57	63,11	328,15	261,44	115,39	207,35	156,86	238,00	
12,000	64,91	66,71	46,88	228,98	153,26	68,51	133,42	86,54	108,18	

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,040 nmol/ml)

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,080 nmol/ml)

nr: kein Ergebnis

** für die statistische Berechnung wurden die bld-Werte 0 nmol/ml gesetzt

*** für die statistische Berechnung wurden die blq-Werte 0,060 nmol/ml oder 6,50 ng/ml ($\hat{=}$ (LOD+LOQ)/2) gesetzt

Zu B. 4

Statistik der BMBA-Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]							
Tag	Zeit [h]	Mittel _{arith} [nmol/ml]	Median [nmol/ml]	n	n*	Min [nmol/ml]	Max [nmol/ml]
1	0	nc	nc	0	0	bld	bld
	0,083	nc	nc	0	0	bld	blq
	0,167	0,14	0,12	6	9	bld	0,42
	0,250	0,44	0,41	9	9	0,10	0,76
	0,333	0,71	0,60	9	9	0,23	1,32
	0,500	1,35	1,30	9	9	0,72	2,13
	0,750	2,87	2,96	9	9	1,53	3,88
	1,000	4,72	4,83	9	9	2,49	6,77
	1,250	6,28	6,28	9	9	2,73	9,24
	1,500	7,94	7,49	9	9	3,97	12,74
	2,000	9,63	9,32	9	9	5,42	14,28
	2,500	10,77	9,38	9	9	8,13	18,32
	3,000	9,97	9,30	9	9	7,78	14,44
	4,000	8,50	7,74	9	9	6,16	11,19
	5,000	6,13	6,30	9	9	3,91	8,25
7,000	2,87	2,60	9	9	1,37	4,30	
10,000	0,99	0,87	9	9	0,35	1,82	
12,000	0,59	0,48	9	9	0,26	1,27	

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq-, bld-, oder nr-Wert)
n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung
nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq-Werte)
bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,040 nmol/ml)
blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,080 nmol/ml)

B. 5 Individuelle TNLA-Plasmakonzentrationen mit Statistik für 9 gesunde männliche und weibliche Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

TNLA Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,167	0,56	bld**	0,21	2,00	0,27	blq***	bld**	0,08	0,20
	0,250	3,88	0,57	0,49	2,23	0,76	0,79	0,09	0,67	4,52
	0,333	5,09	0,57	0,54	2,83	0,97	1,44	0,42	1,27	16,39
	0,500	4,33	1,36	2,23	2,44	2,63	2,96	1,79	1,93	15,06
	0,750	4,35	2,10	2,17	3,53	7,03	3,08	3,81	3,26	10,76
	1,000	2,32	3,80	2,69	3,30	11,00	3,16	2,86	3,12	5,60
	1,250	1,94	1,67	0,86	2,69	8,34	1,69	2,32	2,11	4,44
	1,500	1,38	0,73	1,44	2,21	4,74	2,29	1,24	2,28	3,11
	2,000	1,25	0,56	1,08	1,24	3,90	1,60	1,38	0,87	1,67
	2,500	0,44	0,42	0,50	0,79	1,81	0,73	0,71	0,54	0,96
	3,000	0,23	nr	0,64	0,34	1,51	0,58	0,71	0,37	0,58
	4,000	nr	nr	0,60	0,22	0,60	0,14	0,26	0,12	0,34
	5,000	bld	nr	0,13	bld	0,14	bld	blq	bld	0,12
7,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
10,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
12,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	

TNLA Konzentrationen im Plasma [ng/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,167	84,11	bld**	31,54	300,40	40,55	blq***	bld**	12,02	30,04
	0,250	582,78	85,61	73,60	334,95	114,15	118,66	13,52	100,63	678,90
	0,333	764,52	85,61	81,11	425,07	145,69	216,29	63,08	190,75	2461,78
	0,500	650,37	204,27	334,95	366,49	395,03	444,59	268,86	289,89	2262,01
	0,750	653,37	315,42	325,93	530,21	1055,91	462,62	572,26	489,65	1616,15
	1,000	348,46	570,76	404,04	495,66	1652,20	474,63	429,57	468,62	841,12
	1,250	291,39	250,83	129,17	404,04	1252,67	253,84	348,46	316,92	666,89
	1,500	207,28	109,65	216,29	331,94	711,95	343,96	186,25	342,46	467,12
	2,000	187,75	84,11	162,22	186,25	585,78	240,32	207,28	130,67	250,83
	2,500	66,09	63,08	75,10	118,66	271,86	109,65	106,64	81,11	144,19
	3,000	34,55	nr	96,13	51,07	226,80	87,12	106,64	55,57	87,12
	4,000	nr	nr	90,12	33,04	90,12	21,03	39,05	18,02	51,07
	5,000	bld	nr	19,53	bld	21,03	bld	blq	bld	18,02
7,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
10,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
12,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,036 nmol/ml)
 blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,072 nmol/ml)
 nr: kein Ergebnis

** für die statistische Berechnung wurden die bld-Werte 0 nmol/ml gesetzt

*** für die statistische Berechnung wurden die blq-Werte 0,054 nmol/ml oder 8,11 ng/ml ($\hat{=} (LOD+LOQ)/2$) gesetzt

Zu B. 5

Statistik der TNLA-Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]							
Tag	Zeit [h]	Mittel _{arith} [nmol/ml]	Median [nmol/ml]	n	n*	Min [nmol/ml]	Max [nmol/ml]
1	0	nc	nc	0	0	bld	bld
	0,083	nc	nc	0	0	bld	bld
	0,167	0,37	0,20	6	9	bld	2,00
	0,250	1,56	0,76	9	9	0,09	4,52
	0,333	3,28	1,27	9	9	0,42	16,39
	0,500	3,86	2,44	9	9	1,36	15,06
	0,750	4,45	3,53	9	9	2,10	10,76
	1,000	4,21	3,16	9	9	2,32	11,00
	1,250	2,90	2,11	9	9	0,86	8,34
	1,500	2,16	2,21	9	9	0,73	4,74
	2,000	1,51	1,25	9	9	0,56	3,90
	2,500	0,77	0,71	9	9	0,42	1,81
	3,000	0,62	0,58	8	8	0,23	1,51
	4,000	0,33	0,26	7	7	0,12	0,60
	5,000	nc	nc	3	0	bld	0,14
7,000	nc	nc	0	0	bld	bld	
10,000	nc	nc	0	0	bld	bld	
12,000	nc	nc	0	0	bld	bld	

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq-, bld- oder nr-Wert)
n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung
nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq-Werte)
bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,036nmol/ml)
blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,072 nmol/ml)

B. 6 Individuelle BNLA-Plasmakonzentrationen von 9 gesunde männliche und weibliche Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

BNLA Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,167	blq	bld	bld	0,52	blq	bld	bld	nr	bld
	0,250	blq	nr	blq	0,83	blq	0,37	bld	blq	0,31
	0,333	1,07	0,28	0,19	0,62	nr	0,68	0,10	0,32	2,69
	0,500	nr	0,59	0,41	0,68	0,45	2,22	0,36	nr	2,09
	0,750	bld	nr	nr	0,92	1,51	0,65	0,93	nr	nr
	1,000	bld	nr	nr	nr	1,62	nr	nr	nr	nr
	1,250	bld	nr	nr	nr	0,90	nr	nr	nr	nr
	1,500	bld	bld	bld	nr	nr	nr	nr	bld	bld
	2,000	bld	bld	bld	bld	nr	bld	bld	bld	bld
	2,500	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	3,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	4,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
5,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
7,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
10,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
12,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
BNLA Konzentrationen im Plasma [ng/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,083	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0,167	blq	bld	bld	92,72	blq	bld	bld	nr	bld
	0,250	blq	nr	blq	147,99	blq	65,97	bld	blq	55,27
	0,333	190,78	49,92	33,88	110,55	nr	121,24	17,83	57,06	479,63
	0,500	nr	105,20	73,10	121,24	80,24	395,83	64,19	nr	372,65
	0,750	bld	nr	nr	164,04	269,23	115,90	165,82	nr	nr
	1,000	bld	nr	nr	nr	288,85	nr	nr	nr	nr
	1,250	bld	nr	nr	nr	160,47	nr	nr	nr	nr
	1,500	bld	bld	bld	nr	nr	nr	nr	bld	bld
	2,000	bld	bld	bld	bld	nr	bld	bld	bld	bld
	2,500	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	3,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	4,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
5,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
7,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
10,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	
12,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,042 nmol/ml)
 blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,084 nmol/ml)
 nr: kein Ergebnis

B. 7 Individuelle Urinvolumina der gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

Urinvolumen [ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	45	22	12	56	17	68	77	25	50
	0 - 1	91	na	na	110	na	69	na	na	na
	1 - 2	na	na	na	169	145	na	na	na	na
	2 - 3	315	300	260	175	188	125	115	210	390
	3 - 4	na	na	na	na	110	na	na	na	na
	4 - 6	220	200	na	140	na	170	na	na	150
	6 - 8	na	na	165	na	na	na	160	440	150
	8 - 12	450	620	100	580	700	650	400	350	310
	12 - 24	650	900	1650	920	920	1350	570	1300	1000

B. 8 Individuelle Urinkonzentrationen von α -Liponsäure in gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

LA Urinkonzentrationen [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Proband								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0 - 1	13,80	na	na	23,40	na	39,30	na	na	na
	1 - 2	na	na	na	11,70	32,30	na	na	na	na
	2 - 3	10,80	15,50	11,70	2,90	21,20	16,40	25,20	17,60	18,30
	3 - 4	na	na	na	na	1,90	na	na	na	na
	4 - 6	bld	3,00	na	blq	na	2,00	na	na	2,00
	6 - 8	na	na	10,30	na	na	na	8,50	1,10	1,50
	8 - 12	bld	bld	0,70	bld	bld	bld	blq	bld	bld
	12 - 24	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld

bld: unter der Nachweisgrenze (LOD = 0,25 nmol/ml)
 blq: unter der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,50 nmol/ml)
 na: keine Probe

B. 9 Individuelle Urinkonzentrationen von BMOA in gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

BMOA Urinkonzentrationen [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0 - 1	9,60	na	na	60,80	na	42,80	na	na	na
	1 - 2	na	na	na	85,00	30,70	na	na	na	na
	2 - 3	45,10	90,30	41,60	57,10	27,70	36,00	61,70	107,10	25,80
	3 - 4	na	na	na	na	16,20	na	na	na	na
	4 - 6	10,40	43,60	na	41,30	na	13,60	na	na	18,50
	6 - 8	na	na	60,30	na	na	na	66,30	12,50	2,20
	8 - 12	bld	3,30	5,60	2,70	1,50	bld	2,80	blq	bld
	12 - 24	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld

bld: unter der Nachweisgrenze (LOD = 0,74 nmol/ml)
 blq: unter der Bestimmungsgrenze (LOQ = 1,48 nmol/ml)
 na: keine Probe

B. 10 Individuelle Urinkonzentrationen von BMHA in gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

BMHA Urinkonzentrationen [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0 - 1	11,30	na	na	84,10	na	131,00	na	na	na
	1 - 2	na	na	na	290,00	81,10	na	na	na	na
	2 - 3	451,70	373,50	196,30	433,10	177,00	309,30	576,50	700,30	231,60
	3 - 4	na	na	na	na	493,10	na	na	na	na
	4 - 6	558,40	349,10	na	766,20	na	433,30	na	na	636,30
	6 - 8	na	na	592,20	na	na	na	1833,60	271,50	100,00
	8 - 12	5,00	22,60	57,40	81,10	59,40	22,40	97,20	57,40	15,40
	12 - 24	3,20	bld	bld	bld	bld	bld	3,80	5,00	3,50

bld: unter der Nachweisgrenze (LOD = 0,80 nmol/ml)
 blq: unter der Bestimmungsgrenze (LOQ = 1,60 nmol/ml)
 na: keine Probe

B. 11 Individuelle Urinkonzentrationen von BMBA in gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

BMBA Urinkonzentrationen [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0 - 1	2,90	na	na	19,60	na	39,90	na	na	na
	1 - 2	na	na	na	70,10	28,30	na	na	na	na
	2 - 3	140,00	130,90	89,90	111,00	54,10	314,40	194,10	181,30	78,20
	3 - 4	na	na	na	na	473,70	na	na	na	na
	4 - 6	275,70	156,90	na	254,50	na	272,20	na	na	391,10
	6 - 8	na	na	192,80	na	na	na	448,20	125,80	83,80
	8 - 12	26,70	18,90	41,20	63,40	48,30	44,80	60,30	55,30	20,10
	12 - 24	5,80	3,90	2,50	8,10	6,80	1,90	7,20	10,00	4,30

bld: unter der Nachweisgrenze (LOD = 0,46 nmol/ml)
 blq: unter der Bestimmungsgrenze (LOQ = 0,92 nmol/ml)
 na: keine Probe

B. 12 Individuelle Urinkonzentrationen von TNLA in gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg rac- α -Liponsäure.

TNLA Urinkonzentrationen [nmol/ml]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
	0 - 1	3,10	na	na	11,80	na	15,30	na	na	na
	1 - 2	na	na	na	15,80	26,00	na	na	na	na
	2 - 3	16,70	7,10	10,30	9,20	24,10	15,40	13,00	16,40	12,60
	3 - 4	na	na	na	na	5,50	na	na	na	na
	4 - 6	bld	bld	na	8,80	na	4,20	na	na	bld
	6 - 8	na	na	bld	na	na	na	21,20	blq	bld
	8 - 12	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	blq	bld
	12 - 24	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld

bld: unter der Nachweisgrenze (LOD = 0,56 nmol/ml)
 blq: unter der Bestimmungsgrenze (LOQ = 1,12 nmol/ml)
 na: keine Probe

B. 13 Ausgeschiedene α -Liponsäure Mengen von gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg R(+)- α -Liponsäure.

LA Urinmenge [nmol]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0 - 1	1255,80	na	na	2574,00	na	2711,70	na	na	na
	1 - 2	1255,80	na	na	4551,30	4683,50	2711,70	na	na	na
	2 - 3	4657,80	4650,00	3042,00	5058,80	8669,10	4761,70	2898,00	3696,00	7137,00
	3 - 4	4657,80	4650,00	3042,00	5058,80	8878,10	4761,70	2898,00	3696,00	7137,00
	4 - 6	4657,80	5250,00	3042,00	5058,80	8878,10	5101,70	2898,00	3696,00	7437,00
	6 - 8	4657,80	5250,00	4741,50	5058,80	8878,10	5101,70	4258,00	4180,00	7662,00
	8 - 12	4657,80	5250,00	4811,50	5058,80	8878,10	5101,70	4258,00	4180,00	7662,00
	12 - 24	4657,80	5250,00	4811,50	5058,80	8878,10	5101,70	4258,00	4180,00	7662,00

na: keine Probe

B. 14 Ausgeschiedene BMOA Mengen von gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg R(+)- α -Liponsäure.

BMOA Urinmenge [nmol]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0 - 1	873,60	na	na	6688,00	na	2953,20	na	na	na
	1 - 2	873,60	na	na	21053,00	4451,50	2953,20	na	na	na
	2 - 3	15080,10	27090,00	10816,00	31045,50	9659,10	7453,20	7095,50	22491,00	10062,00
	3 - 4	15080,10	27090,00	10816,00	31045,50	11441,10	7453,20	7095,50	22491,00	10062,00
	4 - 6	17368,10	35810,00	10816,00	36827,50	11441,10	9765,20	7095,50	22491,00	12837,00
	6 - 8	17368,10	35810,00	20765,50	36827,50	11441,10	9765,20	17703,50	27991,00	13167,00
	8 - 12	17368,10	37856,00	21325,50	38393,50	12491,10	9765,20	18823,50	27991,00	13167,00
	12 - 24	17368,10	37856,00	21325,50	38393,50	12491,10	9765,20	18823,50	27991,00	13167,00

na: keine Probe

B. 15 Ausgeschiedene BMHA Mengen von gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg R(+)- α -Liponsäure.

BMHA Urinmenge [nmol]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0 - 1	1028,30	na	na	9251,00	na	9039,0	na	na	na
	1 - 2	1028,30	na	na	58261,00	11759,5	9039,0	na	na	na
	2 - 3	143313,8	112050,0	51038,0	134053,5	45035,5	47701,5	66297,5	147063,0	90324,0
	3 - 4	143313,8	112050,0	51038,0	134053,5	99276,5	47701,5	66297,5	147063,0	90324,0
	4 - 6	266161,8	181870,0	51038,0	241321,5	99276,5	121362,5	66297,5	147063,0	185769,0
	6 - 8	266161,8	181870,0	148751,0	241321,5	99276,50	121362,5	359673,5	266523,0	200769,0
	8 - 12	268411,8	195882,0	154491,0	288359,5	140856,5	135922,5	398553,5	286613,0	205543,0
	12 - 24	270491,8	195882,0	154491,0	288359,5	140856,5	135922,5	400719,5	293113,0	209043,0

na: keine Probe

B. 16 Ausgeschiedene BMBA Mengen von gesunden männlichen und weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg R(+)- α -Liponsäure.

BMBA Urinmenge [nmol]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0 - 1	263,90	na	na	2156,00	na	2753,10	na	na	na
	1 - 2	263,90	na	na	14002,90	4103,50	2753,10	na	na	na
	2 - 3	44363,9	39270,00	23374,0	33427,90	14274,30	42053,10	22321,50	38073,0	30498,0
	3 - 4	44363,9	39270,0	23374,0	33427,90	66381,30	42053,10	22321,50	38073,0	30498,0
	4 - 6	105017,9	70650,0	23374,0	69057,90	66381,30	88327,10	22321,50	38073,0	89163,0
	6 - 8	105017,9	70650,0	55186,0	69057,90	66381,30	88327,10	94033,50	93425,0	101733,0
	8 - 12	117032,9	82368,0	59306,0	105829,9	100191,3	117447,1	118153,5	112780,0	107964,0
	12 - 24	120802,9	85878,0	63431,0	113281,9	106447,3	120012,1	122257,5	125780,0	112264,0

na: keine Probe

B. 17 Ausgeschiedene TNLA Mengen von gesunden männlichen weiblichen Probanden nach oraler Gabe von 600 mg R(+)- α -Liponsäure.

TNLA Urinmenge [nmol]										
Tag	Zeit [h]	Subjekt Nr.								
		21 BL	22 HA	23 GR	24 AJ	25 MK	26 WD	27 ER	28 JB	29 GST
1	-1 - 0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0 - 1	282,10	na	na	1298,00	na	1055,70	na	na	na
	1 - 2	282,10	na	na	3968,20	3770,00	1055,70	na	na	na
	2 - 3	5542,60	2130,00	2678,00	5578,20	8300,80	2980,70	1495,00	3444,00	4914,00
	3 - 4	5542,60	2130,00	2678,00	5578,20	8905,80	2980,70	1495,00	3444,00	4914,00
	4 - 6	5542,60	2130,00	2678,00	6810,20	8905,80	3694,70	1495,00	3444,00	4914,00
	6 - 8	5542,60	2130,00	2678,00	6810,20	8905,80	3694,70	4887,00	3444,00	4914,00
	8 - 12	5542,60	2130,00	2678,00	6810,20	8905,80	3694,70	4887,00	3444,00	4914,00
	12 - 24	5542,60	2130,00	2678,00	6810,20	8905,80	3694,70	4887,00	3444,00	4914,00

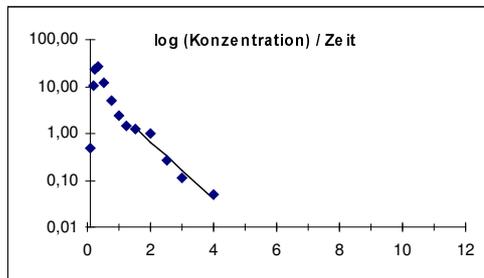
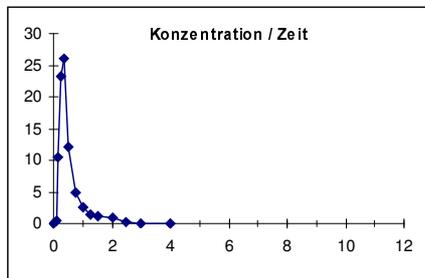
na: keine Probe

B. 18 Nicht kompartimentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg).

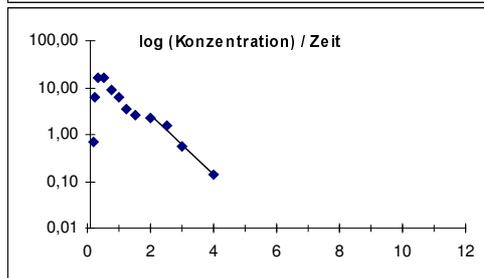
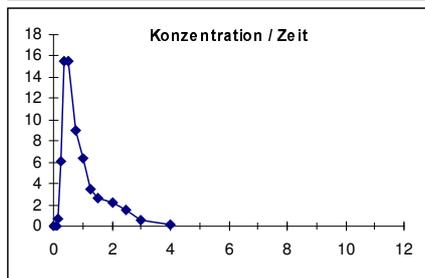
Links: Lineare Darstellung

Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast

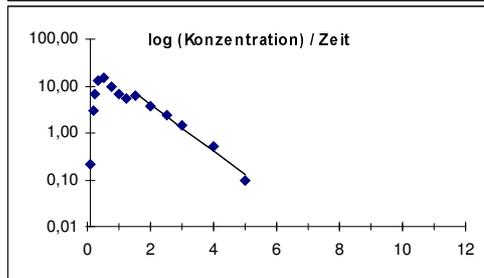
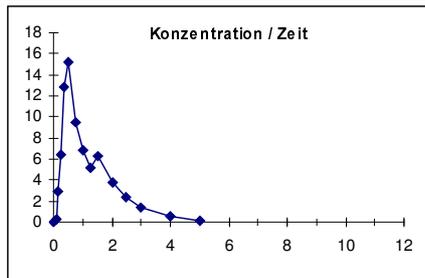
21 BL



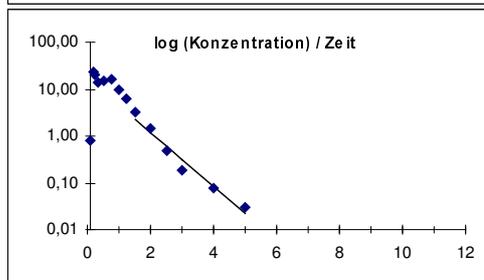
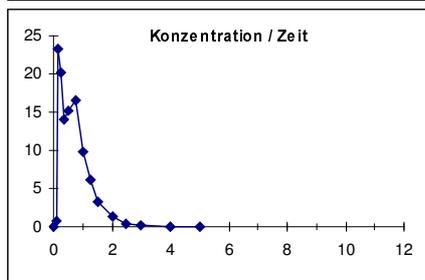
22 HA



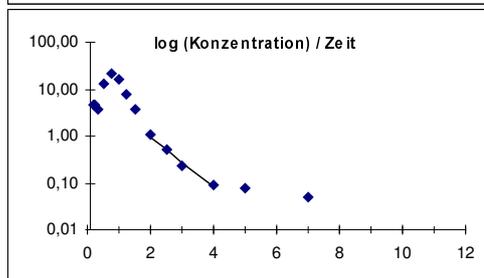
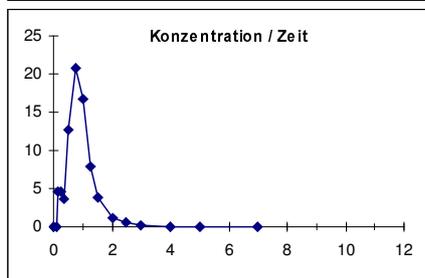
23 GR



24 AJ

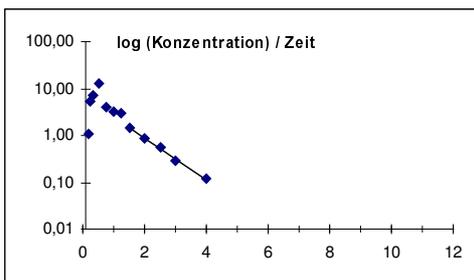
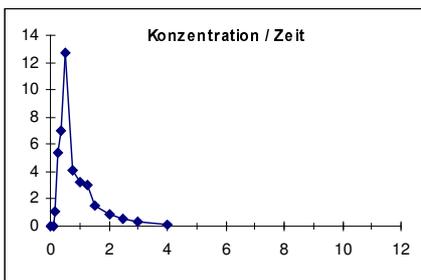


25 MK

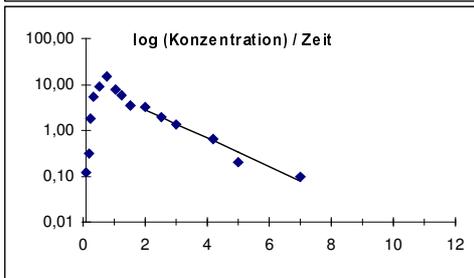
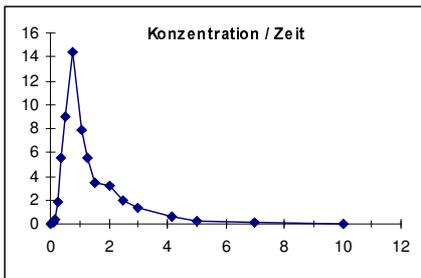


Zu B. 18

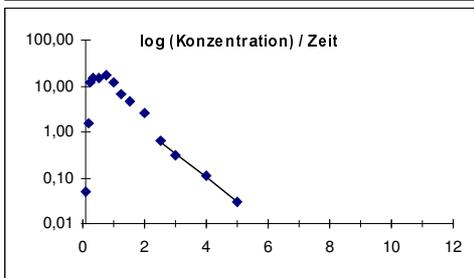
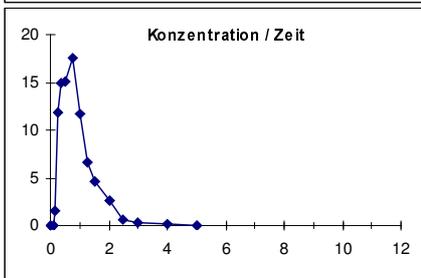
26 WD



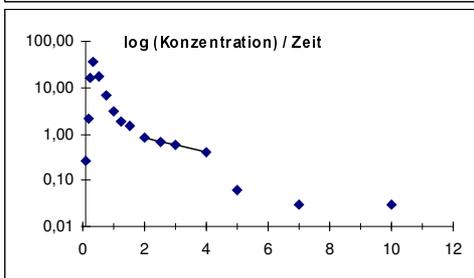
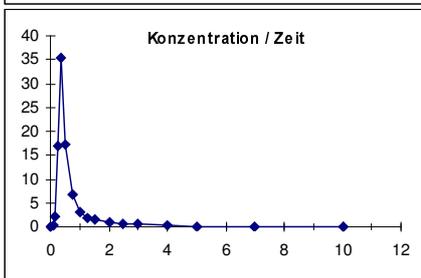
27 ER



28 JB

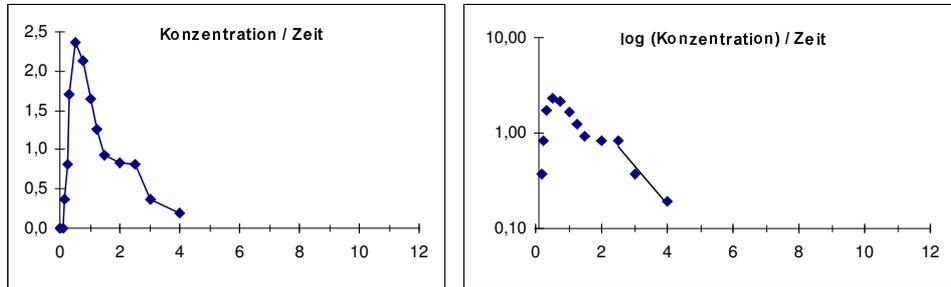


29 GST

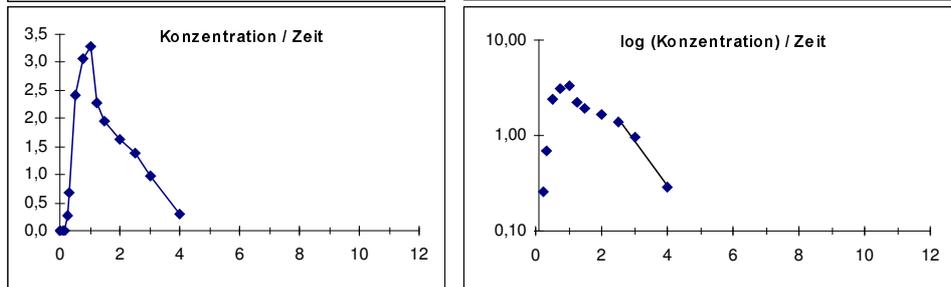


**B. 19 Nicht kompartmentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen BMOA-Konzentrationen im Plasma nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg).
Links: Lineare Darstellung
Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast**

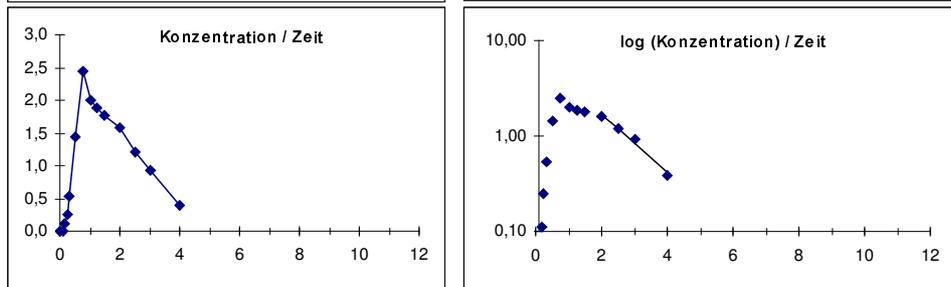
21 BL



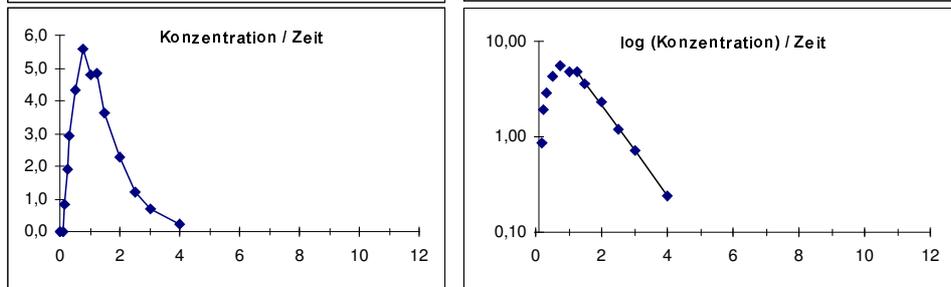
22 HA



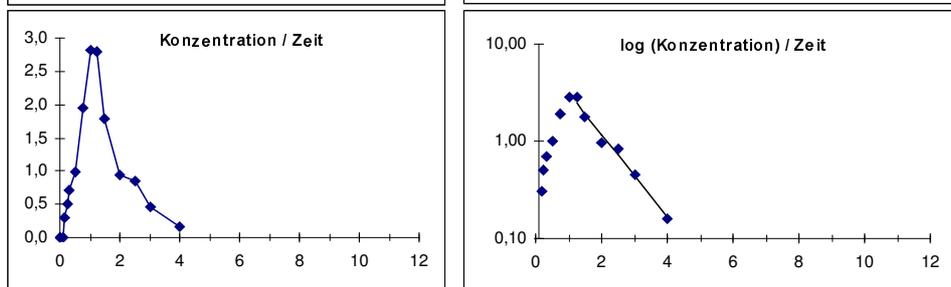
23 GR



24 AJ

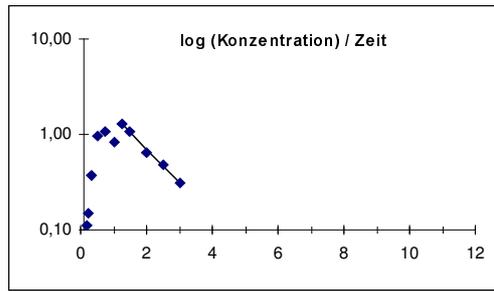
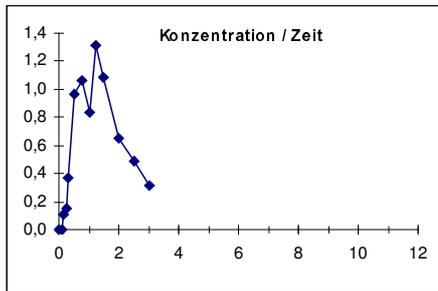


25 MK

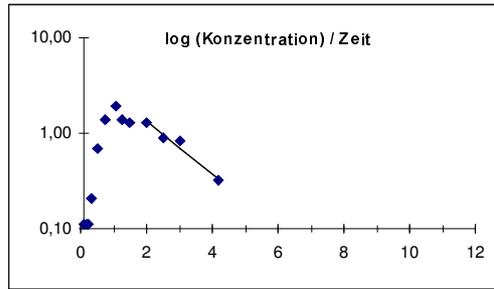
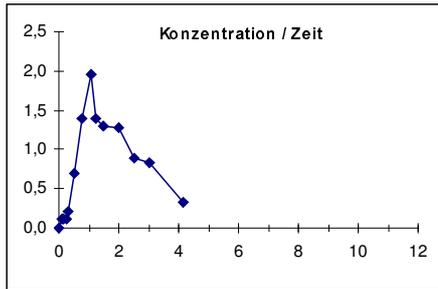


Zu B. 19

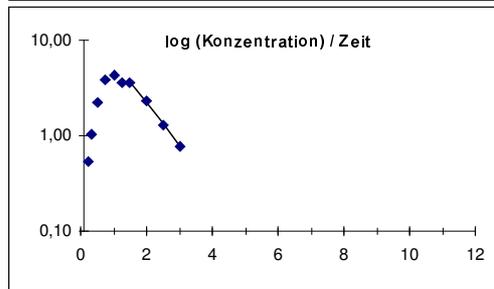
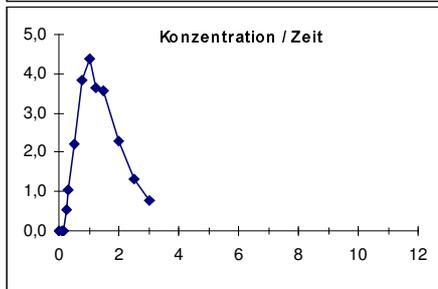
26 WD



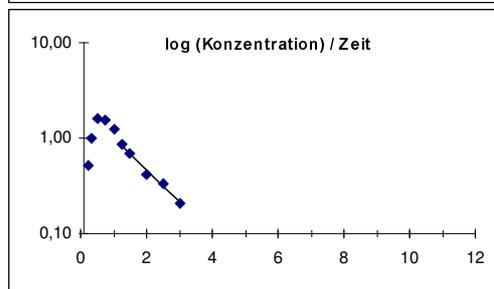
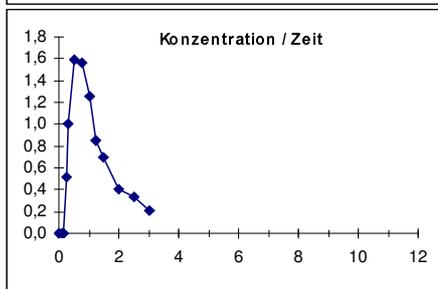
27 ER



28 JB

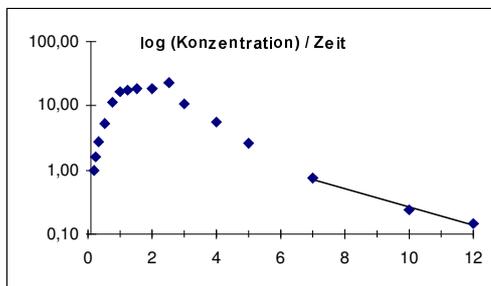
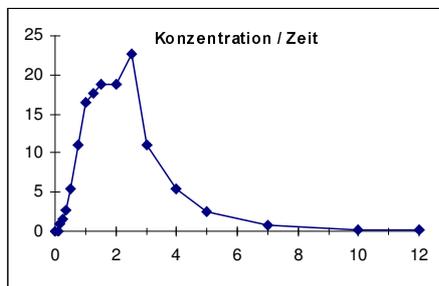


29 GST

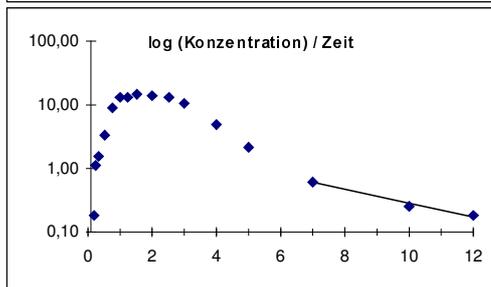
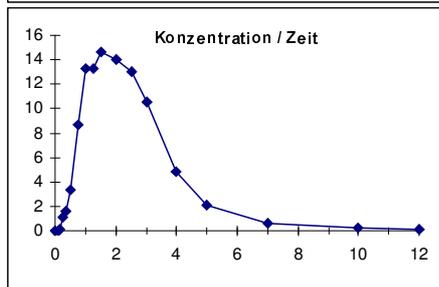


**B. 20 Nicht kompartmentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen BMHA-Konzentrationen im Plasma nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg).
Links: Lineare Darstellung
Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast**

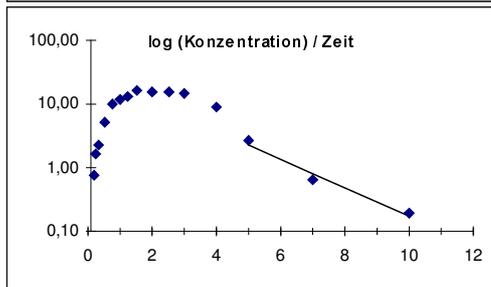
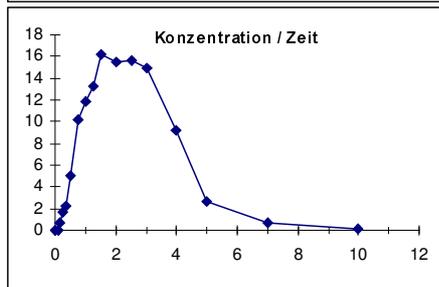
21 BL



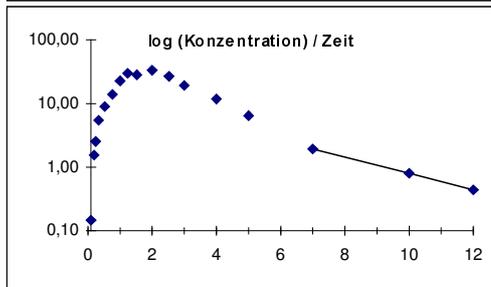
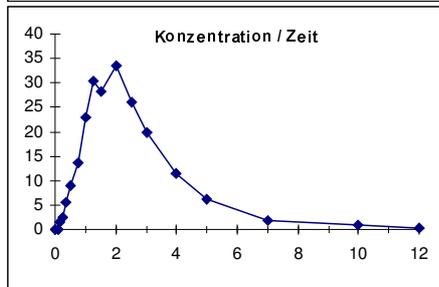
22 HA



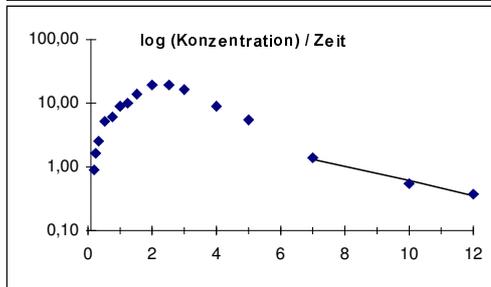
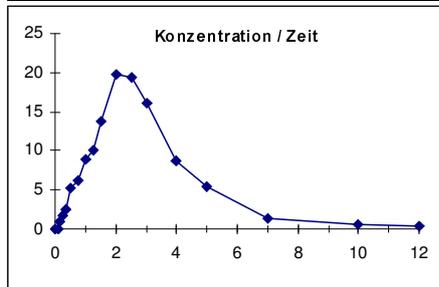
23 GR



24 AJ

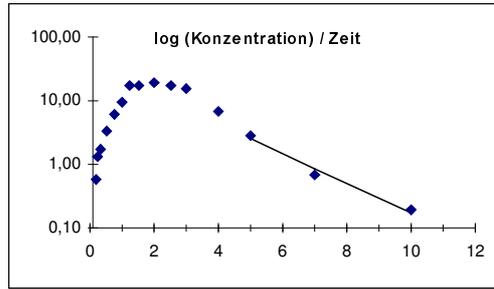
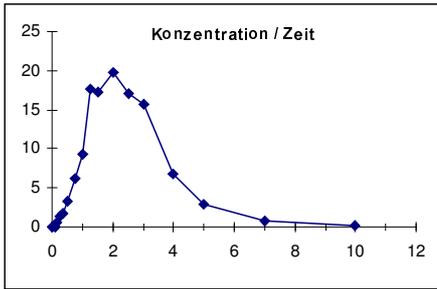


25 MK

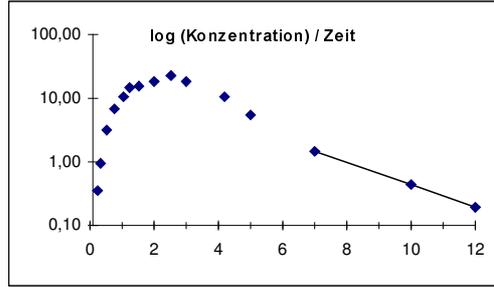
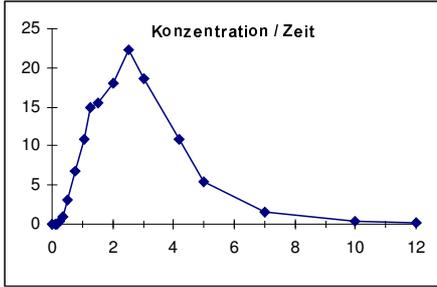


Zu B. 20

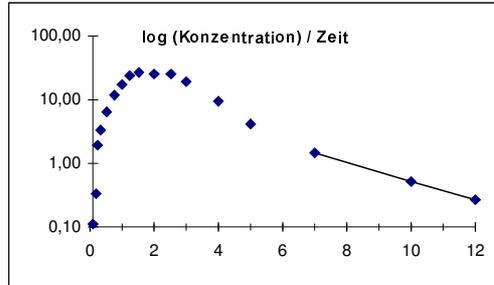
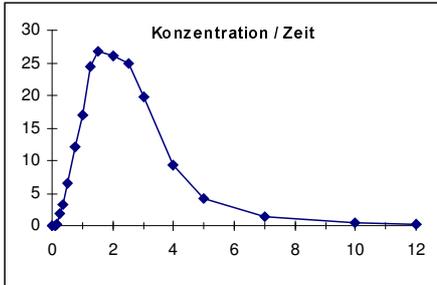
26 WD



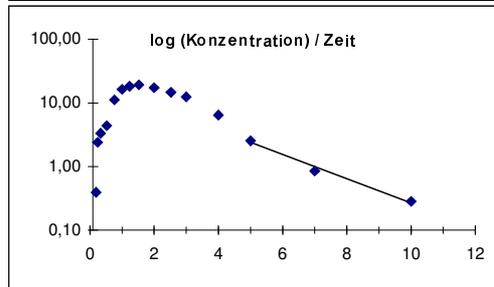
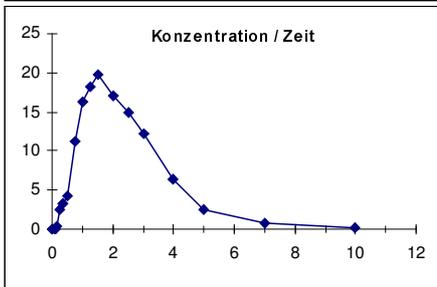
27 ER



28 JB



29 GST

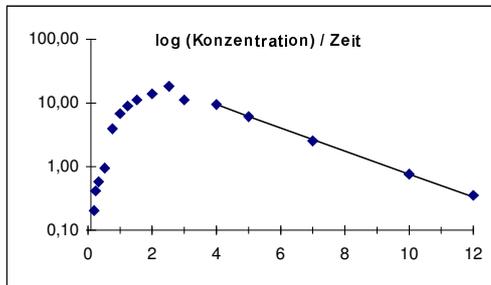
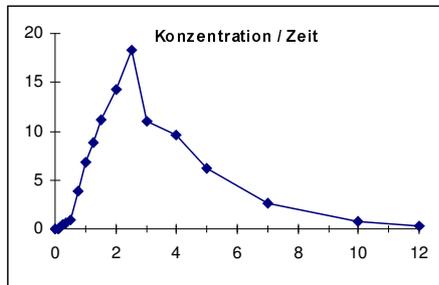


B. 21 Nicht kompartimentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen BMBA-Konzentrationen im Plasma nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg).

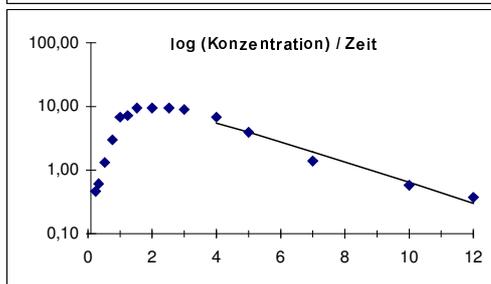
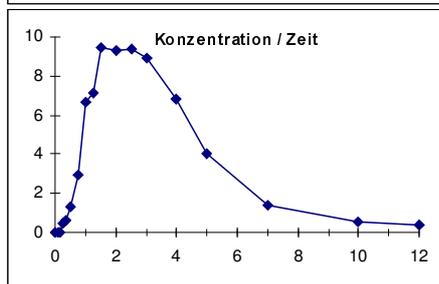
Links: Lineare Darstellung

Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast

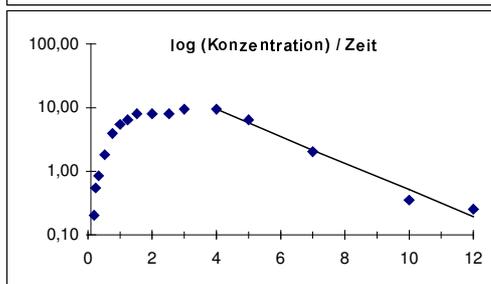
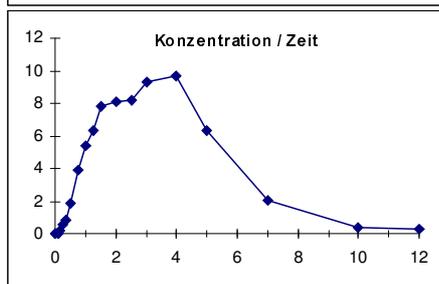
21 BL



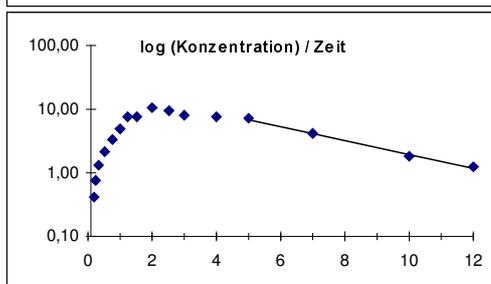
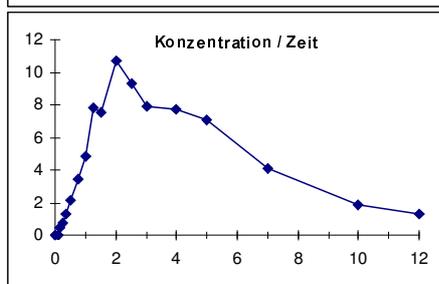
22 HA



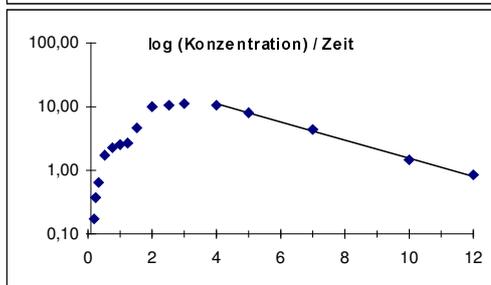
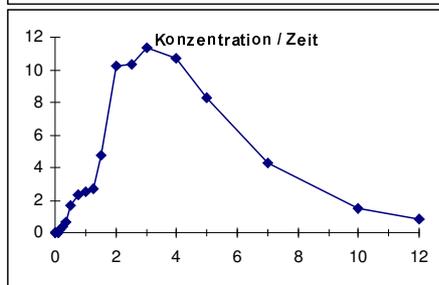
23 GR



24 AJ

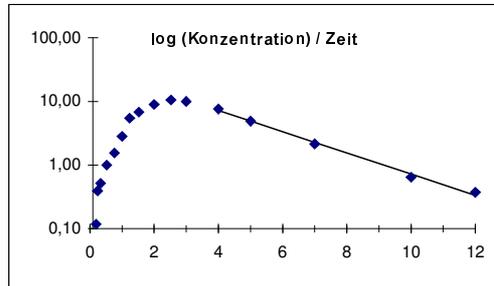
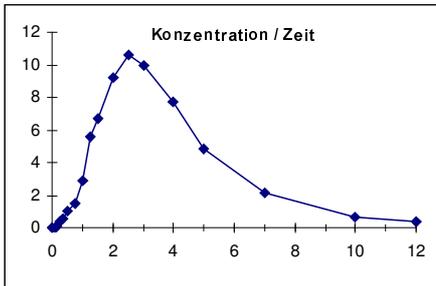


25 MK

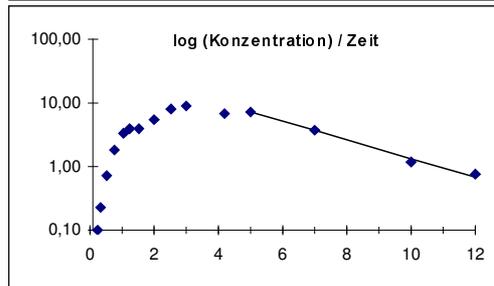
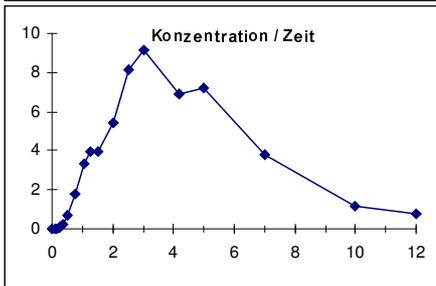


Zu B. 21

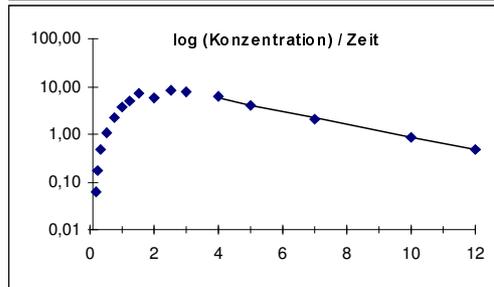
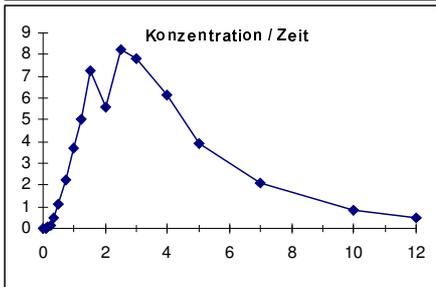
26 WD



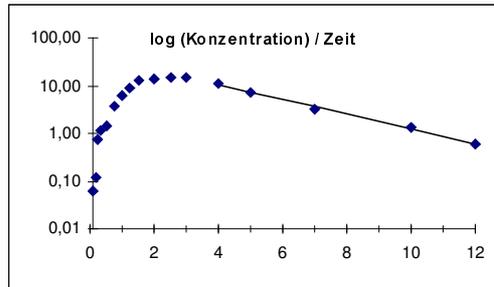
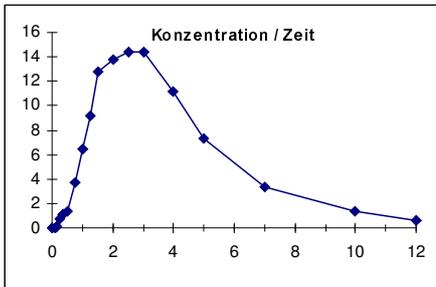
27 ER



28 JB



29 GST

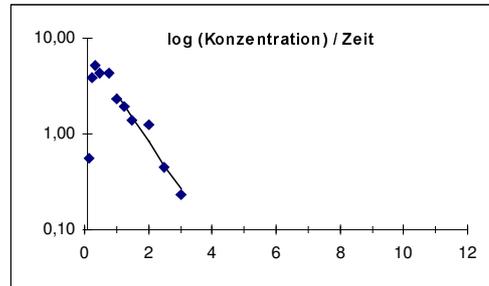
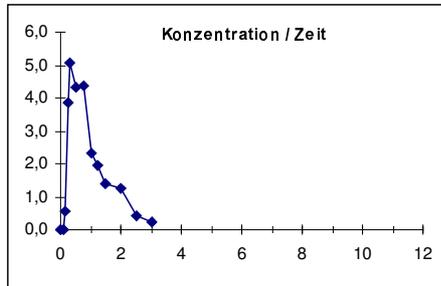


B. 22 Nicht kompartimentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen TNLA-Konzentrationen im Plasma nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg).

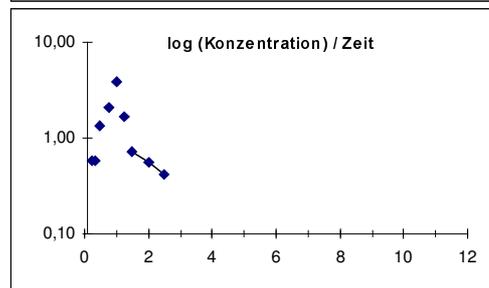
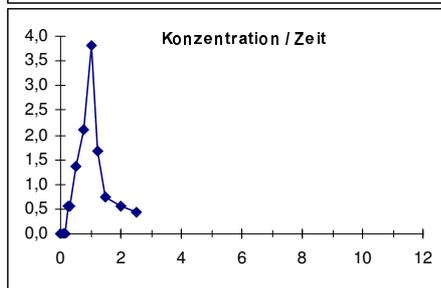
Links: Lineare Darstellung

Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast

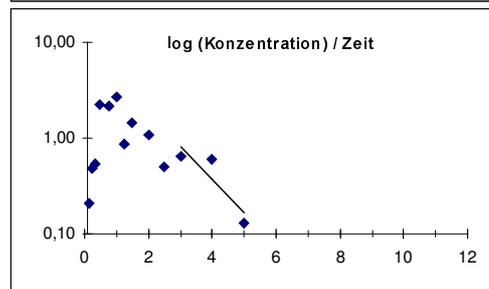
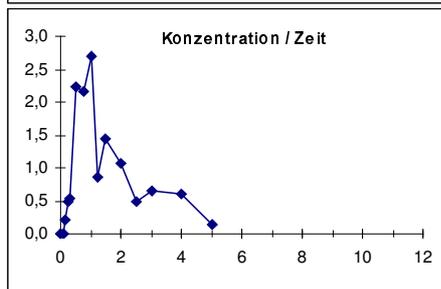
21 BL



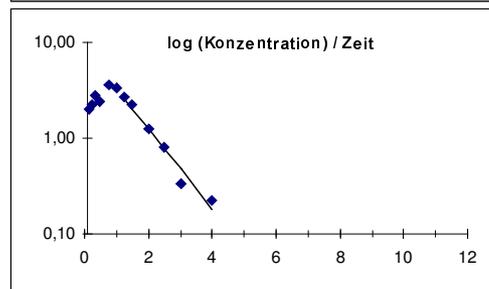
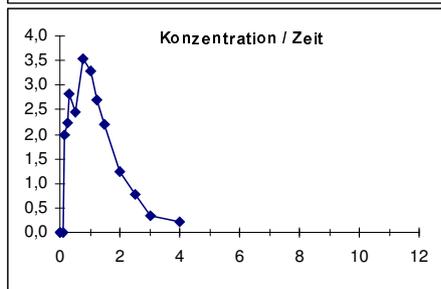
22 HA



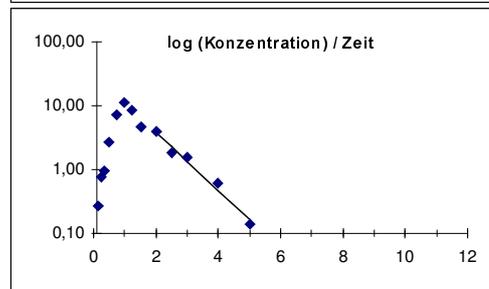
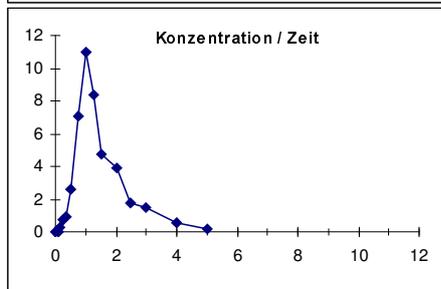
23 GR



24 AJ

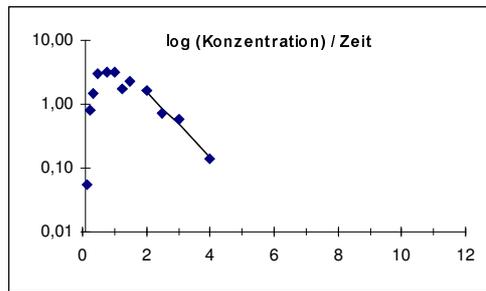
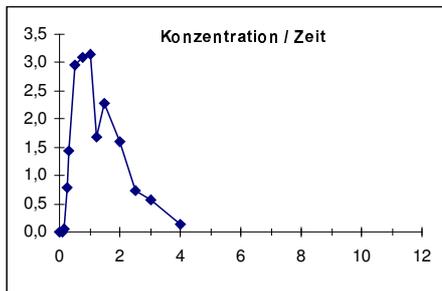


25 MK

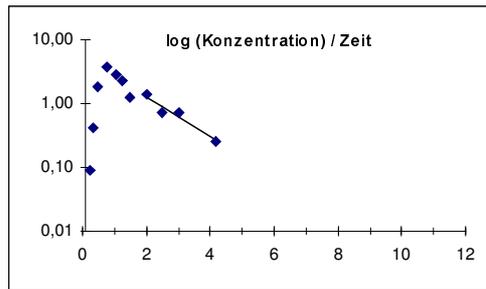
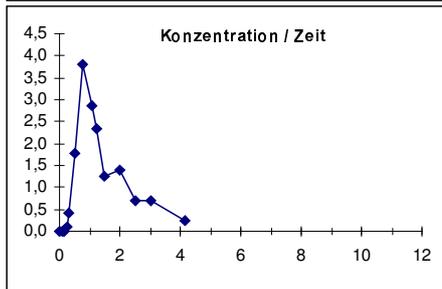


Zu B. 22

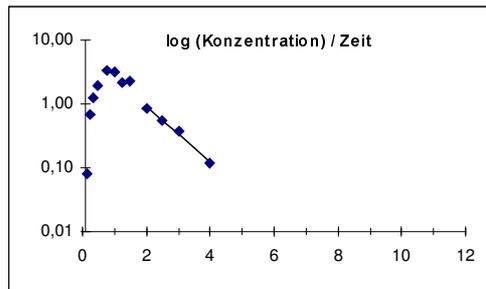
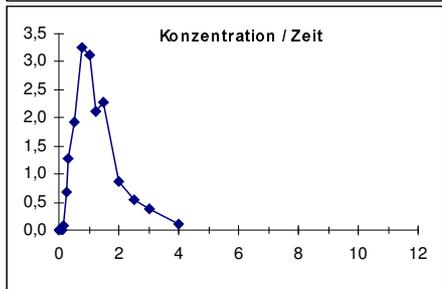
26 WD



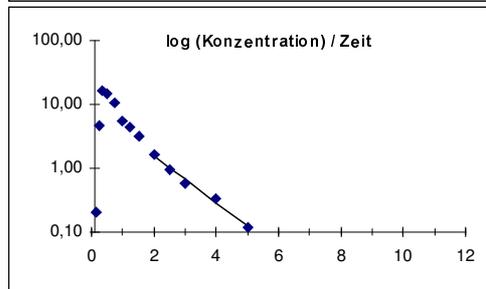
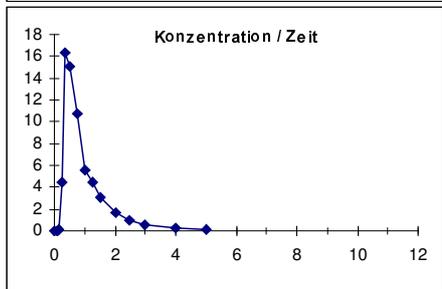
27 ER



28 JB

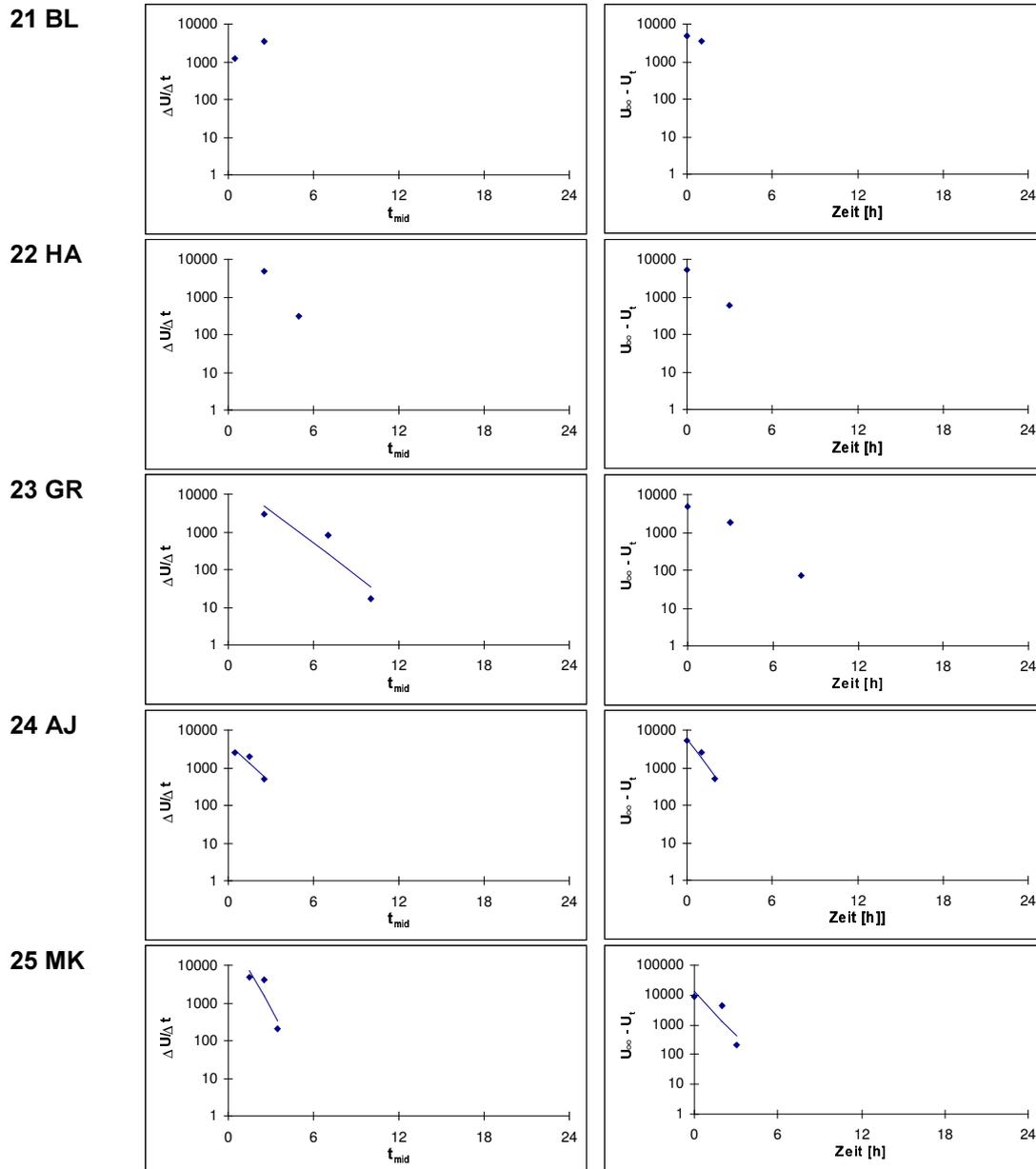


29 GST



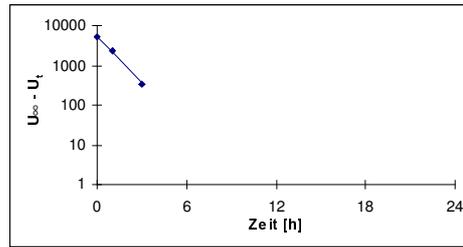
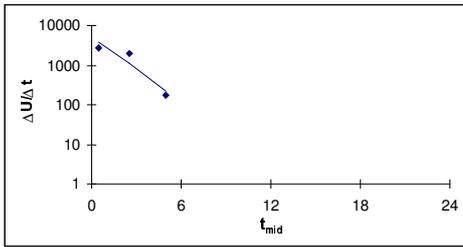
B. 23 Nicht kompartmentelle Auswertung:

Rechts: Graphische Darstellung der individuellen α -Liponsäure-Urinausscheidungsgeschwindigkeiten nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg).
 Links: Graphische Darstellung der individuellen α -Liponsäure-Urinausscheidungsmengen nach der Sigma-Minus-Plot-Methode, falls möglich jeweils mit Fit für den terminalen Ast.

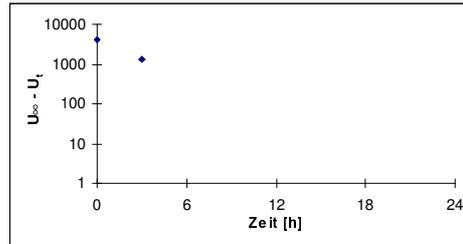
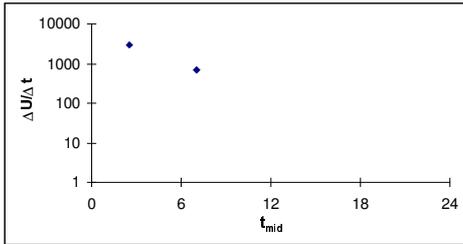


Zu B. 23

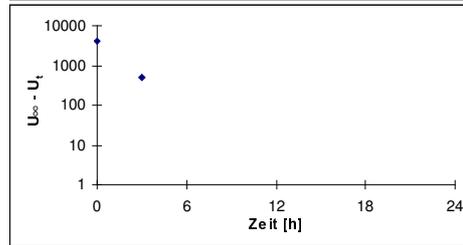
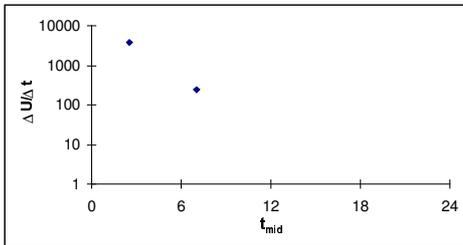
26 WD



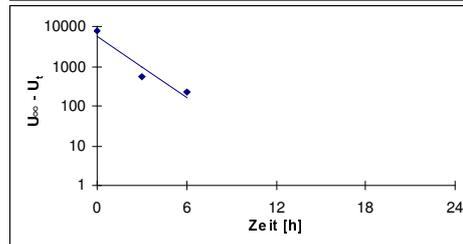
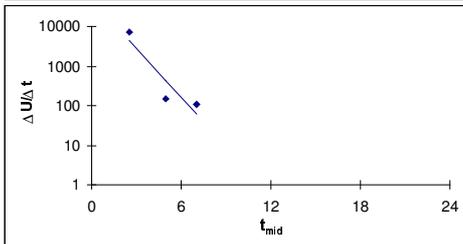
27 ER



28 JB



29 GST

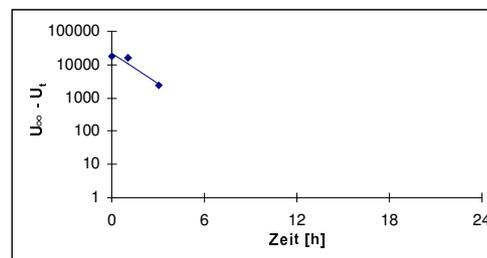
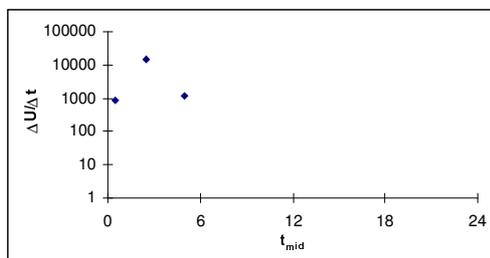


B. 24 Nicht kompartmentelle Auswertung:

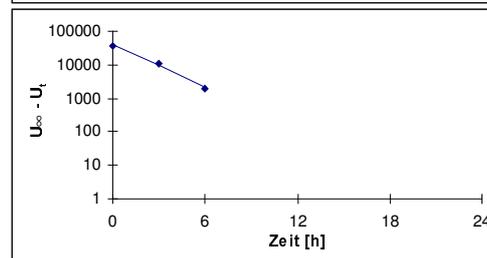
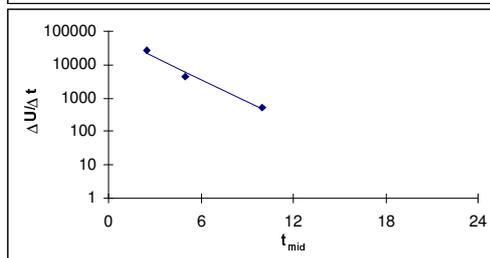
Rechts: Graphische Darstellung der individuellen BMOA-Urinausscheidungs-geschwindigkeiten nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg).

Links: Graphische Darstellung der individuellen BMOA-Urinausscheidungs-mengen nach der Sigma-Minus-Plot-Methode, falls möglich jeweils mit Fit für den terminalen Ast.

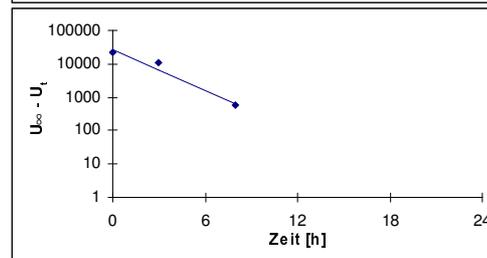
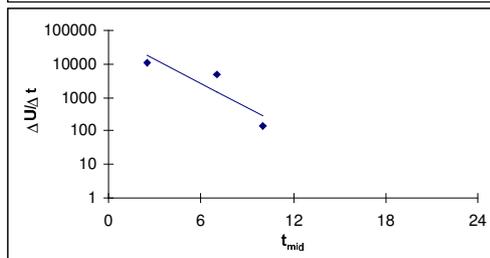
21 BL



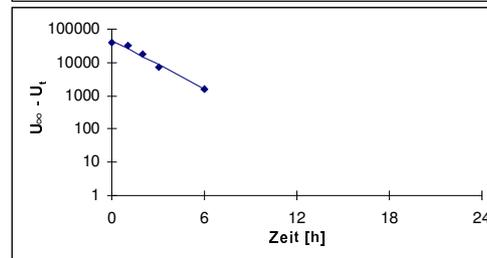
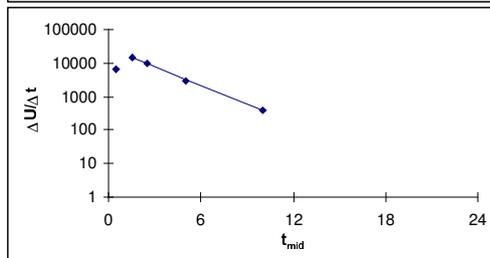
22 HA



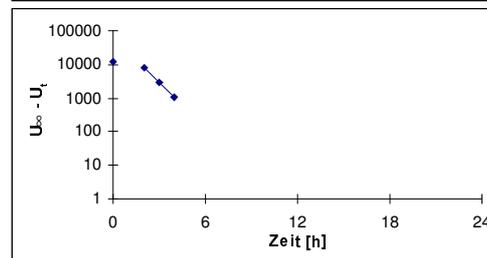
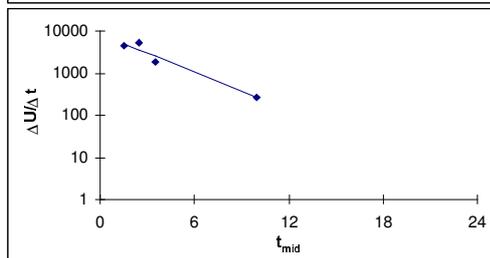
23 GR



24 AJ

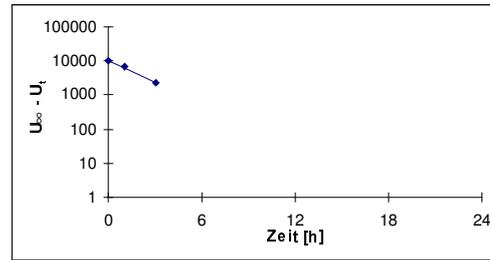
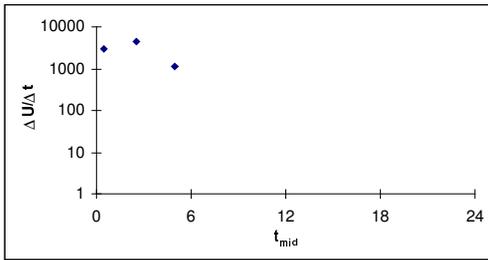


25 MK

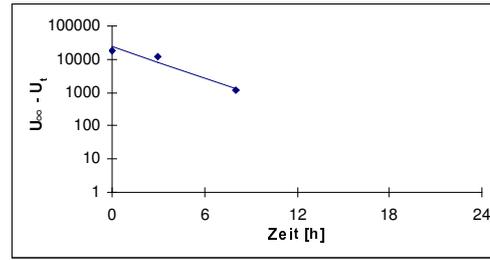
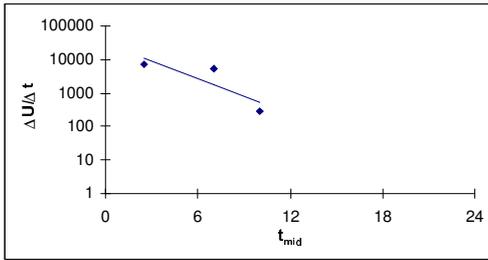


Zu B. 24

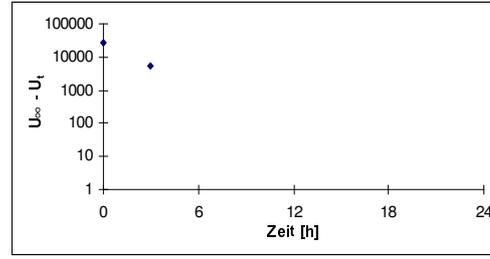
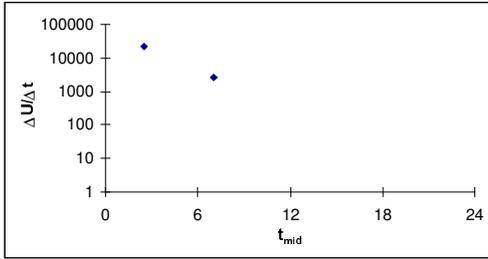
26 WD



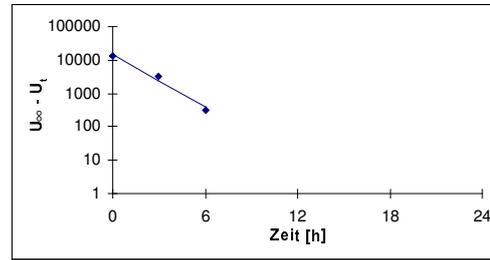
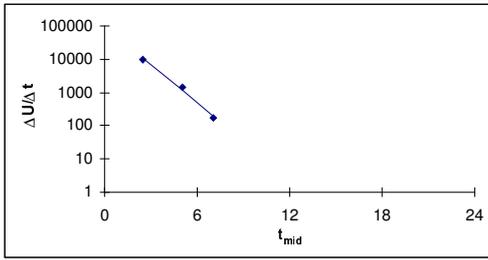
27 ER



28 JB



29 GST

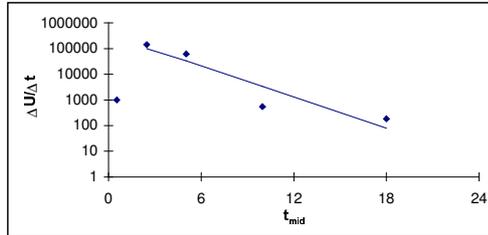


B. 25 Nicht kompartmentelle Auswertung:

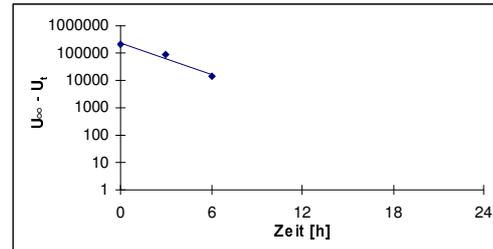
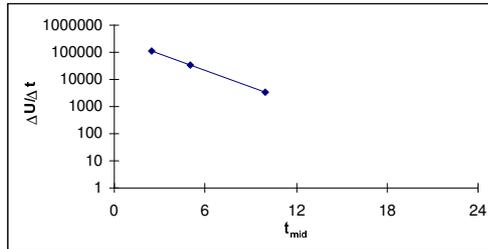
**Rechts: Graphische Darstellung der individuellen BMHA-Urinausscheidungs-
geschwindigkeiten nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg).**

**Links: Graphische Darstellung der individuellen BMHA-Urinausscheidungs-
mengen nach der Sigma-Minus-Plot-Methode, falls möglich jeweils mit Fit für
den terminalen Ast.**

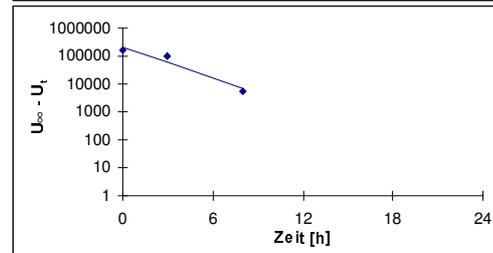
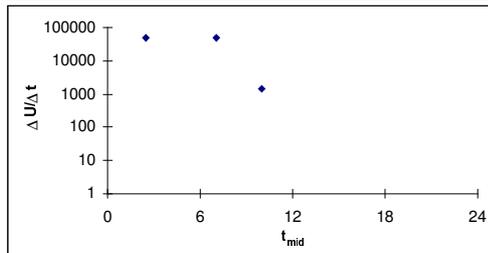
21 BL



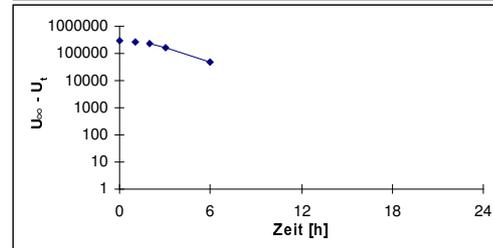
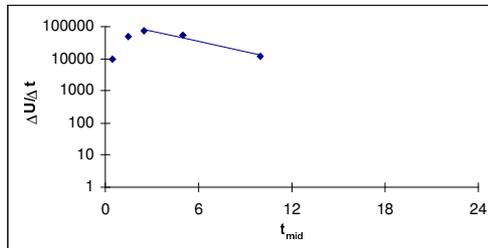
22 HA



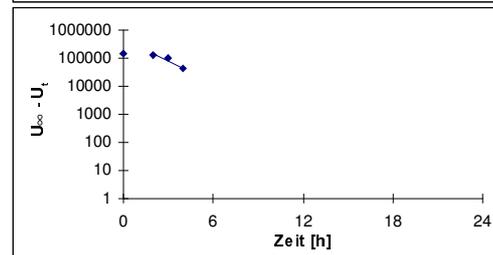
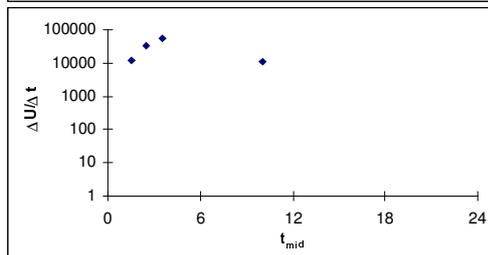
23 GR



24 AJ

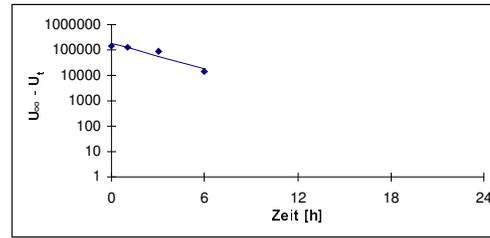
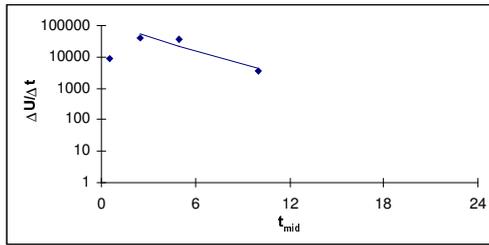


25 MK

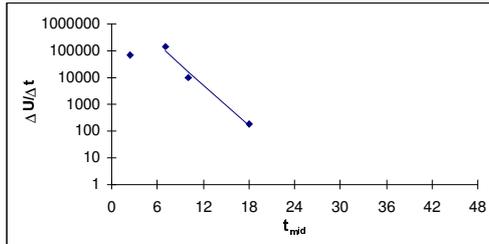


Zu B. 25

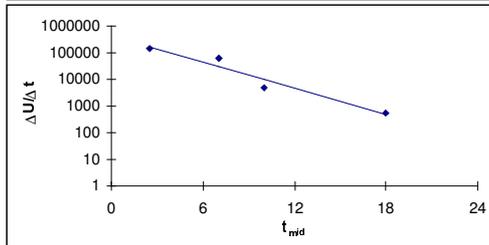
26 WD



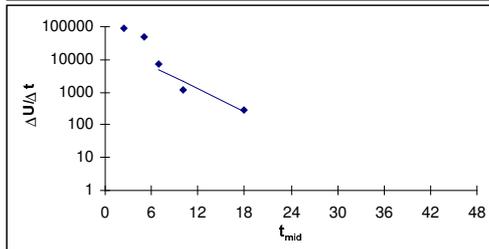
27 ER



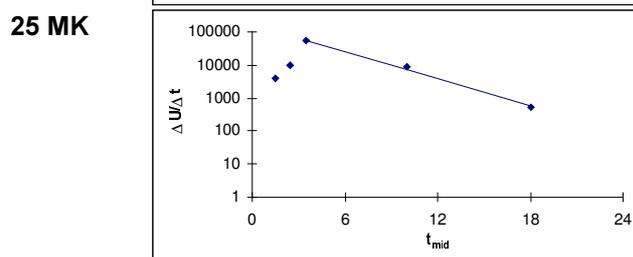
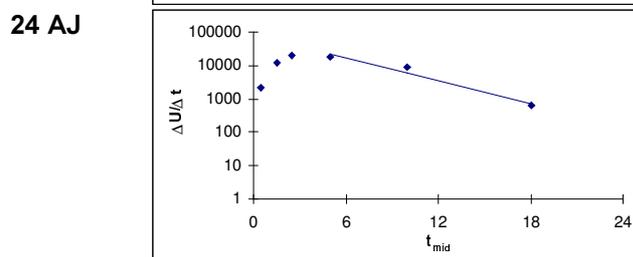
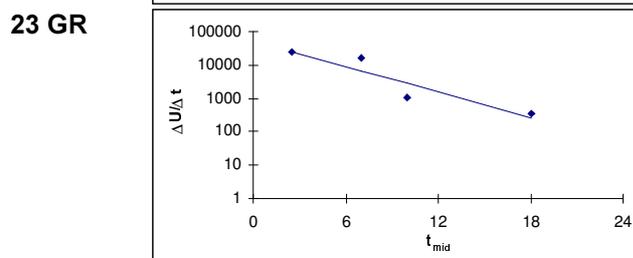
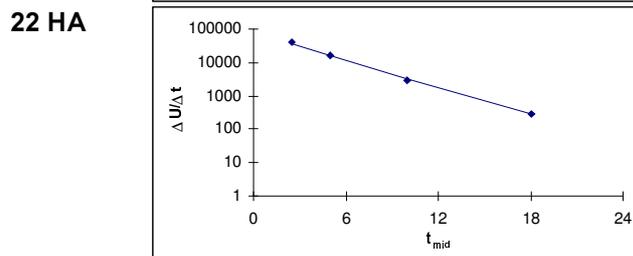
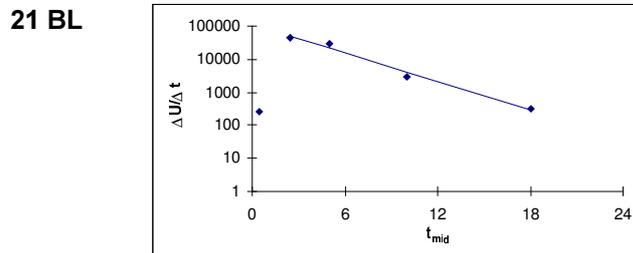
28 JB



29 GST

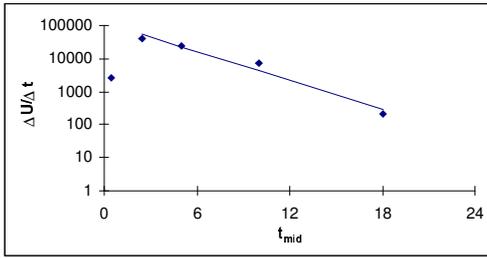


B. 26 Nicht kompartmentelle Auswertung:
Rechts: Graphische Darstellung der individuellen BMBA-Urinausscheidungs-
geschwindigkeiten nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg), falls
möglich mit Fit für den terminalen Ast

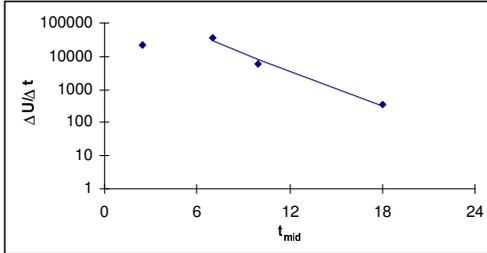


Zu B. 26

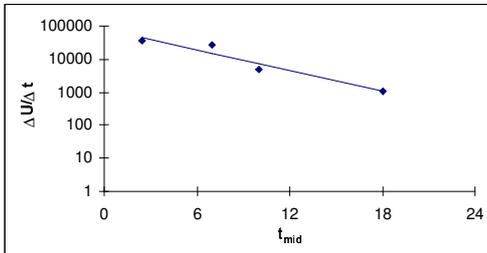
26 WD



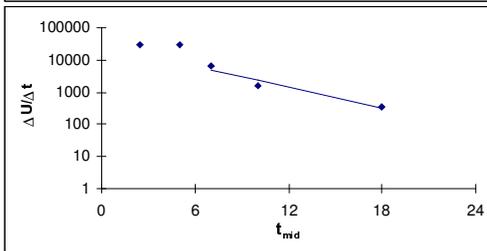
27 ER



28 JB



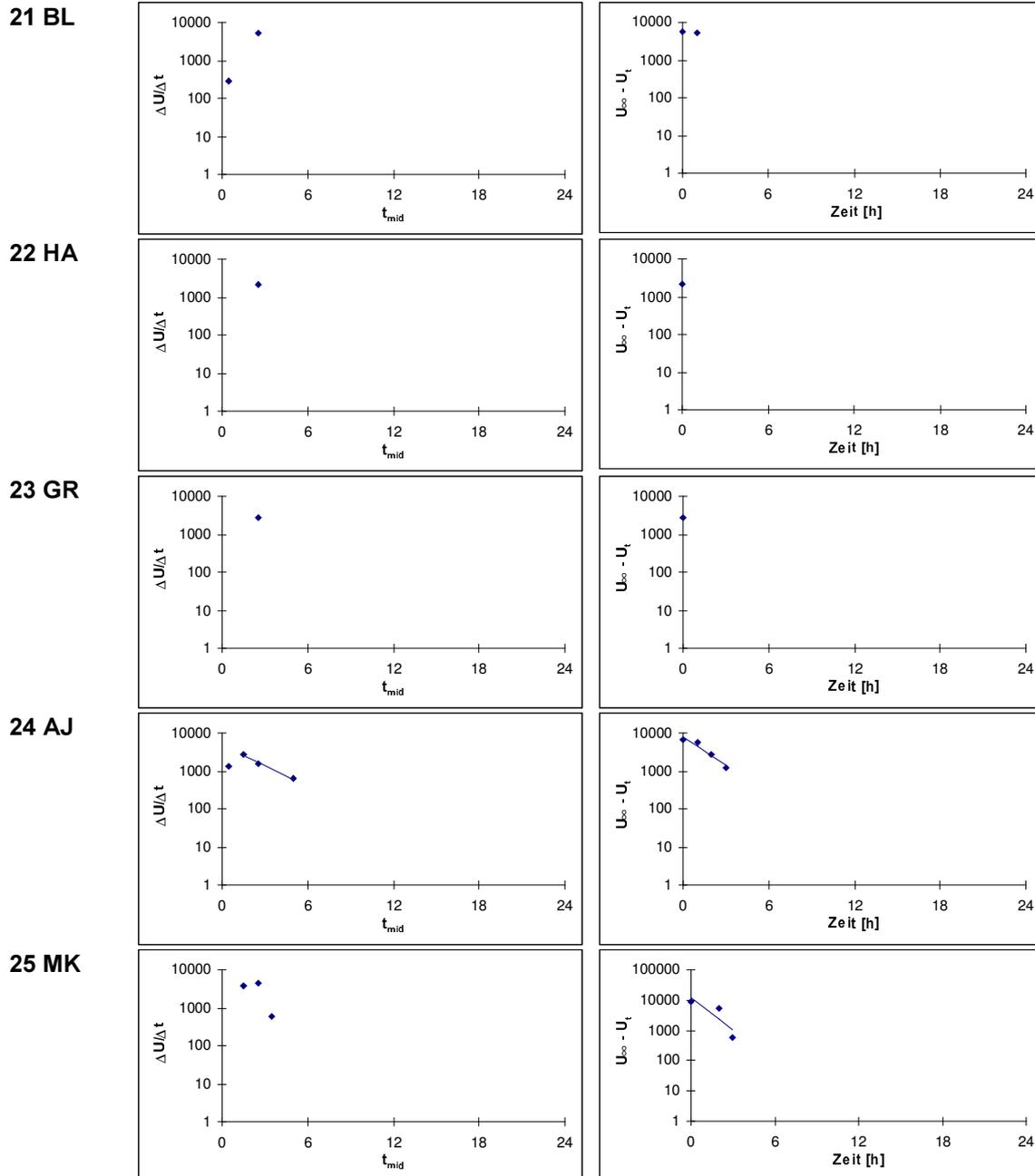
29 GST



B. 27 Nicht kompartmentelle Auswertung:

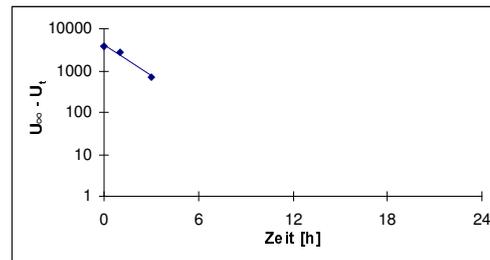
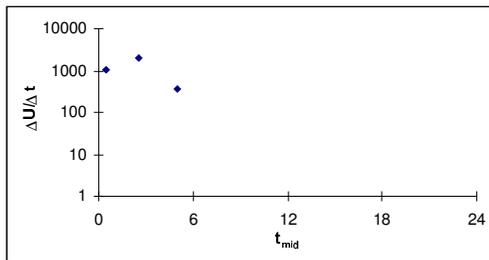
Rechts: Graphische Darstellung der individuellen TNLA-Urinausscheidungs-geschwindigkeiten nach oraler Gabe von rac- α -Liponsäure (600 mg).

Links: Graphische Darstellung der individuellen TNLA-Urinausscheidungs-mengen nach der Sigma-Minus-Plot-Methode, falls möglich jeweils mit Fit für den terminalen Ast.

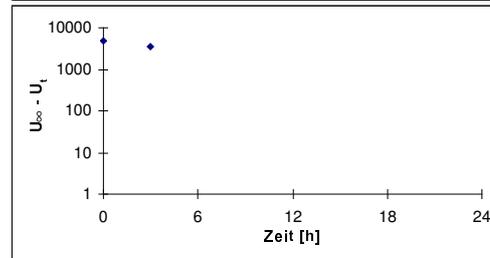
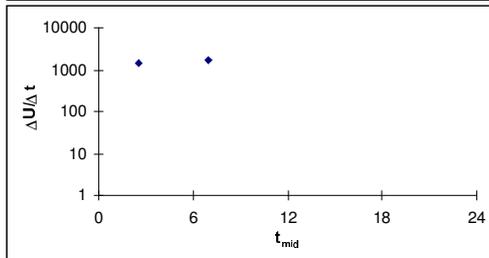


Zu B. 27

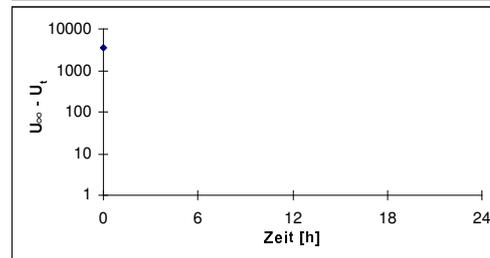
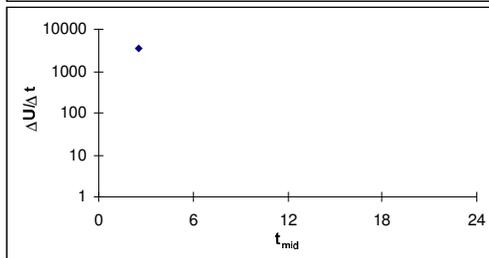
26 WD



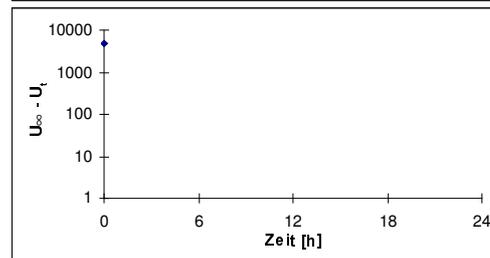
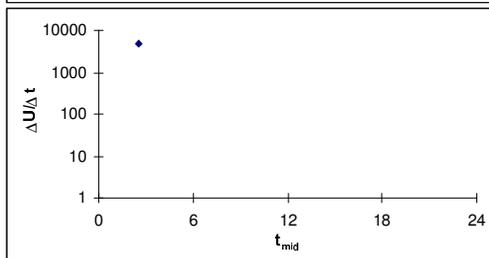
27 ER



28 JB



29 GST



B. 28 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen α -Liponsäure-Konzentrations-Zeitverläufen im Plasma nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / α -Liponsäure im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)															
Subjekt	Gewicht [kg]	t_{max} [h]	C_{max} [nmol/ml]	$AUC_{0-tlast}$ [nmol-h/ml]	AUC [nmol-h/ml]	$AUC_{tlast-inf}$ [%]	AUMC [nmol-h-h/ml]	$t_{1/2}$ [h]	MRT_{oral} [h]	CL/f [ml/min-kg]	Vz/f [l/kg]	$U_{0-\infty}$ [nmol]	CL_R [ml/min-kg]	k [1/h]	r^2 (ln)
21 BL	81	0,33	26,00	12,04	12,07	0,24	7,49	0,50	0,62	49,58	2,13	4657,80	0,08	1,40	0,9419
22 HA	77	0,50	15,54	13,76	13,86	0,72	14,35	0,48	1,04	45,41	1,90	5250,00	0,08	1,44	0,9816
23 GR	71	0,50	15,26	18,07	18,18	0,61	23,96	0,60	1,32	37,56	1,96	4811,50	0,06	1,15	0,9851
24 AJ	97	0,17	23,34	19,05	19,06	0,09	15,03	0,52	0,79	26,21	1,19	5058,80	0,05	1,32	0,9606
25 MK	74	0,75	20,85	17,62	17,69	0,38	16,99	0,56	0,96	37,03	1,81	8878,10	0,11	1,23	0,9824
26 WD	87	0,50	12,74	8,18	8,29	1,36	8,08	0,68	0,97	67,19	3,97	5101,70	0,12	1,01	0,9944
27 ER	59	0,75	14,43	16,07	16,18	0,67	24,67	0,97	1,52	50,77	4,24	4258,00	0,07	0,72	0,9644
28 JB	81	0,75	17,61	18,79	18,82	0,14	18,04	0,58	0,96	31,80	1,60	4180,00	0,05	1,19	0,9959
29 GST	79	0,33	35,48	14,44	15,59	7,43	18,79	1,97	1,21	39,35	6,70	7662,00	0,10	0,35	0,9876
n		9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Mittel _{arith}		0,51	20,14	15,34	15,53	1,29	16,38	0,76	1,04	42,77	2,83	5539,77	0,08	1,09	0,9771
CV [%]		41,27	35,94	23,55	23,06	180,63	36,69	62,18	26,16	28,40	63,17	29,22	33,48	32,26	1,8263
Median		0,50	17,61	16,07	16,18	0,61	16,99	0,58	0,97	39,35	1,96	5058,80	0,08	1,19	0,9824
Min		0,17	12,74	8,18	8,29	0,09	7,49	0,48	0,62	26,21	1,19	4180,00	0,05	0,35	0,9419
Max		0,75	35,48	19,05	19,06	7,43	24,67	1,97	1,52	67,19	6,70	8878,10	0,12	1,44	0,9959
Mittel _{geo}		0,46	19,14	14,88	15,08	0,53	15,24	0,68	1,01	41,31	2,44	5364,04	0,08	1,02	0,9770
CV _{ln} [%]		52,88	33,87	27,85	27,54	215,65	44,25	47,20	27,34	28,39	60,25	26,29	36,78	47,20	1,8403
CI _{ln} (95%) LL		0,32	14,86	12,06	12,25	0,19	11,01	0,48	0,82	33,35	1,59	4397,32	0,06	0,72	0,9632
UL		0,68	24,66	18,36	18,57	1,45	21,10	0,96	1,24	51,17	3,74	6543,30	0,10	1,43	0,9909

B. 29 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen BMOA-Konzentrations-Zeitverläufen im Plasma nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / BMOA im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)											
Subjekt	Gewicht [kg]	t _{max} [h]	C _{max} [nmol/ml]	AUC _{0-tlast} [nmol·h/ml]	AUC [nmol·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	t _{1/2} [h]	U _{0-∞} [nmol]	CL _R [ml/min·kg]	k [1/h]	r ² (ln)
21 BL	81	0,50	2,36	3,61	3,80	0,24	0,50	4657,80	0,08	0,93	0,9430
22 HA	77	1,00	3,29	5,88	6,16	0,72	0,48	5250,00	0,08	1,06	0,9865
23 GR	71	0,75	2,45	4,93	5,51	0,61	0,60	4811,50	0,06	0,71	0,9832
24 AJ	97	0,75	5,60	9,08	9,30	0,09	0,52	5058,80	0,05	1,09	0,9991
25 MK	74	1,00	2,82	4,23	4,40	0,38	0,56	8878,10	0,11	0,99	0,9822
26 WD	87	1,25	1,31	2,13	2,51	1,36	0,68	5101,70	0,12	0,82	0,9932
27 ER	59	1,07	1,95	3,83	4,37	0,67	0,97	4258,00	0,07	0,63	0,9644
28 JB	81	1,00	4,39	6,94	7,71	0,14	0,58	4180,00	0,05	1,03	0,9982
29 GST	79	0,50	1,59	2,10	2,38	7,43	1,97	7662,00	0,10	0,78	0,9822
n		9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Mittel _{arith}		0,87	2,86	4,75	5,13	1,29	0,76	5539,77	0,08	0,89	0,9813
CV [%]		29,82	48,31	47,75	44,99	180,63	62,18	29,22	33,48	18,71	1,8125
Median		1,00	2,45	4,23	4,40	0,61	0,58	5058,80	0,08	0,93	0,9832
Min		0,50	1,31	2,10	2,38	0,09	0,48	4180,00	0,05	0,63	0,9430
Max		1,25	5,60	9,08	9,30	7,43	1,97	8878,10	0,12	1,09	0,9991
Mittel _{geo}		0,83	2,60	4,28	4,67	0,53	0,68	5364,04	0,08	0,88	0,9812
CV _{ln} [%]		33,88	49,17	52,59	49,02	215,65	47,20	26,29	36,78	19,83	1,8312
CI _{ln} (95%) LL		0,64	1,82	2,93	3,27	0,19	0,48	4397,32	0,06	0,75	0,9675
UL		1,07	3,71	6,25	6,68	1,45	0,96	6543,30	0,10	1,02	0,9951

B. 30 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen BMHA-Konzentrations-Zeitverläufen im Plasma nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / BMHA im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)											
Subjekt	Gewicht [kg]	t _{max} [h]	C _{max} [nmol/ml]	AUC _{0-tlast} [nmol·h/ml]	AUC [nmol·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	t _{1/2} [h]	U _{0-∞} [nmol]	CL _R [ml/min·kg]	k [1/h]	r ² (ln)
21 BL	81	2,50	22,74	61,08	61,51	0,69	2,11	-	nc	0,33	0,9849
22 HA	77	1,50	14,69	47,28	47,96	1,42	2,76	195882,00	0,88	0,25	0,9868
23 GR	71	1,50	16,18	58,21	58,55	0,57	1,34	154491,00	0,62	0,52	0,9789
24 AJ	97	2,00	33,50	103,11	104,55	1,38	2,30	288359,50	0,47	0,30	0,9998
25 MK	74	2,00	19,68	66,57	67,90	1,95	2,61	140856,50	0,47	0,27	0,9882
26 WD	87	2,00	19,79	59,18	59,50	0,55	1,30	135922,50	0,44	0,53	0,9795
27 ER	59	2,50	22,22	73,42	73,88	0,62	1,68	-	nc	0,41	1,0000
28 JB	81	1,50	26,74	86,60	87,39	0,90	2,03	-	nc	0,34	0,9997
29 GST	79	1,50	19,75	58,34	58,94	1,01	1,57	-	nc	0,44	0,9847
n		9	9	9	9	9	9	5	5	9	9
Mittel _{arith}		1,89	21,70	68,20	68,91	1,01	1,97	183102,30	0,58	0,38	0,9892
CV [%]		22,06	26,13	25,15	25,27	47,79	27,06	34,62	32,24	27,76	0,8659
Median		2,00	19,79	61,08	61,51	0,90	2,03	154491,00	0,47	0,34	0,9868
Min		1,50	14,69	47,28	47,96	0,55	1,30	135922,50	0,44	0,25	0,9789
Max		2,50	33,50	103,11	104,55	1,95	2,76	288359,50	0,88	0,53	1,0000
Mittel _{geo}		1,85	21,10	66,47	67,15	0,92	1,90	175622,46	0,56	0,36	0,9891
CV _{ln} [%]		21,92	25,21	23,89	23,95	48,01	28,21	31,94	29,78	28,21	0,8648
CI _{ln} (95%) LL		1,57	17,43	55,46	56,00	0,65	1,54	119263,78	0,39	0,29	0,98
UL		2,18	25,53	79,67	80,51	1,30	2,35	258613,65	0,80	0,45	1,00

B. 31 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen BMBA-Konzentrations-Zeitverläufe im Plasma nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / BMBA im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)											
Subjekt	Gewicht [kg]	t _{max} [h]	C _{max} [nmol/ml]	AUC _{0-tlast} [nmol·h/ml]	AUC [nmol·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	t _{1/2} [h]	U _{0-∞} [nmol]	CL _R [ml/min·kg]	k [1/h]	r ² (ln)
21 BL	81	2,50	18,32	61,61	62,43	1,32	1,68	-	nc	0,41	0,9990
22 HA	77	1,50	9,49	42,26	43,11	1,97	1,91	-	nc	0,36	0,9700
23 GR	71	4,00	9,70	47,95	48,35	0,83	1,43	-	nc	0,48	0,9776
24 AJ	97	2,00	10,69	57,87	62,65	7,64	2,77	-	nc	0,25	0,9938
25 MK	74	3,00	11,37	61,26	63,76	3,93	2,13	-	nc	0,33	0,9978
26 WD	87	2,50	10,62	45,12	46,01	1,93	1,82	-	nc	0,38	0,9943
27 ER	59	3,00	9,13	48,59	50,59	3,97	2,06	-	nc	0,34	0,9907
28 JB	81	2,50	8,24	38,50	39,99	3,74	2,22	-	nc	0,31	0,9968
29 GST	79	3,00	14,44	69,38	71,08	2,39	1,94	-	nc	0,36	0,9974
n		9	9	9	9	9	9	-	-	9	9
Mittel _{arith}		2,67	11,33	52,50	54,22	3,08	1,99	-	-	0,36	0,9908
CV [%]		26,52	27,88	19,80	20,15	66,87	18,92	-	-	18,38	1,0246
Median		2,50	10,62	48,59	50,59	2,39	1,94	-	-	0,36	0,9943
Min		1,50	8,24	38,50	39,99	0,83	1,43	-	-	0,25	0,9700
Max		4,00	18,32	69,38	71,08	7,64	2,77	-	-	0,48	0,9990
Mittel _{geo}		2,58	11,00	51,60	53,25	2,54	1,96	-	-	0,35	0,9908
CV _{ln} [%]		28,45	25,22	20,02	20,44	75,00	18,67	-	-	18,67	1,0309
CI _{ln} (95%) LL		2,08	9,09	44,30	45,58	1,52	1,70	-	-	0,31	0,98
UL		3,20	13,32	60,09	62,20	4,25	2,26	-	-	0,41	1,00

nc: nicht kalkuliert

B. 32 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen TNLA-Konzentrations-Zeitverläufe im Plasma nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / TNLA im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)											
Subjekt	Gewicht [kg]	t _{max} [h]	C _{max} [nmol/ml]	AUC _{0-tlast} [nmol·h/ml]	AUC [nmol·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	t _{1/2} [h]	U _{0-∞} [nmol]	CL _R [ml/min·kg]	k [1/h]	r ² (ln)
21 BL	81	0,33	5,09	5,48	5,71	4,02	0,60	5542,60	0,20	1,15	0,9495
22 HA	77	1,00	3,80	2,95	3,72	20,52	1,25	2130,00	0,12	0,55	0,9994
23 GR	71	1,00	2,69	4,50	4,70	4,43	0,87	2678,00	0,13	0,80	0,7803
24 AJ	97	0,75	3,53	5,80	5,99	3,11	0,72	6810,20	0,20	0,97	0,9682
25 MK	74	1,00	11,00	13,78	13,94	1,13	0,66	8905,80	0,14	1,05	0,9768
26 WD	87	1,00	3,16	5,38	5,50	2,28	0,59	3694,70	0,13	1,18	0,9780
27 ER	59	0,75	3,81	4,98	5,35	6,85	0,96	4887,00	0,26	0,72	0,9468
28 JB	81	0,75	3,26	4,64	4,77	2,67	0,70	3444,00	0,15	0,99	0,9940
29 GST	79	0,33	16,39	14,10	14,25	1,06	0,83	4914,00	0,07	0,83	0,9860
n		9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Mittel _{arith}		0,77	5,86	6,85	7,10	5,12	0,80	4778,48	0,16	0,91	0,9532
CV [%]		35,48	80,03	59,95	56,59	118,08	26,40	44,49	34,56	22,45	7,0588
Median		0,75	3,80	5,38	5,50	3,11	0,72	4887,00	0,14	0,97	0,9768
Min		0,33	2,69	2,95	3,72	1,06	0,59	2130,00	0,07	0,55	0,7803
Max		1,00	16,39	14,10	14,25	20,52	1,25	8905,80	0,26	1,18	0,9994
Mittel _{geo}		0,71	4,78	6,01	6,35	3,38	0,78	4373,94	0,15	0,89	0,9509
CV _{ln} [%]		47,45	68,28	55,21	50,15	113,28	24,70	47,50	37,30	24,70	7,6519
CI _{ln} (95%) LL		0,50	2,97	4,04	4,41	1,68	0,64	3092,43	0,11	0,74	0,8966
UL		1,01	7,69	8,93	9,13	6,79	0,94	6186,53	0,19	1,08	1,0084

B. 33 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen α -Liponsäure-Urinkonzentrationen nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik LA im Urin nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)										
Subjekt	* $t_{1/2}$ [h]	*k [1/h]	* r^2 (ln)	$t_{1/2}$ [h]	k [1/h]	r^2 (ln)	R_{max} [nmol/h]	$t_{mid, max}$ [h]	$U_{0-\infty}$ [nmol]	$U_{0-tlast}$ [%]
21 BL	nc	nc	nc	nc	nc	nc	3402,00	2,50	4657,80	0,16
22 HA	nc	nc	nc	nc	nc	nc	4650,00	2,50	5250,00	0,18
23 GR	1,28	0,54	0,9771	1,06	0,66	0,8491	3042,00	2,50	4811,50	0,17
24 AJ	0,60	1,15	0,9537	0,85	0,81	0,8681	2574,00	0,50	5058,80	0,17
25 MK	0,62	1,12	0,7500	0,45	1,55	0,7888	4683,50	1,50	8878,10	0,31
26 WD	0,76	0,91	0,9966	1,10	0,63	0,8708	2711,70	0,50	5101,70	0,18
27 ER	nc	nc	nc	nc	nc	nc	2898,00	2,50	4258,00	0,15
28 JB	nc	nc	nc	nc	nc	nc	3696,00	2,50	4180,00	0,14
29 GST	1,18	0,59	0,9174	0,73	0,95	0,8502	7137,00	2,50	7662,00	0,26
n	5	5	5	5	5	5	9	9	9	9
Mittel _{arith}	0,89	0,86	0,92	0,84	0,92	0,85	3866,02	1,94	5539,77	0,19
CV [%]	36,12	33,41	10,77	31,67	40,97	3,92	37,53	45,36	29,22	29,22
Median	0,76	0,91	0,95	0,85	0,81	0,85	3402,00	2,50	5058,80	0,17
Min	0,60	0,54	0,75	0,45	0,63	0,79	2574,00	0,50	4180,00	0,14
Max	1,28	1,15	1,00	1,10	1,55	0,87	7137,00	2,50	8878,10	0,31
Mittel _{geo}	0,84	0,82	0,91	0,80	0,87	0,84	3668,23	1,65	5364,04	0,18
CV _{in} [%]	36,86	36,86	11,53	37,72	37,72	4,01	33,94	79,21	26,29	26,29
CI _{in} (95%) LL	0,54	0,53	0,79	0,51	0,55	0,80	2846,04	0,97	4397,32	0,15
UL	1,31	1,28	1,05	1,25	1,37	0,89	4727,96	2,82	6543,30	0,22

* $t_{1/2}$, *k und * r^2 wurden mit Hilfe der Sigma-Minus-Plot-Methode ermittelt
nc: nicht kalkuliert

B. 34 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen BMOA-Urinkonzentrationen nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik BMOA im Urin nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)										
Subjekt	*t _{1/2} [h]	*k [1/h]	*r ² (ln)	t _{1/2} [h]	k [1/h]	r ² (ln)	R _{max} [nmol/h]	t _{mid, max} [h]	U _{0-∞} [nmol]	U _{0-tlast} [%]
21 BL	0,96	0,72	0,9063	nc	nc	nc	14206,50	2,50	17368,10	0,60
22 HA	1,43	0,49	0,9937	1,35	0,51	0,9794	27090,00	2,50	37856,00	1,30
23 GR	1,48	0,47	0,9621	1,27	0,55	0,7947	10816,00	2,50	21325,50	0,73
24 AJ	1,23	0,56	0,9835	1,62	0,43	0,9979	14365,00	1,50	38393,50	1,32
25 MK	0,68	1,02	0,9998	1,99	0,35	0,9511	5207,60	2,50	12491,10	0,43
26 WD	1,42	0,49	0,9918	nc	nc	nc	4500,00	2,50	9765,20	0,34
27 ER	1,90	0,36	0,9511	1,72	0,40	0,7204	7095,50	2,50	18823,50	0,65
28 JB	nc	nc	nc	nc	nc	nc	22491,00	2,50	27991,00	0,96
29 GST	1,13	0,61	0,9847	0,76	0,91	0,9928	10062,00	2,50	13167,00	0,45
n	8	8	8	6	6	6	9	9	9	9
Mittel_{arith}	1,28	0,59	0,97	1,45	0,52	0,91	12870,40	2,39	21908,99	0,75
CV [%]	28,82	34,35	3,20	29,38	38,41	13,08	59,74	13,95	48,58	48,58
Median	1,33	0,53	0,98	1,48	0,47	0,97	10816,00	2,50	18823,50	0,65
Min	0,68	0,36	0,91	0,76	0,35	0,72	4500,00	1,50	9765,20	0,34
Max	1,90	1,02	1,00	1,99	0,91	1,00	27090,00	2,50	38393,50	1,32
Mittel_{geo}	1,23	0,56	0,97	1,39	0,50	0,90	10942,91	2,36	19742,06	0,68
CV_{in} [%]	32,01	32,01	3,27	34,66	34,66	13,89	67,71	17,15	51,50	51,50
CI_{in} (95%) LL	0,95	0,43	0,94	0,98	0,35	0,78	6824,43	2,07	13598,23	0,47
UL	1,59	0,73	1,00	1,98	0,71	1,04	17546,84	2,69	28661,74	0,99

*t_{1/2}, *k und *r² wurden mit Hilfe der Sigma-minus-Plot-Methode ermittelt
nc: nicht kalkuliert

B. 35 Nicht kompartimentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen BMHA-Urinkonzentrationen nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartimentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik BMHA im Urin nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)										
Subjekt	*t _{1/2} [h]	*k [1/h]	*r ² (ln)	t _{1/2} [h]	k [1/h]	r ² (ln)	R _{max} [nmol/h]	t _{mid, max} [h]	U _{0-∞} [nmol]	U _{0-tlast} [%]
21 BL	nc	nc	nc	1,51	0,46	0,8762	142285,50	2,50	-	9,30
22 HA	1,58	0,44	0,9594	1,50	0,46	1,0000	112050,00	2,50	195882,00	6,74
23 GR	1,62	0,43	0,9297	nc	nc	nc	51038,00	2,50	154491,00	5,31
24 AJ	1,75	0,40	1,0000	2,70	0,26	0,9752	75792,50	2,50	288359,50	9,91
25 MK	1,22	0,57	0,9304	nc	nc	nc	54241,00	3,50	140856,50	4,84
26 WD	1,84	0,38	0,9045	2,06	0,34	0,9037	38662,50	2,50	135922,50	4,67
27 ER	nc	nc	nc	1,18	0,59	0,9784	146688,00	7,00	-	13,78
28 JB	nc	nc	nc	1,83	0,38	0,9514	147063,00	2,50	-	10,08
29 GST	nc	nc	nc	2,56	0,27	0,8933	90324,00	2,50	-	7,19
n	5	5	5	7	7	7	9	9	9	9
Mittel_{arith}	1,60	0,44	0,94	1,91	0,39	0,94	95349,39	3,11	183102,30	7,98
CV [%]	14,64	16,74	3,86	29,78	30,04	5,14	45,51	48,07	34,62	38,00
Median	1,62	0,43	0,93	1,83	0,38	0,95	90324,00	2,50	154491,00	7,19
Min	1,22	0,38	0,90	1,18	0,26	0,88	38662,50	2,50	135922,50	4,67
Max	1,84	0,57	1,00	2,70	0,59	1,00	147063,00	7,00	288359,50	13,78
Mittel_{geo}	1,59	0,44	0,94	1,84	0,38	0,94	85800,56	2,91	175622,46	7,49
CV_{in} [%]	15,78	15,78	3,83	30,86	30,86	5,17	53,87	35,82	31,94	38,93
CI_{in} (95%) LL	1,30	0,36	0,90	1,39	0,29	0,89	58206,44	2,23	119263,78	5,61
UL	1,93	0,53	0,99	2,43	0,50	0,98	126476,43	3,80	258613,65	10,00

*t_{1/2}, *k und *r² wurden mit Hilfe der Sigma-minus-Plot-Methode ermittelt
nc: nicht kalkuliert

B. 36 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen BMBA-Urinkonzentrationen nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik BMBA im Urin nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)										
Subjekt	*t _{1/2} [h]	*k [1/h]	*r ² (ln)	t _{1/2} [h]	k [1/h]	r ² (ln)	R _{max} [nmol/h]	t _{mid, max} [h]	U _{0-∞} [nmol]	U _{0-tlast} [%]
21 BL	nc	nc	nc	2,08	0,33	0,9852	44100,00	2,50	-	4,15
22 HA	nc	nc	nc	2,20	0,31	0,9975	39270,00	2,50	-	2,95
23 GR	nc	nc	nc	2,36	0,29	0,8589	23374,00	2,50	-	2,18
24 AJ	nc	nc	nc	2,61	0,27	0,9590	19425,00	2,50	-	3,90
25 MK	nc	nc	nc	2,17	0,32	0,9963	52107,00	3,50	-	3,66
26 WD	nc	nc	nc	2,05	0,34	0,9717	39300,00	2,50	-	4,13
27 ER	nc	nc	nc	1,69	0,41	0,9851	35856,00	7,00	-	4,20
28 JB	nc	nc	nc	2,83	0,24	0,9314	38073,00	2,50	-	4,32
29 GST	nc	nc	nc	2,56	0,27	0,8933	30498,00	2,50	-	3,86
n	0	0	0	9	9	9	9	9	0	9
Mittel _{arith}	-	-	-	2,29	0,31	0,95	35778,11	3,11	-	3,71
CV [%]	-	-	-	15,14	15,92	5,14	28,21	48,07	-	18,99
Median	-	-	-	2,20	0,31	0,97	38073,00	2,50	-	3,90
Min	-	-	-	1,69	0,24	0,86	19425,00	2,50	-	2,18
Max	-	-	-	2,83	0,41	1,00	52107,00	7,00	-	4,32
Mittel _{geo}	-	-	-	2,26	0,31	0,95	34376,30	2,91	-	3,63
CV _{in} [%]	-	-	-	15,59	15,59	5,27	31,83	35,82	-	22,58
CI _{in} (95%) LL	-	-	-	2,01	0,27	0,91	27074,99	2,23	-	3,06
UL	-	-	-	2,55	0,35	0,99	43646,55	3,80	-	4,31

*t_{1/2}, *k und *r² wurden mit Hilfe der Sigma-minus-Plot-Methode ermittelt
nc: nicht kalkuliert

B. 37 Nicht kompartimentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen TNLA-Urinkonzentrationen nach oraler Gabe rac- α -Liponsäure (600 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartimentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik TNLA im Urin nach oraler Gabe (Dosis 600 mg)										
Subjekt	*t _{1/2} [h]	*k [1/h]	*r ² (ln)	t _{1/2} [h]	k [1/h]	r ² (ln)	R _{max} [nmol/h]	t _{mid, max} [h]	U _{0-∞} [nmol]	U _{0-tlast} [%]
21 BL	nc	nc	nc	nc	nc	nc	5260,50	2,50	5542,60	0,19
22 HA	nc	nc	nc	nc	nc	nc	2130,00	2,50	2130,00	0,07
23 GR	nc	nc	nc	nc	nc	nc	2678,00	2,50	2678,00	0,09
24 AJ	1,20	0,58	0,9430	1,68	0,41	0,9957	2670,20	1,50	6810,20	0,23
25 MK	0,86	0,81	0,7542	nc	nc	nc	4530,80	2,50	8905,80	0,31
26 WD	1,23	0,56	0,9809	nc	nc	nc	1925,00	2,50	3694,70	0,13
27 ER	nc	nc	nc	nc	nc	nc	1696,00	7,00	4887,00	0,17
28 JB	nc	nc	nc	nc	nc	nc	3444,00	2,50	3444,00	0,12
29 GST	nc	nc	nc	nc	nc	nc	4914,00	2,50	4914,00	0,17
n	3	3	3	1	1	1	9	9	9	9
Mittel _{arith}	1,10	0,65	0,89	-	-	-	3249,83	2,89	4778,48	0,16
CV [%]	18,82	21,05	13,61	-	-	-	41,54	54,58	44,49	44,49
Median	1,20	0,58	0,94	-	-	-	2678,00	2,50	4887,00	0,17
Min	0,86	0,56	0,75	-	-	-	1696,00	1,50	2130,00	0,07
Max	1,23	0,81	0,98	-	-	-	5260,50	7,00	8905,80	0,31
Mittel _{geo}	1,08	0,64	0,89	-	-	-	3006,30	2,65	4373,94	0,15
CV _{ln} [%]	20,27	20,27	14,25	-	-	-	43,97	41,85	47,50	47,50
Cl _{ln} (95%) LL	0,66	0,39	0,62	-	-	-	2176,18	1,94	3092,43	0,11
UL	1,78	1,06	1,26	-	-	-	4153,08	3,61	6186,53	0,21

*t_{1/2}, *k und *r² wurden mit Hilfe der Sigma-minus-Plot-Methode ermittelt
nc: nicht kalkuliert

B. 38 Individuelle R(+)- α -Liponsäure-Plasmakonzentrationen mit Statistik für jeweils 12 männliche und weibliche Probanden nach oraler Gabe von 604,8 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure).

R(+)- α -Liponsäure Konzentrationen im Plasma [ng/ml]												
Zeit [h]	Subjekt (männlich)											
	01 MGI	02 LJ	03 BR	04 NP	05 CV	06 FMT	07 BJ	08 SL	09 AM	10 KRA	11 PA	12 FC
0,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld
0,167	1400,40	208,87	389,82	124,53	107,20	432,86	317,37	7758,00	1059,20	657,93	604,14	606,74
0,250	5049,80	1207,10	1649,20	3064,70	446,61	2928,10	1261,70	9658,60	6546,90	2603,20	4478,90	4123,70
0,333	13665,00	2774,40	1832,00	5378,60	936,76	6689,80	1349,80	11351,00	12094,00	7237,60	6218,00	5498,20
0,500	5073,90	3456,20	1316,10	6329,00	1911,70	7407,60	1966,10	11054,00	17179,00	7956,40	5817,10	4004,90
0,667	1907,60	2385,30	1014,00	3005,30	8722,70	7186,30	2280,70	5581,30	7163,30	11372,00	3752,90	2090,90
0,833	1026,90	1882,30	1142,10	2048,20	5490,30	7337,00	2767,20	2327,20	3223,90	6700,10	2394,70	1494,40
1,000	1378,10	3551,70	2655,60	2209,00	3526,40	2882,00	5148,80	829,74	1194,90	1899,00	1390,80	1793,20
1,250	1810,20	3228,40	2178,20	886,64	1871,00	655,92	3786,10	307,31	421,97	748,67	286,52	1396,80
1,500	717,06	1478,80	2311,80	318,81	581,93	251,17	1869,90	178,06	245,94	317,77	111,98	648,38
1,750	236,15	595,71	873,26	126,92	358,66	136,50	954,22	105,90	165,30	170,01	76,18	232,05
2,000	91,42	288,32	885,45	64,70	506,78	78,73	400,91	64,69	76,63	91,51	45,26	83,88
2,250	135,18	207,58	598,00	38,58	190,81	63,89	254,70	46,74	56,40	57,90	29,45	42,17
2,500	101,21	201,75	407,99	30,59	147,48	46,99	179,85	33,50	45,93	40,51	14,74	30,51
2,750	55,51	54,56	123,82	17,99	140,55	36,74	142,77	34,61	28,36	27,21	12,86	19,04
3,000	47,01	32,50	50,43	13,84	275,35	26,22	183,09	19,59	22,93	19,32	10,61	14,87
3,250	30,18	22,85	27,39	9,55	232,42	18,91	126,89	14,62	18,63	15,82	7,95	10,77
3,500	31,86	15,81	16,63	8,75	52,46	12,43	34,32	12,20	13,91	11,17	5,98	8,01
4,000	18,32	8,92	10,62	5,25	21,32	8,62	9,06	7,71	7,75	9,32	4,34	5,15
4,500	19,62	6,29	7,17	4,51	10,15	7,33	9,23	5,24	5,14	5,91	blq*	4,11
5,000	9,15	2,82	3,54	4,03	5,64	7,74	5,04	3,80	4,07	5,35	bld**	bld**
6,000	3,71	bld	blq	2,52	blq	blq	3,36	bld	3,22	4,40	bld	bld
Zeit [h]	Subjekt Nr. (weiblich)											
	13 SK	14 BA	15 LP	16 FS	17 BIU	18 GHK	19 MMI	20 RP	21 FSA	22 CCL	23 FG	24 KUT
0,000	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	bld	blq
0,167	732,33	309,80	220,44	726,46	651,13	760,30	800,77	4695,70	874,34	4955,61	263,03	327,40
0,250	1863,00	1090,60	3324,30	2081,70	1339,90	3070,20	1673,60	12304,00	5375,22	11614,01	400,23	2314,82
0,333	2133,50	2360,70	5006,00	3132,00	1959,90	5817,40	5155,30	15692,00	7851,79	14503,11	1331,28	3481,45
0,500	5911,90	10738,00	12187,00	5213,10	10998,00	14198,00	10206,00	10224,00	5090,40	15675,37	3724,13	14617,77
0,667	5209,40	15014,00	11222,00	6929,80	6283,60	14280,00	8770,30	4050,10	3439,07	10600,86	6041,86	9783,37
0,833	3911,00	6249,40	9483,00	5459,10	6272,00	7473,70	5639,50	833,89	2964,08	4882,97	13577,44	8661,74
1,000	2426,90	3794,70	7315,30	3961,40	4958,60	2881,80	3084,00	712,22	3289,41	2233,53	9926,86	3249,35
1,250	2892,40	1651,10	2742,70	1825,50	3527,40	768,12	1421,40	256,40	601,61	576,54	12938,00	1148,38
1,500	1551,30	976,72	947,11	672,89	2591,10	356,14	568,13	150,56	265,82	427,34	3572,87	726,73
1,750	1165,70	741,78	390,12	420,21	4371,00	230,64	272,68	92,21	99,54	313,88	1137,37	513,12
2,000	778,06	1025,60	256,60	289,49	1605,20	164,59	193,94	55,32	60,39	218,49	549,24	240,64
2,250	432,99	649,27	121,24	149,64	351,71	94,91	233,80	34,31	35,24	143,46	1032,61	122,81
2,500	278,55	179,90	86,32	76,93	182,60	71,33	193,29	24,27	25,57	85,93	193,27	78,23
2,750	133,77	72,50	59,67	39,07	81,85	52,35	271,20	17,21	17,83	77,94	94,21	56,83
3,000	70,69	39,65	38,10	29,68	57,20	34,45	246,57	13,52	12,94	57,92	43,63	39,26
3,250	39,89	25,81	30,34	22,39	36,71	28,26	283,97	10,23	10,42	38,39	30,19	32,66
3,500	30,80	16,74	21,51	16,70	23,68	24,57	97,88	7,58	7,54	35,94	21,71	23,40
4,000	11,57	11,69	14,29	6,50	13,49	18,47	18,86	4,62	5,12	31,72	11,37	16,07
4,500	9,23	8,62	10,25	4,27	9,10	11,78	12,89	bld**	3,75	22,88	7,55	15,26
5,000	5,42	4,82	6,65	blq*	6,29	8,49	7,27	bld**	2,86	11,68	4,09	9,94
6,000	2,64	bld**	3,48	bld**	bld**	5,55	2,99	bld**	2,59	6,71	2,73	4,82

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 2.5 ng/ml)

*blq-Werte wurden für die statistische Berechnung auf 1,75 ng/ml ((LOD+LOQ)/2) gesetzt

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOQ = 1 ng/ml)

**bld-Werte wurden für die statistische Berechnung auf 0 ng/ml gesetzt

zu B. 38

Statistik (männlich)						
Zeit [h]	Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,000	nc	nc	0	0	bld	bld
0,167	1138,92	518,50	12	12	107,20	7758,00
0,250	3584,88	2996,40	12	12	446,61	9658,60
0,333	6252,10	5858,10	12	12	936,76	13665,00
0,500	6122,67	5445,50	12	12	1316,10	17179,00
0,667	4705,19	3379,10	12	12	1014,00	11372,00
0,833	3152,86	2360,95	12	12	1026,90	7337,00
1,000	2371,60	2054,00	12	12	829,74	5148,80
1,250	1464,81	1141,72	12	12	286,52	3786,10
1,500	752,63	450,37	12	12	111,98	2311,80
1,750	335,90	201,03	12	12	76,18	954,22
2,000	223,19	87,65	12	12	45,26	885,45
2,250	143,45	60,90	12	12	29,45	598,00
2,500	106,75	46,46	12	12	14,74	407,99
2,750	57,83	35,67	12	12	12,86	142,77
3,000	59,65	24,57	12	12	10,61	275,35
3,250	44,67	18,77	12	12	7,95	232,42
3,500	18,63	13,17	12	12	5,98	52,46
4,000	9,70	8,77	12	12	4,34	21,32
4,500	7,20	6,10	11	12	blq	19,62
5,000	4,26	4,05	10	12	bld	9,15
6,000	nc	nc	5	0	bld	4,40

Statistik (weiblich)						
Zeit [h]	Mittel _{arith} [ng/ml]	Median [ng/ml]	n	n*	Min [ng/ml]	Max [ng/ml]
0,000	nc	nc	0	0	bld	blq
0,167	1276,44	729,40	12	12	220,44	4955,61
0,250	3870,97	2198,26	12	12	400,23	12304,00
0,333	5702,04	4243,73	12	12	1331,28	15692,00
0,500	9898,64	10481,00	12	12	3724,13	15675,37
0,667	8468,70	7850,05	12	12	3439,07	15014,00
0,833	6283,99	5944,45	12	12	833,89	13577,44
1,000	3986,17	3269,38	12	12	712,22	9926,86
1,250	2529,13	1536,25	12	12	256,40	12938,00
1,500	1067,23	699,81	12	12	150,56	3572,87
1,750	812,35	405,17	12	12	92,21	4371,00
2,000	453,13	248,62	12	12	55,32	1605,20
2,250	283,50	146,55	12	12	34,31	1032,61
2,500	123,02	86,13	12	12	24,27	278,55
2,750	81,20	66,08	12	12	17,21	271,20
3,000	56,97	39,46	12	12	12,94	246,57
3,250	49,11	30,27	12	12	10,23	283,97
3,500	27,34	22,56	12	12	7,54	97,88
4,000	13,65	12,59	12	12	4,62	31,72
4,500	9,63	9,17	11	12	bld	22,88
5,000	5,77	5,85	10	12	bld	11,68
6,000	2,63	2,68	8	12	bld	6,71

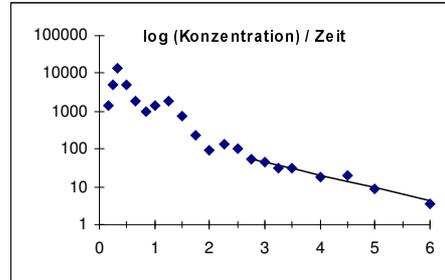
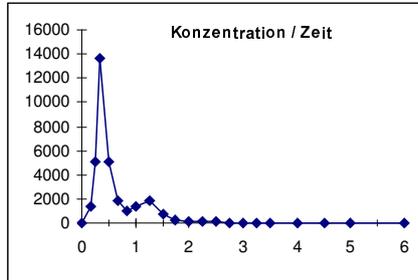
blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 2.5 ng/ml)
 bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOQ = 1 ng/ml)
 n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq oder bld-Wert)
 n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung
 nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq-Werte)

B. 39 Nicht kompartimentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma nach oraler Gabe von Dexlipotam (604,8 mg bezogen auf R(+)- α -Liponsäure).

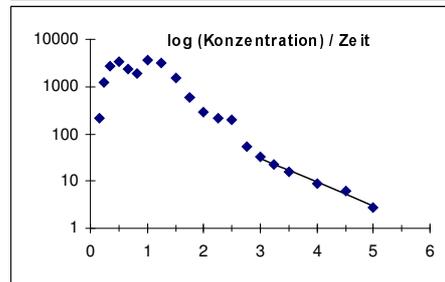
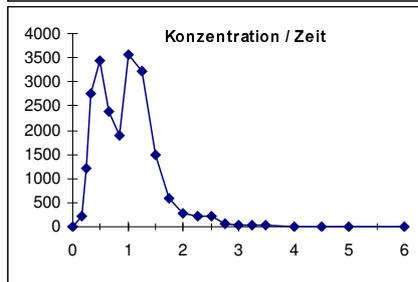
Links: Lineare Darstellung

Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast

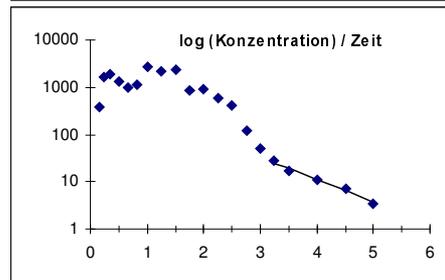
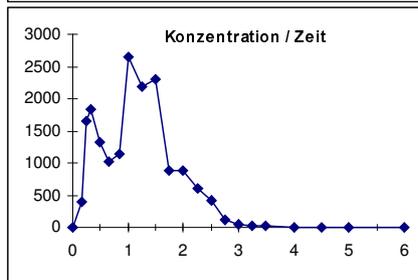
01 MGI



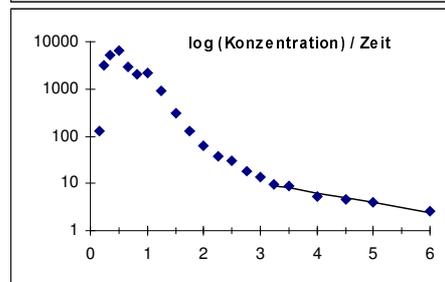
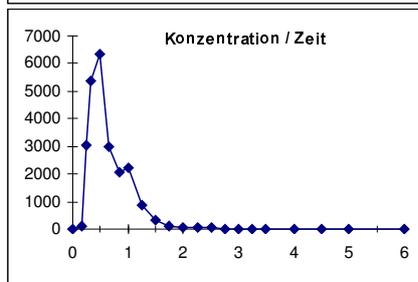
02 LJ



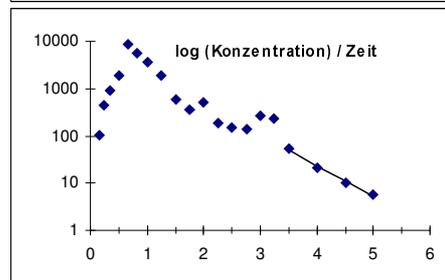
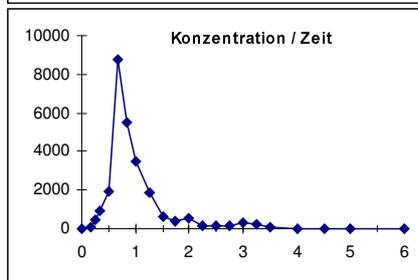
03 BR



04 NP

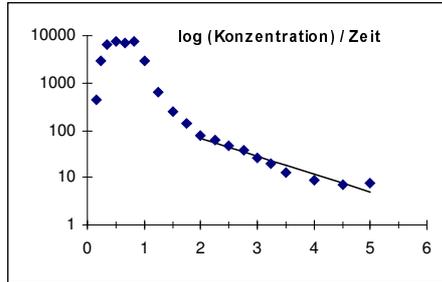
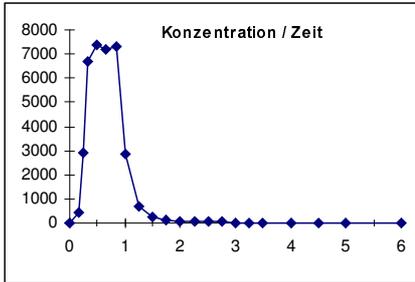


05 CV

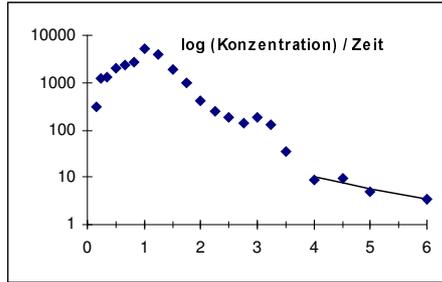
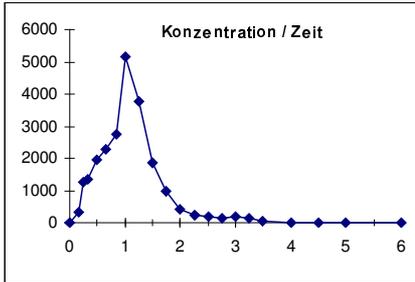


Zu B. 39

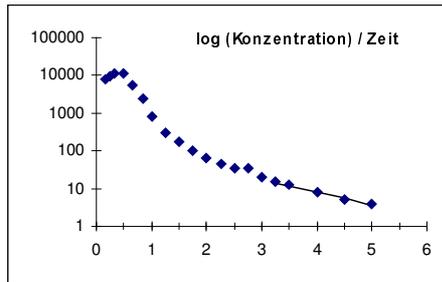
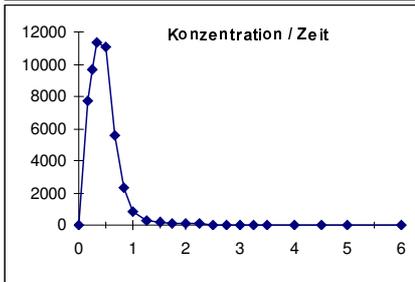
06 FMT



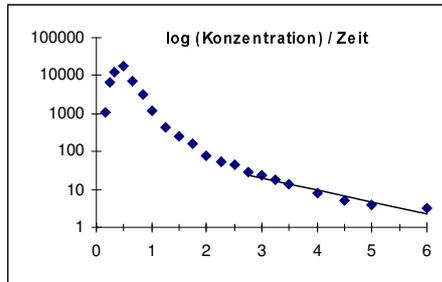
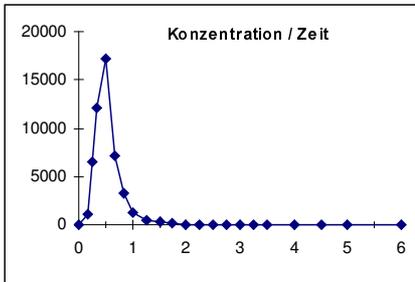
07 BJ



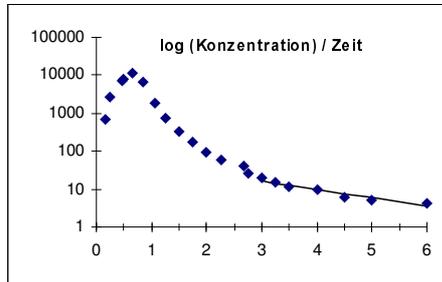
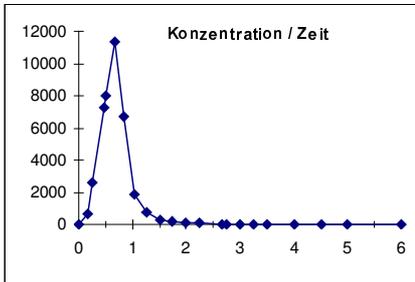
08 SL



09 AM

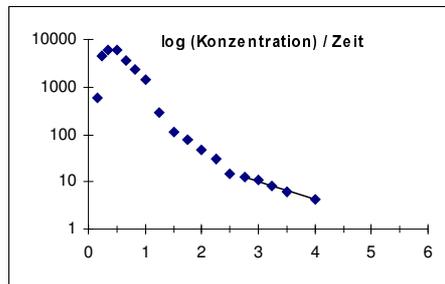
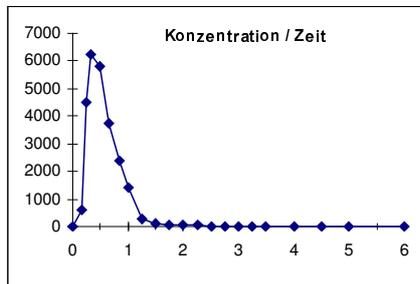


10 KRA

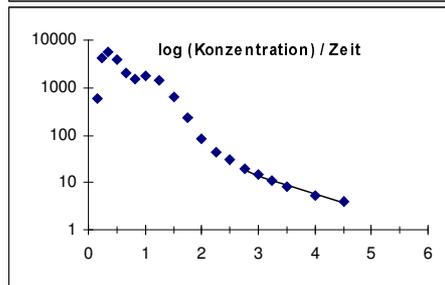
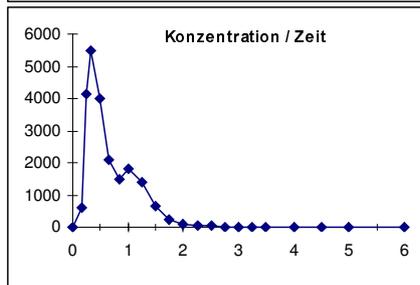


Zu B. 39

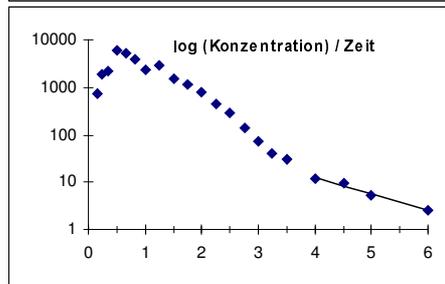
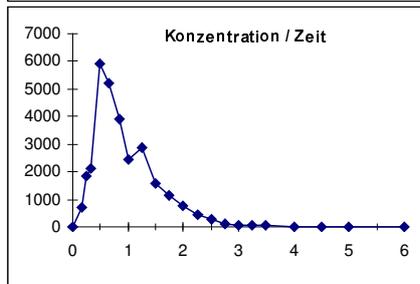
11 PA



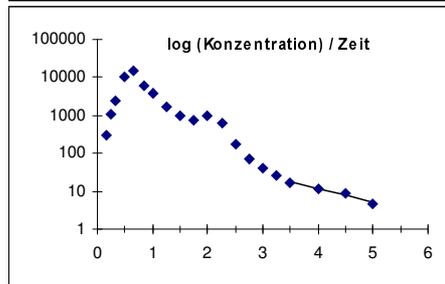
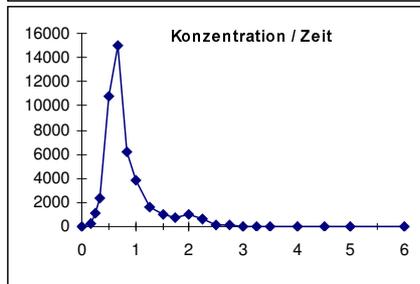
12 FC



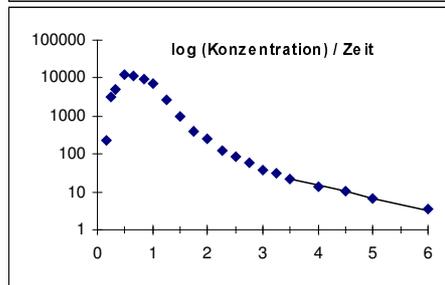
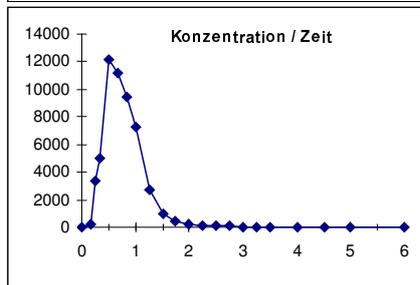
13 SK



14 BA

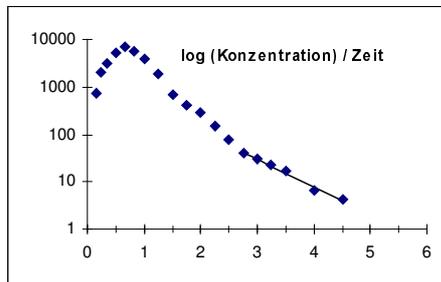
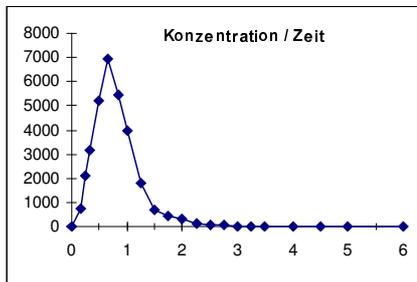


15 LP

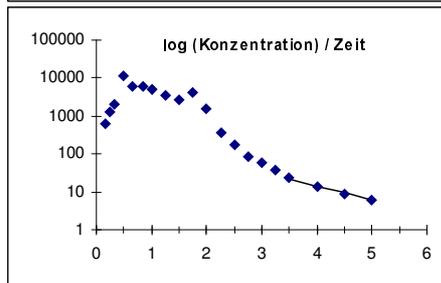
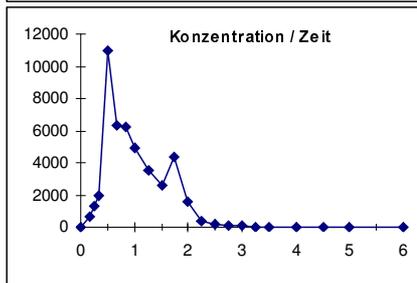


Zu B. 39

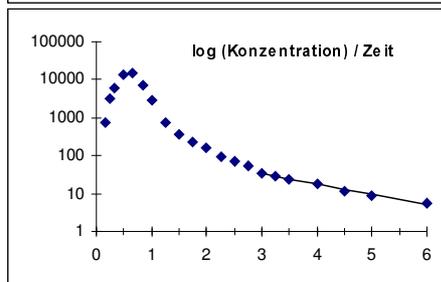
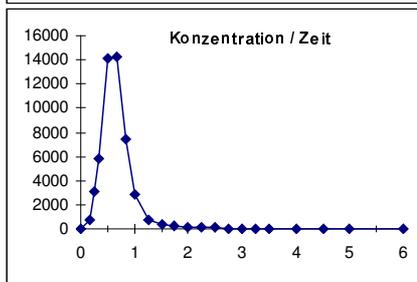
16 FS



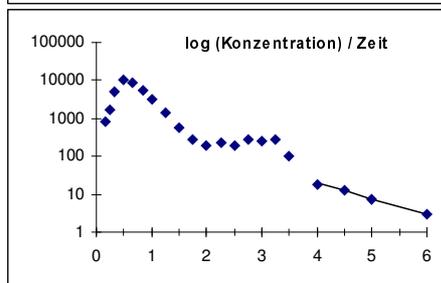
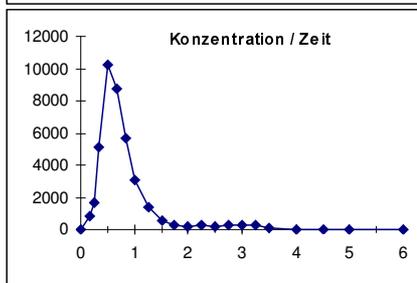
17 BIU



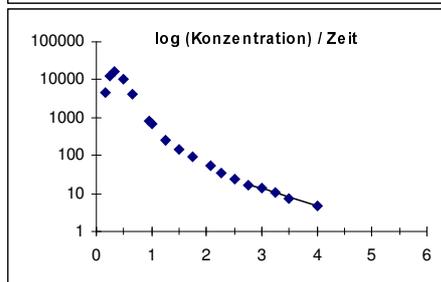
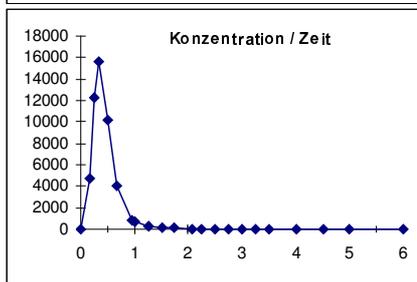
18 GHK



19 MMI

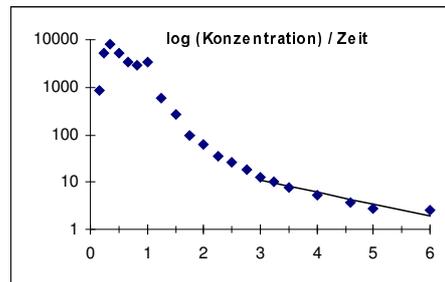
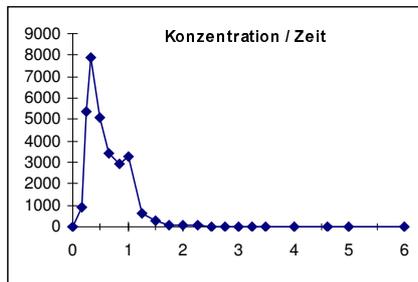


20 RP

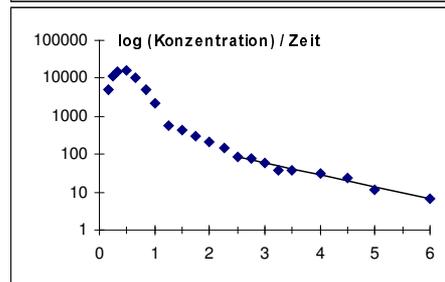
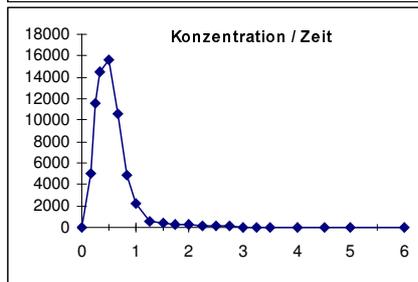


Zu B. 39

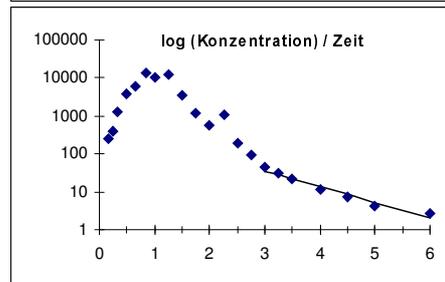
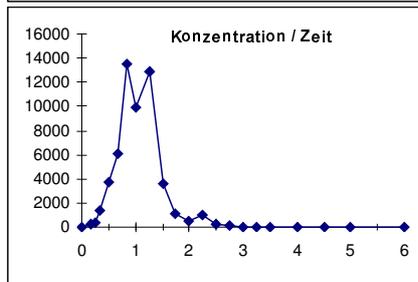
21 FSA



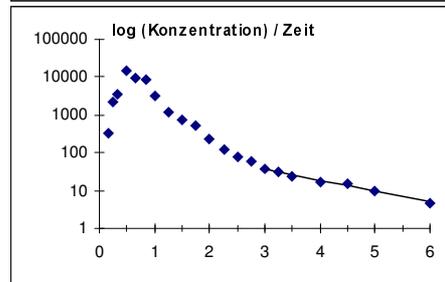
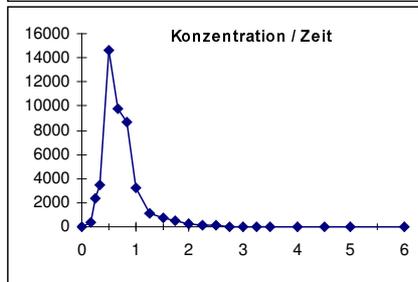
22 CCL



23 FG



24 KUT



B. 40 Nicht kompartimentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen R(+)- α -Liponsäure-Konzentrations-Zeitverläufe im Plasma nach oraler Gabe von Dexlipotam (männliche Probanden, Dosis: 604,8 mg bezogen auf R(+)-Liponsäure) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartimentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / R(+)- α -Liponsäure im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 604,8 mg)											
Subjekt	Gewicht [kg]	t _{max} [h]	C _{max} [ng/ml]	AUC _{0-tlast} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	AUMC [ng·h·h/ml]	t _{1/2} [h]	MRT _{oral} [h]	k [1/h]	r ² (ln)
01 MGI	69,5	0,33	13665,00	4771,44	4776,74	0,11	3195,61	0,88	0,67	0,79	0,9646
02 LJ	86,4	1,00	3551,70	4042,60	4045,18	0,06	4062,44	0,60	1,00	1,16	0,9890
03 BR	87,7	1,00	2655,60	3427,21	3430,63	0,10	4245,88	0,64	1,24	1,09	0,9824
04 NP	87,8	0,50	6329,00	3689,92	3694,93	0,14	2547,70	1,45	0,69	0,48	0,9559
05 CV	92,9	0,67	8722,70	4702,89	4706,40	0,07	4742,27	0,47	1,01	1,49	0,9913
06 FMT	81,3	0,50	7407,60	5733,24	5738,82	0,10	4001,82	0,79	0,70	0,87	0,9238
07 BJ	71,0	1,00	5148,80	4557,29	4563,33	0,13	5220,15	1,27	1,14	0,55	0,9091
08 SL	92,9	0,33	11351,00	6740,04	6744,70	0,07	3289,50	0,88	0,49	0,79	0,9961
09 AM	75,8	0,50	17179,00	7319,87	7323,04	0,04	4127,19	0,95	0,56	0,73	0,9340
10 KRA	74,7	0,67	11372,00	6122,24	6129,30	0,12	4376,80	1,38	0,71	0,50	0,9087
11 PA	79,1	0,33	6218,00	3662,09	3666,69	0,13	2161,30	0,77	0,59	0,90	0,9852
12 FC	85,1	0,33	5498,20	3371,60	3375,62	0,12	2421,70	0,77	0,72	0,90	0,9725
n		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mittel _{arith}		0,60	8258,22	4845,04	4849,62	0,10	3699,36	0,90	0,79	0,85	0,9594
CV [%]		45,25	52,62	27,69	27,67	30,18	26,17	34,36	30,54	34,17	3,39
Median		0,50	6868,30	4630,09	4634,87	0,11	4032,13	0,83	0,71	0,83	0,9685
Min		0,33	2655,60	3371,60	3375,62	0,04	2161,30	0,47	0,49	0,48	0,9087
Max		1,00	17179,00	7319,87	7323,04	0,14	5220,15	1,45	1,24	1,49	0,9961
Mittel _{geo}		0,54	7235,08	4684,88	4689,52	0,09	3572,84	0,86	0,76	0,81	0,9589
CV _{ln} [%]		46,76	59,54	27,29	27,27	36,32	28,90	35,16	30,09	35,16	3,42
Cl _{ln} (95%) LL		0,41	5098,52	3951,28	3955,61	0,08	2984,36	0,69	0,63	0,65	0,9382
UL		0,72	10266,96	5554,68	5559,59	0,12	4277,36	1,06	0,92	1,01	0,9799

B. 41 Nicht kompartimentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen R(+)- α -Liponsäure-Konzentrations-Zeitverläufe im Plasma nach oraler Gabe von Dexlipotam (weibliche Probanden, Dosis: 603,9 mg bezogen auf R(+)- α -Liponsäure) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartimentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / R(+)- α -Liponsäure im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 604,8 mg)											
Subjekt	Gewicht [kg]	t _{max} [h]	C _{max} [ng/ml]	AUC _{0-t_{last}} [ng·h/ml]	AUC [ng·h/ml]	AUC _{t_{last}-inf} [%]	AUMC [ng·h ² /ml]	t _{1/2} [h]	MRT _{oral} [h]	k [1/h]	r ² (ln)
13 SK	72,7	0,50	5911,90	5387,64	5391,09	0,06	5380,73	0,91	1,00	0,77	0,9878
14 BA	58,6	0,67	15014,00	7907,04	7913,46	0,08	6757,68	0,86	0,85	0,81	0,9787
15 LP	49,0	0,50	12187,00	9131,46	9136,09	0,05	7263,02	0,95	0,79	0,73	0,9975
16 FS	72,5	0,67	6929,80	5306,77	5309,76	0,06	4383,26	0,52	0,83	1,33	0,9863
17 BIU	49,1	0,50	10998,00	8619,62	8626,52	0,08	9000,62	0,79	1,04	0,87	0,9892
18 GHK	61,7	0,67	14280,00	8154,06	8162,07	0,10	5674,94	1,10	0,70	0,63	0,9880
19 MMI	69,8	0,50	10206,00	6609,88	6613,05	0,05	5498,82	0,74	0,83	0,94	0,9967
20 RP	80,0	0,33	15692,00	6604,80	6609,09	0,06	3016,11	0,65	0,46	1,07	0,9988
21 FSA	71,6	0,33	7851,79	4432,74	4436,28	0,08	2863,44	1,24	0,65	0,56	0,9093
22 CCL	58,2	0,50	15675,37	9596,56	9605,58	0,09	5719,34	0,96	0,60	0,73	0,9749
23 FG	65,4	0,83	13577,44	11111,19	11113,34	0,02	12090,55	0,73	1,09	0,95	0,9614
24 KUT	61,5	0,50	14617,77	7630,41	7637,77	0,10	5778,65	1,04	0,76	0,67	0,9800
n		12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Mittel_{arith}		0,54	11911,76	7541,01	7546,18	0,07	6118,93	0,87	0,80	0,84	0,9790
CV [%]		26,65	29,40	25,98	25,97	33,81	41,32	23,07	23,35	25,53	2,49
Median		0,50	12882,22	7768,72	7775,62	0,07	5697,14	0,88	0,81	0,79	0,9871
Min		0,33	5911,90	4432,74	4436,28	0,02	2863,44	0,52	0,46	0,56	0,9093
Max		0,83	15692,00	11111,19	11113,34	0,10	12090,55	1,24	1,09	1,33	0,9988
Mittel_{geo}		0,52	11357,30	7298,49	7303,55	0,06	5677,63	0,85	0,78	0,81	0,9787
CV_{ln} [%]		27,67	34,81	27,68	27,68	47,48	42,35	24,49	25,29	24,49	2,56
CI_{ln} (95%) LL		0,44	9161,12	6141,14	6145,50	0,05	4386,26	0,73	0,66	0,70	0,9630
UL		0,62	14079,96	8673,96	8679,82	0,09	7349,20	0,99	0,91	0,95	0,9948

B. 42 Individuelle R(+)- α -Liponsäure-Plasmakonzentrationen für jeweils 3 männliche und weibliche Probanden nach oraler Gabe von 604,8 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure).

R(+)- α -Liponsäure Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]						
Zeit	Subjekt					
	männlich			weiblich		
[h]	02 LJ	11 PA	12 FC	18 GHK	20 RP	21 FSA
0,000	blq	bld	bld	blq	blq	blq
0,167	0,95	2,40	2,03	3,36	19,30	3,25
0,250	6,27	23,15	20,26	12,90	48,38	16,52
0,333	15,01	29,58	23,49	16,74	70,66	19,35
0,500	15,01	15,69	21,48	81,86	40,40	12,13
0,667	10,51	16,83	8,71	72,78	15,81	9,56
0,833	7,81	10,75	5,89	33,55	3,07	12,78
1,000	13,75	5,84	9,63	13,25	2,59	14,87
1,250	11,63	1,00	9,48	3,42	1,43	1,40
1,500	6,23	0,37	2,55	1,78	0,89	0,67
1,750	2,04	0,17	1,04	1,02	0,37	0,24
2,000	0,92	0,27	0,37	0,51	0,26	0,15
2,250	0,98	0,17	0,14	0,26	0,08	0,14
2,500	1,05	0,10	0,12	0,23	0,04	0,05
2,750	0,28	0,10	0,07	0,11	0,03	blq*
3,000	0,08	0,07	nr	0,09	blq*	blq*
3,250	0,09	0,04	0,04	blq	blq	blq
3,500	0,07	blq	blq	blq	blq	blq
4,000	0,04	blq	blq	blq	blq	blq
4,500	blq	blq	blq	blq	blq	blq
5,000	blq	blq	blq	blq	blq	blq
6,000	blq	blq	blq	blq	blq	blq

R(+)- α -Liponsäure Konzentrationen im Plasma [ng/ml]						
Zeit	Subjekt					
	männlich			weiblich		
[h]	02 LJ	11 PA	12 FC	18 GHK	20 RP	21 FSA
0,000	blq	bld	blq	blq	blq	blq
0,167	195,30	495,90	417,85	693,69	3981,05	670,86
0,250	1292,62	4775,61	4180,64	2661,53	9980,21	3407,27
0,333	3096,03	6103,07	4845,04	3453,41	14576,51	3991,58
0,500	3096,16	3237,48	4430,79	16887,17	8334,44	2502,40
0,667	2169,17	3471,17	1797,29	15015,52	3262,40	1971,91
0,833	1612,01	2217,20	1214,57	6920,46	633,29	2637,00
1,000	2837,29	1203,78	1987,65	2734,09	535,00	3066,98
1,250	2398,37	205,70	1956,59	706,16	295,16	289,56
1,500	1284,26	77,01	525,17	366,33	182,72	137,83
1,750	420,33	34,63	215,14	210,43	75,73	49,47
2,000	190,24	56,65	76,88	105,78	54,46	30,82
2,250	202,02	35,87	28,03	54,53	17,12	29,81
2,500	215,76	21,33	25,15	46,51	8,78	10,67
2,750	58,70	20,15	14,66	23,64	6,31	blq**
3,000	17,16	15,07	nr	18,86	blq*	blq***
3,250	17,75	8,10	7,73	blq	blq	blq
3,500	15,13	blq	blq	blq	blq	blq
4,000	7,69	blq	blq	blq	blq	blq
4,500	blq	blq	blq	blq	blq	blq
5,000	blq	blq	blq	blq	blq	blq
6,000	blq	blq	blq	blq	blq	blq

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 5 ng/ml oder 0,024 nmol/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 2 ng/ml oder 0,010 nmol/ml)

*: blq wurde für die statistische Berechnung auf 0,017 ng/ml gesetzt (LOQ+LOD)/2

**: blq wurde für die statistische Berechnung auf 0,029 ng/ml gesetzt (LOQ+LOD)/2

Zu B. 42

Statistik						
Zeit [h]	Mittel _{arith} [nmol/ml]	Median [nmol/ml]	n	n*	Min [nmol/ml]	Max [nmol/ml]
0,000	nc	nc	0	0	bld	blq
0,167	5.21	2.83	6	6	0.95	19.30
0,250	21.25	18.39	6	6	6.27	48.38
0,333	29.14	21.42	6	6	15.01	70.66
0,500	31.09	18.59	6	6	12.13	81.86
0,667	22.37	13.16	6	6	8.71	72.78
0,833	12.31	9.28	6	6	3.07	33.55
1,000	9.99	11.44	6	6	2.59	14.87
1,250	4.73	2.43	6	6	1.00	11.63
1,500	2.08	1.33	6	6	0.37	6.23
1,750	0.81	0.69	6	6	0.17	2.04
2,000	0.42	0.32	6	6	0.15	0.92
2,250	0.30	0.16	6	6	0.08	0.98
2,500	0.27	0.11	6	6	0.04	1.05
2,750	0.10	0.08	5	6	0.03	0.28
3,000	0.06	0.07	3	5	0.02	0.09
3,250	nc	nc	3	0	blq	0.09
3,500	nc	nc	1	0	blq	0.07
4,000	nc	nc	1	0	blq	0.04
4,500	nc	nc	0	0	blq	blq
5,000	nc	nc	0	0	blq	blq
6,000	nc	nc	0	0	blq	blq

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 5 ng/ml oder 0,024 nmol/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 2 ng/ml oder 0,010 nmol/ml)

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq oder bld-Wert)

n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq-Werte)

B. 43 Individuelle Tetranorliponsäure-Plasmakonzentrationen für jeweils 3 männliche und weibliche Probanden nach oraler Gabe von 604,8 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure),

TNLA Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]						
Zeit	Subjekt					
	männlich			weiblich		
[h]	02 LJ	11 PA	12 FC	18 GHK	20 RP	21 FSA
0,000	blq	bld	bld	bld	blq	blq
0,167	0,07	blq*	0,12	0,09	0,78	0,03
0,250	0,70	1,86	2,96	1,14	3,56	0,22
0,333	1,80	4,66	4,00	1,36	6,00	0,57
0,500	2,67	4,69	6,41	4,47	6,24	0,95
0,667	2,45	2,01	4,40	14,93	4,79	1,45
0,833	2,27	1,22	2,18	14,84	2,57	1,94
1,000	2,78	3,63	2,93	13,35	2,11	1,48
1,250	4,23	2,64	5,40	5,05	1,13	1,09
1,500	3,11	1,63	2,05	3,64	1,02	0,76
1,750	1,72	1,47	1,75	3,47	0,43	0,26
2,000	1,25	1,10	0,99	1,76	0,29	0,20
2,250	0,66	0,81	0,57	0,77	0,14	0,11
2,500	0,38	0,36	0,33	0,88	0,09	0,07
2,750	0,14	0,26	0,18	nr	0,05	0,05
3,000	0,24	0,18	0,07	0,19	0,06	0,02
3,250	0,16	0,13	0,12	0,16	0,03	0,02
3,500	0,19	0,10	0,07	0,12	0,02	0,02
4,000	0,11	0,07	0,05	0,09	0,01	blq*
4,500	0,07	0,02	0,03	0,07	0,01	blq*
5,000	0,04	0,02	0,01	0,05	blq*	blq*
6,000	0,01	0,01	0,01	0,02	blq*	blq*

TNLA Konzentrationen im Plasma [ng/ml]						
Zeit	Subjekt					
	männlich			weiblich		
[h]	02 LJ	11 PA	12 FC	18 GHK	20 RP	21 FSA
0,000	blq	bld	blq	blq	blq	blq
0,167	10,10	blq*	17,44	13,76	117,71	4,79
0,250	105,14	279,40	444,57	171,15	534,02	32,40
0,333	270,20	700,48	600,90	204,42	901,30	85,94
0,500	400,32	705,07	962,85	671,82	937,77	142,98
0,667	368,57	301,40	660,74	2242,42	720,17	218,00
0,833	340,53	183,68	327,38	2228,25	386,75	290,93
1,000	417,16	545,80	439,64	2005,32	317,36	222,51
1,250	635,34	396,60	811,83	758,30	169,31	164,30
1,500	466,87	245,11	308,12	546,86	152,64	114,32
1,750	257,74	220,20	263,40	521,91	63,92	39,29
2,000	187,32	164,50	149,35	264,29	43,97	30,43
2,250	99,19	122,10	86,22	115,53	21,39	17,11
2,500	56,33	54,02	48,91	131,56	13,94	10,09
2,750	21,62	38,49	27,46	nr	8,19	7,83
3,000	36,43	26,82	11,26	28,84	8,56	3,56
3,250	23,39	19,90	18,28	24,29	4,53	3,16
3,500	28,65	14,67	11,03	17,39	2,94	3,22
4,000	17,22	10,91	6,83	13,97	1,04	blq*
4,500	10,67	3,26	5,05	11,16	1,44	blq*
5,000	5,31	2,80	1,52	7,10	blq*	blq*
6,000	1,23	1,74	1,00	3,16	blq*	blq*

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 1 ng/ml oder 0,007 nmol/ml)
 bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,5 ng/ml oder 0,003 nmol/ml)
 *: blq wurde für die statistische Berechnung auf 0,005 ng/ml gesetzt (LOQ+LOD)/2

Zu B. 43

Statistik						
Zeit [h]	Mittel _{arith} [nmol/ml]	Median [nmol/ml]	n	n*	Min [nmol/ml]	Max [nmol/ml]
0,000	nc	nc	0	0	bld	blq
0,167	0.18	0.08	5	0	blq	0.78
0,250	1.74	1.50	6	6	0.22	3.56
0,333	3.07	2.90	6	6	0.57	6.00
0,500	4.24	4.58	6	6	0.95	6.41
0,667	5.01	3.43	6	6	1.45	14.93
0,833	4.17	2.22	6	6	1.22	14.84
1,000	4.38	2.85	6	6	1.48	13.35
1,250	3.26	3.44	6	6	1.09	5.40
1,500	2.03	1.84	6	6	0.76	3.64
1,750	1.52	1.59	6	6	0.26	3.47
2,000	0.93	1.04	6	6	0.20	1.76
2,250	0.51	0.62	6	6	0.11	0.81
2,500	0.35	0.34	6	6	0.07	0.88
2,750	0.14	0.14	5	5	0.05	0.26
3,000	0.13	0.13	6	6	0.02	0.24
3,250	0.10	0.13	6	6	0.02	0.16
3,500	0.09	0.09	6	6	0.02	0.19
4,000	0.06	0.06	5	6	blq	0.11
4,500	0.04	0.03	5	6	blq	0.07
5,000	0.02	0.01	5	6	blq	0.05
6,000	0.01	0.01	5	6	blq	0.02

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 1 ng/ml oder 0,007 nmol/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,5 ng/ml oder 0,003 nmol/ml)

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq oder bld-Wert)

n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq-Werte)

B. 44 Individuelle Bisnorliponsäure-Plasmakonzentrationen für jeweils 3 männliche und weibliche Probanden nach oraler Gabe von 604,8 mg/kg Dexlipotam (bezogen auf die freie Säure).

BNLA Konzentrationen im Plasma [nmol/ml]						
Zeit	Subjekt					
	männlich			weiblich		
[h]	02 LJ	11 PA	12 FC	18 GHK	20 RP	21 FSA
0,000	blq	bld	blq	blq	blq	bld
0,167	blq	blq	0,01	bld	0,16	bld
0,250	0,05	blq*	0,41	0,06	0,81	0,34
0,333	0,10	0,77	0,78	0,15	1,00	0,69
0,500	0,14	1,47	0,74	1,76	0,92	0,80
0,667	0,08	0,71	0,24	3,53	0,85	0,40
0,833	0,09	0,29	0,08	1,89	0,25	0,45
1,000	0,11	0,32	0,08	0,56	0,18	0,65
1,250	0,17	blq*	0,38	0,14	0,10	0,14
1,500	0,10	blq*	0,08	0,20	0,10	0,02
1,750	0,04	blq	0,03	0,08	blq	blq
2,000	0,01	blq	0,03	0,07	blq	blq
2,250	0,01	blq	0,01	0,05	blq	blq
2,500	0,01	blq	blq	bld	blq	blq
2,750	blq	blq	blq	bld	blq	blq
3,000	blq	blq	blq	bld	blq	blq
3,250	blq	blq	blq	blq	blq	blq
3,500	blq	blq	blq	blq	blq	blq
4,000	blq	blq	blq	blq	blq	blq
4,500	blq	blq	blq	blq	blq	blq
5,000	blq	blq	blq	blq	blq	blq
6,000	blq	blq	blq	blq	blq	blq

BNLA Konzentrationen im Plasma [ng/ml]						
Zeit	Subjekt					
	männlich			weiblich		
[h]	02 LJ	11 PA	12 FC	18 GHK	20 RP	21 FSA
0,000	blq	bld	blq	blq	blq	bld
0,167	blq	blq	1,28	bld	28,63	bld
0,250	8,29	blq*	73,25	10,09	144,47	60,51
0,333	17,23	136,40	138,57	26,21	178,65	122,97
0,500	24,59	261,39	131,95	313,00	164,22	143,16
0,667	13,45	126,11	42,79	628,71	152,29	71,69
0,833	16,41	52,29	14,08	337,40	43,74	80,67
1,000	20,08	56,89	14,32	99,68	32,22	115,70
1,250	29,52	blq*	68,45	24,36	16,99	24,80
1,500	17,06	blq*	14,51	35,57	17,83	3,67
1,750	6,63	blq	4,83	13,54	blq	blq
2,000	2,10	blq	4,93	11,80	blq	blq
2,250	1,81	blq	1,85	8,26	blq	blq
2,500	1,22	blq	blq	bld	blq	blq
2,750	blq	blq	blq	bld	blq	blq
3,000	blq	blq	blq	bld	blq	blq
3,250	blq	blq	blq	loq	blq	blq
3,500	blq	blq	blq	loq	blq	blq
4,000	blq	blq	blq	loq	blq	blq
4,500	blq	blq	blq	loq	blq	blq
5,000	blq	blq	blq	loq	blq	blq
6,000	blq	blq	blq	loq	blq	blq

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 1 ng/ml oder 0,006 nmol/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,5 ng/ml oder 0,003 nmol/ml)

*: blq wurde für die statistische Berechnung auf 0,004 ng/ml gesetzt (LOQ+LOD)/2

Zu B. 44

Statistik						
Zeit [h]	Mittel _{arith} [nmol/ml]	Median [nmol/ml]	n	n*	Min [nmol/ml]	Max [nmol/ml]
0,000	nc	nc	0	0	bld	blq
0,167	nc	nc	2	0	bld	28.63
0,250	49.56	35.30	5	6	blq	144.47
0,333	103.34	129.68	6	6	17.23	178.65
0,500	173.05	153.69	6	6	24.59	313.00
0,667	172.50	98.90	6	6	13.45	628.71
0,833	90.77	48.02	6	6	14.08	337.40
1,000	56.48	44.55	6	6	14.32	115.70
1,250	27.48	24.58	5	6	blq	68.45
1,500	14.90	15.79	5	6	blq	35.57
1,750	nc	nc	3	0	blq	13.54
2,000	nc	nc	3	0	blq	11.80
2,250	nc	nc	3	0	blq	8.26
2,500	nc	nc	1	0	blq	1.22
2,750	nc	nc	0	0	bld	blq
3,000	nc	nc	0	0	bld	blq
3,250	nc	nc	0	0	blq	blq
3,500	nc	nc	0	0	blq	blq
4,000	nc	nc	0	0	blq	blq
4,500	nc	nc	0	0	blq	blq
5,000	nc	nc	0	0	blq	blq
6,000	nc	nc	0	0	blq	blq

blq: unterhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ = 1 ng/ml oder 0,006 nmol/ml)

bld: unterhalb der Nachweisgrenze (LOD = 0,5 ng/ml oder 0,003 nmol/ml)

n: Anzahl der gemessenen Konzentrationen (ohne blq oder bld-Wert)

n*: Anzahl der verwendeten Konzentrationen für die statistische Berechnung

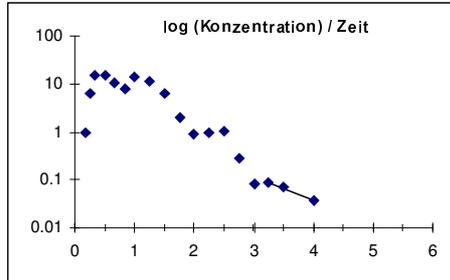
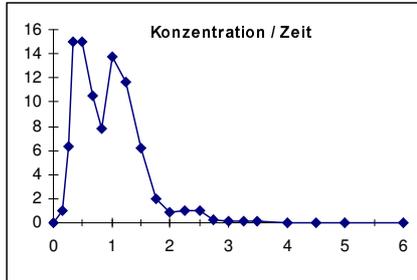
nc: nicht kalkuliert (mehr als 50 % der gemessenen Konzentrationen waren blq-Werte)

B. 45 Nicht kompartimentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen R(+)- α -Liponsäure-Konzentrationen im Plasma nach oraler Gabe von Dexlipotam (604,8 mg bezogen auf R(+)- α -Liponsäure).

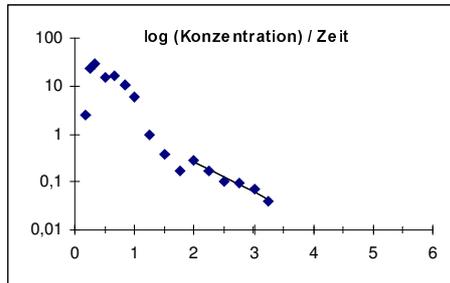
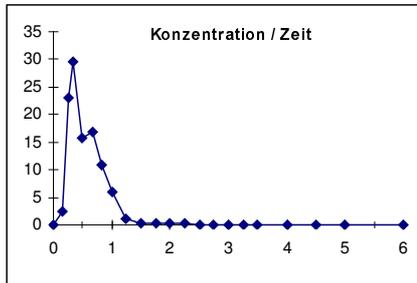
Links: Lineare Darstellung

Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast

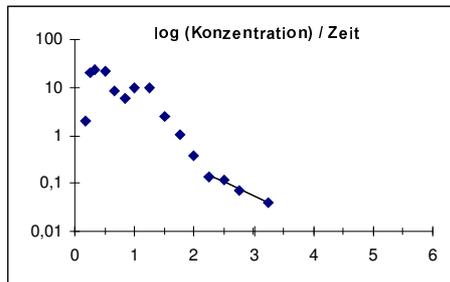
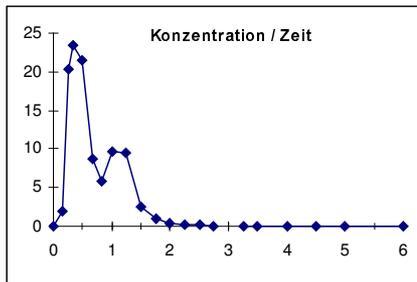
02 LJ



11 PA

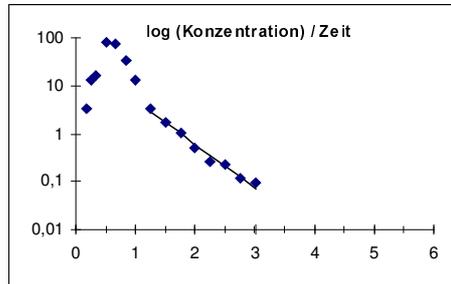
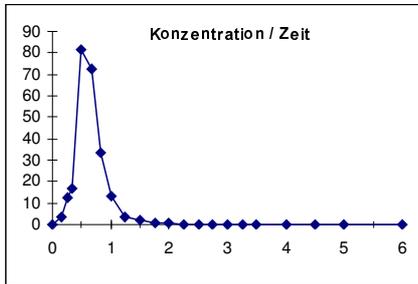


12 FC

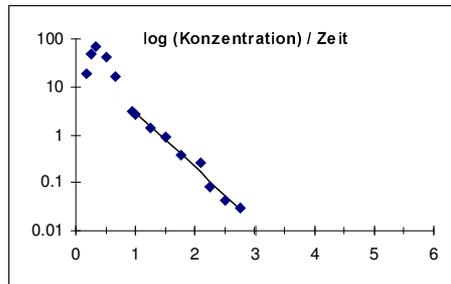
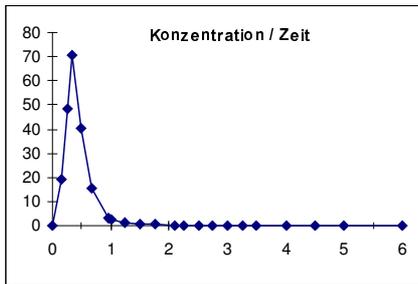


Zu B. 45

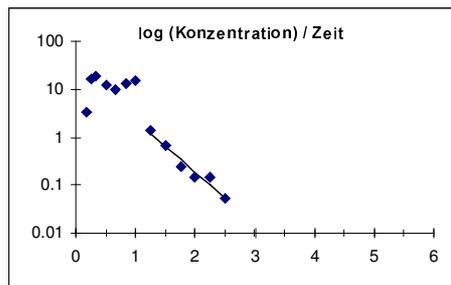
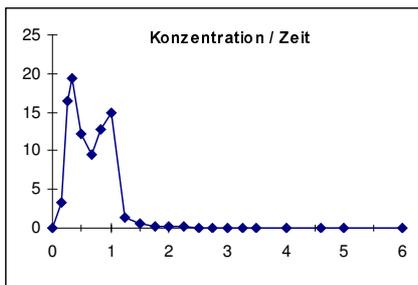
18 GHK



20 RP



21 FSA

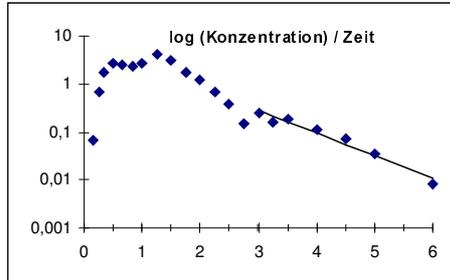
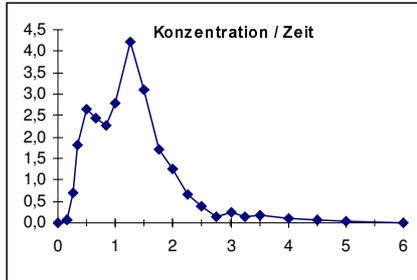


B. 46 Nicht kompartmentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen Tetranoliponsäure-Konzentrationen im Plasma nach oraler Gabe von Dexlipotam (604,8 mg bezogen auf R(+)- α -Liponsäure).

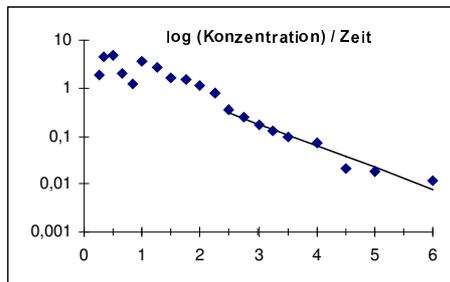
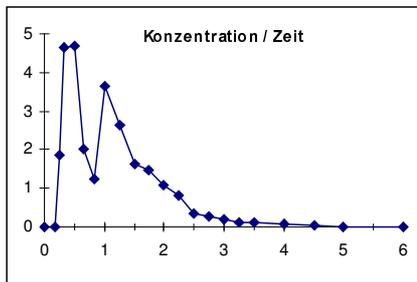
Links: Lineare Darstellung

Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast

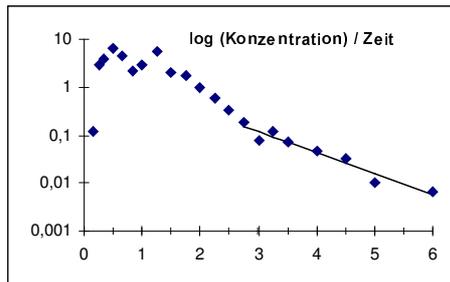
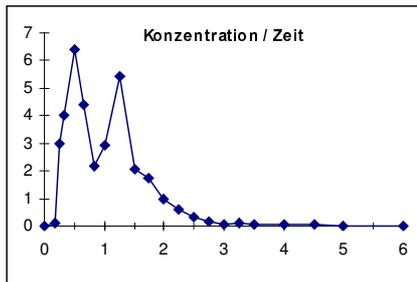
02 LJ



11 PA

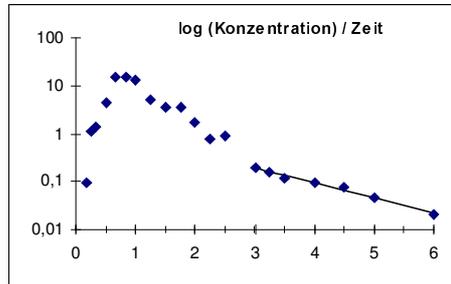
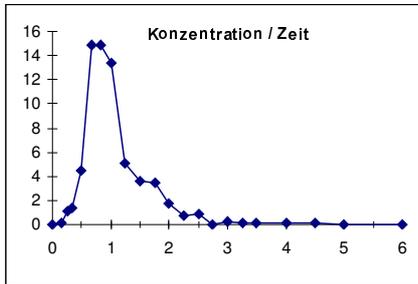


12 FC

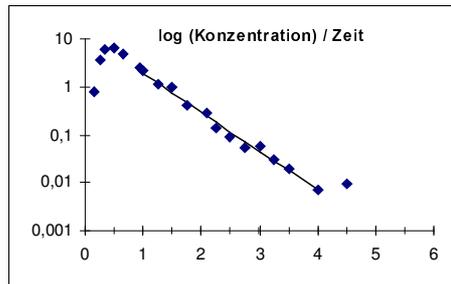
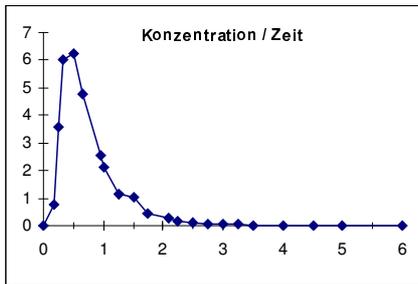


Zu B. 46

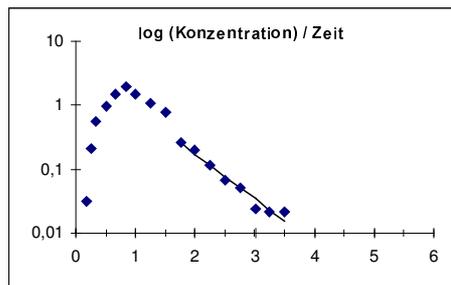
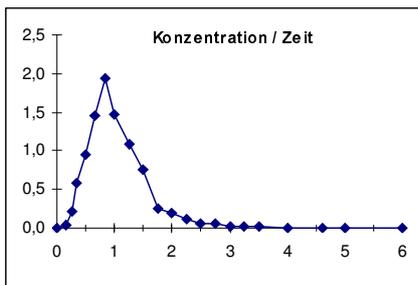
18 GHK



20 RP



21 FSA

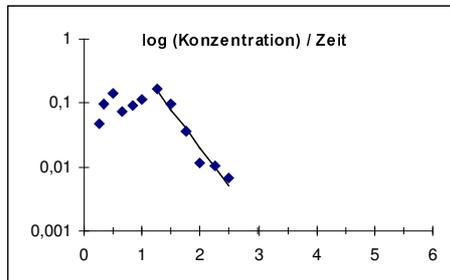
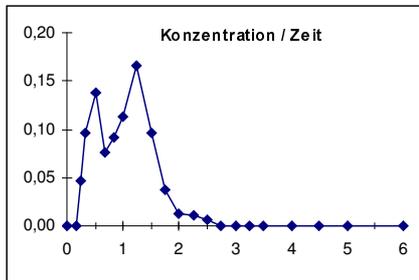


B. 47 Nicht kompartmentelle Auswertung: Graphische Darstellung der individuellen Bisnorliponsäure-Konzentrationen im Plasma nach oraler Gabe von Dexlipotam (604,8 mg bezogen auf R(+)- α -Liponsäure).

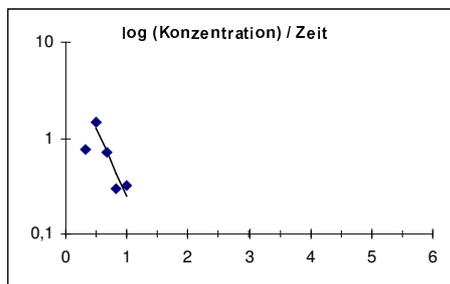
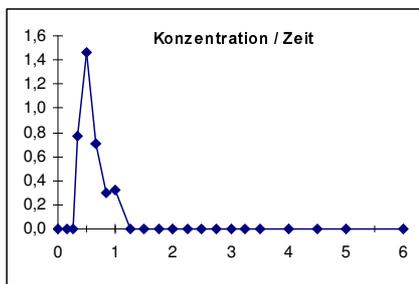
Links: Lineare Darstellung

Rechts: Semilogarithmische Darstellung mit Fit für den terminalen Ast

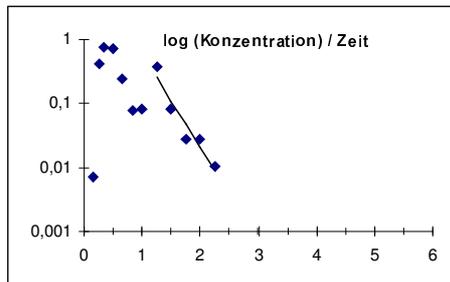
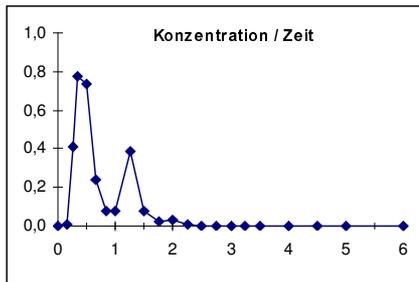
02 LJ



11 PA

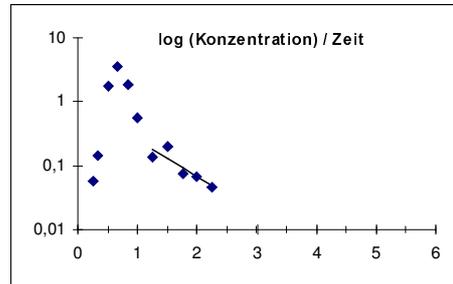
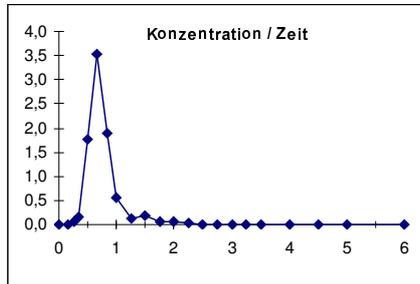


12 FC

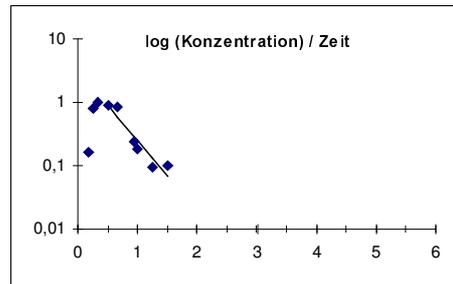
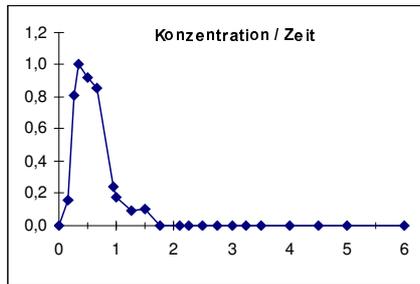


Zu B. 47

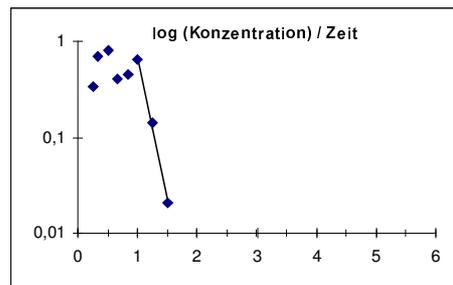
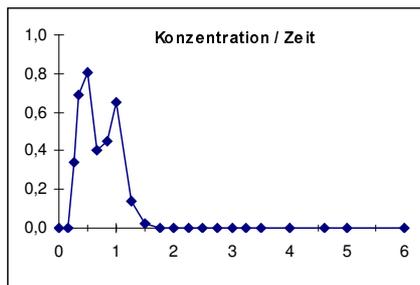
18 GHK



20 RP



21 FSA



B. 48 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen R(+)- α -LA-Konzentrations-Zeitverläufe im Plasma nach oraler Gabe R(+)- α -Liponsäure (604,8 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokinetik Parameter mit Statistik / R(+)- α -Liponsäure im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 604,8 mg)											
Subjekt	Gewicht [kg]	t _{max} [h]	C _{max} [nmol/ml]	AUC _{0-tlast} [nmol·h/ml]	AUC [nmol·h/ml]	AUC _{tlast-inf} [%]	AUMC [nmol·h·h/ml]	t _{1/2} [h]	MRT _{oral} [h]	k [1/h]	r ² (ln)
02 LJ	86.4	0.50	15.01	16.80	16.83	0.20	16.29	0.60	0.97	1.15	0.9770
11 PA	79.1	0.33	29.58	14.92	14.96	0.21	8.74	0.49	0.58	1.42	0.9595
12 FC	85.1	0.33	23.49	16.36	16.39	0.19	11.97	0.54	0.73	1.29	0.9672
18 GHK	61.7	0.50	81.86	39.56	39.59	0.09	26.33	0.33	0.66	2.11	0.9832
20 RP	80.0	0.33	70.66	27.25	27.26	0.04	12.18	0.26	0.45	2.63	0.9836
21 FSA	71.6	0.33	19.35	13.70	13.72	0.16	9.19	0.28	0.67	2.47	0.9506
n		6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittel_{arith}		0.39	39.99	21.43	21.46	0.15	14.12	0.42	0.68	1.84	0.9702
CV [%]		22.13	71.82	47.20	47.15	46.41	46.49	34.55	25.52	34.65	1.38
Median		0.33	26.53	16.58	16.61	0.17	12.08	0.41	0.67	1.76	0.9721
Min		0.33	15.01	13.70	13.72	0.04	8.74	0.26	0.45	1.15	0.9506
Max		0.50	81.86	39.56	39.59	0.21	26.33	0.60	0.97	2.63	0.9836
Mittel_{geo}		0.38	32.45	19.82	19.85	0.13	13.09	0.40	0.66	1.75	0.9701
CV_{ln} [%]		21.17	79.25	43.32	43.26	73.08	42.71	36.67	25.89	36.67	1.39
CI_{ln} (95%) LL		0.31	15.60	12.82	12.85	0.06	8.52	0.27	0.50	1.21	0.9561
UL		0.48	67.51	30.62	30.65	0.25	20.11	0.57	0.86	2.54	0.9843

B. 49 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen TNLA-Konzentrations-Zeitverläufe im Plasma nach oraler Gabe R(+)- α -Liponsäure (604,8 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokineitk Parameter mit Statistik / TNLA im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 604,8 mg)									
Subjekt	Gewicht [kg]	t_{max} [h]	C_{max} [nmol/ml]	$AUC_{0-tlast}$ [nmol·h/ml]	AUC [nmol·h/ml]	$AUC_{tlast-inf}$ [%]	$t_{1/2}$ [h]	k [1/h]	r^2 (ln)
02 LJ	86,4	1,25	4,23	5,27	5,28	0,19	0,64	1,09	0,9603
11 PA	79,1	0,50	4,69	4,78	4,84	1,25	0,67	1,04	0,9544
12 FC	85,1	0,50	6,41	6,48	6,49	0,09	0,69	1,01	0,9355
18 GHK	61,7	0,67	14,93	12,92	12,95	0,24	0,98	0,71	0,9881
20 RP	80,0	0,50	6,24	4,84	4,84	0,07	0,37	1,88	0,9885
21 FSA	71,6	0,83	1,94	1,78	1,79	0,53	0,43	1,61	0,9576
n		6	6	6	6	6	6	6	6
Mittel_{arith}		0,71	6,41	6,01	6,03	0,39	0,63	1,22	0,9641
CV [%]		41,93	69,91	61,93	61,81	113,51	34,41	35,56	2,15
Median		0,58	5,47	5,05	5,06	0,22	0,65	1,07	0,9589
Min		0,50	1,94	1,78	1,79	0,07	0,37	0,71	0,9355
Max		1,25	14,93	12,92	12,95	1,25	0,98	1,88	0,9885
Mittel_{geo}		0,67	5,33	5,13	5,15	0,24	0,60	1,16	0,9639
CV_{ln} [%]		38,56	74,64	70,98	70,82	147,10	36,30	36,30	2,14
CI_{ln} (95%) LL		0,45	2,65	2,62	2,64	0,08	0,41	0,80	0,9424
UL		0,98	10,72	10,02	10,05	0,74	0,86	1,68	0,9858

B. 50 Nicht kompartmentelle Auswertung: Darstellung der pharmakokinetischen Parameter der individuellen BNLA-Konzentrations-Zeitverläufe im Plasma nach oraler Gabe R(+)- α -Liponsäure (604,8 mg) mit statistischer Berechnung.

Nicht kompartmentelle Auswertung: Pharmakokineitk Parameter mit Statistik / BNLA im Plasma nach oraler Gabe (Dosis 604,8 mg)									
Subjekt	Gewicht [kg]	t_{\max} [h]	C_{\max} [nmol/ml]	$AUC_{0-t_{\text{last}}}$ [nmol·h/ml]	AUC [nmol·h/ml]	$AUC_{t_{\text{last}}-\text{inf}}$ [%]	$t_{1/2}$ [h]	k [1/h]	r^2 (ln)
02 LJ	86,4	1,25	0,17	0,17	0,17	1,08	0,25	2,72	0,9517
11 PA	79,1	0,50	1,47	0,53	0,61	12,36	0,21	3,27	0,8673
12 FC	85,1	0,33	0,78	0,46	0,46	0,59	0,21	3,32	0,9092
18 GHK	61,7	0,67	3,53	1,46	1,50	2,43	0,53	1,31	0,7779
20 RP	80,0	0,33	1,00	0,66	0,69	3,77	0,27	2,60	0,9005
21 FSA	71,6	0,50	0,80	0,56	0,57	0,56	0,10	6,90	0,9962
n		6	6	6	6	6	6	6	6
Mittel_{arith}		0,60	1,29	0,64	0,67	3,47	0,26	3,35	0,9005
CV [%]		57,48	90,93	67,76	66,85	130,75	54,97	56,15	8,31
Median		0,50	0,90	0,55	0,59	1,76	0,23	3,00	0,9048
Min		0,33	0,17	0,17	0,17	0,56	0,10	1,31	0,7779
Max		1,25	3,53	1,46	1,50	12,36	0,53	6,90	0,9962
Mittel_{geo}		0,53	0,90	0,53	0,55	1,85	0,23	2,98	0,8978
CV_{ln} [%]		52,70	131,41	78,07	79,16	179,42	57,59	57,59	8,51
CI_{ln} (95%) LL		0,32	0,31	0,26	0,27	0,53	0,13	1,70	0,8212
UL		0,90	2,58	1,10	1,15	6,53	0,41	5,22	0,9816

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Dorothee Jutta Krone
geb. Ochs

Geburtsdatum: 13.06.1969
Geburtsort: 64653 Lorsch

Familienstand: seit 09.07.1997 verheiratet

Schulausbildung:

1975 – 1979 Grundschohle in Lorsch
1979 – 1988 Gymnasium Liebfrauenschule in Bensheim

Berufsausbildung:

1988 – 1992 Studium der Chemie an der Fachhochschule Fresenius in Wiesbaden
1991 – 1992 Diplomarbeit bei der Firma Hoechst AG, Frankfurt am Main
Thema: „Markierung des Aktivzentrums der Prolyl-4-Hydroxylase“

1993 – 1996 Studium der Wirtschaftswissenschaftslehre an der Fachhochschule Mainz im berufsintegrierten Aufbaustudiengang für Ingenieure
1995 – 1996 Diplomarbeit bei der Firma ASTA Medica AG, Frankfurt am Main
Thema: „Kostenkontrolle in der Arzneimittelentwicklung mit Hilfe des Projektmanagements (am Beispiel des Unternehmens ASTA Medica AG)“

seit Dezember 1999 Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Berufstätigkeit:

seit 01.04.92 als Angestellte bei der Firma VIATRIS GmbH Co. KG (ehemalig ASTA Medica AG) tätig

1992 – 1996 Technische Angestellte in der Gruppe Analytische Biochemie der Abteilung Biologische Forschung Biochemie

1996 – 1997 Laborleiterin der Gruppe Analytische Biochemie in der Abteilung Biologische Forschung Biochemie

1997 – 2001 Laborleiterin in der Gruppe Radiokinetik (ADME Studien am Tier) in der Abteilung Biologische Forschung Biochemie

seit 2001 Laborleiterin (Pharmakokinetik) in der Gruppe Bioanalytics & Pharmacokinetics der Abteilung Early Phase Development