

**Zur Bedeutung der Biotransformation für die Wirkung von Dihydrocodein beim  
Menschen**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

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

**von  
Helmut Schmidt  
aus Darmstadt**

**Frankfurt am Main  
2002  
(D F 1)**

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

Dekan: Prof. Dr. W. E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. U. Fuhr  
Prof. Dr. T. Dingermann

Datum der Disputation: 10. September 2002

---

**INHALTSVERZEICHNIS**


---

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>3</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 OPIATE UND OPIOIDE.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Historischer Überblick.....	8
1.1.2 Opioid-Rezeptoren und Liganden.....	9
1.1.3 Gewebe für Ligandenbindungsversuche - SH-SY5Y-Zelllinie .....	10
1.1.4 Wirkungsmechanismus der Opioid-Rezeptorliganden .....	12
<b>1.2 CHARAKTERISIERUNG VON DIHYDROCODEIN.....</b>	<b>13</b>
1.2.1 CYP2D6-Polymorphismus.....	13
1.2.2 Pharmakokinetische Eigenschaften beim Menschen.....	14
1.2.3 Pharmakodynamische Parameter zur Messung von Opioid-Wirkungen beim Menschen ...	15
1.2.3.1 Pupillometrie .....	15
1.2.3.2 Schmerzmodelle.....	16
<b>1.3 ZIELSETZUNG.....</b>	<b>17</b>
<b>2 METHODEN.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 RADIOREZEPTORASSAY AN HIRNMEMBRANPRÄPARATIONEN.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 Hirnmembranpräparationen.....	18
2.1.2 Rezeptorbindungsversuche.....	19
2.1.2.1 Allgemeine Durchführung.....	19
2.1.2.2 Sättigungsexperimente .....	20
2.1.2.3 Konkurrenzexperimente.....	21
2.1.2.4 Proteinbestimmung .....	21
<b>2.2 RADIOREZEPTORASSAY AN AUSDIFFERENZIIERTEN SH-SY5Y-ZELLEN.....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Zellkultur und Ausdifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen.....	22
2.2.2 Rezeptorbindungsversuche.....	22
2.2.2.1 Allgemeine Durchführung.....	22
2.2.2.2 Sättigungsexperimente .....	24
2.2.2.3 Konkurrenzexperimente.....	24
2.2.2.4 Proteinbestimmung .....	25
<b>2.3 cAMP-AKKUMULATIONSSASSAY .....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Zellkultur und Ausdifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen.....	25
2.3.2 cAMP-Akkumulationsversuche .....	25

2.3.2.1	<i>Durchführung der Forskolin stimulierten cAMP-Akkumulation</i> .....	26
2.3.2.2	<i>Proteinbestimmung</i> .....	27
2.4	<b>CHEMISCHE DETEKTIONSMETHODE (HPLC)</b> .....	27
2.5	<b>VERWENDETE CHEMIKALIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE</b> .....	28
2.5.1	<b>Chemikalien</b> .....	28
2.5.1.1	<i>Prüf- und Kontrollsubstanzen aller Untersuchungen</i> .....	28
2.5.1.2	<i>Radiorezeptorassay an Hirnmembranpräparationen</i> .....	29
2.5.1.3	<i>Zellkultur, Passagierung und Ausdifferenzierung</i> .....	29
2.5.1.4	<i>Radiorezeptorassay an ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen</i> .....	30
2.5.1.5	<i>cAMP-Akkumulationsassay</i> .....	31
2.5.1.6	<i>Proteinbestimmung</i> .....	31
2.5.2	<b>Materialien</b> .....	31
2.5.2.1	<i>Radiorezeptorassay an Hirnmembranpräparationen bzw. an ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen</i> .....	31
2.5.2.2	<i>cAMP-Akkumulationsassay</i> .....	32
2.5.2.3	<i>Proteinbestimmung</i> .....	32
2.5.3	<b>Geräte</b> .....	32
2.6	<b>DURCHFÜHRUNG DER DIHYDROCODEIN-STUDIE AN GESUNDEN PROBANDEN</b> .....	33
2.6.1	<b>Studienziel</b> .....	34
2.6.2	<b>Studiendesign</b> .....	34
2.6.3	<b>Probandenkollektiv</b> .....	34
2.6.4	<b>Studienablauf</b> .....	35
2.6.5	<b>Behandlung der biologischen Proben</b> .....	37
2.6.5.1	<i>Blutentnahmen</i> .....	37
2.6.5.2	<i>Urinsammlung</i> .....	37
2.6.6	<b>Messungen mittels Pupillometrie</b> .....	37
2.6.7	<b>Messungen mittels Schmerzmodell</b> .....	39
2.7	<b>AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE</b> .....	40
2.7.1	<b>Allgemeine Grundlagen zur Auswertung der Rezeptorbindungsexperimente</b> .....	40
2.7.1.1	<i>Sättigungsexperimente - Bestimmung von <math>K_D</math> und <math>B_{max}</math> durch nichtlineare Regression</i> .....	40
2.7.1.2	<i>Sättigungsexperimente - Bestimmung von <math>K_D</math> und <math>B_{max}</math> durch lineare Regression (Scatchard Plot)</i> ...	41
2.7.1.3	<i>Kompetitionsexperimente - Bestimmung von <math>K_i</math> durch nichtlineare Regression</i> .....	42
2.7.1.4	<i>Kompetitionsexperimente - Bestimmung von <math>K_D</math> durch nichtlineare Regression</i> .....	43
2.7.2	<b>Auswertung und Darstellung der Rezeptorbindungsexperimente</b> .....	44
2.7.2.1	<i>Sättigungsexperimente</i> .....	45
2.7.2.2	<i>Kompetitionsexperimente</i> .....	45
2.7.3	<b>Auswertung und Darstellung der cAMP-Akkumulationsexperimente</b> .....	46
2.7.4	<b>Auswertung und Darstellung der Probandenstudie</b> .....	47
2.7.4.1	<i>Pharmakokinetische Parameter von DHC und seinen Metaboliten in Plasma und Urin</i> .....	47
2.7.4.2	<i>Pupillometrie</i> .....	47
2.7.4.3	<i>Schmerzmodell</i> .....	48
3	<b>ERGEBNISSE</b> .....	49
3.1	<b>RADIOREZEPTORASSAY AN HIRNMEMBRANPRÄPARATIONEN</b> .....	49

3.1.1	Bestimmung von $K_D$ und $B_{max}$ .....	49
3.1.2	Bestimmung von $K_i$ .....	50
3.2	<b>RADIOREZEPTORASSAY AN INTAKTEN UND AUSDIFFERENZIIERTEN SH-SY5Y-ZELLEN</b> .....	52
3.2.1	Bestimmung von $K_D$ und $B_{max}$ .....	52
3.2.2	Bestimmung von $K_i$ .....	53
3.3	<b>cAMP-AKKUMULATIONSASSAY</b> .....	55
3.4	<b>PROBANDENSTUDIE</b> .....	56
3.4.1	Pharmakokinetische Parameter von DHC und seinen Metaboliten in Plasma und Urin .....	56
3.4.2	Pupillometrie.....	57
3.4.3	Schmerzmodell.....	58
4	<b>DISKUSSION</b> .....	59
4.1	<b>AFFINITÄTSPROFILE VON DIHYDROCODEIN UND SEINEN METABOLITEN AN <math>\mu</math>-, <math>\delta</math>- UND <math>\kappa</math>-OPIOID-REZEPTOREN VON HIRNMEMBRANPRÄPARATIONEN</b> .....	59
4.2	<b>AFFINITÄTSPROFILE VON DIHYDROCODEIN UND SEINEN METABOLITEN AN OPIOID-REZEPTOREN VON HUMANEN NEUROBLASTOMZELLEN</b> .....	62
4.3	<b>AKTIVITÄTSPROFILE VON DIHYDROCODEIN UND SEINEN METABOLITEN IN HUMANEN NEUROBLASTOMZELLEN</b> .....	64
4.4	<b>PHARMAKOKINETISCHE UND PHARMAKODYNAMISCHE PARAMETER VON DIHYDROCODEIN UND SEINEN METABOLITEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES CYP2D6-PHÄNOTYPS</b> .....	66
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	70
6	<b>TABELLEN</b> .....	72
7	<b>ABBILDUNGEN</b> .....	87
8	<b>LITERATUR</b> .....	122
	Danksagung .....	131
	Lebenslauf.....	133

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**


---

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen, nur einmal im Text vorkommende und dort erklärte Abkürzungen werden hier nicht aufgeführt.

A	Stromstärke (Ampere)
Ae	(im Urin) ausgeschiedene Menge (amount excreted)
AUC bzw. AUC <sub>0-∞</sub>	Fläche unter der Konzentrations - Zeit - Kurve (bis unendlich extrapoliert)
C <sub>max</sub>	höchste Plasmakonzentration im Messzeitraum
CYP + Ziffer/ Buchstabe/Ziffer	Bezeichnung einer Cytochrom P450 - Isoform nach Zugehörigkeit zu Familie und Subfamilie [1]
DHC	Dihydrocodein
DHM	Dihydromorphin
EKG	Elektrokardiogramm
EM	schnelle Metabolisierer (extensive metabolizer) für CYP2D6
h	Stunde
ID	ursprünglicher Pupillendurchmesser (initial diameter)
k (Präfix)	kilo (10 <sup>3</sup> )
l	Liter
μ (Präfix)	mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	Meter, männlich („m“ wird im Text für beide Begriffe verwendet)
m (Präfix)	milli (10 <sup>-3</sup> )
MIN	minimaler Pupillendurchmesser nach der Stimulation (minimal diameter after stimulation)
mol	Mol (Mengenangabe)
n (Präfix)	nano (10 <sup>-9</sup> )
PM	langsame Metabolisierer (poor metabolizer) für CYP2D6
RA	Reflexamplitude (reflex amplitude, Differenz zwischen ursprünglichem und minimalem Pupillendurchmesser)
RD	Pupillendurchmesser 3 Sekunden nach der Stimulation (redilated diameter)

RRA	Radiorezeptorassay
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean)
$t_{1/2}$	(terminale) Eliminationshalbwertszeit
$t_{\max}$	Zeit bis zum Erreichen von $C_{\max}$
TTM	Zeit bis zum Erreichen des Pupillendurchmesserminimums (time to minimum)
UE	Unerwünschtes Ereignis
w	weiblich

---

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 OPIATE UND OPIOIDE

Der Begriff „Opiate“ umfasst sowohl die aus Opium isolierten Substanzen als auch deren halbsynthetisch abgewandelten Derivate. Die Bezeichnung „Opioid“ hingegen ist spezifisch für alle Agonisten und Antagonisten und alle natürlich vorkommenden oder synthetischen Peptide mit morphinähnlichen Wirkungen.

### 1.1.1 Historischer Überblick

Obwohl die psychologischen Effekte von Opium bereits den alten Sumerern bekannt gewesen sein könnten, finden sich die ersten zweifelsfreien Hinweise auf Mohnsaft in den Schriften des Theophrastus im dritten Jahrhundert vor Christi. Der altgriechische Philosoph Heraklit nutzte Opium als schmerzstillendes Mittel und zur Behandlung von Cholera und Husten. Vor dieser Zeit verwandte der altgriechische Arzt Hippokrates (420 v. Chr.) Opium als Narkosemittel in Form eines Weines. Das Wort „Opium“ an sich leitet sich vom griechischen Namen für „Saft“ ab und ist der an der Luft eingetrocknete Milchsaft unreifer Samenkapseln von *Papaver somniferum* (Schlafmohn). Die arabischen Ärzte waren im Umgang mit Opium sehr beschlagen. Arabische Händler machten das Opium im Orient bekannt, wo es hauptsächlich zur Behandlung von Durchfällen eingesetzt wurde. Im Mittelalter wurde Opium zur Herstellung des Theriakts verwendet. Paracelsus (1493-1541) ist es zu verdanken, dass das Arzneimittel, das aufgrund seiner Giftigkeit in Ungnade gefallen war, wieder eingeführt wurde. Zur Mitte des 16. Jahrhunderts waren viele seiner Indikationen akzeptiert. 1664 erfand der englische Arzt Thomas Sydenham die Tinctura Opii crocata, 1803 isolierte der Pariser Apotheker Derosne aus dem Opium ein Kristallgemisch, das wahrscheinlich aus Morphin und Noscapin bestand.

Opium enthält mehr als 20 verschiedene Alkaloide, deren Gehalt sehr stark schwanken kann. 1803-1805 gelang dem Paderborner Apotheker Sertürner (1783-1841) mit der Analyse eines Opiumextraktes ein epochaler Durchbruch, dessen therapiehistorische Konsequenzen bis



heute nachwirken. Erst 1817 benannte er die von ihm isolierte Substanz „Morphin“, dessen Name er von dem griechischen Gott des Schlafes, Morpheus, ableitete. In der Pharmacopoea Borussica ed. IV (1827) ist das Morphin zum ersten Male aufgeführt. Die Entdeckung weiterer Alkaloide aus Opium folgte der des Morphins (Codein 1832 durch Pierre Jean Robiquet (1780-1840), Papaverin 1848 durch Georg Merck (1825-1873)). Weitere wichtige Nebenalkaloide im Opium sind Narcotin (Noscapin), Thebain und Narcein. Zur Mitte des 19. Jahrhunderts war in der Medizin der Einsatz reiner Alkaloide verbreiteter als der des rohen Opiums.

Die Suchtproblematik der Opioide beschleunigte die Suche nach potenten, aber nicht süchtig machenden Analgetika. Kurz vor, aber auch in den Jahren nach dem 2. Weltkrieg wurden synthetische Präparate mit typischen morphinähnlichen Wirkungen wie z. B. Meperidin (Pethidin) und Methadon in die klinische Medizin eingeführt. Nalorphin, ein Morphinabkömmling, war eine Ausnahme. Auf der einen Seite antagonisierte Nalorphin in niedrigen Dosen die Wirkung von Morphin und wurde deswegen in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts zur Bekämpfung von Morphinvergiftungen eingesetzt. Auf der anderen Seite hingegen besaß Nalorphin in hohen Dosen analgetische Wirksamkeit. Dieses ungewöhnliche pharmakologische Profil von Nalorphin leitete die Entwicklung von neuen Arzneimitteln ein, so z. B. der relativ reine Antagonist Naloxon und Wirkstoffe mit kombinierten Wirkungen (Pentazocin, Butorphanol und Buprenorphin).

### 1.1.2 Opioid-Rezeptoren und Liganden

Die komplexen Wechselwirkungen des Morphins und der kombinierten Agonisten-Antagonisten (Nalorphin) führten zu der Annahme, dass verschiedene Klassen von Opioid-Rezeptoren existieren könnten. Martin [2] postulierte schließlich einen Morphin- (M-) und einen Nalorphin- (N-) Rezeptor. Der M-Rezeptor entspricht heute dem  $\mu$ -Opioid-Rezeptor [3], für den mittlerweile 3 Subtypen vorgeschlagen wurden:  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  und  $\mu_3$ . Die unterschiedlichen Aktivitäten von Morphin und den endogenen Opioid-Peptiden am *vas deferens* von Mäusen führten zu der Charakterisierung der  $\delta$ -Opioid-Rezeptoren. Hier wurden mittlerweile 2 Subtypen identifiziert:  $\delta_1$  und  $\delta_2$ . Die verschiedenen Reaktionen von Benzomorphanen führten zur Postulierung und Charakterisierung der  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren, von denen mittlerweile 3 Subtypen abgeleitet wurden:  $\kappa_1$ ,  $\kappa_2$  und  $\kappa_3$ . Erst 1991 zeigten Paul *et*

*al.* [4], dass die Nalorphin-Analgesie hauptsächlich durch  $\kappa_3$ -Rezeptoren vermittelt wird, und dieser  $\kappa_3$ -Rezeptor somit dem N-Rezeptor von Martin [2] entsprach. Neben diesen 3 Hauptklassen  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\kappa$  werden noch weitere Klassen wie  $\epsilon$ ,  $\lambda$ ,  $\iota$ ,  $\zeta$  und  $\sigma$  diskutiert. Letztere sind keine Opioid-Rezeptoren im engeren Sinne, da die durch  $\sigma$ -Rezeptoren vermittelten Effekte nicht durch Opioid-Antagonisten umkehrbar sind.

Um zwischen den einzelnen Opioid-Rezeptoren unterscheiden zu können, war es notwendig, spezifische Liganden zu entwickeln. Der erste hochspezifische und noch heute am meisten verwandte Ligand für den  $\mu$ -OR ist das Enkephalin-Analogon DAMGO (DAGO, Tyr-D-Ala-Gly-N-Methyl-Phe-Glyol, D-Ala<sup>2</sup>-MePhe<sup>4</sup>-Glyol<sup>5</sup>-Enkephalin) [5]. Daneben werden noch Morphiceptin [6] und sein Analogon PL017 [7] verwendet. Alle 3 Substanzen weisen wenigstens eine 100-fache  $\mu$ -Selektivität gegenüber den anderen Subtypen auf. 1981 isolierten Broccardo *et al.* [8] aus Froschhäuten eine neue Klasse von  $\mu$ -selektiven Opioid-Peptiden, die als Dermorphine bezeichnet werden. An den  $\delta$ -Opioid-Rezeptoren zeigten 2 Enkephalin-Analoga mit D-Penicillamin an Position 2 und D- oder L-Penicillamin an Position 5 hohe Selektivität: DPDPE (D-Pen<sup>2</sup>-D-Pen<sup>5</sup>-Enkephalin) [9] und DPLPE (D-Pen<sup>2</sup>-L-Pen<sup>5</sup>-Enkephalin) [10]. Daneben werden noch DSLET (Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr) und sein *O*-tert.-Butyl-Analogon DSBuLET verwendet [11, 12]. Erspamer *et al.* [13] schließlich isolierten aus Froschhäuten mehrere  $\delta$ -selektive Enkephalin-Analoga, die unter der Bezeichnung Deltorphine zusammengefasst wurden. Selektive  $\kappa$ -Liganden wurden ebenfalls synthetisiert. Dazu zählen die Nichtpeptid-Verbindungen U50,488H, U69,593 [14, 15] und PD 117302 [16], des Weiteren verschiedene Derivate des Dynorphin A: DAKLI [17] und D-Pro<sup>10</sup>-Dynorphin 1-11 [18].

### 1.1.3 Gewebe für Ligandenbindungsversuche - SH-SY5Y-Zelllinie

Für die Ermittlung von Affinitätsprofilen an pharmakologischen Rezeptoren als ersten Hinweis auf den Wirkungsmechanismus der zu untersuchenden Substanzen gibt es prinzipiell zwei Vorgehensweisen. Zum einen kann man ein Gewebe mit (annähernd) nur einem Rezeptorsubtyp auswählen. Dann genügt ein hochaffiner, nicht selektiver Ligand, der kompetitiv durch die Prüfsubstanzen verdrängt werden kann. Zum anderen kann man ein Gewebe mit mehreren Rezeptorsubtypen verwenden. Dann benötigt man allerdings für jeden

zu messenden Subtyp einen hochaffinen, selektiven Liganden, der ebenfalls kompetitiv durch die zu untersuchenden Verbindungen verdrängt werden kann. Da Gewebe mit nur einem Rezeptorsubtyp nicht oder nur selten zur Verfügung stehen, ist es unumgänglich, selektive Liganden einzusetzen, sofern man Affinitäten der zu untersuchenden Verbindungen an nur einem Rezeptorsubtyp bestimmen möchte.

Erst durch die Entwicklung selektiver Liganden (siehe Kapitel 1.1.2) war es somit möglich, Affinitäten von Opioiden an den einzelnen Rezeptorsubtypen zu bestimmen. Hierzu wurden die unterschiedlichsten Gewebe wie Gehirn- und Rückenmarkpräparationen (z. B. von der Ratte, vom Schwein oder vom Meerschweinchen), periphere Gewebe (z. B. Mäuse-*vas deferens*, Meerschweinchen-Ileum) und abgetrennte Zellen bzw. Zellpräparationen (klassische Zellen, klonierte Zellen, genetisch modifizierte Zellen) verwendet. Zu den klonierten Zellen zählt der von Ross *et al.* [19] aus der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH dreifach selektierte Subklon SH-SY5Y.

SH-SY5Y-Zellen haben kleine, runde Zellkörper, wenig Zytoplasma und Neurit-ähnliche zytoplasmatische Fortsätze. In Kultur aggregieren sie zu dichten Zellanhäufungen (Pseudoganglien). Die Ausdifferenzierung zu reifen Neuronen mit Vitamin-A-Säure (Tretinoin, all-trans-Retinsäure) [20] ist mit einer Reihe von morphologischen und biochemischen Veränderungen verbunden. Hierzu zählen die Zunahme an Opioid-Bindungsstellen [21, 22] sowie die verstärkte Hemmung der Adenylatcyclase durch Opioide und damit die reduzierte Bildung von cAMP nach Stimulation mit Forskolin [23]. Forskolin ist in der Lage, die Adenylatcyclase sowohl in Membranpräparationen als auch in intakten Zellen schnell, reversibel und potent zum einen durch direkten Angriff am Enzymkomplex und zum anderen durch Verstärkung der durch Hormone bzw. Guaninnukleotide modulierten Enzymaktivität zu aktivieren [24]. Die Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Vitamin-A-Säure für die Dauer von 6 Tagen führt zu einer deutlichen Zunahme der Opioid-Rezeptorbindung. Cheng *et al.* [22] ermittelten eine mit [ $^3\text{H}$ ]-Diprenorphin gemessene Steigerung der Gesamtbindung von über 100%. Diese Steigerung der Gesamtbindung verteilt sich jedoch unterschiedlich auf die einzelnen Subtypen. Die  $\mu$ -Opioid-Rezeptorbindung nahm etwa um 90%, die  $\delta$ -Opioid-Rezeptorbindung etwa um 140% und die  $\kappa_3$ -Opioid-Rezeptorbindung sogar etwa um 200% zu.

SH-SY5Y-Zellen exprimieren  $\mu$ -,  $\delta$ - [23, 25, 26] und  $\kappa_3$ -Opioid-Rezeptoren [22]. Die Entdeckung der  $\kappa_3$ -Rezeptoren brachte die bis dato geltende Auffassung über die Verteilung

der Rezeptoren in den SH-SY5Y-Zellen ( $\mu$ : $\delta$  ungefähr 5:1) [26, 27] und der damit verbundenen Bewertung der SH-SY5Y-Zelllinie als Modell zur Erforschung von vorwiegend  $\mu$ -OR vermittelten Effekten zumindest bei hohen Agonist-Konzentrationen zu Fall. Cheng *et al.* [22] konnten vielmehr zeigen, dass in undifferenzierten Zellen nur etwa 60% der gesamten Opioid-Bindung der Bindung an  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptoren entsprechen, während die restlichen etwa 40% die Bindung an  $\kappa_3$ -Rezeptoren darstellen (gemessen mit dem unselektiven Antagonisten [ $^3$ H]Diprenorphin). In den 6 Tage lang mit 10  $\mu\text{mol/l}$  Vitamin-A-Säure ausdifferenzierten Zellen nimmt der Anteil der Bindung an  $\kappa_3$ -Rezeptoren sogar noch zu. Er beträgt hier wenigstens 50% der gesamten Opioid-Bindung.

#### 1.1.4 Wirkungsmechanismus der Opioid-Rezeptorliganden

Opioid-Rezeptoren sind im Zentralnervensystem und in der Peripherie weit verbreitet und greifen in die Kontrolle von zahlreichen physiologischen Systemen ein. Sie gehören zu den membranständigen Klasse-2- oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Typisches Strukturmerkmal sind die sieben helikalen transmembranären Domänen sowie je 3 extra- und intrazelluläre Schleifen. Opioid-Rezeptoren werden hauptsächlich in 3 Klassen eingeteilt, die mit  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\kappa$  bezeichnet werden (siehe auch Kapitel 1.1.2). Durch Reaktion eines Agonisten mit einem Opioid-Rezeptor kann es zu einer G-Protein-vermittelten direkten Beeinflussung eines Ionenkanals (z. B.  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) oder durch Interaktion mit einem Enzym zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung oder Hemmung verschiedener second messenger kommen. Eines der wichtigsten, durch G-Proteine beeinflussbaren Enzyme ist die Adenylatcyclase, deren Stimulation die Bildung des second messenger cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) aus ATP (Adenosintriphosphat) bewirkt. Der second messenger löst dann Folgereaktionen aus, z. B. die Aktivierung von Proteinkinasen und damit die Phosphorylierung von Proteinen sowie die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Letztere sind für die Regulation zahlreicher zellulärer Funktionen von zentraler Bedeutung. Im weiteren Verlauf der Signaltransduktion innerhalb der Zelle aktiviert cAMP Proteinkinasen, mit deren Hilfe Proteine (meist Enzyme oder Membranproteine) phosphoryliert werden. Die spezifische Zellantwort hängt letztendlich von der Art des phosphorylierten Proteins ab, das wiederum durch die jeweilige in der Zielzelle vorhandene Proteinkinase bestimmt wird und reicht von Änderungen des Fett-, Protein- und Glucosestoffwechsels über Zellteilungs- und

differenzierungsprozesse bis hin zu Sekretionsvorgängen, Permeabilitätsänderungen und Muskelkontraktionen. Der Abbau bzw. die Hydrolyse von cAMP zu 5'-AMP (5'-Adenosinmonophosphat) wird durch verschiedene Phosphodiesterasen (PDE) katalysiert. Eine Hemmung dieser Phosphodiesterasen führt zur Akkumulation von cAMP innerhalb der Zelle und damit zu einer Verlängerung des Hormoneffektes. Eine wichtige Substanz, die *in vitro* unselektiv Phosphodiesterasen hemmt, ist IBMX (1-Methyl-3-isobutylxanthin).

Die meisten zur Schmerzbehandlung verwendeten Opioide binden relativ selektiv an  $\mu$ -Rezeptoren. Weitere Effekte einer  $\mu$ -Rezeptoraktivierung sind Atemdepression, Miosis, reduzierte Motilität des Gastrointestinaltraktes, Sedation und Euphorie. Selektive  $\kappa$ -Agonisten bewirken dagegen Dysphorie. Die Auswirkungen einer  $\delta$ -Opioid-Rezeptorstimulation sind noch nicht vollständig geklärt. Morphin und verwandte Opioid-Agonisten sind wertvolle Arzneistoffe, besitzen aufgrund ihrer euphorisierenden Wirkung jedoch ein Missbrauchspotential.

## 1.2 CHARAKTERISIERUNG VON DIHYDROCODEIN

Dihydrocodein (4,5 $\alpha$ -Epoxy-3-methoxy-*N*-methyl-6 $\alpha$ -morphinanol (IUPAC)) ist ein halbsynthetisches Opiat mit agonistischer Wirkung an Opioid-Rezeptoren. Medizinisch wird es als Analgetikum und Antitussivum sowie zur Substitutionsbehandlung Heroinabhängiger eingesetzt. Es wurde 1912 unter der Handelsbezeichnung „Paracodin“ eingeführt.

### 1.2.1 CYP2D6-Polymorphismus

Schon lange ist bekannt, dass sowohl einzelne Patienten als auch bestimmte Bevölkerungsgruppen anders als der Rest der Bevölkerung auf bestimmte Arzneimittel reagieren. Neuere Untersuchungen zeigen, dass diese unerwarteten Arzneimittelwirkungen häufig erblich bedingt und oft auf pharmakogenetische Polymorphismen fremdstoff-metabolisierender Enzyme zurückzuführen sind, d. h. auf von Patient zu Patient unterschiedliche DNA-Sequenzen an der gleichen Stelle der jeweiligen genetischen Information (Genotypen). Daraus können wiederum mehrere Phänotypen resultieren. Ein

Phänotyp ist eine erkennbare Expression eines Genotyps und zeigt sich z. B. im Unterschied von langsamen und schnellen Metabolisierern (siehe unten). Die therapeutischen Konsequenzen aus diesem Polymorphismus können vielfältig sein und hängen u. a. von der therapeutischen Breite, der Bildung aktiver Metaboliten und der Beteiligung des betroffenen Enzyms am Gesamtstoffwechsel der Prüfsubstanz ab. Auf der einen Seite kann beispielsweise der genetische Defekt zu einer Kumulation der Ausgangssubstanz und damit bei langsamen Metabolisierern zu vermehrten unerwünschten Ereignissen führen. Auf der anderen Seite hingegen kann der genetische Defekt bei langsamen Metabolisierern zu einer Wirkungsverminderung bis hin zu vollständigem Therapieversagen führen, sofern die eigentlich wirksame Substanz erst aus einem Prodrug durch das betroffene Enzym gebildet wird.

Das Enzym Cytochrom P450 2D6 (kurz CYP2D6) ist an der Biotransformation von mehr als 40 Arzneistoffen beteiligt. Dazu zählen einige  $\beta$ -Adrenozeptorenblocker, Antiarrhythmika, Antidepressiva, Neuroleptika und Opioide. Etwa 5-10% der weißen Bevölkerung (auch als Kaukasier bezeichnet) sind vom CYP2D6-Polymorphismus betroffen, weisen daher kein funktionelles CYP2D6-Enzym auf und sind deshalb nicht in der Lage, die durch dieses Enzym katalysierten Biotransformationsschritte auszuführen [28, 29]. Sie werden deshalb auch als langsame Metabolisierer (PM) im Gegensatz zu den schnellen Metabolisierern (EM) für CYP2D6-Substrate bezeichnet. Dieses Enzym katalysiert u. a. die *O*-Demethylierung von Codein bzw. Dihydrocodein zu Morphin [30, 31] bzw. Dihydromorphin [32]. Da die 3-*O*-dealkylierten Metaboliten üblicherweise eine höhere Affinität zum  $\mu$ -OR besitzen [33], wird vermutet, dass im Falle von Codein und Dihydrocodein die 3-*O*-demethylierten Metaboliten zur Wirkung der Muttersubstanzen beitragen, auch wenn sie nur in geringen Mengen gebildet werden. In PM sind daher möglicherweise die pharmakologischen Effekte nach Gabe von Codein bzw. Dihydrocodein schwächer ausgeprägt als in EM.

### 1.2.2 Pharmakokinetische Eigenschaften beim Menschen

Zur Pharmakokinetik von Dihydrocodein nach Gabe einer oralen Einzeldosis existieren nur wenige Publikationen. Berücksichtigt man darüber hinaus noch den CYP2D6-Polymorphismus und die Gabe einer oralen Einzeldosis ohne verzögerte Wirkstofffreisetzung,

so reduziert sich die Anzahl der verfügbaren Arbeiten auf eine einzige. In dieser Arbeit ermittelten Fromm *et al.* [32] pharmakokinetische Daten von DHC und seinen wichtigsten Metaboliten in jeweils 6 EM und PM nach Gabe einer oralen Einzeldosis von 60 mg Dihydrocodeinhydrogentartrat (entsprechend 40,1 mg DHC-Base). So bestimmte die Arbeitsgruppe für DHC vergleichbare Werte für pharmakokinetische Parameter in EM und PM (AUC  $3896 \pm 1089$  bzw.  $4350 \pm 1682$  nmol·h/l,  $C_{\max}$   $643 \pm 168$  bzw.  $722 \pm 208$  nmol/l,  $t_{\max}$   $1,2 \pm 0,8$  bzw.  $1,3 \pm 0,9$  h,  $t_{1/2}$  4,4 bzw. 5,0 h in EM bzw. PM). Für DHM hingegen waren die Werte für AUC und  $C_{\max}$  signifikant unterschiedlich in EM und PM (AUC  $76 \pm 43$  bzw.  $10 \pm 6$  nmol·h/l,  $C_{\max}$   $12 \pm 7$  bzw.  $1,4 \pm 0,7$  nmol/l,  $t_{\max}$   $1,0 \pm 0,4$  bzw.  $1,3 \pm 0,7$  h,  $t_{1/2}$  8,1 bzw. 9,2 h in EM bzw. PM). Aufgrund des CYP2D6-Polymorphismus sollten diese Unterschiede zwischen EM und PM auch im Metabolitenmuster zu beobachten sein (Abbildung 1). Tatsächlich waren die Wiederfindungsraten von DHM und seinen Konjugaten in Urin 8,9% der applizierten Dosis in EM und nur etwa 1,3% in PM. Ansonsten waren die Wiederfindungsraten für DHC und die weiteren Metaboliten annähernd gleich (Abbildung 2). Aus diesen Ergebnissen formulierte die Arbeitsgruppe folgende Schlussfolgerungen: DHC wird umfangreich biotransformiert und nur zu etwa 30% unverändert ausgeschieden. Der wichtigste Metabolit ist das DHC6G mit einer Wiederfindungsrate in Urin von etwa 30%. DHM und seine Konjugate sind Metaboliten von DHC, für deren Bildung CYP2D6 von herausragender Bedeutung ist.

### **1.2.3 Pharmakodynamische Parameter zur Messung von Opioid-Wirkungen beim Menschen**

#### ***1.2.3.1 Pupillometrie***

Da der Pupillenlichtreflex vom sympathischen und parasympathischen System gesteuert wird [34], können Einflüsse von Pharmaka auf das autonome Nervensystem zu einer Veränderung der Pupillenmotorik führen. Diese pharmakologische Beeinflussung der Pupillenmuskulatur lässt sich prinzipiell durch zwei Phänomene beurteilen: Die Pupillenerweiterung (Mydriasis) ist als Folge eines überwiegend adrenergen bzw. sympathikotonen Effektes, die

Pupillenverengung (Miosis) als Folge eines cholinergen oder vagotonen Effektes einer aktiven Substanz anzusehen. Während Opioide in Affen, Mäusen und Ratten eine Mydriasis bewirken, tritt beim Menschen und anderen Spezies eine Miosis auf. Als Wirkorte der Opioide werden beim Menschen im wesentlichen Opioid-Rezeptoren im Westfahl-Edinger-Kern des Mesenzephalon sowie weitere Rezeptoren in der Iris diskutiert. Die durch Opioide erzeugte Miosis ist eine spezifische Opioid-Wirkung, da sie durch Naloxon antagonisiert werden kann [35].

Die Veränderungen des Pupillendurchmessers lassen sich mit der dynamischen lichtevozierten Pupillometrie [36, 37] bestimmen. Hierbei wird mit einem Pupillometer unter konstanten Lichtverhältnissen der Pupillendurchmesser nach Stimulation mit einem Lichtimpuls über eine Messdauer von wenigen Sekunden gemessen. Die so erhaltenen Pupillendurchmesser-Zeit-Diagramme werden simultan aufgezeichnet und können später ausgewertet werden.

Zur Pharmakodynamik von Dihydrocodein mittels Pupillometrie existiert nur eine Arbeit von Freye *et al.* [38]. In dieser Arbeit erhielten die 12 Versuchspersonen in 3 Prüfphasen jeweils Placebo, 60 und 120 mg Dihydrocodeinhydrogentartrat mit verzögerter Wirkstofffreisetzung. Vor Gabe der jeweiligen Prüfmedikation und 120 min danach bestimmten sie den Pupillendurchmesser über eine Zeitspanne von 3 s mit dem monokularen Pupillometer Pupilsan<sup>®</sup> der Firma Fairville Medical Optics, England. Dabei ermittelten sie eine signifikante Abnahme des Pupillenlichtreflexes nach Applikation der beiden DHC-Dosen im Vergleich zu Placebo. Zwischen den beiden DHC-Dosen hingegen ergab sich bezüglich des Pupillenlichtreflexes kein signifikanter Unterschied.

### ***1.2.3.2 Schmerzmodelle***

Die wesentliche Wirkkomponente der Opioide ist die Schmerzunterdrückung. Um diesen pharmakodynamischen Effekt bestimmen zu können, sind verschiedene Modelle entwickelt worden. Zu diesen zählen die Schmerzschwellenmodelle, bei denen sowohl subjektive als auch objektive Parameter durch ein System zur Stimulation, Ableitung, Darstellung, Auswertung und Registrierung von elektrophysiologischen Potentialen bestimmt werden [39, 40]. Hierbei wird den Versuchspersonen durch geringe Stromstärken Schmerzen zugefügt, deren Stärke sie anhand einer visuellen Analog-Skala (VAS) subjektiv bewerten sollen.



Gleichzeitig wird als objektiver Parameter die elektromyographische Antwort des R-III-Reflexes ermittelt.

Zur Pharmakodynamik von Dihydrocodein mittels Schmerzschwellenmodell (Messung des R-III-Reflexes) existiert keine Arbeit.

### 1.3 ZIELSETZUNG

Zur Klärung der Bedeutung von DHM und seiner sekundären Metaboliten sowie des für seine Bildung wesentlichen Enzyms CYP2D6 für die Wirkung von DHC wurden für die vorliegende Arbeit folgende Ziele festgelegt:

1. Die Erstellung eines Affinitätsprofils von Dihydrocodein und seinen Metaboliten an  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren von Hirnmembranpräparationen mit Hilfe von subtypselektiven Radiorezeptorassays.
2. Die Erstellung eines Affinitätsprofils von Dihydrocodein und seinen Metaboliten an intakten und ausdifferenzierten humanen Neuroblastomzellen SH-SY5Y mit Hilfe von subtypunselektiven Radiorezeptorassays.
3. Die Erstellung eines Aktivitätsprofils von Dihydrocodein und seinen Metaboliten in intakten, adhären und ausdifferenzierten humanen Neuroblastomzellen SH-SY5Y mit Hilfe von Forskolin stimulierter cAMP-Akkumulation.
4. Die Bestimmung von pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern (und deren Zusammenhang) von Dihydrocodein und seinen Metaboliten beim gesunden Menschen unter Berücksichtigung des CYP2D6-Phänotyps mit Hilfe einer Probandenstudie.

Die Ergebnisse der Affinitäts- und Aktivitätsversuche sollen mit publizierten Daten verglichen werden. Ferner sollen diese *in vitro*-Ergebnisse mit den Ergebnissen der Probandenstudie in Zusammenhang gebracht werden.

---

## 2 METHODEN

---

### 2.1 RADIOREZEPTORASSAY AN HIRNMEMBRANPRÄPARATIONEN

Der Radiorezeptorassay (RRA) diente zur Erstellung eines Affinitätsprofils von Dihydrocodein und seinen Metaboliten an  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren von Hirnmembranpräparationen.

#### 2.1.1 Hirnmembranpräparationen

Für den RRA wurden Gehirne von Pirbright-white Meerschweinchen verwendet.

Puffer A: 10 mmol/l Tris, 290 mmol/l Saccharose, pH 7,4

Puffer B: 50 mmol/l Tris, pH 7,4

Die Meerschweinchen (450-550 g Körpergewicht) wurden mit Hilfe einer Handguillotine enthauptet, die Gehirne entnommen, gewogen und in eiskaltem Puffer A aufgenommen (je g Gehirn 10 ml Puffer) oder unmittelbar in flüssigem Stickstoff und anschließender Lagerung bei -80 °C bis zur Verarbeitung innerhalb eines Tages tiefgefroren. Der Zeitraum zwischen dem Tod der Tiere und der Zerkleinerung bzw. dem Tieffrieren der Gehirne betrug nicht länger als etwa 10 min. Die im Puffer A befindlichen Gehirne wurden mit Hilfe eines haushaltsüblichen Mixers zerkleinert. Diese Gewebesuspension wurde dann entweder mit 10 Hüben eines Teflon/Glas Zellhomogenisators bei 300 U/min oder einem Ultra-Turrax 30 s lang unter Eiskühlung weitestgehend homogenisiert. Das Homogenat wurde 15 min bei 1000 g und 4 °C in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 30 min bei 100000 g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde schließlich mit eiskaltem Puffer B versetzt (je g eingesetztes Gehirn 2 ml Puffer B), erneut homogenisiert mit Hilfe des Teflon/Glas-Zellhomogenisators bzw. Ultra-Turrax, in 2 ml-Portionen aliquotiert und unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Aliquots wurden bis zu den

Versuchstagen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die bei dieser Temperatur gelagerten Hirnmembranpräparationen wurden innerhalb von 3 Monaten verbraucht.

Diese Methode zur Gewinnung von Hirnmembranpräparationen wurde in modifizierter Weise nach Schwanstecher *et al.* [41] durchgeführt.

## 2.1.2 Rezeptorbindungsversuche

### 2.1.2.1 Allgemeine Durchführung

Da Pentapeptide die Eigenschaft besitzen, sich an nichtsilanisierte Oberflächen zu heften, wurden alle Verdünnungen der radioaktiv- bzw. nichtradioaktiv-markierten Pentapeptide DAMGO und DPDPE mit Ausnahme der 2-stündigen Inkubation in den Polystyrolröhrchen in silanisierten Glas- oder Polypropylengefäßen hergestellt bzw. gelagert. Da Polystyrolröhrchen beim Silanisieren zerstört werden, wurden die Ergebnisse von identisch durchgeführten Rezeptorbindungsversuchen in silanisierten Polypropylengefäßen und in nichtsilanisierten Polystyrolröhrchen miteinander verglichen. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Da die Polystyrolröhrchen-Strips (jeweils 12 Polystyrolröhrchen hängen aneinander und bilden 1 Strip) für die Filtrationsanlage vorgesehen sind, wurden sie für alle weiteren Rezeptorbindungsversuche verwendet.

Alle Rezeptorbindungsversuche wurden entsprechend folgendem Ansatz (500  $\mu\text{l}$ ) durchgeführt:

- 100  $\mu\text{l}$  (Sättigungsexperimente) bzw. 50  $\mu\text{l}$  (Kompetitionsexperimente) Ligand: [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO ( $\mu\text{-OR}$ ), [ $^3\text{H}$ ]-DPDPE ( $\delta\text{-OR}$ ) oder [ $^3\text{H}$ ]-U69,593 ( $\kappa\text{-OR}$ )
- 100  $\mu\text{l}$  Inhibitor: Dihydrocodein, seine Metaboliten oder eine der Kontrollsubstanzen
- 200  $\mu\text{l}$ /300  $\mu\text{l}$  (mit/ohne Inhibitor, Sättigungsexperimente) bzw. 250  $\mu\text{l}$ /350  $\mu\text{l}$  (mit/ohne Inhibitor, Kompetitionsexperimente) Puffer B: 50 mmol/l Tris, pH 7,4
- 100  $\mu\text{l}$  1:4 mit Puffer B verdünnte Hirnmembransuspension

Die aufgetauten Hirnmembranen wurden mit Puffer B 1:4 verdünnt. 100 µl dieser Suspension wurden in Polystyrolröhrchen (Fassungsvermögen 1 ml) pipettiert. Danach wurden die anderen Bestandteile des Ansatzes (s. o.) in folgender Reihenfolge pipettiert: Inhibitor, Ligand, Puffer B. Die Herstellung der Verdünnungsreihen der Inhibitoren sowie die Einstellung der Radioaktivität der Liganden auf die erforderliche Konzentration mittels der spezifischen Aktivität erfolgte mit Puffer B. Anschließend wurden die Ansätze 2 Stunden bei 37 °C in einem für die Röhrchen-Strips passenden Heizblock inkubiert. Nach Inkubation wurden die Proben entnommen und der freie Ligand vom proteingebundenen Anteil durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter mittels einer 12-Kanal-Filtrationsanlage mit angeschlossener Vakuumpumpe getrennt. Die GF/B-Glasfaserfilter hatten einem Durchmesser von 25 mm und wurden mind. 1 h vor Filtration in 4 °C kaltem Puffer B eingelegt, der 0,15% Polyethylenimin enthielt. Die Filter wurden im Anschluss zweimal mit je 5 ml 4 °C kaltem Puffer B gewaschen. Filtrations- und Waschvorgang dauerten insgesamt nicht länger als 15 s. Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden die Filter in 4 ml wasseraufnehmender Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und in einem  $\beta$ -Counter jeweils 15 min gezählt (automatische Quenchbestimmung). Zur Bestimmung der eingesetzten Gesamtradioaktivität wurden 50 µl des Radioliganden ebenfalls in 4 ml Szintillator gezählt.

### ***2.1.2.2 Sättigungsexperimente***

Die Sättigbarkeit als Vorbedingung einer spezifischen Bindung des Radioliganden an den entsprechenden Rezeptoren, d. h. die Kapazität der spezifischen Bindung ( $B_{\max}$ ) und daraus resultierend seine Äquilibriumdissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurden durch Messung der Bindung steigender Konzentrationen der Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO, [ $^3\text{H}$ ]-DPDPE und [ $^3\text{H}$ ]-U69,593 (10 Konzentrationen im Messbereich 0,1 bis 20 nmol/l) nach Inkubation mit der Hirnmembransuspension ermittelt. Die unspezifische Bindung (NSB) wurde durch Zugabe einer konstanten Menge (100 µmol/l, mind. 5000facher Überschuss) der entsprechenden nichtradioaktiv-markierten Inhibitoren DAMGO, DPDPE und U69,593 bestimmt.

### **2.1.2.3 *Kompetitionsexperimente***

Zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wurden steigende Konzentrationen der eingesetzten Substanzen (21 Konzentrationen im Messbereich 10 pmol/l bis 1 mmol/l mit Ausnahme von DHM3G und DHM6G (17 bzw. 19 Konzentrationen im Messbereich 10 pmol/l bis 10  $\mu$ mol/l) zu einer konstanten Konzentration an Radioligand (0,5 nmol/l [ $^3$ H]-DAMGO, 1 nmol/l [ $^3$ H]-DPDPE oder 1 nmol/l [ $^3$ H]-U69,593) gegeben und mit der Hirnmembransuspension inkubiert. Eine Abschätzung der  $IC_{50}$ -Werte zur Findung des optimalen Konzentrationsbereiches jeder Prüfsubstanz wurde in Vorversuchen durchgeführt. Bei DHM3G und DHM6G waren höhere Konzentrationen als 10  $\mu$ mol/l nicht möglich, da für alle Experimente innerhalb dieser Arbeit nur 2,6 mg DHM3G und 2,7 mg DHM6G zur Verfügung standen.

Aus den ermittelten  $IC_{50}$ -Werten wurden die Äquilibriumdissoziationskonstanten der Prüfsubstanzen ( $K_i$ ) mit Hilfe der  $K_D$ -Werte der radioaktiv-markierten Liganden berechnet.

### **2.1.2.4 *Proteinbestimmung***

20  $\mu$ l der 1:4 verdünnten Hirnmembransuspension (siehe 2.1.2.1) wurden 1:50 in Wasser verdünnt. 50  $\mu$ l dieser Verdünnung wurden zusammen mit 200  $\mu$ l 1:2 mit Wasser verdünntes Bradford-Reagenz in unsterile 96er Mikrotiterplatten pipettiert. Innerhalb 5-60 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und mit Hilfe der mit Rinderserumalbumin (BSA) hergestellten Standardgeraden (80, 60, 40, 20, 0  $\mu$ g/ml BSA) in Proteingehalte umgerechnet.

Diese Methode zur Proteinbestimmung wurde in modifizierter Weise nach Bradford [42] durchgeführt.

## **2.2 RADIOREZEPTORASSAY AN AUSDIFFERENZIIERTEN SH-SY5Y-ZELLEN**

Der Radiorezeptorassay (RRA) diente zur Erstellung eines Affinitätsprofils von Dihydrocodein und seinen Metaboliten an Opioid-Rezeptoren von intakten und ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen.

## 2.2.1 Zellkultur und Ausdifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen

Humane Neuroblastomzellen SH-SY5Y wurden in sterilen Gewebekulturflaschen mit Filter (75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche) im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 96% in RPMI-1640 Medium kultiviert, dem 10% fötales Rinderserum, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden (= Vollmedium). Bei annähernd 100%iger Konfluenz wurden die Zellen mit 0,04% EDTA in einer Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freien Phosphat gepufferten Salzlösung pH 7,4 (PBS-EDTA 0,04%) folgender Zusammensetzung passagiert (g/l): NaCl 8,0, KCl 0,2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O 1,4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2, EDTA-Na<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O 0,4. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 32%iger Natronlauge. Die passagierten Zellen wurden entweder erneut in Flaschen (zur Erhaltung der Kultur oder für den Radiorezeptorassay) oder in Schalen (für den cAMP-Akkumulationsassay) ausgesät. Bei 70%iger Konfluenz wurden die Zellen mit 10 µmol/l Vitamin-A-Säure 4-9 Tage (Radiorezeptorassay) bzw. 7-12 Tage (cAMP-Akkumulationsassay) ausdifferenziert. Das Differenzierungsmedium enthielt je 100 ml Vollmedium 100 µl einer 0,01 molaren Lösung von Vitamin-A-Säure in absolutem Ethanol. Der Zeitraum zwischen Aussaat der Zellen und Zugabe von Vitamin-A-Säure betrug mindestens 2 Tage. Medien wurden sowohl in den Flaschen als auch in den Schalen alle 2 Tage erneuert.

## 2.2.2 Rezeptorbindungsversuche

### 2.2.2.1 Allgemeine Durchführung

Alle Rezeptorbindungsversuche wurden entsprechend folgendem Ansatz (1000 µl) durchgeführt:

- 100 µl Ligand: [<sup>3</sup>H]-Diprenorphin
- 100 µl (Sättigungsexperimente) bzw. 200 µl (Kompetitionsexperimente) Inhibitor: Dihydrocodein, seine Metaboliten oder eine der Kontrollsubstanzen

- 300 µl/400 µl (mit/ohne Inhibitor, Sättigungsexperimente) bzw. 200 µl/400 µl (mit/ohne Inhibitor, Konkurrenzexperimente) Puffer C: Krebs-HEPES-Puffer (KHP), pH 7,4
- 500 µl Zellsuspension

Als Puffer C wurde Krebs-HEPES-Puffer (KHP) folgender Zusammensetzung verwendet (g/l): NaCl 6,9, KCl 0,2, NaHCO<sub>3</sub> 2,1, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 0,3, HEPES 2,4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 3H<sub>2</sub>O 0,3, CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O 0,4, D(+)-Glucose-monohydrat 2,3. Daraus resultierten folgende Ionenkonzentrationen (mmol/l): 143,3 Na<sup>+</sup>, 2,5 Ca<sup>2+</sup>, 125,6 Cl<sup>-</sup>, 4,7 K<sup>+</sup>, 1,2 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 25 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1,2 Mg<sup>2+</sup>, 1,2 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 11,7 Glucose, 10 HEPES. Der pH-Wert wurde mit 32%iger Natronlauge auf 7,4 eingestellt.

Nach Entfernen des Mediums wurden die in den Flaschen ausdifferenzierten Zellen mit 10 ml PBS-EDTA 0,04% von der Wachstumsfläche abgelöst und in sterile Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 100-150 g und anschließendem Absaugen der über dem Pellet stehenden PBS-EDTA-Lösung wurden die Zellen einer Flasche in 25 ml Krebs-HEPES-Puffer (KHP) resuspendiert. Unmittelbar danach wurden die Zellen auf ihre Unversehrtheit überprüft, indem 20 µl Zellsuspension mit 20 µl 1:10 mit PBS verdünnter Trypanblau-Lösung angefärbt wurden (Vitalfärbung), und die Anzahl sowohl der intakten als auch der zerstörten Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt wurde.

Für den RRA wurden 500 µl der hergestellten Zellsuspension in Polystyrolröhrchen (Fassungsvermögen 1 ml, jeweils 12 Röhrchen bildeten 1 Strip) pipettiert. Danach wurden die anderen Bestandteile des Ansatzes (s. o.) in folgender Reihenfolge pipettiert: Inhibitor, Ligand, Puffer C. Die Herstellung der Verdünnungsreihen der Inhibitoren sowie die Einstellung der Radioaktivität der Liganden auf die erforderliche Konzentration mittels der spezifischen Aktivität erfolgte mit Puffer C. Anschließend wurden die Ansätze 2 Stunden bei 37 °C in einem für die Röhrchen-Strips passenden Heizblock inkubiert. Nach Inkubation wurden die Proben entnommen und der freie Ligand vom proteingebundenen Anteil durch Filtration über GF/B-Glasfaserfilter mittels einer 12-Kanal-Filtrationsanlage mit angeschlossener Vakuumpumpe getrennt. Die GF/B-Glasfaserfilter hatten einen Durchmesser von 25 mm und wurden mind. 1 h vor Filtration in 4 °C kaltem Puffer B eingelegt, der 0,15% Polyethylenimin enthält. Die Filter wurden im Anschluss zweimal mit je 5 ml 4 °C kaltem Puffer B gewaschen. Filtrations- und Waschvorgang dauerten insgesamt nicht länger als 15 s. Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden die Filter in 4 ml wasseraufnehmender

Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und in einem  $\beta$ -Counter jeweils 15 min gezählt (automatische Quenchbestimmung). Zur Bestimmung der eingesetzten Gesamtradioaktivität wurden 100  $\mu$ l des Radioliganden ebenfalls in 4 ml Szintillator gezählt.

### ***2.2.2.2 Sättigungsexperimente***

Die Sättigbarkeit als Vorbedingung einer spezifischen Bindung des Radioliganden an den entsprechenden Rezeptoren, d. h. die Kapazität der spezifischen Bindung ( $B_{\max}$ ) und daraus resultierend seine Äquilibriumdissoziationskonstante ( $K_D$ ) wurden durch Messung der Bindung steigender Konzentrationen des Radioliganden [ $^3$ H]-Diprenorphin (10 Konzentrationen im Messbereich 0,1 bis 10 nmol/l) nach Inkubation mit der Zellsuspension ermittelt. Die unspezifische Bindung (NSB) wurde durch Zugabe einer konstanten Menge (10  $\mu$ mol/l, mind. 1000facher Überschuss) des entsprechenden nichtradioaktiv-markierten Inhibitors Diprenorphin bestimmt.

### ***2.2.2.3 Konkurrenzexperimente***

Zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wurden steigende Konzentrationen der eingesetzten Substanzen (19 Konzentrationen im Messbereich 1 mmol/l bis 1 nmol/l mit Ausnahme von DHM3G und DHM6G (19 Konzentrationen im Messbereich 10  $\mu$ mol/l bis 1 nmol/l) und DPN (19 Konzentrationen im Messbereich 1 mmol/l bis 300 pmol/l)) zu einer konstanten Konzentration an Radioligand (0,1 nmol/l [ $^3$ H]-Diprenorphin) gegeben und mit der Zellsuspension inkubiert. Eine Abschätzung der  $IC_{50}$ -Werte zur Findung der optimalen Konzentrationen innerhalb der Messbereiche wurde in Vorversuchen durchgeführt. Bei DHM3G und DHM6G waren höhere Konzentrationen als 10  $\mu$ mol/l nicht möglich, da für alle Experimente innerhalb dieser Arbeit nur 2,6 mg DHM3G und 2,7 mg DHM6G zur Verfügung standen.

Aus den ermittelten  $IC_{50}$ -Werten wurden die Äquilibriumdissoziationskonstanten der Prüfsubstanzen ( $K_i$ ) mit Hilfe des  $K_D$ -Wertes des radioaktiv-markierten Liganden berechnet.



#### **2.2.2.4 Proteinbestimmung**

Zur Freisetzung der Proteine wurden die Zellen von 50 µl Zellsuspension (siehe 2.2.2.1) durch Zugabe von 950 µl 0,1 N HCl (1:20) über einen Zeitraum von 30 min lysiert. 50 µl dieser Verdünnung wurden zusammen mit 200 µl 1:2 mit Wasser verdünntes Bradford-Reagenz in unsterile 96er Mikrotiterplatten pipettiert. Innerhalb 5-60 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und mit Hilfe der mit Rinderserumalbumin (BSA) hergestellten Standardgeraden (80, 60, 40, 20, 0 µg/ml BSA) in Proteingehalte umgerechnet.

Diese Methode zur Proteinbestimmung wurde in modifizierter Weise nach Bradford [42] durchgeführt.

### **2.3 cAMP-AKKUMULATIONSSASSAY**

Der cAMP-Akkumulationsassay diente zur Erstellung eines Aktivitätsprofils von Dihydrocodein und seinen Metaboliten in ausdifferenzierten humanen Neuroblastomzellen SH-SY5Y mit Hilfe von Forskolin stimulierter cAMP-Bildung.

#### **2.3.1 Zellkultur und Ausdifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen**

Die Zellkultur und Ausdifferenzierung von SH-SY5Y-Zellen erfolgte in der unter 2.2.1 beschriebenen Weise.

#### **2.3.2 cAMP-Akkumulationsversuche**

Die Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurde in modifizierter Weise nach Yu und Sadée [23] durchgeführt.

### 2.3.2.1 Durchführung der Forskolin stimulierten cAMP-Akkumulation

Alle cAMP-Akkumulationsversuche wurden entsprechend folgendem Ansatz durchgeführt:

Vorinkubation:

- 10 µl Phosphodiesterase-Inhibitor: 50 mmol/l IBMX in DMSO
- 2500 µl Medium: RPMI-1640

Inkubation:

- 10 µl Adenylatcyclase-Aktivator mit Phosphodiesterase-Inhibitor: 2,5 mmol/l Forskolin mit 50 mmol/l IBMX in DMSO
- 50 µl Inhibitor: Dihydrocodein, seine Metaboliten oder eine der Kontrollsubstanzen
- 2500 µl Medium: RPMI-1640

Die cAMP-Akkumulationsexperimente wurden in sterilen Gewebekulturschalen (Durchmesser 60 mm, Wachstumsfläche 21 cm<sup>2</sup>) durchgeführt. Als Medium wurde Serum-freies RPMI-1640 verwendet. Nach Absaugen des Differenzierungsmediums wurden die ausdifferenzierten Zellen einmal mit 2,5 ml RPMI-1640 Medium gewaschen. Nach Entfernen des Waschmediums und Zugabe von 2,5 ml Medium und 10 µl 50 mmol/l IBMX wurden die Schalen im Brutschrank vorinkubiert. Die Endkonzentration von IBMX in den Schalen betrug somit 0,2 mmol/l. Nach 30 min Vorinkubation wurde das Medium erneut gewechselt, und es erfolgte die gleichzeitige Zugabe von 10 µl 2,5 mmol/l Forskolin mit 50 mmol/l IBMX in DMSO und 50 µl Inhibitor. Die Endkonzentrationen von Forskolin und IBMX betragen somit 10 µmol/l bzw. 0,2 mmol/l. Die Verdünnungsreihen der Inhibitoren wurden mit RPMI-1640-Medium hergestellt. Für die Bestimmung der basalen und maximalen cAMP-Konzentrationen als Kontrollen wurden die Gewebekulturschalen nur mit Medium/IBMX bzw. Medium/Forskolin/IBMX inkubiert. Die Konzentration von DMSO in den Schalen betrug sowohl bei der Vorinkubation als auch bei der eigentlichen Inkubation 0,4%. 20 min nach Zugabe von Forskolin wurde die Reaktion durch Absaugen des Versuchsmediums und unmittelbarer Zugabe von 2,5 ml eiskalter 0,1 N Salzsäure gestoppt, und die Gewebekulturschalen wurden zur Zellyse und der damit verbundenen Freisetzung von intrazellulärem cAMP 30 min auf Eis gelegt. Die Konzentration an cAMP in 100 µl

Überstand wurde anschließend mit dem Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit der Firma Biotrend Chemikalien in Köln bestimmt. Die Absorptionen wurden bei 405 nm mit Korrektur bei 590 nm mit Hilfe des SPECTRAFluor Plus der Firma Tecan in Crailsheim gemessen und anhand der Standardkurve (halblogarithmische Auftragung, 5000, 500, 50, 5, 0,5 pg/ml cAMP) in Konzentrationen umgerechnet. Die zusätzliche Messung bei 590 nm diente zur Korrektur von optischen Inhomogenitäten in der Mikroplatte. Die berechneten Konzentrationen wurden schließlich auf die entsprechenden Proteingehalte je Schale bezogen und als pg cAMP pro mg Protein ausgewertet.

### **2.3.2.2 Proteinbestimmung**

20 µl Überstand jeder Schale wurden gleichzeitig mit 100 µl Überstand für die cAMP-Bestimmung (siehe 2.3.2.1) entnommen und 1:50 in Wasser verdünnt. 50 µl dieser Verdünnung wurden zusammen mit 200 µl 1:2 mit Wasser verdünntes Bradford-Reagenz in unsterile 96er Mikrotiterplatten pipettiert. Innerhalb 5-60 min wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und mit Hilfe der mit Rinderserumalbumin (BSA) hergestellten Standardgeraden (80, 60, 40, 20, 0 µg/ml BSA) in Proteingehalte umgerechnet.

Diese Methode zur Proteinbestimmung wurde in modifizierter Weise nach Bradford [42] durchgeführt.

## **2.4 CHEMISCHE DETEKTIONSMETHODE (HPLC)**

Die Konzentrationsbestimmungen von DHC und seinen Metaboliten in Plasma und Urin wurden im Institut für Rechtsmedizin der Universität Heidelberg durchgeführt. Die Messungen wurden mit einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie- (HPLC-) Methode mit Fluoreszenz-Detektion analog Klinder *et al.* [43] durchgeführt. Die Quantifizierungsbereiche lagen bei 66-4980 nmol/l (DHC), 42-3180 nmol/l (DHC6G), 11-1045 nmol/l (DHM), 33-1637 nmol/l (DHM3G), 11-545 nmol/l (DHM6G) und 52-3135 nmol/l (NDHC). Die linearen Korrelationskoeffizienten der Kalibrationsgeraden waren > 0,99. Die Wiederfindungsraten für DHM und DHM6G lagen etwa bei 70%, die für die anderen Prüfsubstanzen etwa bei 80%. Die Inter-Assay-Varianz betrug < 13,5% für DHM und DHM6G und < 10% für DHC,

DHC6G, DHM3G und NDHC. Die Intra-Assay-Varianz betrug  $< 8,0\%$  für DHM und DHM6G und  $< 5,5\%$  für die anderen Prüfsubstanzen.

## 2.5 VERWENDETE CHEMIKALIEN, MATERIALIEN UND GERÄTE

### 2.5.1 Chemikalien

#### 2.5.1.1 Prüf- und Kontrollsubstanzen aller Untersuchungen

- Dihydrocodein (DHC), Dihydrocodeinhydrogentartrat ( $C_{22}H_{29}NO_9$ ,  $M_r$  451,5); Knoll Deutschland GmbH, Ludwigshafen
- Dihydrocodein-6-*O*- $\beta$ -D-glucuronid (DHC6G), Dihydrocodein-6-*O*- $\beta$ -D-glucuronid-trifluoracetat-monohydrat ( $C_{24}H_{31}NO_9 \cdot CF_3COOH \cdot H_2O$ ,  $M_r$  609,5); Lipomed AG, Arlesheim, Schweiz
- Dihydromorphin (DHM), Dihydromorphinhydrochlorid ( $C_{17}H_{22}ClNO_3$ ,  $M_r$  323,8), DHM wurde synthetisiert durch Reduktion von Hydromorphon mit  $NaBH_4$  [44]
- Dihydromorphin-3-*O*- $\beta$ -D-glucuronid (DHM3G), Dihydromorphin-3-*O*- $\beta$ -D-glucuronid-monohydrat ( $C_{23}H_{29}NO_9 \cdot H_2O$ ,  $M_r$  481,5); Lipomed AG, Arlesheim, Schweiz
- Dihydromorphin-6-*O*- $\beta$ -D-glucuronid (DHM6G), Dihydromorphin-6-*O*- $\beta$ -D-glucuronid-trifluoracetat-monohydrat ( $C_{23}H_{29}NO_9 \cdot CF_3COOH \cdot H_2O$ ,  $M_r$  595,5); Lipomed AG, Arlesheim, Schweiz
- Nordihydrocodein (NDHC), Nordihydrocodein-trifluoracetat-monohydrat ( $C_{17}H_{21}NO_3 \cdot CF_3COOH \cdot H_2O$ ,  $M_r$  419,4); Lipomed AG, Arlesheim, Schweiz
- Codein (COD), Codein-hemihydrat ( $C_{18}H_{21}NO_3 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ ,  $M_r$  308,4); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Levomethadon (LEV), Levomethadonhydrochlorid ( $C_{21}H_{28}ClNO$ ,  $M_r$  345,9), linksdrehendes (*R*)-Methadon; Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt/Main
- Methadon (MET), Methadonhydrochlorid ( $C_{21}H_{28}ClNO$ ,  $M_r$  345,9), Racemat aus linksdrehendem (*R*)- und rechtsdrehendem (*S*)-Methadon; Synopharm GmbH, Barsbüttel

- Morphin (MOR), Morphinhydrochlorid-trihydrat ( $C_{17}H_{20}ClNO_3 \cdot 3H_2O$ ,  $M_r$  375,8); Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

### **2.5.1.2 Radiorezeptorassay an Hirnmembranpräparationen**

- [ $^3H$ ]DAMGO, [ $^3H$ ]-DAMGO, [Tyrosyl-3,5- $^3H(N)$ ]Tyr-D-Ala-Gly-N-Methyl-Phe-Glyol, 55,3 Ci/mmol; NEN Life Science Products - GmbH, Köln
- [ $^3H$ ]DPDPE, [ $^3H$ ]-DPDPE, [Tyrosyl-2,6- $^3H(N)$ ]Enkephalin (2-D-Penicillamin, 5-D-Penicillamin), 36,0 Ci/mmol; NEN Life Science Products - GmbH, Köln
- [ $^3H$ ]U69,593, [ $^3H$ ]-U69,593, [Phenyl-3,4- $^3H$ ]U-69,593, [Phenyl-3,4- $^3H$ ](5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8 $\beta$ )-(-)-N-methyl-N-(7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspiro(4,5)dec-8-yl)benzolacetamid, 47,5 Ci/mmol; NEN Life Science Products - GmbH, Köln
- DAMGO, Tyr-D-Ala-Gly-N-Methyl-Phe-Glyol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- DPDPE, [D-Pen<sup>2,5</sup>]Enkephalin, Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- U69,593, (5 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8 $\beta$ )-(-)-N-methyl-N-(7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspiro(4,5)dec-8-yl)benzolacetamid, Alexis Deutschland GmbH, Grünberg
- Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
- Saccharose, Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
- Dichlordimethylsilan, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- n-Heptan, Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- PEI, Polyethylenimin (50%ige wässrige Lösung); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Quicksafe A Szintillationsflüssigkeit; Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt/Main

### **2.5.1.3 Zellkultur, Passagierung und Ausdifferenzierung**

- RPMI-1640 Medium mit  $NaHCO_3$ , ohne L-Glutamin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

- Fötale Rinderserum, fötales Kälberserum (FKS, FCS), Herkunft: Südafrika, Ch.-B.: P960496, PAN Biotech GmbH, Aidenbach
- L-Glutamin 200 mmol/l; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Penicillin-Streptomycin-Lösung mit 10000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin pro ml in 0,9%iger Kochsalzlösung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Vitamin-A-Säure, Tretinoin, all-trans-Retinsäure; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Ethanol, absolut; Riedel-de Haën Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Seelze
- NaCl, Natriumchlorid; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- KCl, Kaliumchlorid; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Kaliumdihydrogenphosphat; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- $\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat; Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

#### **2.5.1.4 Radiorezeptorassay an ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen**

- [ $^3\text{H}$ ]Diprenorphin, [ $^3\text{H}$ ]-Diprenorphin, [ $^{15,16(n)-3}\text{H}$ ]Diprenorphin, 45,0 Ci/mmol; Amersham Buchler GmbH & Co KG, Braunschweig
- Diprenorphin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
- PEI, Polyethylenimin (50%ige wässrige Lösung); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Trypanblau Lösung (0,4%), Naphthylaminblau Lösung (0,4%); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,
- Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) ohne  $\text{NaHCO}_3$ ; Gibco Life Technologies, Karlsruhe
- Quicksafe A Szintillationsflüssigkeit; Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt/Main
- Rinderserumalbumin (BSA); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Bradford Reagenz zur Proteinbestimmung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- NaCl, Natriumchlorid; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

- KCl, Kaliumchlorid; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- NaHCO<sub>3</sub>, Natriumhydrogencarbonat; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, Magnesiumsulfat-heptahydrat; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- HEPES, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure; AppliChem, Darmstadt
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 3H<sub>2</sub>O, Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O, Calciumchlorid-dihydrat; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- D(+)-Glucose-monohydrat; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- NaOH, Natriumhydroxid Plätzchen; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt

#### **2.5.1.5 cAMP-Akkumulationsassay**

- IBMX, 3-Isobutyl-1-methylxanthin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Forskolin, Colforsin, aus *Coleus forskohlii*; Alexis Deutschland GmbH, Grünberg
- Naloxonhydrochlorid; Alexis Deutschland GmbH, Grünberg
- DMSO, Dimethylsulfoxid; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
- Salzsäure-Maßlösung 0,1 N; AppliChem, Darmstadt

#### **2.5.1.6 Proteinbestimmung**

- Rinderserumalbumin (BSA); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Bradford Reagenz zur Proteinbestimmung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### **2.5.2 Materialien**

#### **2.5.2.1 Radiorezeptorassay an Hirnmembranpräparationen bzw. an ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen**

- Gewebekulturflaschen, 250 ml, 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, steril, mit Filter; Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
- Macrowell Röhrchen-Strips, 12 Röhrchen/Strip, aus Polystyrol; Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt/Main
- Whatman Glasfasermikrofilter GF/B; Merck Eurolab GmbH, Frankfurt/Main
- Zinsser Minis 2000 Typ 01 Szintillationsgefäße; Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt/Main

#### **2.5.2.2 *cAMP-Akkumulationsassay***

- Gewebekulturschalen, 60,0/15 mm, 21 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche, steril, mit Nocken; Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
- PP-Zentrifugenröhrchen, steril, 15 ml, 17,0/120 mm; Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
- Falcon PP-Zentrifugenröhrchen, steril, 50 ml, 30,0/115 mm; Fisher Scientific GmbH, Nidderau
- Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit, 480 Well Kit; Biotrend Chemikalien GmbH, Köln

#### **2.5.2.3 *Proteinbestimmung***

- Polystyrol-Mikroplatte, 96-Well, unsteril, F-Form; Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen

#### **2.5.3 *Geräte***

- Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer, Flüssigkeitsszintillationsspektrometer, Modell 2100TR; Canberra-Packard GmbH, Dreieich



- Brandel Cell Harvester, 12-Kanal Filtrationsanlage, Modell M-12SP; Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
- Membran-Vakuumpumpe, Typ MZ2C, Vacuubrand GmbH, Wertheim
- Zählkammer, Neubauer improved, geeicht; Merck Eurolab GmbH, Frankfurt/Main
- HERAsafe Sicherheitswerkbank Klasse 2, Typ HS 12; Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Hanau
- HERAcell CO<sub>2</sub>-Inkubator mit Desinfektionsstufe; Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Hanau
- Memmert Wasserbad Typ WB 45; Merck Eurolab GmbH, Frankfurt/Main
- Eppendorf Zentrifuge 5403, gekühlt, mit Ausschwingrotor und Adapter für 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln
- Mikroskop Axiovert 25; Carl Zeiss, Göttingen
- Ultra Turrax; Kika-Werke, Jahnke und Kunkel KG
- Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Hannover
- Mixer Typ 240 A, Krups
- Teflon/Glas-Zellhomogenisator Typ 283 S, Braun, Melsungen
- Ultrazentrifuge Centricon T-2070, Kontron, Hamburg

## **2.6 DURCHFÜHRUNG DER DIHYDROCODEIN-STUDIE AN GESUNDEN PROBANDEN**

Der Prüfplan zur Studie wurde von Helmut Schmidt entworfen und von Dr. med. Stefan V. Vormfelde\* auf die Anforderungen der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Georg August-Universität in Göttingen umgeschrieben. Die endgültige Version wurde dem Ethikkommission zur Überprüfung vorgelegt. Das zustimmende Votum der Ethikkommission wurde am 25.04.1997 erteilt.

\* Abteilung für Klinische Pharmakologie, Klinikum der Georg August-Universität, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen

### **2.6.1 Studienziel**

Ziel dieser Studie war die Zusammenführung pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Parameter von DHC und seiner Metaboliten unter Berücksichtigung des CYP2D6-Phänotyps.

### **2.6.2 Studiendesign**

Die Studie war als eine placebo-kontrollierte, doppelblinde, randomisierte Studie, im Zwei-Perioden-Cross-over-Design angelegt. Alle Versuchspersonen durchliefen beide Prüfphasen, wobei sie im Rahmen der ersten Testreihe entweder eine orale Einzeldosis von 7,18 g Paracodin<sup>®</sup> N-Tropfen (entsprechend 60 mg DHC-Base) oder eine entsprechende Menge wirkstofffreier Lösung erhielten und im Rahmen der zweiten Testreihe die noch nicht eingenommene Lösung bekamen. Die wirkstofffreie Lösung (Paracodin<sup>®</sup> N-Tropfen, Placebo, 8 Flaschen à 200 g) wurde von der Knoll AG, Zweigwerk in Uetersen, gekauft.

Blut- und Urinproben wurden von unmittelbar vor Gabe der Prüflösung bis 24 h danach abgenommen bzw. gesammelt. Messungen mittels Pupillometrie/Schmerzmodell wurden innerhalb dieses Zeitraums ebenfalls durchgeführt. Die Probanden wurden dazu auf eine geeignete Station aufgenommen und verblieben dort für etwa 25 h unter identischen diätetischen Bedingungen.

### **2.6.3 Probandenkollektiv**

An der Studie nahmen 9 freiwillige, männliche Probanden (5 EM und 4 PM für CYP2D6) teil. Die Charakteristika der Probanden sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Versuchspersonen wurden aus einem Pool bekannter, durch Spartein phänotypisierter EM und PM rekrutiert. Vor Beginn der Studie wurde eine ausführliche Anamnese und eine körperliche Untersuchung einschließlich Kontrolle der Vitalfunktionen (Blutdruck, Puls und Atemfrequenz) sowie ein Antikörper- (HBsAg, HBcAg und Anti-HIV1/2) und Drogen-Screening (Barbiturate, Amphetamine, Opiate, Benzodiazepine, Kokain-Metaboliten, Cannabinoide) durchgeführt. Darüber hinaus wurden vor Beginn und nach Abschluss der Studie ein Ruhe-12-Kanal-EKG

und eine Bestimmung der wichtigsten Laborparameter (Hämatologie (Zahl der weißen Blutkörperchen, Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Thrombozytenzahl, Differentialblutbild (Lymphozyten, Monozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, sonstige)), klinische Chemie (SGPT, SGOT, Gamma-GT, alkalische Phosphatase, LDH, Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Glucose, Gesamtbilirubin, Gesamtprotein, Albumin, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, PT, PTT) und Urinanalyse (Combur-9-Stäbchen-Test zur Bestimmung von Leukozyten, Nitrit, pH, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Blut, Hämoglobin, mikroskopische Sedimentanalyse bei abnormalen Entdeckungen) durchgeführt.

Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren eine mehr als 15%ige Abweichung des Körpergewichts vom Broca-Index (Körperlänge in cm minus 100 = Normalgewicht in kg), erkennbare körperliche oder geistige Krankheiten, Anamnese einer metabolischen, renalen, hepatischen oder kardiovaskulären Erkrankung oder Blutungsneigung, sowie einer Erkrankung des Gastrointestinaltraktes (außer Blinddarmoperation), Veränderungen im EKG (AV-Block II. oder III. Grades, QRS-Zeit > 120 ms, QTc-Zeit > 500 ms), klinisch relevante Veränderungen von Laborparametern bei der Aufnahmeuntersuchung, positiver HIV-Test, positiver HBcAg- oder HBsAg-Test, Anamnese von allergischen Erkrankungen, Kontraindikationen für DHC, sowie Verdacht oder Anamnese von Medikamentenmissbrauch, Zigarettenkonsum (mehr als 1 Zigarette pro Woche) bzw. ein mehr als mäßiger Alkohol- (mehr als 40 g Ethanol pro Tag) oder Koffeinkonsum (mehr als 5 Tassen Kaffee bzw. schwarzen Tee pro Tag) und Kontaktlinsenträger (Störung der Pupillometrie).

Außerdem sollten die systolischen Blutdruckwerte (gemessen im Liegen nach Riva Rocci) im Bereich von 100-140 mm Hg, die diastolischen Werte im Bereich von 50-90 mm Hg und der Ruhepuls im Bereich von 50-90 Schlägen pro Minute liegen.

Die Probanden wurden über den Ablauf der Studie und eventuell auftretende Risiken aufgeklärt und mussten eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme abgeben.

#### **2.6.4 Studienablauf**

Die Studie wurde vom 01. bis 22.07.97 im Klinikum der Georg August-Universität, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen durchgeführt.

Die Zuteilung der Versuchspersonen zu den Präparatesequenzen (Dihydrocodein oder Placebo) erfolgte zufällig (randomisiert). Die Zuteilung wurde anhand einer Randomisierungsliste vorgenommen, die in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universitätsklinik in Göttingen von Personen erstellt wurde, die nicht an der Studie teilnahmen (d.h. weder als Proband noch als Untersucher). Zwischen den beiden Versuchstagen wurde eine Pause von mindestens 7 Tagen eingehalten. Die Freiwilligen wurden anhand einer zweistelligen Zahl und ihrer Initialen identifiziert (TR03, HR06, CS07, LS08 und JL09 waren EM, JS01, BK02, GS04 und AK05 waren PM).

Die Versuchspersonen erschienen etwa 1 Stunde vor Einnahme der Prüfmedikation. Sie wurden nach Veränderungen ihres Befindens im Vergleich zur Aufnahmeuntersuchung gefragt. Weiterhin wurden die Vitalfunktionen (Blutdruck, Puls und Atemfrequenz) kontrolliert, Blut und Urin abgenommen sowie Messungen mittels Pupillometrie und Schmerzmodell durchgeführt.

Die Einnahme der Prüflösung erfolgte unter Kontrolle des Prüfarztes zwischen 7.00 und 9.00 Uhr. Die Prüflösung wurde rasch und vollständig eingenommen, das Gefäß wurde viermal mit je 50 ml stillem Wasser nachgespült, die Spüllösungen wurden ebenfalls getrunken. Dieser Vorgang dauerte nicht länger als 3 Minuten.

Nach Einnahme der Prüflösung wurden innerhalb 24 h 16 Blutproben entnommen, in 6 mehrstündigen Zeiträumen Urin gesammelt, 9 Messungen mittels Pupillometrie und Schmerzmodell sowie 9 Überprüfungen der Vitalfunktionen (Blutdruck, Puls und Atemfrequenz) und 7 Abfragen auf Unerwünschte Ereignisse durchgeführt. Die genauen Zeitpunkte der einzelnen Untersuchungen sind im Studienablaufschema (Tabelle 2) aufgeführt.

Am Prüftag traten die Probanden nüchtern die Untersuchung an. Nahrungsaufnahme und Flüssigkeitszufuhr (CO<sub>2</sub>-armes Mineralwasser) nach Menge und Zeit war wie folgt vorgesehen:

ein Frühstück und 400 ml Mineralwasser bei 60 Minuten, 200 ml Mineralwasser bei 2 h, freie Flüssigkeitsaufnahme (Mineralwasser) ab 4 h, ein Mittagessen (Vollkost) bei 5 h, ein Abendessen bei 10 h und ein Imbiss bei 12 h nach Einnahme der Prüfmedikation.

Während der einzelnen Prüfphasen durften die Versuchspersonen die Probandenstation nicht verlassen.

## **2.6.5 Behandlung der biologischen Proben**

### **2.6.5.1 Blutentnahmen**

Nach Legen der Braunüle wurden die 17 Blutproben à 5,5 ml zu den im Studienablaufplan angegebenen Zeitpunkten mit Hilfe von Monovetten (S-Monovette AH, Ammonium-Heparin, 15 I.E. Heparin/ml Blut, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) abgenommen und bis zur Zentrifugation in Eiswasser gelagert. Innerhalb 10 min wurde jede Probe 5 min lang bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Hannover). 1 ml Plasma wurde zur Versendung nach Heidelberg (Analytik von DHC und Metaboliten) abgenommen. Das restliche Plasma wurde in ein zweites Gefäß überführt (Reagenzröhrchen mit Übergriffstopfen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht). Die Plasmaproben wurden verschlossen und bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.6.5.2 Urinsammlung**

Innerhalb der 7 mehrstündigen Zeiträume sammelten die Probanden ihren Urin in lichtgeschützten Sammelflaschen (2 l Volumen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht). Am Ende der jeweiligen Sammelzeiträume wurden 2 mal 10 ml in Urin-Monovetten (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) abgenommen und bei -20 °C gelagert.

## **2.6.6 Messungen mittels Pupillometrie**

Für die pupillometrischen Messungen wurde ein eigens hergerichteter Raum verwendet. Die konstanten Lichtverhältnisse im Raum während der gesamten Studie als Voraussetzung für

reproduzierbare pupillometrische Messergebnisse wurden durch folgende Maßnahmen gewährleistet:

- Ausschluss von Fremdlicht (das Fenster des Raumes wurde lichtdicht mit Aluminiumfolie bedeckt, während den Untersuchungen war die Tür des Raumes geschlossen)
- eine einzige Lichtquelle (als Lichtquelle diente die Deckenbeleuchtung des Raumes)
- unveränderter Messort (die Probanden wurden immer liegend an derselben Stelle im Bett untersucht)

Die Messungen wurden mit dem monokularen Pupillometer Pupilsan<sup>®</sup> PC Typ 6EV der Firma Fairville Medical Optics, Inc., Buckinghamshire, England durchgeführt. Mit Hilfe der am Pupillometer befestigten Stirnstütze wurde das Gerät in konstantem Abstand über dem rechten Auge der Versuchsperson positioniert. Durch ein Okular auf der Rückseite des Gerätes war die Prüfperson in der Lage, die zentrale Ausrichtung des Pupillometers über der Pupille zu kontrollieren bzw. einzustellen. Nach optimaler Ausrichtung des Gerätes wurde der Proband angehalten, den Lidschlag des Auges zu unterbinden. Unmittelbar danach erfolgte die Stimulation der Pupille über 2 grüne Leuchtdioden mit einer Intensität von 22 cd/m<sup>2</sup> und einer Stimulationslänge von 100 ms durch mechanische Auslösung durch die Prüfperson. Der Pupillendurchmesser wurde nun mit Hilfe von 2 Infrarotdioden und einer Digitalisierungsrate von 20 Hz über eine Messdauer von 3,0 s gemessen. Die Daten wurden auf einem IBM-kompatiblen PC gespeichert. Dabei wurden die Pupillendurchmesser-Zeit-Diagramme erfasst (zur Beurteilung eventueller Artefakte) und folgende Parameter daraus ermittelt:

- ursprünglicher Pupillendurchmesser (initial diameter (ID))
- minimaler Pupillendurchmesser nach der Stimulation (minimal diameter after stimulation (MIN))
- Zeit bis zum Erreichen des Minimums (time to minimum (TTM))
- Reflexamplitude (reflex amplitude (RA = ID - MIN))
- Pupillendurchmesser 3 Sekunden nach der Stimulation (redilated diameter (RD = pupil diameter after 3 s relative to ID))

Während einer Messperiode wurden die dynamischen lichtevozierten pupillometrischen Messungen 10 mal mit einem Interstimulusintervall von 30 s wiederholt. Die Gesamtdauer der

einzelnen Untersuchungen betrug etwa 7 min. Ausgewertet wurden pro Proband und Messperiode jeweils die ersten 5 artefaktfreien Pupillendurchmesser-Zeit-Diagramme.

### **2.6.7 Messungen mittels Schmerzmodell**

Die Ermittlung der R-III-Reflexschwelle und der Schmerzintensität erfolgte mit dem Neuroport (Biotron, Miehlen, Deutschland), bei dem es sich um ein System zur Stimulation, Ableitung, Darstellung, Auswertung und Registrierung von elektrophysiologischen Potentialen handelte. Für die Gesamtdauer der Messungen lagen die Versuchspersonen zur Entspannung der Muskulatur auf dem Rücken. Zunächst wurde eine Hautelektrode über dem retromalleolären Teil des N. suralis befestigt. Diese diente der Auslösung des experimentellen Schmerzreizes. Die Ableitelektroden zur Bestimmung der R-III-Reflexschwelle wurden über dem kurzen Kopf des M. biceps femoris aufgeklebt.

Die Bestimmung der R-III-Reflexschwelle und der Schmerzintensität erfolgte simultan, indem die Person 40 mal mit randomisierten Stromstärken zwischen 0 und 100 mA gereizt wurde. Bei jeder Stromstärke, bei der der R-III-Reflex zu beobachten war, wurde eine „1“ notiert, anderenfalls eine „0“. Die subjektive Schmerzintensität wurde von den Probanden gleichzeitig anhand einer visuellen Analog-Skala bewertet. Der jeweilige Wert zwischen „0%“ (keine Schmerzen) und „100%“ (stärkste Schmerzen) wurde ebenfalls bei der entsprechenden Stromstärke notiert. Zwischen den Einzelreizen wurde mindestens ein Zeitraum von 30 Sekunden eingehalten, um eine Adaptation zu verhindern. Daraus ergab sich eine Gesamtdauer der einzelnen Untersuchungen von ca. 20 min.

Zielparameter des Schmerzmodells waren:

- R-III-Reflexschwelle
- Schmerzintensität

## 2.7 AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE

Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte, sofern in den einzelnen Kapiteln nichts anderes angegeben ist, mit dem Office 97-Paket, Microsoft<sup>®</sup> Deutschland GmbH, Unterschleißheim.

### 2.7.1 Allgemeine Grundlagen zur Auswertung der Rezeptorbindungsexperimente

#### 2.7.1.1 Sättigungsexperimente - Bestimmung von $K_D$ und $B_{max}$ durch nichtlineare Regression

Die zwischen Rezeptor und Ligand eintretende Interaktion folgt der Michaelis-Menten-Beziehung in abgewandelter Form:

$$(1) \quad G_L = \frac{B_{max} \cdot L}{K_D + L} + NSB \cdot L$$

$G_L$  ist die bei einer bestimmten Konzentration des Radioliganden  $L$  gebundene Gesamtmenge des Radioliganden. Sie setzt sich zusammen aus der spezifischen und unspezifischen Bindung.  $B_{max}$  ist das Ausmaß (Kapazität) der spezifischen Bindung,  $K_D$  die Äquilibriumdissoziationskonstante und  $NSB$  die unspezifische Bindung.

Durch Messung sowohl der Gesamt- als auch der unspezifischen Bindung und anschließender Subtraktion lässt sich die spezifische Bindung  $B_L$ , d. h. der Anteil an Radioligand, der am Rezeptor gebunden ist, bestimmen. Gleichung (1) vereinfacht sich dann zu Gleichung (2):

$$(2) \quad B_L = \frac{B_{max} \cdot L}{K_D + L}$$



Gleichung (2) stellt mathematisch eine einfache rektanguläre hyperbolische Funktion mit 2 Variablen ( $K_D$  und  $B_{max}$ ) dar, die durch nichtlineare Regression bestimmt werden können.

Gleichung (2) ist nur gültig, wenn der Rezeptor nur eine Bindungsstelle für Liganden besitzt. Um zu überprüfen, ob eine zweite Bindungsstelle vorhanden ist, muss Gleichung (2) zu Gleichung (3) erweitert werden:

$$(3) \quad B_L = \frac{B_{max1} \cdot L}{K_{D1} + L} + \frac{B_{max2} \cdot L}{K_{D2} + L}$$

Gleichung (3) stellt mathematisch eine doppelte rektanguläre hyperbolische Funktion mit 4 Variablen ( $K_{D1}$ ,  $K_{D2}$ ,  $B_{max1}$  und  $B_{max2}$ ) dar, die durch nichtlineare Regression bestimmt werden können.  $K_{D2}$  stellt die Dissoziationskonstante für den Liganden an der 2. Bindungsstelle am Rezeptor mit einer Kapazität  $B_{max2}$  dar, unter der Voraussetzung, dass der Radioligand nicht zwischen den beiden Bindungsstellen unterscheidet.

Mit Hilfe des F-Testes lässt sich für die Sättigungen prüfen, ob sich die ermittelten Daten mit einer oder zwei Bindungsstellen erklären lassen [45].

### ***2.7.1.2 Sättigungsexperimente - Bestimmung von $K_D$ und $B_{max}$ durch lineare Regression (Scatchard Plot)***

In der Scatchard Plot-Analyse werden die spezifische Bindung  $B_L$  und die freie, ungebundene Radioaktivität  $F_L$  ermittelt, und anschließend die Werte für  $K_D$  und  $B_{max}$  mittels linearer Regression anhand folgender Geradengleichung berechnet:

$$(4) \quad \frac{B_L}{F_L} = \frac{B_{max} - B_L}{K_D}$$

In dieser Gleichung entspricht  $K_D$  dem negativen reziproken Wert der Steigung und  $B_{\max}$  dem Schnittpunkt mit der Abszisse.

Da in der Scatchard Plot-Analyse der Wert für  $x$  ( $B_L$ ) zur Berechnung von  $y$  ( $B_L/F_L$ ) herangezogen wird und dadurch eine Voraussetzung für die Durchführung linearer Regressionen nicht erfüllt ist, kann es bei der Berechnung von  $K_D$  und  $B_{\max}$  zu Ungenauigkeiten kommen. Aus diesem Grund wurde der Scatchard Plot nur zur orientierenden Auswertung herangezogen.

### 2.7.1.3 *Kompetitionsexperimente - Bestimmung von $K_i$ durch nichtlineare Regression*

In den Kompetitionsexperimenten kommt es durch die Anwesenheit eines zweiten nichtradioaktiv-markierten Liganden  $L_2$  zu einer Konkurrenzreaktion mit dem radioaktiv-markierten Liganden um die Rezeptorbindungsstelle. Daher muss Gleichung (1) zur Gleichung (5) erweitert werden:

$$(5) \quad G_L^* = \frac{B_{\max} \cdot L}{K_D \cdot (1 + i/K_i) + L} + \text{NSB} \cdot L$$

$G_L^*$  ist hier der Anteil des gebundenen Radioliganden  $L$  (spezifische und unspezifische Bindung) in Anwesenheit eines zweiten, nichtradioaktiv-markierten Liganden.  $K_i$  ist die Dissoziationskonstante dieses Liganden und  $i$  seine Konzentration.

Aus den Kompetitionsisothermen ist der  $IC_{50}$ -Wert ablesbar, d. h. die Konzentration an nichtradioaktiv-markiertem Ligand, die benötigt wird, um die Rezeptorbindung des Radioliganden um 50% zu vermindern. Er ist somit abhängig von der Radioligandenkonzentration  $L$  und dessen  $K_D$ . Vorausgesetzt, dass  $i = IC_{50}$  und  $G_L^* = 0,5 \cdot G_L$  ist, ergibt sich nach Auflösen von Gleichung (1) und (5) Gleichung (6) [46]:

$$(6) \quad K_i = \frac{IC_{50}}{L_V/K_D + 1}$$

Somit lässt sich der  $K_i$ -Wert des nichtradioaktiv-markierten Liganden mit Hilfe der aus dem Sättigungsexperiment bekannten Daten für  $L_V$  (Konzentration des verdrängenden, nichtradioaktiven Liganden) und  $K_D$  berechnen.

Gleichung (5) ist nur gültig, wenn der Rezeptor nur eine Bindungsstelle für Liganden besitzt. Um zu überprüfen, ob eine zweite Bindungsstelle vorhanden ist, muss Gleichung (5) zu Gleichung (7) erweitert werden:

$$(7) \quad G_L^* = \frac{B_{\max 1} \cdot L}{K_D \cdot (1 + i/K_{i1}) + L} + \frac{B_{\max 2} \cdot L}{K_D \cdot (1 + i/K_{i2}) + L} + NSB \cdot L$$

$K_{i2}$  stellt die Dissoziationskonstante für den nichtradioaktiv-markierten Liganden an der 2. Bindungsstelle am Rezeptor mit einer Kapazität  $B_{\max 2}$  dar, unter der Voraussetzung, dass der Radioligand nicht zwischen den beiden Bindungsstellen unterscheidet.

Mit Hilfe des F-Testes lässt sich für die Kompetitionen prüfen, ob sich die ermittelten Daten mit einer oder zwei Bindungsstellen erklären lassen [45].

#### **2.7.1.4** *Kompetitionsexperimente - Bestimmung von $K_D$ durch nichtlineare Regression*

Ist der  $K_D$  des radioaktiv-markierten Liganden aus dem Sättigungsexperiment nicht bekannt, so kann er im Kompetitionsexperiment mit dem nichtradioaktiv-markierten Analogon bestimmt werden. Bei der Konzentration, bei der die Rezeptorbindung des Radioliganden um 50% vermindert ist ( $IC_{50}$ ), gilt dann:

$$(8) \quad K_i = K_D$$

Nach Auflösen von Gleichung (8) in (6) ergibt sich somit:

$$(8) \quad K_D = IC_{50} - L$$

Mit Hilfe des aus den Kompetitionsisothermen ermittelten  $IC_{50}$ -Wertes und der eingesetzten (konstanten) Konzentration des radioaktiv-markierten Liganden lässt sich damit dessen  $K_D$  berechnen.

Die Auswertung der Sättigungs- und Konkurrenzexperimente mit Hilfe der unter (1) bis (9) aufgeführten Gleichungen ist nur unter folgenden Voraussetzungen möglich:

- Der Anteil an spezifisch gebundener Radioaktivität ( $B_L$ ) muss im Vergleich zum freien Anteil ( $F_L$ ) vernachlässigbar klein sein, so dass eine Korrektur des freien Anteils nicht notwendig ist ( $F_L \gg B_L$ ).
- Die Bindung eines Liganden an eine Bindungsstelle darf die Affinitätseigenschaften einer anderen Bindungsstelle nicht verändern.
- In den Experimenten muss der Gleichgewichtszustand erreicht sein.
- Die Bindung der Liganden an den Rezeptor muss reversibel sein und dem Massenwirkungsgesetz folgen.

### 2.7.2 Auswertung und Darstellung der Rezeptorbindungsexperimente

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte durch Berechnung des Medians (SEM). Der Median resultierte jeweils aus  $n$  voneinander unabhängigen Einzelbestimmungen, und der SEM (standard error of the mean) errechnete sich aus dem Quotienten der Standardabweichung und der Wurzel aus der Anzahl der voneinander unabhängigen Einzelbestimmungen ( $SEM = \sigma_n / \sqrt{n}$ )

### 2.7.2.1 Sättigungsexperimente

Die im Szintillationszähler gemessene Radioaktivität (Rohdaten) entsprach zum einen der Gesamtbindung an spezifischer und unspezifischer Bindung (Inkubationen ohne Überschuss nichtradioaktiv-markiertem Liganden) und zum anderen der unspezifischen Bindung (Inkubationen mit Überschuss nichtradioaktiv-markiertem Liganden) und wurde in DPM (= Zerfälle pro Minute) gemessen. Die spezifische Bindung (sDPM, spezifische DPM-Werte) ergab sich durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung. Durch Umrechnung der sDPM- in pmol/l-Werte anhand der spezifischen Aktivität des jeweiligen radioaktiv-markierten Liganden und anschließende Division durch den Proteingehalt je Inkubation ließ sich der gebundene Anteil  $B_L$  in fmol/mg Protein berechnen.

*Nichtlineare Regression.* Durch zweidimensionale, lineare Darstellung von  $L$  (nmol/l) auf der Abszisse und  $B_L$  auf der Ordinate und anschließender nichtlinearer Regression ließen sich der  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Wert für jeden einzelnen Versuch mit einem computergesteuerten Verfahren (SigmaPlot 5.0 (Jandel Scientific Software GmbH, Erkrath)) nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmen [47]. Die Anpassung und Transformation führte dieses Programm anhand der unter 2.7.1.1 aufgeführten Gleichungen (2) und (3) durch.

*Lineare Regression (Scatchard Plot).* Durch zweidimensionale, lineare Darstellung von  $B_L$  auf der Abszisse und  $B_L/F_L$  in fmol/mg Protein/nmol/l auf der Ordinate und anschließender linearer Regression ließen sich der  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Wert für jeden einzelnen Versuch bestimmen. Die freie, ungebundene Radioaktivität  $F_L$  wurde berechnet durch Subtraktion der Gesamtbindung  $G_L$  von der eingesetzten Radioaktivität  $L$ . Die  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Werte wurden dann wie unter 2.7.1.2 beschrieben ermittelt.

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte durch Berechnung des Medians (SEM) für beide Bestimmungsmethoden ( $n = 3-4$ ).

### 2.7.2.2 Konkurrenzexperimente

Die im Szintillationszähler gemessene Radioaktivität (Rohdaten) repräsentierte die Gesamtbindung an spezifischer und unspezifischer Bindung und wurde in DPM (= Zerfälle pro Minute) angegeben. Die spezifische Bindung (sDPM, spezifische DPM-Werte) ergab sich

durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung. Für die Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden die DPM-Werte der Inkubationen mit 1  $\mu\text{mol/l}$  der verdrängenden Substanz oder 1  $\mu\text{mol/l}$  Morphin verwendet. Die sDPM-Werte wurden dann in Prozent der maximal gebundenen spezifischen Radioaktivität (Inkubationen ohne verdrängende Substanz) umgerechnet. In den zweidimensionalen Abbildungen sind auf der Abszisse die Konzentrationen der Inhibitoren (in mol/l) in logarithmischer, auf der Ordinate die spezifische Bindung der [ $^3\text{H}$ ]-markierten Liganden (in %) in linearer Skalierung aufgetragen. Jeder Messpunkt stellt den Median (SEM) dar ( $n = 3-11$ ). Die Anpassung und Transformation mit den reziproken SEM-Werten als Wichtung und der Bedingung Hill  $< 0$  wurden mit einem computergesteuerten Verfahren (SigmaPlot 5.0, Jandel Scientific Software GmbH, Erkrath) für nichtlineare Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate [47] mit den Gleichungen  $B_{L\%} = 100/(1 + (\text{IC}_{50}/L_v)^{\text{Hill}})$  (1 Bindungsstelle) bzw.  $B_{L\%} = (100 - B_{\%2})/(1 + (\text{IC}_{501}/L_v)^{\text{Hill1}}) + B_{\%2}/(1 + (\text{IC}_{502}/L_v)^{\text{Hill2}})$  (2 Bindungsstellen) durchgeführt.  $B_{L\%}$  ist die spezifisch gebundene Radioaktivität in %,  $L_v$  die eingesetzte Konzentration des verdrängenden, nichtradioaktiv-markierten Liganden, Hill die Steilheit der sigmoidalen logistischen Kurve und  $B_{\%2}$  das Ausmaß der Bindung (in %) an der 2. Bindungsstelle.

### 2.7.3 Auswertung und Darstellung der cAMP-Akkumulationsexperimente

Die mit dem Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit in pg/ml bestimmten cAMP-Konzentrationen wurden durch die entsprechenden Proteinkonzentrationen in den Schalen (in mg/ml) dividiert. Die so erhaltenen cAMP-Gehalte (pg cAMP/mg Protein) wurden dann in Prozent der maximal akkumulierten cAMP-Menge pro mg Protein (Inkubationen ohne Inhibitor nur mit Forskolin/IBMX) umgerechnet. In den zweidimensionalen Abbildungen sind auf der Abszisse die Konzentrationen der Inhibitoren (in mol/l) in logarithmischer, auf der Ordinate die cAMP-Akkumulation (in %) in linearer Skalierung aufgetragen. Jeder Messpunkt stellt den Median (SEM) dar ( $n = 5-8$ ). Die weitere Auswertung wurde analog 2.7.2.2 durchgeführt mit dem Unterschied, dass die Anpassung und Transformation mit den reziproken SEM-Werten als Wichtung und der Bedingung Hill  $< 0$  mit der Gleichung  $A_{\%} = (100 - A_{\text{min}\%})/(1 + (\text{IC}_{50}/L_I)^{\text{Hill}}) + A_{\text{min}\%}$  erfolgte.  $A_{\%}$  ist die cAMP-Akkumulation in %,  $L_I$  die eingesetzte Konzentration des Inhibitors, Hill die Steilheit der sigmoidalen logistischen Kurve

und  $A_{\min\%}$  die minimale cAMP-Akkumulation in % bei maximaler Hemmung durch den Inhibitor oder 10  $\mu\text{mol/l}$  Morphin.

## 2.7.4 Auswertung und Darstellung der Probandenstudie

### 2.7.4.1 *Pharmakokinetische Parameter von DHC und seinen Metaboliten in Plasma und Urin*

Die pharmakokinetischen Parameter  $C_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  und  $A_e$  wurden für DHC und Metaboliten aus den gemessenen Plasma- bzw. Urinkonzentrationen mit dem computergesteuerten Verfahren WinNonlin<sup>®</sup> Pro Version 2.1, Pharsight Corporation, Kalifornien, USA berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte durch Berechnung des Mittelwertes  $\pm$  Standardabweichung (SD) für  $n = 5$  (EM) bzw.  $n = 4$  (PM). Die ermittelten Daten für EM und PM wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. Die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe (Abszisse: Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden, Ordinate: mittlere Plasmakonzentration in  $\text{nmol/l}$ ) und die mittlere kumulative Urinausscheidung (Abszisse: Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden, Ordinate: kumulative Urinausscheidung in  $\mu\text{mol}$ ) sind zweidimensional dargestellt.

### 2.7.4.2 *Pupillometrie*

Eine Digitalisierungsrate von 20 Hz über eine Messdauer von 3,0 s ergibt 60 Datenpunkte je Einzelmessung (alle 0,05 s ein gemessener Pupillendurchmesser). Zur Auswertung der pupillometrischen Bestimmungen wurden die ersten 5 artefaktfreien Einzelmessungen je Versuchsperson und Zeitpunkt herangezogen. Zur Ermittlung des mittleren ursprünglichen Pupillendurchmessers wurden die 25 (EM) bzw. 20 (PM) artefaktfreien Einzelmessungen zum Zeitpunkt 0,05 s jeweils in Mittelwert und Standardabweichung (+ SD oder - SD) zusammengefasst. Die ermittelten Daten für EM und PM wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. In der zweidimensionalen Darstellung ist die Zeit nach

Einnahme der Prüfmedikation in Stunden auf der Abszisse und der mittlere ursprüngliche Pupillendurchmesser in mm auf der Ordinate aufgetragen.

#### **2.7.4.3 Schmerzmodell**

Zur Ermittlung der R-III-Reflexschwelle wurden einerseits die Stromstärken notiert, bei denen der Reflex zu beobachten war, und andererseits die Stromstärken notiert, bei denen der Reflex nicht zu beobachten war. Die R-III-Reflexschwelle ergab sich dann als Mittelwert des zweitniedrigsten (Reflex vorhanden) und zweithöchsten Wertes (Reflex nicht vorhanden) innerhalb der Messreihe von jeweils 40 Stimulationen. Die R-III-Reflexschwelle vor Einnahme der Prüflösung wurde dann gleich 100% gesetzt (= Basislinie), und alle weiteren R-III-Reflexschwellen zu den Zeitpunkten 1-24 h wurden in % der Basislinie umgerechnet. Die so erhaltenen Datenreihen der Versuchspersonen wurden nach Zeitpunkt, Placebo bzw. Verum und EM bzw. PM statistisch in Mittelwert und Standardabweichung (+ SD oder – SD) zusammengefasst. Die ermittelten Daten für EM und PM wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. In der zweidimensionalen Darstellung ist die Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden auf der Abszisse und die mittlere R-III-Reflexschwelle in % der Basislinie auf der Ordinate aufgetragen.

Zur Ermittlung des VAS-EC<sub>50</sub> wurde eine Gerade durch die 40 Datenpunkte (Stromstärke in mA und VAS in %) durch lineare Regression gelegt und anschließend die Stromstärke berechnet, die 50% der VAS-Skala entsprach (= VAS-EC<sub>50</sub>). Der VAS-EC<sub>50</sub> vor Einnahme der Prüflösung wurde dann gleich 100% gesetzt (= Basislinie), und alle weiteren VAS-EC<sub>50</sub> zu den Zeitpunkten 1-24 h wurden in % der Basislinie umgerechnet. Die so erhaltenen Datenreihen der Versuchspersonen wurden nach Zeitpunkt, Placebo bzw. Verum und EM bzw. PM statistisch in Mittelwert und Standardabweichung (+ SD oder – SD) zusammengefasst. Die ermittelten Daten für EM und PM wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. In der zweidimensionalen Darstellung ist die Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden auf der Abszisse und der mittlere VAS-EC<sub>50</sub> in % der Basislinie auf der Ordinate aufgetragen.



---

## 3 ERGEBNISSE

---

### 3.1 RADIOREZEPTORASSAY AN HIRNMEMBRANPRÄPARATIONEN

Die Anpassung der Kurvenverläufe an die ermittelten Daten durch nichtlineare Regression (Sättigungs- und Konkurrenzexperimente) konnte bei jedem Experiment mit den beiden Gleichungen für 1 Bindungsstelle besser erklärt werden als mit den Gleichungen für 2 Bindungsstellen (siehe Kapitel 2.7). Die Überprüfung erfolgte mit Hilfe des F-Testes. Dies traf auch für die Konkurrenzexperimente mit einem Hill-Koeffizienten außerhalb des Bereiches  $-1,2 < \text{Hill} < -0,8$  zu.

#### 3.1.1 Bestimmung von $K_D$ und $B_{\max}$

Die  $K_D$ - und  $B_{\max}$ -Werte der drei Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO ( $\mu$ -OR), [ $^3\text{H}$ ]-DPDPE ( $\delta$ -OR) und [ $^3\text{H}$ ]-U69,593 ( $\kappa$ -OR) wurden sowohl durch Sättigungsexperimente (nichtlinear und linear (Scatchard Plot)) als auch durch Konkurrenzexperimente (nichtlinear) bestimmt. In den Sättigungsexperimenten wurde der jeweilige [ $^3\text{H}$ ]-Ligand in Konzentrationen von 0,1 bis 20 nmol/l eingesetzt. In den Konkurrenzexperimenten wurden [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO, [ $^3\text{H}$ ]-DPDPE und [ $^3\text{H}$ ]-U69,593 in konstanter Konzentration von 0,5, 1,0 und 1,0 nmol/l eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde jeweils durch Inkubation mit 100  $\mu\text{mol/l}$  des entsprechenden nichtradioaktiv-markierten Liganden bestimmt. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die ermittelten Werte. In den Abbildungen 3 und 4 sind repräsentative Graphen der Sättigungsexperimente dargestellt. Die Konkurrenzexperimente sind in Kapitel 3.1.2 dargestellt.

Der Anteil an spezifisch gebundener Radioaktivität ( $B_L$ ) betrug zwischen 0,1 und 2,6% des freien, nicht gebundenen Anteils ( $F_L$ ).

Da jede Inkubation eines Versuches dieselbe Menge an Membransuspension enthielt, war der Proteingehalt in den Inkubationen innerhalb eines Versuches identisch. Aus diesem Grund wurde nur der Proteingehalt der vor jedem Versuch in ausreichender Menge hergestellten

Membransuspension bestimmt. Der Proteingehalt im Inkubationsvolumen von 500  $\mu\text{l}$ , das 100  $\mu\text{l}$  Membransuspension enthielt, lag je nach hergestellter Membransuspension zwischen 0,18 und 0,20 mg.

Die Sättigungsexperimente zeigten, dass die Bindungen an  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren sättigbar und reversibel waren. Die  $B_{\text{max}}$ -Werte der radioaktiven Pentapeptide waren nahezu identisch und betragen etwa 80 fmol/mg Protein, während [ $^3\text{H}$ ]-U69,593 eine fast doppelt so hohe Bindungskapazität aufwies. Die  $K_{\text{D}}$ -Werte lagen im einstelligen nanomolaren Bereich, wobei es geringe Unterschiede zwischen den Bestimmungsmethoden gab (maximaler Unterschied: Faktor 2). Die durch Kompetition ermittelten Werte sind die niedrigsten (2,2, 3,0 und 2,9 nmol/l für [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO, [ $^3\text{H}$ ]-DPDPE und [ $^3\text{H}$ ]-U69,593), dann folgten die Werte ermittelt durch Scatchard Plot-Analyse und schließlich die durch nichtlineare Regression. Ursache dieser Unterschiede könnte die geringe Anzahl an Datenpunkten bei höheren Konzentrationen in den Sättigungsexperimenten sein. Da die radioaktiven Ausgangslösungen sehr kostenintensiv waren (25  $\mu\text{l}$  etwa 500,00 DM), konnten nur 1 bis 2 Konzentrationen größer als 5 nmol/l eingesetzt werden. Dadurch wirkten sich jedoch geringe Messfehler bei diesen Konzentrationen je nach Gewichtung sofort auf den  $K_{\text{D}}$ - und  $B_{\text{max}}$ -Wert aus. Bei den Bestimmungen durch Kompetition war dies nicht der Fall. Hier wurde eine konstante Menge an Radioaktivität durch 21 Konzentrationen des entsprechenden nichtradioaktiven Liganden verdrängt. Messfehler bei 1 oder 2 Konzentrationen wirkten sich bei dieser Bestimmungsmethode praktisch nicht auf den  $K_{\text{D}}$  aus. Aus diesem Grund wurden die durch Kompetition ermittelten  $K_{\text{D}}$ -Werte für die Berechnung der  $K_{\text{i}}$ -Werte (Kapitel 3.1.2) verwendet.

### 3.1.2 Bestimmung von $K_{\text{i}}$

Die Kompetitionisothermen von Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen an  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren sind in den Abbildungen 5-7 dargestellt. Als radioaktiv-markierte Liganden wurden [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO, [ $^3\text{H}$ ]-DPDPE und [ $^3\text{H}$ ]-U69,593 in konstanten Konzentrationen von 0,5, 1,0 und 1,0 nmol/l verwendet. Die  $K_{\text{i}}$ -Werte der verdrängenden Substanzen wurden nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (Gleichung (6), Kapitel 2.7.1.3) mit Hilfe der aus den Kompetitionsexperimenten ermittelten  $K_{\text{D}}$ -Werte der

radioaktiven Liganden berechnet (siehe auch Kapitel 3.1.1) und sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Hill-Koeffizienten der untersuchten Verbindungen lagen im Bereich von  $-0,8$  bis  $-1,2$  mit Ausnahme von Methadon ( $-1,6$   $\mu$ -OR), Levomethadon ( $-1,4$   $\mu$ - und  $\delta$ -OR) und DHM6G ( $-0,6$   $\delta$ -OR).

Der Anteil der gebundenen Radioaktivität auf den Filtern an der Gesamtradioaktivität je Inkubation lag zwischen  $0,9$  und  $2,2\%$ . Die gebundene Radioaktivität auf den Filtern bestand aus der spezifischen und unspezifischen Bindung, die zwischen  $13,7$  und  $32,5\%$  der spezifischen Bindung betrug.

Da jede Inkubation eines Versuches dieselbe Menge an Membransuspension enthielt, war der Proteingehalt in den Inkubationen innerhalb eines Versuches identisch. Aus diesem Grund wurde nur der Proteingehalt der vor jedem Versuch in ausreichender Menge hergestellten Membransuspension bestimmt. Der Proteingehalt im Inkubationsvolumen von  $500$   $\mu\text{l}$ , das  $100$   $\mu\text{l}$  Membransuspension enthielt, lag je nach hergestellter Membransuspension zwischen  $0,13$  und  $0,29$  mg.

Alle aktiven Prüfsubstanzen zeigten ihre größte Affinität zum  $\mu$ - und, mit Ausnahme von Morphin, ihre niedrigste zum  $\kappa$ -Opioid-Rezeptor. Die Ermittlung der Bindung von DHM, DHM6G und Morphin am  $\mu$ -OR ergab die größten Affinitäten aller getesteten Prüfsubstanz-Rezeptor-Kombinationen. Die Affinitäten von DHM und DHM6G am  $\mu$ -OR waren etwa  $130$  und  $70$  mal größer als die von DHC, während die anderen Metaboliten vergleichbare Affinitäten aufwiesen.  $6-O-\beta-D$ -Glucuronidierung von DHM veränderte praktisch nicht die Affinität zum  $\mu$ -Rezeptor, während das  $3-O-\beta-D$ -Glucuronid eine deutlich verringerte Affinität zeigte. Dihydrocodein und Dihydromorphin hatten doppelt so große Affinitäten wie ihre  $7,8$ -ungesättigten Analoga, wobei DHC ebenfalls eine doppelt so große Affinität wie sein  $6-O-\beta-D$ -Glucuronid aufwies.

Die Affinitäten am  $\delta$ -OR waren grob betrachtet etwa um den Faktor  $20-30$  niedriger als die am  $\mu$ -Rezeptor, die Reihenfolge der Affinitäten hingegen war ähnlich mit Ausnahme von DHC6G, dessen Affinität doppelt so groß war wie die von DHC.

Die Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]-U69,593 am  $\kappa$ -OR ergab  $K_i$ -Werte, die unterschiedlich zu den an den anderen Rezeptor-Subtypen waren. Die  $6-O-\beta-D$ -Glucuronide von DHC und DHM

zeigten deutlich verringerte Affinitäten verglichen mit ihren Muttersubstanzen, während die Substanzpaare Morphin/Dihydromorphin ( $K_i$ -Werte 206 and 223 nmol/l), Codein/Dihydrocodein ( $K_i$ -Werte 18061 and 14242 nmol/l) und Methadon/Levomethadon ( $K_i$ -Werte 1674 and 1492 nmol/l) praktisch identische Affinitäten am  $\kappa$ -OR aufwiesen. Da die Analyse von Methadon und Levomethadon praktisch identische  $K_i$ -Werte ergab, muss das rechtsdrehende (*S*)-Enantiomer eine ähnliche Bindung am  $\kappa$ -OR aufweisen wie Levomethadon. An den anderen Subtypen konnte dies nicht beobachtet werden, dort zeigte das (*S*)-Enantiomer keine Affinität.

### 3.2 RADIOREZEPTORASSAY AN INTAKTEN UND AUSSDIFFERENZIIERTEN SH-SY5Y-ZELLEN

Die Anpassung der Kurvenverläufe an die ermittelten Daten durch nichtlineare Regression (Sättigungs- und Kompetitionsexperimente) konnte bei jedem Experiment mit den beiden Gleichungen für 1 Bindungsstelle besser erklärt werden als mit den Gleichungen für 2 Bindungsstellen (siehe Kapitel 2.7). Die Überprüfung erfolgte mit Hilfe des F-Testes. Dies traf auch für die Kompetitionsexperimente mit einem Hill-Koeffizienten außerhalb des Bereiches  $-1,2 < Hill < -0,8$  zu.

#### 3.2.1 Bestimmung von $K_D$ und $B_{max}$

Der  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Wert des unselektiven Antagonisten [ $^3$ H]-Diprenorphin wurde sowohl durch Sättigungsexperimente (nichtlinear und linear (Scatchard Plot)) als auch durch Kompetitionsexperimente (nichtlinear) bestimmt. In den Sättigungsexperimenten wurde der [ $^3$ H]-Ligand in Konzentrationen von 0,1 bis 10 nmol/l eingesetzt. In den Kompetitionsexperimenten wurde der [ $^3$ H]-Ligand in konstanter Konzentration von 0,1 nmol/l eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde durch Inkubation mit 10  $\mu$ mol/l (Sättigungsexperimente) bzw. 100  $\mu$ mol/l (Kompetitionsexperimente) Diprenorphin bestimmt. In den Abbildungen 8 und 9 sind repräsentative Graphen der Sättigungsexperimente dargestellt. Die Kompetitionsexperimente sind in Kapitel 3.2.2 dargestellt.

Der Anteil an spezifisch gebundener Radioaktivität ( $B_L$ ) betrug zwischen 0,2 und 2,4% des freien, nicht gebundenen Anteils ( $F_L$ ).

Da jede Inkubation eines Versuches dieselbe Menge an Zellsuspension enthielt, war der Proteingehalt in den Inkubationen innerhalb eines Versuches identisch. Aus diesem Grund wurde nur der Proteingehalt der vor jedem Versuch in ausreichender Menge hergestellten Zellsuspension bestimmt. Der Proteingehalt im Inkubationsvolumen von 1000  $\mu$ l, das 500  $\mu$ l Zellsuspension enthielt, lag je nach hergestellter Zellsuspension zwischen 0,45 und 0,78 mg. Die Vitalfärbung dieser Zellsuspensionen mit Trypanblau ergab einen Anteil an intakten Zellen von wenigstens 85%.

Die Sättigungsexperimente zeigten, dass die Bindung des unselektiven Antagonisten [ $^3$ H]-Diprenorphin an die Opioid-Rezeptoren der intakten und ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen sättigbar und reversibel war. Die  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Werte betragen  $7,8 \pm 0,4$  nmol/l und  $191 \pm 23,7$  fmol/mg Protein (nichtlineare Sättigung,  $n = 3$ ),  $6,0 \pm 0,9$  nmol/l und  $128 \pm 15,9$  fmol/mg Protein (lineare Sättigung (Scatchard Plot),  $n = 4$ ) bzw.  $18,3 \pm 1$  nmol/l (nichtlineare Kompetition,  $n = 5$ ). Ursache des Unterschiedes in den durch Sättigung und Kompetition bestimmten  $K_D$ -Werten (etwa Faktor 3) könnte die geringe Anzahl an Datenpunkten bei höheren Konzentrationen in den Sättigungsexperimenten sein. Da die radioaktiven Ausgangslösungen sehr kostenintensiv waren (25  $\mu$ l etwa 500,00 DM), konnten nur 1 bis 2 Konzentrationen größer als 5 nmol/l eingesetzt werden. Dadurch wirkten sich jedoch geringe Messfehler bei diesen Konzentrationen je nach Gewichtung sofort auf den  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Wert aus. Bei den Bestimmungen durch Kompetition war dies nicht der Fall. Hier wurde eine konstante Menge an Radioaktivität durch 19 Konzentrationen des entsprechenden nichtradioaktiven Liganden verdrängt. Messfehler bei 1 oder 2 Konzentrationen wirkten sich bei dieser Bestimmungsmethode praktisch nicht auf den  $K_D$  aus. Aus diesem Grund wurde der durch Kompetition ermittelte  $K_D$ -Wert für die Berechnung der  $K_i$ -Werte (Kapitel 3.2.2) verwendet.

### 3.2.2 Bestimmung von $K_i$

Die Kompetitionsisothermen von Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen an Opioid-Rezeptoren von intakten und ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen sind in der

Abbildung 10 dargestellt. Als radioaktiv markierter Ligand wurde [<sup>3</sup>H]-Diprenorphin in einer Konzentration von 0,1 nmol/l verwendet. Die  $K_i$ -Werte der verdrängenden Substanzen wurden nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (Gleichung (6), Kapitel 2.7.1.3) mit Hilfe des aus den Kompetitionsexperimenten ermittelten  $K_D$ -Wertes von [<sup>3</sup>H]-Diprenorphin berechnet (siehe auch Kapitel 3.2.1) und sind in Tabelle 6 aufgeführt. Nur die Hill-Koeffizienten von Methadon und Levomethadon lagen im Bereich von  $-0,8$  bis  $-1,2$ . Alle anderen Prüfsubstanzen mit Ausnahme von Diprenorphin ( $-1,8$ ) hatten einen Hill-Koeffizienten größer als  $-0,8$ .

Der Anteil der gebundenen Radioaktivität auf den Filtern an der Gesamtradioaktivität je Inkubation lag zwischen 4,9 und 21,4%. Die gebundene Radioaktivität auf den Filtern bestand aus der spezifischen und unspezifischen Bindung, die zwischen 25,5 und 37,6% der spezifischen Bindung betrug.

Da jede Inkubation eines Versuches dieselbe Menge an Zellsuspension enthielt, war der Proteingehalt in den Inkubationen innerhalb eines Versuches identisch. Aus diesem Grund wurde nur der Proteingehalt der vor jedem Versuch in ausreichender Menge hergestellten Zellsuspension bestimmt. Der Proteingehalt im Inkubationsvolumen von 1000  $\mu$ l, das 500  $\mu$ l Zellsuspension enthielt, lag je nach hergestellter Zellsuspension zwischen 0,26 und 0,51 mg. Die Vitalfärbung dieser Zellsuspensionen mit Trypanblau ergab einen Anteil an intakten Zellen von wenigstens 85%.

Die Affinitäten von DHM und DHM6G waren etwa 100 bzw. 50 mal größer als die von DHC, während die anderen Metaboliten niedrigere Affinitäten aufwiesen. Im Einzelnen, 6-*O*- $\beta$ -D-Glucuronidierung von DHM reduzierte die Affinität etwa um die Hälfte, während das 3-*O*- $\beta$ -D-Glucuronid eine deutlich niedrigere Affinität als DHM besaß. Dihydrocodein und Dihydromorphin wiesen 2- bzw. 3-fach größere Affinitäten wie ihre 7,8-ungesättigten Analoga auf. DHC hat ebenfalls eine 3-fach größere Affinität als sein 6-*O*- $\beta$ -D-Glucuronid. Der Vergleich der  $K_i$ -Werte von Methadon (Racemat aus rechtsdrehendem (*S*)- und linksdrehendem (*R*)-Enantiomer) und Levomethadon (nur linksdrehendes (*R*)-Enantiomer) zeigte (Unterschied Faktor 1,5), dass das rechtsdrehende (*S*)-Enantiomer des Methadons anscheinend eine gewisse Affinität besaß. Wäre dies nicht der Fall gewesen, müssten sich die  $K_i$ -Werte um den Faktor 2 unterscheiden.

### 3.3 cAMP-AKKUMULATIONSSASSAY

Die Inhibitionsisothermen der stimulierten cAMP-Akkumulation durch Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen in intakten, adhärenen und ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen sind in Abbildung 11 dargestellt. Als Aktivator der Adenylatcyclase wurde Forskolin in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ , als unspezifischer Phosphodiesterase-Hemmer IBMX in einer Konzentration von 0,2 mmol/l verwendet. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für die inhibitorischen Prüfsubstanzen sind in Tabelle 6 aufgeführt und repräsentieren die Konzentrationen bei 50%iger Hemmung des maximalen Effektes. Die Hill-Koeffizienten aller Prüfsubstanzen lagen im Bereich von  $-0,8$  bis  $-1,2$  mit Ausnahme von DHM ( $-1,4$ ), Morphin ( $-0,6$ ) und NDHC ( $-1,4$ ).

Der Proteingehalt je Schale betrug zwischen 1,8 und 8,6 mg. Da das Wachstum der Zellen in den Schalen durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, und somit der Proteingehalt von Schale zu Schale variieren kann, wurde der Proteingehalt jeder Schale bestimmt, und die gemessene cAMP-Konzentration auf pg cAMP pro mg Protein bezogen.

Die basalen cAMP-Konzentrationen lagen im Bereich von 6,5 bis 41 pg/mg Protein. Die Forskolin stimulierten cAMP-Konzentrationen stiegen annähernd linear mit der Dauer der Differenzierung und resultierten in folgenden Werten (Median (SEM)): 498 pg/mg Protein (Differenzierung für die Dauer von 7 Tagen, 1 Experiment), 917 (143) pg/mg (8 Tage, 5 Experimente), 1058 (72) pg/mg (9 Tage, 7 Experimente), 1372 (154) (10 Tage, 6 Experimente), 1744 (260) (11 Tage, 5 Experimente) und 1840 bzw. 2103 (12 Tage, 2 Experimente). Diese stimulierten Konzentrationen repräsentierten eine 41- bis 166-fache Zunahme gegenüber den basalen Werte.

Der maximale Hemmeffekt der cAMP-Akkumulation durch die Prüfsubstanzen lag im Bereich von 60 bis 70%. Im Einzelnen, DHC senkte die cAMP-Akkumulation auf 38% (5%) (Median (SEM)), DHC6G auf 31% (4%), DHM auf 36% (2%), DHM6G auf 38% (1%), NDHC auf 35% (3%), Methadon auf 37% (2%), Levomethadon auf 37% (1%), Codein auf 40% (8%) und Morphin auf 32% (3%). DHM3G und Naloxon hatten keinen nennenswerten Effekt auf die cAMP-Akkumulation.

Die inhibitorischen Effekte waren Naloxon-reversibel. Dieser Effekt wurde durch gleichzeitige Inkubation von Forskolin, 100  $\mu\text{mol/l}$  Naloxon und 10  $\mu\text{mol/l}$  der folgenden

Prüfsubstanzen beobachtet (Werte sind Mediane (SEM) von 3 unabhängigen Experimenten, zum Vergleich sind die cAMP-Level derselben Prüfsubstanzkonzentration ohne Naloxon-Inkubation in Klammern angegeben): DHC 96% (1%) (68% (4%)), DHC6G 94% (6%) (52% (3%)), DHM 83% (1%) (38% (3%)), DHM6G 79% (1%) (38% (4%)), NDHC 91% (4%) (56% (5%)) and Morphin 98% (9%) (34% (2%)).

Die intrinsischen Aktivitäten von DHM und DHM6G waren etwa 200 bzw. 250 mal größer als die von DHC, während die anderen Metaboliten vergleichbare oder niedrigere Aktivitäten hatten. Im Einzelnen, 6-*O*- $\beta$ -D-Glucuronidierung von DHM veränderte nicht wesentlich die Aktivität, während das 3-*O*- $\beta$ -D-Glucuronid eine wesentlich niedrigere Aktivität aufwies. Dihydromorphin zeigte eine 3-fach größere Aktivität als sein 7,8-ungesättigtes Analogon, wohingegen Dihydrocodein sowohl zu seinem 6-*O*- $\beta$ -D-Glucuronid als auch zum 7,8-ungesättigten Analogon vergleichbare Aktivität besaß. Da die intrinsische Aktivität von Levomethadon (nur linksdrehendes (*R*)-Enantiomer) etwa doppelt so groß war wie die von Methadon (Racemat aus rechtsdrehendem (*S*)- und linksdrehendem (*R*)-Enantiomer), beruht die Aktivität von Methadon allein auf dem linksdrehenden (*R*)-Enantiomer, das rechtsdrehende (*S*)-Enantiomer des Methadons besitzt trotz einer gewissen Affinität (siehe Kapitel 3.2.2) anscheinend keinerlei Aktivität.

### 3.4 PROBANDENSTUDIE

#### 3.4.1 Pharmakokinetische Parameter von DHC und seinen Metaboliten in Plasma und Urin

In der kompartmentfreien Analyse erreichte DHC maximale Plasmakonzentrationen nach 1,3 bzw. 1,4 Stunden (EM bzw. PM). Die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe für DHC in EM und PM sind in Abbildung 12 dargestellt. Der Hauptmetabolit, der nach etwa 20 min nach Einnahme der Prüfmedikation im Plasma nachgewiesen werden konnte, war jeweils DHC6G mit maximalen Plasmakonzentrationen nach 2,3 bzw. 2,9 Stunden und scheinbaren Eliminationshalbwertzeiten von 4,6 bzw. 4,9 Stunden (EM bzw. PM). Für DHC und DHC6G wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen EM und PM im Hinblick auf die Parameter  $AUC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  und  $t_{1/2}$  festgestellt. DHM hingegen mit maximaler



Plasmakonzentration nach 1,5 Stunden war nur in EM detektierbar (Abbildung 13). Eine Übersicht über die wichtigsten pharmakokinetischen Parameter einschließlich der unterschiedlichen Quotienten  $AUC_{DHC}/AUC_{Metabolit}$  stellt Tabelle 7 dar. Nach etwa 6 Stunden war DHM im Plasma von EM nicht mehr nachzuweisen. DHM wurde darüber hinaus zu DHM3G ( $t_{max} = 2$  h) biotransformiert, das selbst nach 12 h noch im Plasma detektierbar war. Die scheinbaren Eliminationshalbwertszeiten von DHM und DHM3G waren 0,8 bzw. 5,8 Stunden. Auch DHM, DHM3G und DHM6G konnten im Plasma von PM nicht nachgewiesen werden.

Der Hauptmetabolit im Urin war ebenfalls DHC6G. Mehr als die Hälfte und 20-24% der applizierten Dosis von 60 mg Dihydrocodein wurden innerhalb 24 h als DHC6G und unverändert als DHC ausgeschieden (keine Unterschiede zwischen EM und PM). Eine Übersicht über die kumulative Urinausscheidung von DHC und Metaboliten stellt Abbildung 14 dar. Die renale Ausscheidung von DHC war im Sammelzeitraum 0 bis 2 h maximal, während die Ausscheidung der Metaboliten im Zeitraum 4 bis 8 h am höchsten war. Signifikant unterschiedlich war die Ausscheidung von NDHC (EM:  $11,8 \pm 2,3 \mu\text{mol}/24\text{h}$ , PM:  $22,0 \pm 2,8 \mu\text{mol}/24\text{h}$ ,  $p < 0,05$ ). Weder DHM, DHM3G noch DHM6G konnten im Urin von PM nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Pupillometrie

Die Messungen mittels dynamischer lichtevozierter Pupillometrie ergaben bei den mit Placebo behandelten Probanden (EM und PM) keine Veränderung im initialen Pupillendurchmesser über die gesamte Messdauer von 24 h (Abbildung 15). Der durchschnittliche Pupillendurchmesser vor Stimulation der Pupille lag zwischen 6,7 und 7,1 mm. Nach Gabe von DHC hingegen waren die ursprünglichen Pupillendurchmesser an den Zeitpunkten 1 bis 6 Stunden signifikant kleiner als nach Gabe von Placebo (4,7 bis 5,5 mm (EM) bzw. 5,3 bis 5,8 (PM),  $p < 0,05$ ) (Abbildung 15). Danach, d. h. etwa 8 h nach Gabe der Prüfmedikation, entsprachen die Pupillendurchmesser wieder den Werten vor DHC-Einnahme. Zwischen 0,7 und 0,8 s nach Stimulation der Pupille wurden sowohl bei den EM als auch bei den PM die niedrigsten Pupillendurchmesser beobachtet. Signifikante Unterschiede zwischen EM und PM in der Reagibilität des Pupillendurchmessers konnten jedoch nicht ermittelt werden.

### **3.4.3 Schmerzmodell**

Für die Messung der Schmerzempfindung wurde das in Kapitel 2.6.7 beschriebene Schmerzmodell verwendet. Veränderungen der R-III-Reflexschwelle und des VAS-EC<sub>50</sub> von der Basislinie waren nicht signifikant unterschiedlich und entsprechend auch nicht unterschiedlich zwischen EM und PM während der gesamten Messdauer von 24 Stunden (Abbildung 16 und 17). Mit Hilfe dieses Schmerzmodells konnten damit keine analgetischen Effekte von 60 mg DHC gezeigt werden.

---

## 4 DISKUSSION

---

Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, die Bedeutung der Biotransformation für die Wirkung von Dihydrocodein beim Menschen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden

- Affinitäts- und Aktivitätsprofile von Dihydrocodein und seinen Metaboliten erstellt,
- pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter (und deren Zusammenhang) von Dihydrocodein und seinen Metaboliten beim gesunden Menschen unter Berücksichtigung des CYP2D6-Phänotyps mit Hilfe einer Probandenstudie bestimmt,
- die Ergebnisse der Affinitäts- und Aktivitätsversuche mit den Ergebnissen der Probandenstudie in Zusammenhang gebracht.

### 4.1 AFFINITÄTSPROFILE VON DIHYDROCODEIN UND SEINEN METABOLITEN AN $\mu$ -, $\delta$ - UND $\kappa$ -OPIOID-REZEPTOREN VON HIRNMEMBRANPRÄPARATIONEN

Für die Ermittlung von Affinitätsprofilen an pharmakologischen Rezeptoren gibt es prinzipiell zwei Vorgehensweisen. Zum einen kann man ein Gewebe mit (annähernd) nur einem Rezeptorsubtyp auswählen. Dann genügt ein hochaffiner, nicht selektiver Radioligand, der kompetitiv durch die zu untersuchenden Substanzen verdrängt werden kann. Zum anderen kann man ein Gewebe mit mehreren Rezeptorsubtypen verwenden. Dann benötigt man allerdings für jeden zu messenden Subtyp einen hochaffinen, selektiven Radioliganden, der ebenfalls kompetitiv durch die zu untersuchenden Substanzen verdrängt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen an Hirnmembranpräparationen von Meerschweinchen durchgeführt. In Vorversuchen wurden auch andere Gewebe untersucht. Im Vergleich zum Meerschweinchen ergaben die Messungen mit Hirnmembranpräparationen vom Schwein oder der Ratte jedoch wesentlich kleinere Quotienten aus spezifischer zu unspezifischer Bindung. Da die Präparationen sowohl  $\mu$ -,  $\delta$ - als auch  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren enthielten, wurden zur Ermittlung der Affinitäten an den unterschiedlichen Subtypen hochaffine, selektive Radioliganden verwendet. Hierbei handelte es sich um [ $^3$ H]-DAMGO für den  $\mu$ - [5], [ $^3$ H]-DPDPE für den  $\delta$ - [9] und [ $^3$ H]-U69,593 [15] für den  $\kappa$ -Opioid-Rezeptor.

Haben die Kompetitionskurven einen monophasigen Verlauf mit einem Hill-Koeffizienten von etwa  $-1$  ( $-1,2 < \text{Hill} < -0,8$ ), dann liegt nur eine Bindungsstelle vor. Flache oder biphasige Kompetitionskurven mit einem Hill-Koeffizienten größer als  $-0,8$  deuten auf die Existenz von mehreren Bindungsstellen hin. In den Untersuchungen konnten die Kurvenverläufe an die ermittelten Daten mit der Gleichung für eine Bindungsstelle am besten beschrieben werden. Die Hill-Koeffizienten lagen bis auf wenige Ausnahmen in der Nähe von  $-1$ .

Die  $K_D$ -Werte der radioaktiv-markierten Liganden wurden sowohl durch nichtlineare Sättigungs- als auch durch nichtlineare Konkurrenzexperimente bestimmt. Die Bestimmung durch lineare Transformation (Scatchard Plot) diente zur graphischen Darstellung der Sättigungsbindung (Abbildung 4). Die dabei ermittelten Werte für  $K_D$  und  $B_{\max}$  wurden nur zur Vollständigkeit in Tabelle 3 aufgenommen, da verschiedene Faktoren bei der Abschätzung der Parameter durch Scatchard-Analyse zu fehlerhaften Werten führen können (zur Übersicht siehe Leslie [48]). Für die Berechnung der  $K_i$ -Werte von Dihydrocodein, seinen Metaboliten und den Kontrollsubstanzen wurden die bei der Konkurrenz ermittelten  $K_D$ -Werte herangezogen (siehe Kapitel 3.1.1).

Die für  $[^3\text{H}]$ -DAMGO,  $[^3\text{H}]$ -DPDPE und  $[^3\text{H}]$ -U69,593 ermittelten  $K_D$ -Werte liegen im niedrigen nanomolaren Bereich und sind praktisch identisch mit den von Löser *et al.* unter annähernd denselben Versuchsbedingungen, jedoch mit unterschiedlichen Hirnmembranpräparationen gemessenen Werten [49]. Waren die Versuchsbedingungen hingegen unterschiedlich, so ergaben sich unterschiedliche  $K_D$ -Werte. Chen *et al.* [33] und Mignat *et al.* [50] inkubierten kürzer (15 und 60 min) und bei niedrigeren Temperaturen (20 und 25 °C) und erzielten dadurch etwa um den Faktor 2-8 niedrigere  $K_D$ -Werte. Die Auswahl der Hirnmembranpräparation (Meerschweinchen, Ratte, Schwein) scheint somit im Gegensatz zu den Versuchsbedingungen einen geringeren Einfluss auf die Höhe der Affinitäten zu haben. Dies konnte in den oben erwähnten Vorversuchen bestätigt werden. Bei konstanten Versuchsbedingungen, aber unterschiedlichen Hirnmembranpräparationen ergaben sich annähernd gleiche Affinitäten.

Alle aktiven Prüfsubstanzen besaßen zu  $\mu$ -Rezeptoren eine mind. 6-fach bzw. mind. 32-fach höhere Affinität als zu  $\delta$ - bzw.  $\kappa$ -Rezeptoren, so dass man von vorwiegend  $\mu$ -selektiven Verbindungen sprechen kann. Ein Vergleich zwischen den Effekten der Glucuronidierung,

7,8-Dihydrierung, *N*- und 3-*O*-Dealkylierung auf die Affinitäten am  $\mu$ -Rezeptor zeigt Tabelle 5. Die für die Kontrollsubstanzen ermittelten  $K_i$ -Werte waren vergleichbar mit den in der Tabelle angegebenen Literaturdaten. Vergleicht man die angegebenen Affinitäten bezüglich struktureller Veränderungen an bestimmten Molekülpositionen, so lassen sich daraus Parallelen ableiten: Während sich die Affinitäten bei Glucuronidierung an *C*-6 oder *N*-Demethylierung nicht oder nur geringfügig ändern, führt die *O*-Demethylierung zu einer deutlichen Affinitätszunahme (mind. Faktor 100). 7,8-Dihydro-Derivate besitzen etwa um den Faktor 2 höhere Affinitäten als ihre ungesättigten Analoga. 3-*O*-Glucuronide besitzen offenbar keine Affinität zu Opioid-Rezeptoren, und die scheinbaren Verdrängungen der radioaktiven Liganden bei höheren Konzentrationen (Abbildung 5-7) sind vermutlich auf Verunreinigungen mit den nicht-glucuronidierten Analoga zurückzuführen [49, 51].

Aus den Ergebnissen der Rezeptorbindungsstudien an Hirnmembranpräparationen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten: Alle aktiven Prüfsubstanzen sind vorwiegend  $\mu$ -selektive Verbindungen. 3-*O*-Glucuronid-Metaboliten besitzen keine Affinität zu Opioid-Rezeptoren und sind somit unwirksam. 6-*O*-Glucuronid-Metaboliten haben annähernd dieselbe Affinität wie die nicht-glucuronierten Analoga und könnten deshalb zur Wirkung dieser Verbindungen beitragen. 3-*O*-Demethyl-Metaboliten haben deutlich höhere Affinitäten als die nicht-demethylierten Analoga und könnten daher wesentlich zur Wirkung dieser Verbindungen beitragen. Im Falle von Dihydrocodein kann daher die Bildung von Dihydromorphin und seinem 6-*O*-glucuronid möglicherweise zur Wirkung von DHC beitragen, auch wenn die Metaboliten nur in geringen Mengen gebildet werden [32].

Die Interpretation der Daten aus Rezeptorbindungsstudien an Hirnmembranpräparationen ist jedoch mit verschiedenen Einschränkungen verbunden:

- Die Radioligand-Rezeptor- bzw. Prüfsubstanz-Rezeptor-Interaktionen finden unter nichtphysiologischen Bedingungen an nicht intakten Zellen statt. Die ermittelten Affinitäten entsprechen daher nicht den tatsächlichen Affinitäten *in vivo*. Da sich jedoch die Affinitäten vor allem an  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren verschiedener Gewebe nur geringfügig von denen an klonierten humanen Rezeptoren unterscheiden [52], sind aber auf jeden Fall - wie in der vorliegenden Arbeit - vergleichende Aussagen über die Affinitäten der verschiedenen Opioide sinnvoll.

- In Rezeptorbindungsstudien wird prinzipiell nur die Affinität an einer oder mehreren Bindungsstellen bestimmt. Ein (pharmakologischer) Rezeptor ist im Gegensatz zu einer Bindungsstelle mit einer Funktion verknüpft. Rezeptorbindungsstudien ermöglichen jedoch keinen Rückschluss auf die Funktion des Rezeptors, so dass die intrinsische Aktivität der Prüfsubstanzen nicht bestimmt werden kann. So ist es durchaus möglich, dass zwei Verbindungen mit derselben Affinität unterschiedliche intrinsische Aktivitäten besitzen.
- In Rezeptorbindungsstudien sind die Konzentrationen der Prüfsubstanzen am Rezeptor genau definiert. *In vivo* hingegen sind diese Konzentrationen von verschiedenen Vorgängen wie Resorption, Verteilung, Biotransformation und Exkretion abhängig, so dass die tatsächliche Konzentration am Rezeptor weitestgehend unbekannt ist. Dieser Punkt ist daher bei Rückschlüssen auf die Affinitätsverhältnisse *in vivo* zu berücksichtigen.

#### 4.2 AFFINITÄTSPROFILE VON DIHYDROCODEIN UND SEINEN METABOLITEN AN OPIOID-REZEPTOREN VON HUMANEN NEUROBLASTOMZELLEN

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt, wurden die bei den Rezeptorbindungsstudien an Hirnmembranpräparationen gemessenen Affinitäten unter nichtphysiologischen Bedingungen ermittelt. Um den tatsächlichen Affinitäten *in vivo* näher zu kommen, wurden daher die weiteren Untersuchungen an intakten und ausdifferenzierten Zellen der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y durchgeführt. Diese Zelllinie exprimiert  $\mu$ ,  $\delta$ - und  $\kappa_3$ -Opioid-Rezeptoren (siehe Kapitel 1.1.3). Durch die Ausdifferenzierung zu reifen Neuronen nimmt die Opioid-Rezeptorbindung um ca. 100% zu. Die mit [<sup>3</sup>H]-Diprenorphin gemessene Gesamtbindung beträgt im ausdifferenzierten Zustand jeweils ca. 25% für den  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptor und ca. 50% für den  $\kappa_3$ -Rezeptor [22]. Die von verschiedenen Arbeitsgruppen in Unkenntnis der  $\kappa_3$ -Rezeptoren postulierte Schlussfolgerung, dass die SH-SY5Y-Zelllinie ein Modell zur Erforschung von vorwiegend  $\mu$ -OR vermittelten Effekten ist [25, 26], muss daher zumindest ein wenig relativiert werden: Auf der einen Seite beträgt die Selektivität von Morphin und anderen Agonisten an  $\mu$ -Rezeptoren nur höchstens 10-fach im Vergleich zu  $\kappa_3$ -Rezeptoren, was auf einen gewissen  $\mu$ -unselektiven Effekt von Morphin und anderen

Agonisten hindeutet. Auf der anderen Seite hingegen inhibiert der hochselektive  $\mu$ -Antagonist CTAP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>) die durch Morphin vermittelte Hemmung der Forskolin-stimulierten Adenylatcyclase, was auf einen  $\mu$ -selektiven Effekt von Morphin schließen lässt. Zusammenfassend könnte man daher formulieren, dass Morphin und andere Agonisten in niedrigen Konzentrationen  $\mu$ -selektiv wirken, in höheren Konzentrationen möglicherweise jedoch auch  $\mu$ -unselektiv an Opioid-Rezeptoren von ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen wirken könnten [22].

Wie in Kapitel 4.1 bereits erwähnt, deuten flache oder biphasige Kompetitionskurven mit einem Hill-Koeffizienten größer als  $-0,8$  auf die Existenz von mehreren Bindungsstellen hin. Da in den Untersuchungen nahezu alle Hill-Koeffizienten größer als  $-0,8$  waren, könnte dies in Verbindung mit der möglicherweise bei höheren Konzentrationen auftretenden Unselektivität (siehe vorangegangener Abschnitt) tatsächlich auf die Bindung an unterschiedliche Rezeptorklassen ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ) hindeuten. Neben dieser Theorie der Bindung an unterschiedliche Rezeptorklassen kommen bei Inkubationen unter physiologischen Bedingungen noch weitere Erklärungsansätze in Frage: Hill-Koeffizienten größer  $-0,8$  zeigen möglicherweise die Existenz von ineinander umwandelbaren Formen hoher und niedriger Affinität derselben Bindungsstelle an. Eine Vielzahl von Ionen und Nukleotiden fungieren dabei als allosterische Effektoren an den Opioid-Bindungsstellen. So stabilisieren Na<sup>+</sup> und GTP die Bindungsstelle im Stadium der niedrigen und zweiwertige Kationen wie Mn<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> im Stadium der hohen Affinität [53]. Darüber hinaus ist noch die negative Kooperativität zwischen Bindungsstellen zu nennen [54], die ebenfalls zu flachen Kompetitionskurven führt. Trotz dieser Vielzahl an prinzipiellen Erklärungsmöglichkeiten für 2 oder mehr Bindungsstellen konnten die Kurvenläufe an die ermittelten Daten mit der Gleichung für 1 Bindungsstelle am besten angepasst werden (siehe auch Kapitel 3.2).

Da Inkubationen in physiologischem Puffer mit hoher Na<sup>+</sup>-Konzentration zu einer deutlichen Abnahme der Affinität von Agonisten - im Gegensatz zu Antagonisten - führen [53], wurden die Untersuchungen mit dem unselektiven Antagonisten [<sup>3</sup>H]-Diprenorphin durchgeführt. Dieser Effekt, der auf Konformationsänderungen der Opioid-Rezeptoren zurückzuführen ist, zeigte sich hingegen in den Affinitäten von Dihydrocodein und seinen Metaboliten (mit Ausnahme von DHM3G), die gegenüber den Messungen am  $\mu$ -Rezeptor von Hirnmembranpräparationen etwa um den Faktor 70 größer waren.

Der  $K_D$ -Wert des radioaktiv-markierten Liganden wurde sowohl durch nichtlineare Sättigungs- als auch durch nichtlineare Kompetitionsexperimente bestimmt. Die Bestimmung durch lineare Transformation (Scatchard Plot) diente zur graphischen Darstellung der Sättigungsbindung (Abbildung 9). Für die Berechnung der  $K_i$ -Werte von Dihydrocodein, seinen Metaboliten und den Kontrollsubstanzen wurde der bei der Kompetition ermittelte  $K_D$ -Wert herangezogen (siehe Kapitel 3.2.1).

Der für [ $^3\text{H}$ ]-Diprenorphin ermittelte  $K_D$ -Wert liegt mit 18,3 nmol/l im niedrigen nanomolaren Bereich. Vergleichswerte, die unter denselben Versuchsbedingungen ermittelt wurden, sind bisher nicht publiziert worden. Vielmehr wurden die  $K_D$ -Werte entweder an intakten, undifferenzierten Zellen oder an differenzierten und undifferenzierten Zellmembranpräparationen bestimmt. Die hierbei gemessenen  $K_D$ -Werte waren kleiner als 1 nmol/l [22, 27, 55, 56].

Die für die Prüfsubstanzen (mit Ausnahme von DHM3G) ermittelten  $K_i$ -Werte waren - wie bereits oben erwähnt - einheitlich etwa um den Faktor 70 größer als die entsprechenden Werte am  $\mu$ -OR der Hirnmembranpräparationen. Dadurch veränderten sich auch praktisch nicht die Verhältnisse der einzelnen Substanzen untereinander, so dass die Schlussfolgerungen aus Kapitel 4.1 in diesen Untersuchungen an intakten und ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen bestätigt werden konnten. Auch die in Kapitel 4.1 aufgelisteten Einschränkungen gelten mit der am Anfang dieses Kapitels genannten Ausnahme ebenfalls für die Bindungsversuche an den Zellen.

### **4.3 AKTIVITÄTSPROFILE VON DIHYDROCODEIN UND SEINEN METABOLITEN IN HUMANEN NEUROBLASTOMZELLEN**

Größter Nachteil von Rezeptorbindungsstudien ist der fehlende Nachweis, dass es sich bei der Bindungsstelle tatsächlich um einen Rezeptor handelt, d. h. dass der Rezeptor mit einer Funktion verknüpft ist. Aus diesem Grund wurden in den weiteren Untersuchungen Aktivitätsprofile der Prüfsubstanzen in intakten, adhärenen und ausdifferenzierten Zellen der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y erstellt. Im Unterschied zu den Bindungsversuchen wurden in diesen Untersuchungen die Zellen in ihrem Zellverband belassen.



Alle Opioid-Rezeptoren inhibieren bei Stimulation G-Protein-gekoppelt Adenylatcyclasen und hemmen dadurch die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), das als second messenger eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion innerhalb der Zelle einnimmt (siehe Einleitung bzw. Childers [57] zur Übersicht). Die Aktivitätsprofile wurden daher durch Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration erstellt. Da die basalen cAMP-Konzentrationen nur wenige pg/ml betragen und eine Änderung dieser geringen Konzentrationen praktisch nicht messbar war, wurde Forskolin als Aktivator der Adenylatcyclase eingesetzt [24]. Um den unkontrollierten Abbau von cAMP zu unterbinden, wurde die unselektive Phosphodiesterase IBMX verwendet [58].

Die Inhibitionsisothermen der stimulierten cAMP-Akkumulation sind in Abbildung 11 dargestellt. Die  $IC_{50}$ -Werte für die inhibitorischen Prüfsubstanzen sind in Tabelle 6 aufgeführt und repräsentieren die Konzentrationen bei 50%iger Hemmung des maximalen Effektes. Vergleichswerte, die unter denselben Versuchsbedingungen ermittelt wurden, sind für DHC und seine Metaboliten bisher nicht publiziert worden. Allein für die Kontrollsubstanzen liegen vereinzelte Daten vor. So ermittelten Yu und Sadée [23] für Morphin einen  $IC_{50}$  von 50-100 nmol/l, der praktisch identisch mit dem Wert in der vorliegenden Arbeit war. Die Hill-Koeffizienten lagen bis auf wenige Ausnahmen im Bereich von  $-0,8$  bis  $-1,2$ , was in Übereinstimmung mit Cheng *et al.* [22] vermutlich auf einen  $\mu$ -selektiven Effekt der aktiven Prüfsubstanzen zurückzuführen war (siehe auch Kapitel 4.2).

Der maximale Hemmeffekt der cAMP-Akkumulation lag im Bereich von 60 bis 70% und war damit mit den in der Literatur angegebenen Werten identisch (z. B. Yu und Sadée [23]).

Die intrinsischen Aktivitäten von DHM und DHM6G waren etwa um den Faktor 200 größer als die von DHC, während die anderen Metaboliten (mit Ausnahme von DHM3G) vergleichbare Aktivitäten aufwiesen.

Zusammenfassend könnte man daher festhalten:

1. Alle Prüfsubstanzen mit Ausnahme des unwirksamen DHM3G sind vorwiegend  $\mu$ -selektive Agonisten.
2. Das prinzipielle Verhältnis der Affinitäten bzw. Aktivitäten der einzelnen aktiven Prüfsubstanzen zueinander war in allen Untersuchungen annähernd gleich, so dass sich für den Bereich der *in vitro*-Untersuchungen folgender Grundsatz ableiten lässt: Die

Affinitäten/Aktivitäten von DHM und DHM6G sind deutlich größer als die von DHC, während die anderen Metaboliten (mit Ausnahme des unwirksamen DHM3G) vergleichbare Affinitäten/Aktivitäten besitzen.

#### **4.4 PHARMAKOKINETISCHE UND PHARMAKODYNAMISCHE PARAMETER VON DIHYDROCODEIN UND SEINEN METABOLITEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES CYP2D6-PHÄNOTYPS**

Die *in vitro*-Untersuchungen bestätigten die Hypothese, dass DHM und DHM6G deutlich wirksamer sind als DHC. *In vivo* tragen sie daher möglicherweise zur Wirkung von DHC bei, auch wenn sie nur in geringen Konzentrationen gebildet werden. Voraussetzung ist allerdings, dass wirksame Konzentrationen am Rezeptor erreicht werden.

Für die Lösung dieses Problems, d. h. den Beitrag von wirksamen Metaboliten zur pharmakologischen Gesamtwirkung zu bestimmen, sind verschiedene experimentelle Methoden entwickelt worden. Zum einen kann man den wirksamen Metaboliten alleine applizieren, zum anderen kann man den metabolischen Abbauweg des wirksamen Metaboliten hemmen und zuletzt kann man pharmakologische Effekte in Subpopulationen bestimmen, die bezüglich der metabolischen Abbauwege des wirksamen Metaboliten polymorph sind.

Da die Biotransformation von DHC eben diesen zuletzt genannten Polymorphismus zeigt (siehe Kapitel 1.2.1), wurden im nächsten Schritt im Rahmen einer Probandenstudie Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von DHC und seinen Metaboliten unter Berücksichtigung des CYP2D6-Phänotyps nach Einmalgabe von 60 mg DHC bestimmt (Abbildungen 12 und 13). Die Konzentrations-Zeit-Verläufe von DHC entsprachen den in der Literatur angegebenen Daten [59]. Wird der CYP2D6-Phänotyp berücksichtigt, dann waren die pharmakokinetischen Daten von DHC (Tabelle 7) relativ vergleichbar mit denen von Fromm *et al.* (mittlere  $AUC_{DHC}$  3896 (EM) gegenüber 4350 (PM) nmol·h/l [32]) und Ammon *et al.* (mittlere  $AUC_{DHC}$  3415 (EM) nmol·h/l [60]). Relativ deshalb, weil sich die Daten von Fromm *et al.* und Ammon *et al.* auf die Applikation von jeweils nur 40,1 mg DHC-Base bezogen. Plasmakonzentrationen für DHM, DHM3G und DHM6G konnten in den PM im Gegensatz zu Fromm *et al.* und Wilder-Smith *et al.* [61] nicht bestimmt werden, da die

Nachweisgrenzen mit 10-30 nmol/l aufgrund der weniger sensitiven HPLC-Analytik etwa um den Faktor 100 höher lagen.

Bezüglich der Urinausscheidung war kein Unterschied zwischen DHC und DHC6G in EM und PM zu beobachten. NDHC hingegen wurde signifikant weniger in EM als in PM ausgeschieden. Dies ist vermutlich auf eine Substratverschiebung zu CYP3A-Enzymen in PM zurückzuführen, da diese Enzyme vorwiegend die Bildung von NDHC katalysieren [62].

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten pharmakokinetischen Ergebnisse bestätigen in der Literatur angegebene Daten und belegen, dass CYP2D6 wesentlich für die Bildung von DHM und seinen Glucuroniden ist. Darüber hinaus konnten weitere pharmakokinetische Daten, insbesondere jeweils gesondert für DHM, DHM3G und DHM6G in EM gemessen werden. Andere Arbeiten bestimmten nur DHM vor und nach Hydrolyse der Konjugate [32, 60, 61]. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die geringe Bildung von DHM und seinen Metaboliten (etwa 9%) die Ausscheidung von DHC sowohl in EM als auch in PM nicht beeinflusste.

Obwohl keine Unterschiede in der Pharmakokinetik von DHC selbst festgestellt werden konnten, könnten die beobachteten Unterschiede in der Pharmakokinetik der Metaboliten die Pharmakodynamik in EM und PM unterschiedlich beeinflussen.

Die pharmakodynamischen Untersuchungen mittels Pupillometrie ergaben im Vergleich zu Placebo einen signifikanten Effekt der DHC-Einnahme auf den ursprünglichen Pupillendurchmesser an den Zeitpunkten 1 bis 6 Stunden nach Gabe der Prüfmedikation bei EM und PM. Damit konnte zunächst eine eigene *in vivo*-Wirkung von DHC beim Menschen nachgewiesen werden. Allerdings ergaben sich - und das ist die für die Fragestellung dieser Arbeit wichtigere Erkenntnis - keine signifikanten Unterschiede in der Reagibilität zwischen EM und PM. Dieser fehlende Unterschied zwischen EM und PM könnte somit zur Schlussfolgerung führen, dass DHM und DHM6G trotz ihrer weitaus höheren Wirksamkeit wahrscheinlich nicht wesentlich zur pharmakologischen Wirkung von DHC beitragen. Einschränkend muss jedoch hier erwähnt werden, dass die Studie aufgrund der kleinen Fallzahl nur Pilotcharakter aufwies. Dieses aufgrund der Rezeptorbindungsstudien unerwartete Ergebnis könnte darüber hinaus durch das unterschiedliche Verhalten der Substanzen *in vivo* bezüglich Verteilung und Exkretion und der daraus resultierenden Affinität bzw. Aktivität am Rezeptor im Vergleich zu den konstanten Bedingungen *in vitro* begründet werden. Derartige Unterschiede in den *in vivo*- und *in vitro*-Daten sind zum Beispiel für das

chemisch verwandte Opioid Morphin-6-*O*- $\beta$ -D-glucuronid (M6G) berichtet worden. *In vivo* zeigte M6G eine höhere analgetische Potenz als Morphin. *In vitro* hingegen hatten Morphin und M6G vergleichbare Affinitäten am  $\mu$ -OR [63]. Gleichmaßen war der 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronidierte Metabolit (M3G) in der Lage, den analgetischen Effekt von Morphin zu antagonisieren, obwohl er nur eine geringe Affinität zum  $\mu$ -OR aufwies [63].

Im zweiten pharmakodynamischen Modell (Schmerzswellenmodell) konnten bezüglich der Parameter R-III-Reflexschwelle und VAS-EC<sub>50</sub> keine Unterschiede sowohl zwischen EM und PM als auch zwischen Placebo und EM bzw. PM festgestellt werden. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein: Zu kleine Fallzahl (Pilotcharakter der Studie), keine analgetische Wirkung von 60 mg DHC, ungeeignetes Schmerzmodell (für die Ermittlung der analgetischen Potenz von 60 mg DHC).

Es existieren nur wenige Daten über die Pharmakodynamik von DHC. Wilder-Smith *et al.* ermittelten nach Gabe von 60 mg DHC keinen signifikant unterschiedlichen Effekt auf die untersuchten Schmerzswellen zwischen EM und Quinidin-induzierten PM [61]. In einer anderen Studie wurde die analgetische Wirksamkeit von 60, 90 und 120 mg DHC auf Kälte-induzierten Schmerz („Cold-Pressor-Test“) erforscht. Dabei stellte sich heraus, dass nur die Dosen von 90 und 120 mg analgetisch wirksam waren [64]. Im Tiermodell wurde als Messmethode für den Schmerz die nozizeptive Aktivität von DHC und DHM im Thalamus von Ratten untersucht. Jurna *et al.* kamen hierbei zum Ergebnis, dass die durch DHC erzeugte Analgesie unabhängig von der Biotransformation zu DHM war [65]. In einer von Webb *et al.* durchgeführten PK/PD-Modell-Analyse wurde die analgetische Wirksamkeit von 60 mg DHC im „Cold-Pressor-Test“ untersucht. Dabei kam die Arbeitsgruppe zur Schlussfolgerung, dass die analgetischen Effekte hauptsächlich auf DHC und nicht auf DHM zurückzuführen waren und deshalb polymorphe Unterschiede in der Biotransformation von DHC zu DHM keine bzw. nur geringe Auswirkungen auf die Analgesie haben sollten [66].

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten pharmakodynamischen Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied im Pupillendurchmesser innerhalb der ersten 6 Stunden zwischen Placebo einerseits und EM bzw. PM andererseits. Allerdings ergab sich kein signifikanter Unterschied im Pupillendurchmesser zwischen EM und PM. Dieses Ergebnis in Zusammenhang mit den angegebenen Literaturdaten unterstützt die Schlussfolgerung, dass die pharmakologisch wesentlich aktiveren Metaboliten DHM und DHM6G nicht oder nur geringfügig zur Wirkung von DHC nach oraler Einzelgabe von 60 mg DHC beitragen. Inwieweit der CYP2D6-Phänotyp allerdings bei höheren Einzeldosen, insbesondere in der

Substitutionstherapie von Heroinabhängigen, in der bis zu 3000 mg Dihydrocodein pro Tag appliziert werden [67], eine Rolle spielen könnte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die in der vorliegenden Arbeit applizierte Dosis von 60 mg DHC-Base bereits der vom pharmazeutischen Unternehmer angegebenen Tageshöchstdosis entsprach. Somit sind höhere Dosen - mit Ausnahme in der Substitutionstherapie - therapeutisch eher von geringerem Interesse. In der Substitutionstherapie wiederum werden die Dosen empirisch, d. h. nach Wirkung ermittelt, so dass praktisch keine feststehenden Dosierungsschemata existieren. Sofern der CYP2D6-Phänotyp also in der Therapie von Heroinabhängigen eine Rolle spielen sollte, müssten die Dosen bei EM im Vergleich zu PM relativ niedriger sein, da die CYP2D6-abhängige *O*-Demethylierung von DHC in EM nicht sättigbar ist [60], auch wenn Dosen bis zu 1800 mg/Tag appliziert werden [68]. Trotzdem ließen sich aus dieser Erkenntnis keine feststehenden Dosierungsschemata ableiten, da die Toleranzentwicklung als wesentliche dosierungsbestimmende Größe von Abhängigem zu Abhängigem unterschiedlich ausgeprägt ist. Die Kenntnis des CYP2D6-Phänotyps wäre dann ggf. zwar für die grobe Dosisfindung von Vorteil, die exakte Dosis an sich müsste aber trotzdem nach wie vor empirisch ermittelt werden.

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

---

Dihydrocodein wird im wesentlichen zu Dihydrocodein-6-*O*- $\beta$ -D-glucuronid (DHC6G), Dihydromorphin (DHM), Dihydromorphin-3-*O*- $\beta$ -D-glucuronid (DHM3G), Dihydromorphin-6-*O*- $\beta$ -D-glucuronid (DHM6G) und Nordihydrocodein (NDHC) biotransformiert. In Analogie zu Codein wird vermutet, dass die Metaboliten DHM und DHM6G pharmakologisch deutlich aktiver als die Muttersubstanz sind und somit zur Wirkung von DHC wesentlich beitragen können, auch wenn sie nur in geringen Mengen gebildet werden. Da die *O*-Demethylierung von Dihydrocodein zu Dihydromorphin durch das polymorphe Cytochrom P450-Enzym CYP2D6 katalysiert wird, sind in EM und PM unterschiedliche Metabolitenprofile zu beobachten. In etwa 5-10% der Kaukasier, die PM für CYP2D6 sind, könnte sich somit ein Therapiemisserfolg nach Gabe von therapeutisch empfohlenen Standarddosen an DHC einstellen.

Es war daher Ziel der vorliegenden Arbeit, die Bedeutung der Biotransformation für die Wirkung von Dihydrocodein beim Menschen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Affinitätsprofile an Hirnmembranpräparationen und Affinitäts- und Aktivitätsprofile an humanen Neuroblastomzellen für DHC und seine Metaboliten erstellt. Des Weiteren wurden pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter (und deren Zusammenhang) von Dihydrocodein und seinen Metaboliten beim gesunden Menschen unter Berücksichtigung des CYP2D6-Phänotyps mit Hilfe einer Pilot-Probandenstudie bestimmt. Zuletzt wurden die Ergebnisse der Affinitäts- und Aktivitätsversuche mit den Ergebnissen der Probandenstudie unter Berücksichtigung der verfügbaren Literaturdaten in Zusammenhang gebracht.

Die *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass alle Prüfsubstanzen mit Ausnahme des unwirksamen DHM3G vorwiegend  $\mu$ -selektive Agonisten waren und dass das prinzipielle Verhältnis der Affinitäten bzw. Aktivitäten der einzelnen aktiven Prüfsubstanzen zueinander in allen Untersuchungen annähernd gleich war. Auf Grundlage dieser Daten konnte folgender Grundsatz formuliert werden: Die Affinitäten/Aktivitäten von DHM und DHM6G waren etwa um den Faktor 100 größer als die von DHC, während die anderen Metaboliten (mit Ausnahme des unwirksamen DHM3G) vergleichbare Affinitäten/Aktivitäten besaßen.

Die im Rahmen der Probandenstudie ermittelten pharmakokinetischen Werte bestätigten verfügbare Literaturdaten, insbesondere dass CYP2D6 wesentlich für die Bildung von DHM war. So konnten weder DHM, DHM3G noch DHM6G in Plasma und Urin von PM detektiert werden. Die pharmakodynamischen Untersuchungen mittels Pupillometrie zeigten einen signifikanten Unterschied im ursprünglichen Pupillendurchmesser an den Zeitpunkten 1 bis 6 Stunden zwischen Placebo einerseits und EM bzw. PM andererseits. Damit konnte zunächst eine eigene *in vivo*-Wirkung von DHC beim Menschen nachgewiesen werden. Jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen EM und PM. Im zweiten pharmakodynamischen Modell (Schmerzmodell) konnten bezüglich der Parameter R-III-Reflexschwelle und VAS-EC<sub>50</sub> keine Unterschiede sowohl zwischen EM und PM als auch zwischen Placebo und EM bzw. PM festgestellt werden, so dass 60 mg DHC keine analgetische Wirkung hatte oder das Modell für die Ermittlung der analgetischen Potenz von 60 mg DHC ungeeignet war. Einschränkend muss jedoch hier erwähnt werden, dass die Studie aufgrund der kleinen Fallzahl nur Pilotcharakter aufwies.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Zusammenhang mit den verfügbaren Literaturdaten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die pharmakologisch wesentlich aktiveren Metaboliten DHM und DHM6G nicht oder nur geringfügig zur Wirkung von DHC nach oraler Einzelgabe von 60 mg DHC beitragen. Gründe hierfür könnten die geringe Bildung von DHM und seinen Metaboliten (ca. 9%) und/oder durch Verteilung und Ausscheidung bedingte niedrige Konzentrationen am Rezeptor *in vivo* sein. Somit scheint die Biotransformation keine Bedeutung für die Wirkung von DHC zu haben. Entsprechend sind keine Unterschiede in der Therapie von EM und PM mit niedrigen therapierelevanten DHC-Dosen zu erwarten.

---

## 6 TABELLEN

---



**Tabelle 1:** Charakteristika der Versuchspersonen. Angegebene Zahlenwerte sind Mittelwerte  $\pm$  SD (n = Anzahl der Probanden, BMI = „Body Mass Index“).

<b>CYP2D6- Phänotyp</b>	<b>n =</b>	<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>Körpergröße (cm)</b>	<b>Körpergewicht (kg)</b>	<b>Alter (Jahre)</b>
<b>EM</b>	5	24,9 ± 1,1	184 ± 2,6	84,4 ± 5,4	27,6 ± 2,1
<b>PM</b>	4	25,2 ± 2,8	182 ± 2,8	83,7 ± 10,2	28,0 ± 2,9

**Tabelle 2:** Studienablaufschemata („Study Flow Chart“).

Uhrzeit (zur groben Orien- tierung)	Zeit nach Einnahme der Prüf- lösung (Stunden, Minuten)	Abnahme der Blut- proben (B), Samm- lung der Urin- proben (UX)*	Messungen mittels Pupillometrie (P) unmittelbar <u>vor</u> der Blutentnahme	Messungen mittels Schmerzmodell (S) unmittelbar <u>nach</u> der Blutentnahme	Messungen Blutdruck/ Puls/ Atemfrequenz (BPA) in Rückenlage ( <u>vor</u> Schmerzmodell), Frage nach Uner- wünschten Ereignissen (UE), sonstiges	
07.00	-01.00		[U1] P**	S**	Aufnahme auf die Probandenstation, Abfrage von Veränderungen	
07.45	-00.15	B				
08.00	00.00		U1] [U2]		Einnahme der Prüf- lösung, unmittelbar davor BPA, UE	
08.10	00.10	B				
08.20	00.20	B				
08.30	00.30	B			BPA	
08.45	00.45	B				
09.00	01.00	B		P	S	BPA, UE, im Anschluss Frühstück
09.30	01.30	B				BPA
10.00	02.00	B	U2] [U3]	P	S	BPA, UE, 200 ml Mineralwasser
10.30	02.30	B				
11.00	03.00	B		P	S	
12.00	04.00	B	U3] [U4]	P	S	BPA, UE, ab 4. h freie Flüssigkeitsaufnahme (Mineralwasser)
13.00	05.00	B				im Anschluss Mittagessen
14.00	06.00	B		P	S	
16.00	08.00	B	U4] [U5]	P	S	BPA, UE
18.00	10.00					Abendessen
20.00	12.00	B	U5] [U6]	P	S	BPA, UE, im Anschluss Imbiss
00.00	16.00	B	U6] [U7]	P	S	BPA, UE
08.00	24.00	B	U7]	P	S	BPA, UE, im Anschluss Frühstück, danach Entlassung.

\*) Die nach dem U folgende Ziffer gibt den jeweiligen Sammelzeitraum an (Anfang und Ende des Zeitraums enthalten dieselbe Ziffer), U1 = Morgenurin.

\*\*\*) Die ersten Messungen wurden innerhalb einer Stunde vor Gabe der Prüflösung durchgeführt.

Zwischen beiden Prüfphasen war eine Auswaschperiode von mindestens 7 Tagen.

**Tabelle 3:**  $K_D$ - und  $B_{max}$ -Werte der spezifischen Agonisten [ $^3H$ ]-DAMGO ( $\mu$ -OR), [ $^3H$ ]-DPDPE ( $\delta$ -OR) und [ $^3H$ ]-U69,593 ( $\kappa$ -OR) ermittelt durch verschiedene Messmethoden. Die spezifischen Agonisten wurden in Konzentrationen von 0,1 bis 20 nmol/l (Sättigungsexperimente) bzw. 0,5, 1,0 und 1,0 nmol/l (Kompetitionsexperimente) eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde durch Inkubation mit 100  $\mu$ mol/l des entsprechenden nichtradioaktiv-markierten Liganden bestimmt. Die angegebenen Werte ( $K_D$  in nmol/l und  $B_{max}$  in fmol/mg Protein) repräsentieren den Median (SEM) von  $n = 3-7$  unabhängigen Experimenten.

	<b>[<sup>3</sup>H]-DAMGO</b> <b>(μ-OR)</b>		<b>[<sup>3</sup>H]-DPDPE</b> <b>(δ-OR)</b>		<b>[<sup>3</sup>H]-U69,593</b> <b>(κ-OR)</b>	
<b>Sättigungsexperimente (nichtlineare Regression)</b>						
K <sub>D</sub>	4,3	(0,8)	3,5	(1,3)	4,8	(0,9)
B <sub>max</sub>	104	(17,7)	81	(12,7)	159	(17,7)
n =	4		4		3	
<b>Sättigungsexperimente (lineare Regression - Scatchard Plot)</b>						
K <sub>D</sub>	2,6	(0,3)	3,0	(0,4)	3,5	(0,3)
B <sub>max</sub>	81	(10,7)	80	(6,4)	142	(8,2)
n =	4		4		3	
<b>Kompetitionsexperimente (nichtlineare Regression)</b>						
K <sub>D</sub>	2,2	(0,2)	3,0	(0,4)	2,9	(0,2)
n =	4		7		4	

**Tabelle 4:**  $K_i$ -Werte (nmol/l) für die Verdrängung der spezifischen Agonisten durch Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen an Opioid-Rezeptoren von Hirnmembranpräparationen des Meerschweinchens. Die spezifischen Agonisten [ $^3\text{H}$ ]-DAMGO, [ $^3\text{H}$ ]-DPDPE und [ $^3\text{H}$ ]-U69,593 wurden in konstanten Konzentrationen von 0,5, 1,0 und 1,0 nmol/l eingesetzt. Die angegebenen Werte repräsentieren den Median (SEM) von 3-8 unabhängigen Experimenten entsprechend den Abbildungen 5-7.

	<b>[<sup>3</sup>H]-DAMGO</b>		<b>[<sup>3</sup>H]-DPDPE</b>		<b>[<sup>3</sup>H]-U69,593</b>	
	<b>(μ-OR)</b>		<b>(δ-OR)</b>		<b>(κ-OR)</b>	
<b>DHC und seine wichtigsten Metaboliten</b>						
DHC	325	(12)	5905	(359)	14242	(466)
DHC6G	549	(15)	3089	(144)	395165	(20564)
DHM	2,5	(0,2)	137	(12)	223	(7)
DHM3G	> 10000		> 10000		> 10000	
DHM6G	4,5	(0,5)	111	(10)	6743	(537)
NDHC	430	(15)	7074	(122)	13707	(277)
<b>Kontrollsubstanzen</b>						
Codein	589	(17)	11442	(616)	18061	(793)
Morphin	4,9	(0,3)	273	(12)	206	(3)
Methadon	24,8	(2,1)	543	(27)	1674	(53)
Levomethadon	9,3	(1,1)	240	(15)	1492	(45)



**Tabelle 5:** Vergleich der Effekte von Glucuronidierung, 7,8-Dihydrierung, *N*- und 3-*O*-Dealkylierung auf die  $\mu$ -Rezeptoraffinität von Referenzopioiden. Die zum Vergleich herangezogenen Literaturwerte sind nicht in jedem Fall unter denselben experimentellen Bedingungen wie die der vorliegenden Arbeit ermittelt worden. Einzelheiten hierzu können den durch hochgestellte Buchstaben gekennzeichneten Literaturstellen entnommen werden.

Die angegebenen Zahlenwerte sind  $K_i$ -Werte in nmol/l.

**Referenzopioid**

<b>Dihydrocodein</b>	<b>Codein</b>	<b>Dihydromorphin</b>	<b>Morphin</b>
<b>Affinitäten der 3-O-Demethyl-Derivate</b>			
2,5	4,9 1,2 <sup>a</sup> 3,3-5,9 <sup>b</sup> 1,8 <sup>c</sup>	n. a.	n. a.
<b>Affinitäten der 7,8-Dihydro-Derivate</b>			
n. a.	325 240 <sup>c</sup>	n. a.	2,5
<b>Affinitäten der N-Demethyl-Derivate</b>			
430	267 <sup>a</sup>	keine Daten vorhanden	4,7 <sup>a</sup>
<b>Affinitäten der 6-O-Glucuronide</b>			
549 270 <sup>c</sup>	239 <sup>a</sup> 790 <sup>c</sup>	4,5	0,6 <sup>a</sup> 8,9-11,1 <sup>b</sup> 3,5 <sup>c</sup>
<b>Affinitäten der 3-O-Glucuronide</b>			
n. a.	n. a.	> 10000	37 <sup>a</sup> 360 <sup>c</sup>

n. a. = nicht anwendbar; <sup>a</sup> = Chen *et al.* [33]; <sup>b</sup> = Löser *et al.* [49]; <sup>c</sup> = Mignat *et al.* [50]

**Tabelle 6:**  $K_i$ -Werte (nmol/l) für die Verdrängung des unspezifischen Antagonisten [ $^3$ H]-Diprenorphin und  $IC_{50}$ -Werte für die Hemmung der Forskolin stimulierten cAMP-Akkumulation durch Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen an Opioid-Rezeptoren von intakten und ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. Der unspezifische Antagonist [ $^3$ H]-Diprenorphin wurde in einer Konzentrationen von 0,1 nmol/l, der Adenylatcyclase-Aktivator Forskolin in einer Konzentration von 10  $\mu$ mol/l und der unspezifische Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX in einer Konzentration von 0,2 mmol/l eingesetzt. Die angegebenen Werte repräsentieren den Median (SEM) von 5-11 unabhängigen Experimenten entsprechend den Abbildungen 10 und 11.

	Verdrängung von [ <sup>3</sup> H]- Diprenorphin (K <sub>i</sub> -Werte)		Hemmung der Forskolin- stimulierten cAMP- Akkumulation (IC <sub>50</sub> -Werte)	
<b>DHC und seine wichtigsten Metaboliten</b>				
DHC	19812	(2820)	7079	(1977)
DHC6G	56989	(7596)	4736	(888)
DHM	186	(24)	38	(8)
DHM3G	> 10000		> 10000	
DHM6G	366	(23)	28	(2)
NDHC	31727	(2467)	5449	(714)
<b>Kontrollsubstanzen</b>				
Codein	35785	(2705)	5517	(2599)
Morphin	549	(28)	109	(22)
Methadon	615	(82)	92	(12)
Levomethadon	421	(26)	37	(4)
Naloxon	-	-	> 100000	

**Tabelle 7:** Pharmakokinetische Parameter von DHC und seinen Metaboliten in EM und PM.

Angegebene Zahlenwerte sind Mittelwerte  $\pm$  SD.

u.d.B. = unterhalb der Bestimmungsgrenze, n.g. = nicht gemessen, \* =  $p < 0,05$

	<b>DHC</b>		<b>DHC6G</b>		<b>DHM</b>		<b>DHM3G</b>		<b>DHM6G</b>		<b>NDHC</b>	
	<b>EM</b>	<b>PM</b>	<b>EM</b>	<b>PM</b>	<b>EM</b>	<b>PM</b>	<b>EM</b>	<b>PM</b>	<b>EM</b>	<b>PM</b>	<b>EM</b>	<b>PM</b>
<b><i>Plasma</i></b>												
$C_{\max}$ (nmol/l)	853 ± 307	791 ± 49	1544 ± 216	1529 ± 288	29 ± 13	u.d.B.	141 ± 29	u.d.B.	28 ± 11	u.d.B.	n.g.	n.g.
$t_{\max}$ (h)	1,3 ± 0,9	1,4 ± 0,6	2,3 ± 0,7	2,9 ± 1,4	1,5 ± 0,9	u.d.B.	2,0 ± 0,6	u.d.B.	2,2 ± 0,9	u.d.B.	n.g.	n.g.
$t_{1/2}$ (h)	5,1 ± 1,8	4,3 ± 2,0	4,6 ± 0,4	4,9 ± 0,8	0,8 ± 0,4	u.d.B.	5,8 ± 2,4	u.d.B.	0,8 ± 0,5	u.d.B.	n.g.	n.g.
$AUC_{0-\infty}$ (nmol·h/L)	5188 ± 774	5448 ± 1587	13150 ± 750	15865 ± 3988	57 ± 11	u.d.B.	1300 ± 902	u.d.B.	66,4 ± 34,7	u.d.B.	n.g.	n.g.
Quotient $AUC_{DHC}/$ $AUC_{Metabolit}$	-	-	0,4	0,3	91	-	4	-	79	-	n.g.	n.g.
<b><i>Urin</i></b>												
$A_e$ (µmol/24 h)	36,6 ± 7,7	43,0 ± 11,7	86,2 ± 11,9	86,8 ± 11,2	1,2 ± 0,5	-	7,6 ± 2,3	-	0,8 ± 0,4	-	11,8 ± 2,3*	22,0 ± 2,8*

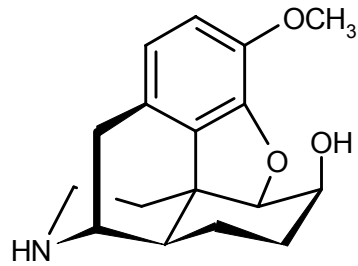
---

## 7 ABBILDUNGEN

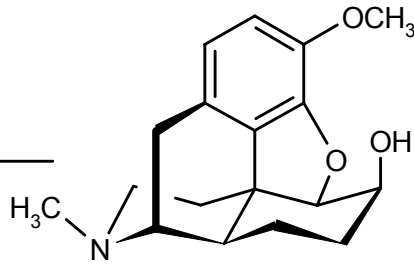
---

**Abbildung 1:** Strukturformeln von Dihydrocodein und seinen wichtigsten Metaboliten.

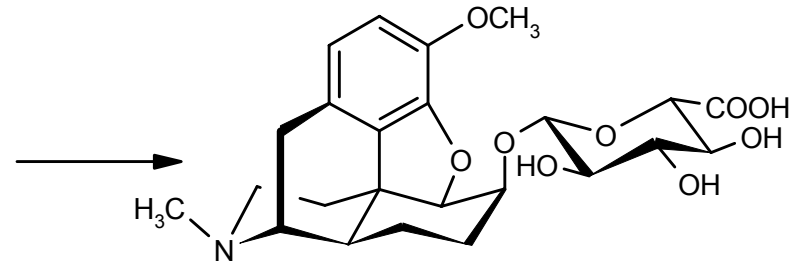




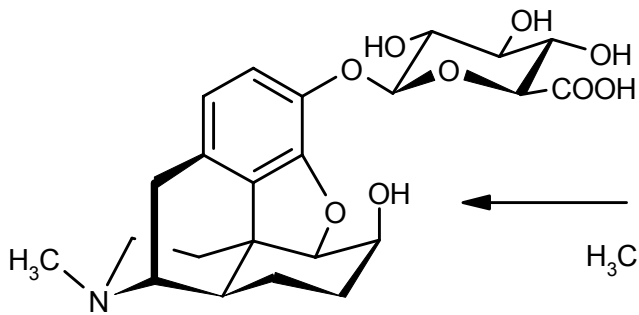
**Nordihydrocodein (NDHC)**



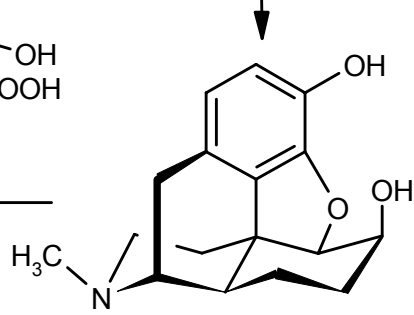
**Dihydrocodein (DHC)**



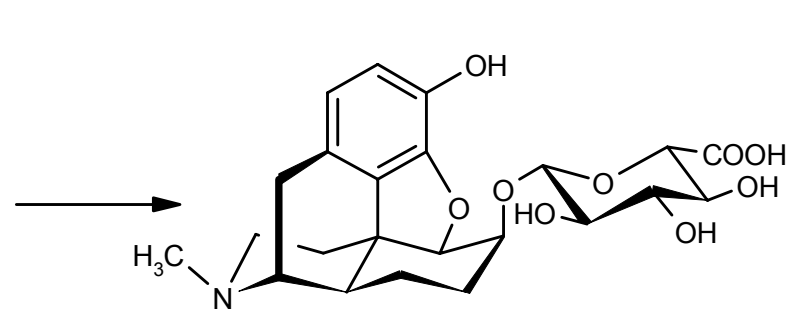
**Dihydrocodein-6-O-β-D-glucuronid (DHC6G)**



**Dihydromorphin-3-O-β-D-glucuronid (DHM3G)**

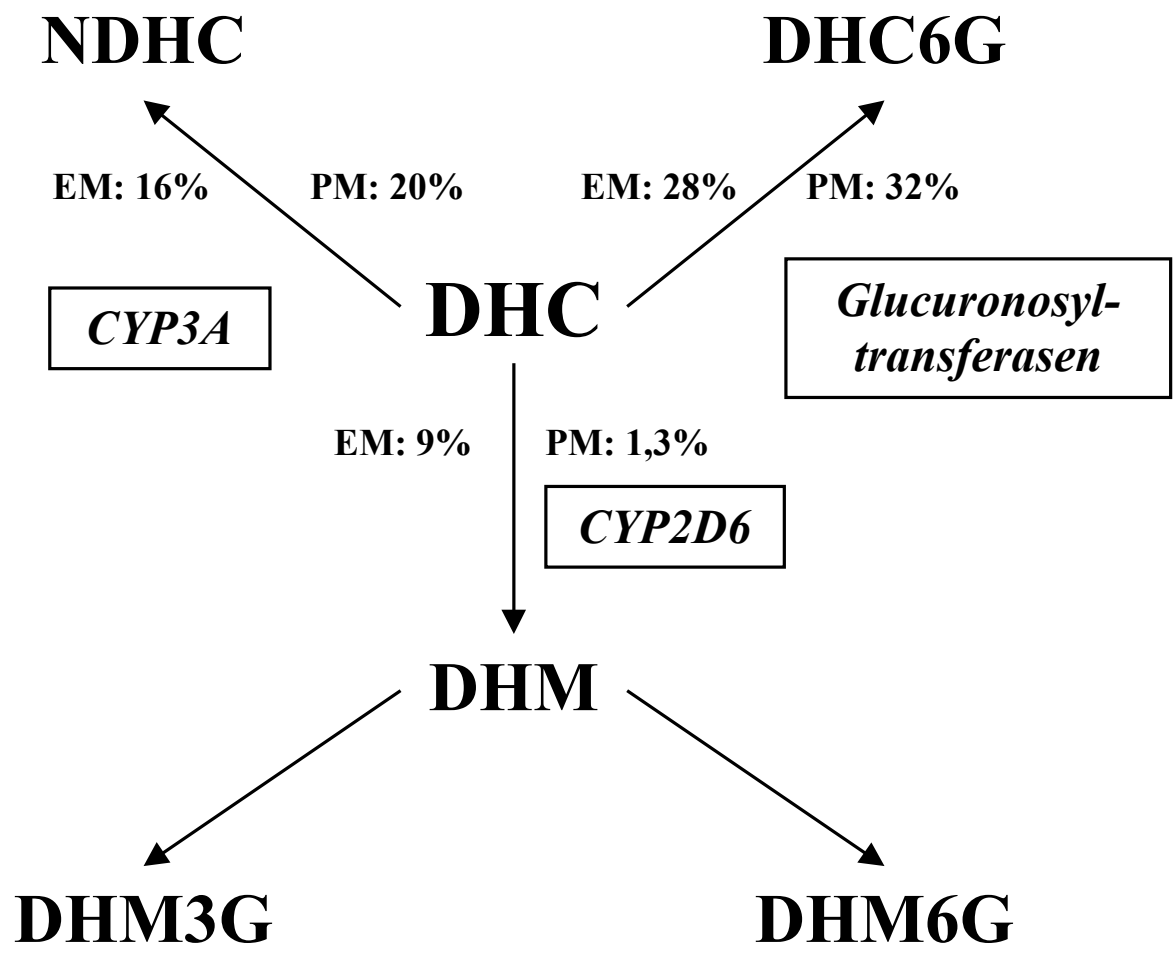


**Dihydromorphin (DHM)**



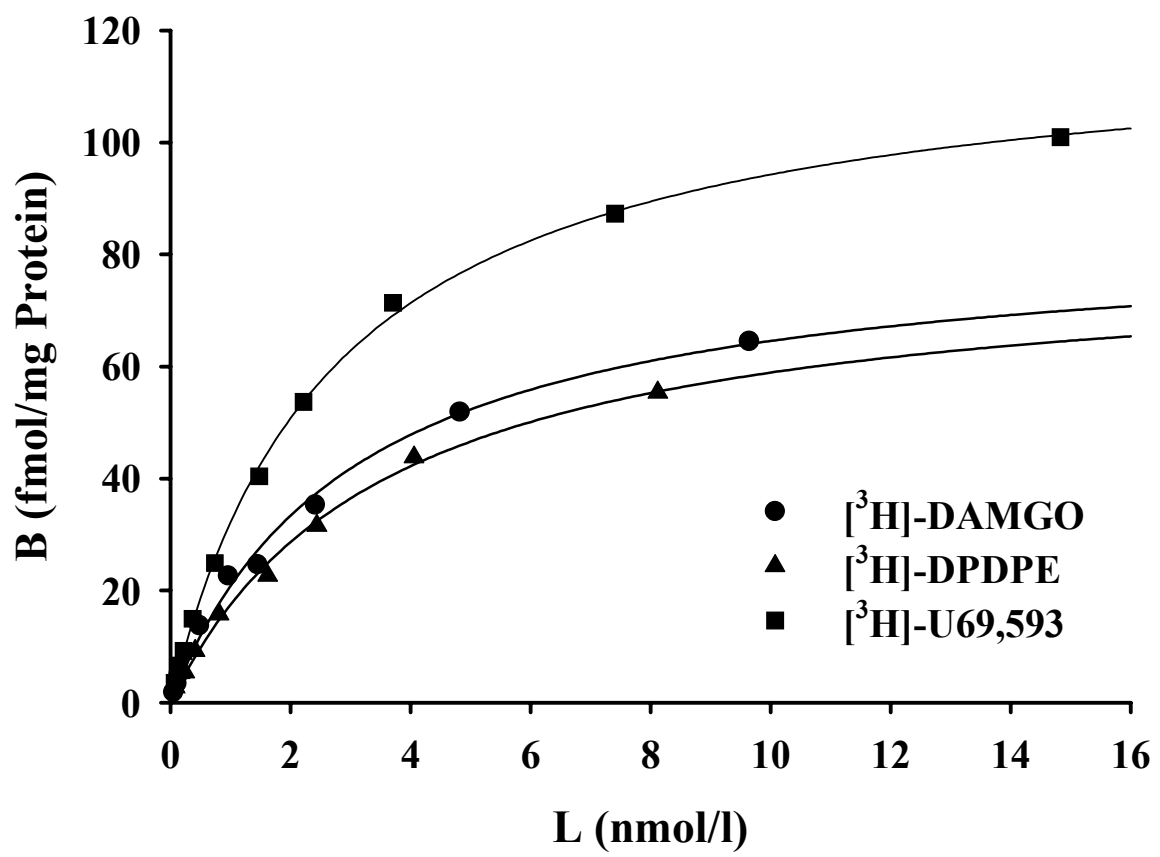
**Dihydromorphin-6-O-β-D-glucuronid (DHM6G)**

**Abbildung 2:** Biotransformation von DHC in EM and PM. Angegebene Prozentwerte entsprechen den Wiederfindungsraten der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten nach Gabe einer oralen Einzeldosis von 60 mg Dihydrocodeinhydrogentartrat (Daten aus Fromm *et al.* [32] und Kirkwood *et al.* [62, 69]).



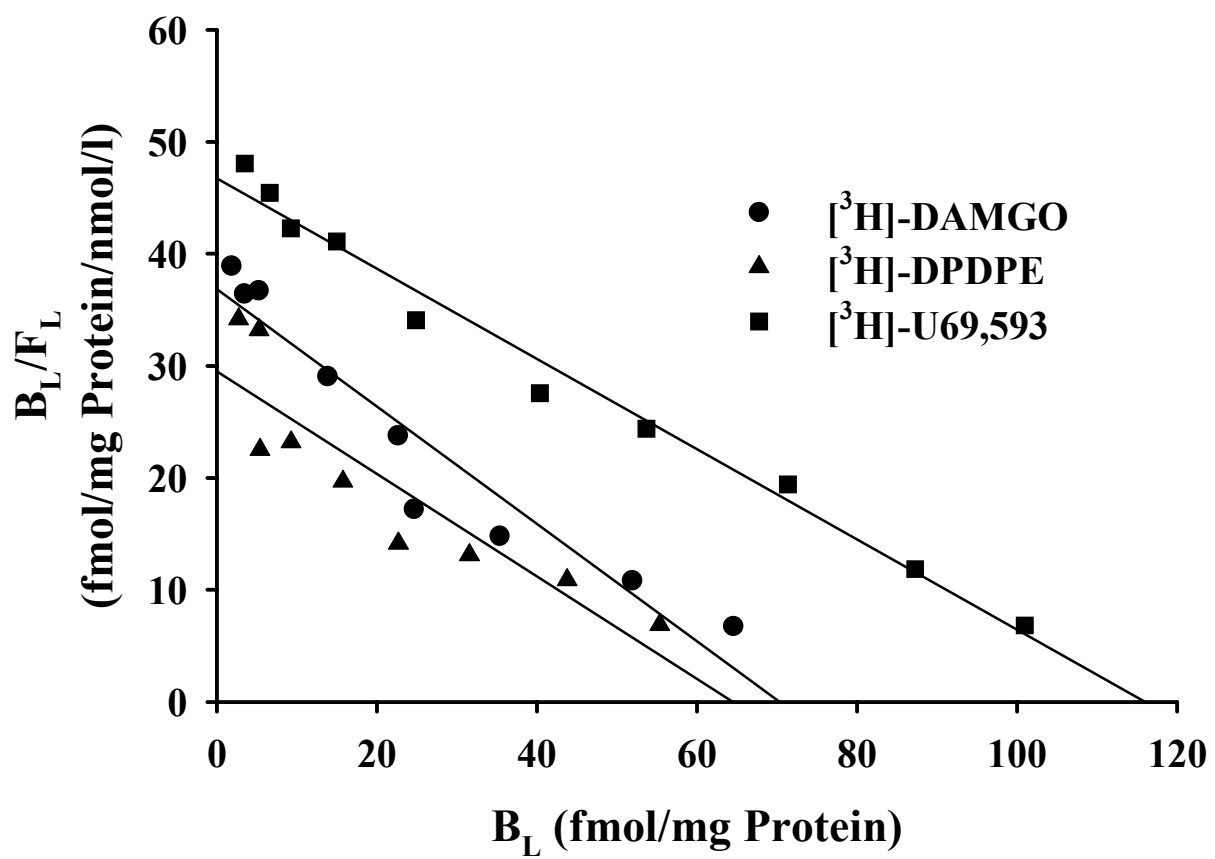
**Abbildung 3:** Repräsentative Sättigungsisothermen der spezifischen Agonisten [<sup>3</sup>H]-DAMGO ( $\mu$ -OR), [<sup>3</sup>H]-DPDPE ( $\delta$ -OR) und [<sup>3</sup>H]-U69,593 ( $\kappa$ -OR). Die spezifischen Agonisten wurden in Konzentrationen von 0,1 bis 20 nmol/l eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde durch Inkubation mit 100  $\mu$ mol/l des entsprechenden nichtradioaktiv-markierten Liganden bestimmt. Messpunkte entsprechen den Werten jeweils einer repräsentativen Messung. Die Anpassung der Kurven an die ermittelten Daten erfolgte durch nichtlineare Regression anhand der rektangulären hyperbolischen Funktion nach der im Abschnitt 2.7.1.1 angegebenen Gleichung (2).

In der zweidimensionalen Darstellung ist die eingesetzte Konzentration L in nmol/l auf der Abszisse und die spezifische Bindung  $B_L$  in fmol/mg Protein auf der Ordinate aufgetragen.



**Abbildung 4:** Repräsentative Sättigungsisothermen der spezifischen Agonisten [<sup>3</sup>H]-DAMGO ( $\mu$ -OR), [<sup>3</sup>H]-DPDPE ( $\delta$ -OR) und [<sup>3</sup>H]-U69,593 ( $\kappa$ -OR). Die spezifischen Agonisten wurden in Konzentrationen von 0,1 bis 20 nmol/l eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde durch Inkubation mit 100  $\mu$ mol/l des entsprechenden nichtradioaktiv-markierten Liganden bestimmt. Messpunkte entsprechen den Werten jeweils einer repräsentativen Messung. Die Anpassung der Geraden an die ermittelten Daten erfolgte durch lineare Regression anhand der im Abschnitt 2.7.1.2 angegebenen Geradengleichung (4) (Scatchard Plot).

In der zweidimensionalen Darstellung ist die spezifische Bindung  $B_L$  in fmol/mg Protein auf der Abszisse und der Quotient aus der spezifischen Bindung  $B_L$  und der freien, ungebundenen Radioaktivität  $F_L$  in fmol/mg Protein/nmol/l auf der Ordinate aufgetragen.

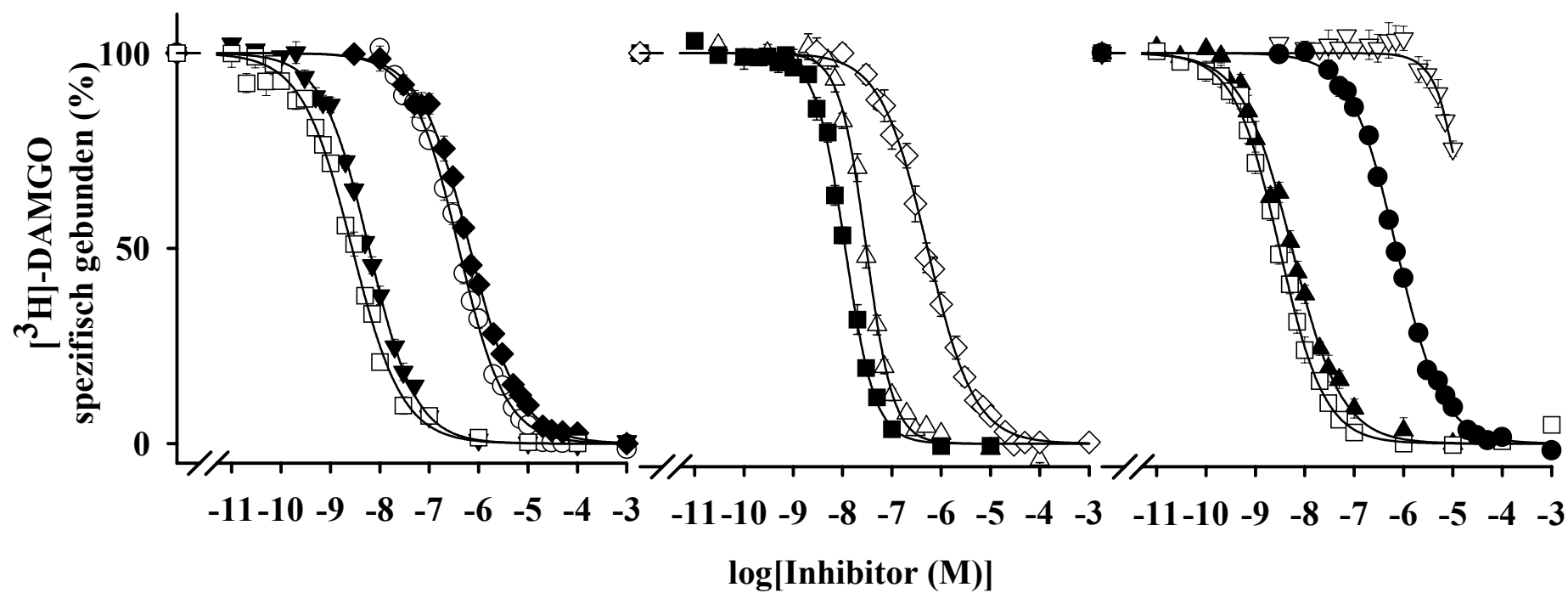


**Abbildung 5:** Kompetitionsisothermen von Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen an  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren ( $\mu$ -OR) von Hirnmembranpräparationen des Meerschweinchens. Als radioaktiv markierter Ligand wurde [ $^3$ H]-DAMGO in einer konstanten Konzentration von 0,5 nmol/l verwendet. Messpunkte repräsentieren den Median (SEM) von 4-8 unabhängigen Experimenten. Die Anpassung der Kurven an die ermittelten Daten erfolgte durch nichtlineare Regression anhand der sigmoidalen logistischen Funktion nach der im Abschnitt 2.7.2.2 angegebenen Gleichung.

In der zweidimensionalen Darstellung ist die eingesetzte Konzentration  $L_V$  der verdrängenden Substanzen logarithmisch in mol/l auf der Abszisse und die spezifische Radioligandenbindung  $B_{L\%}$  in Prozent auf der Ordinate aufgetragen.



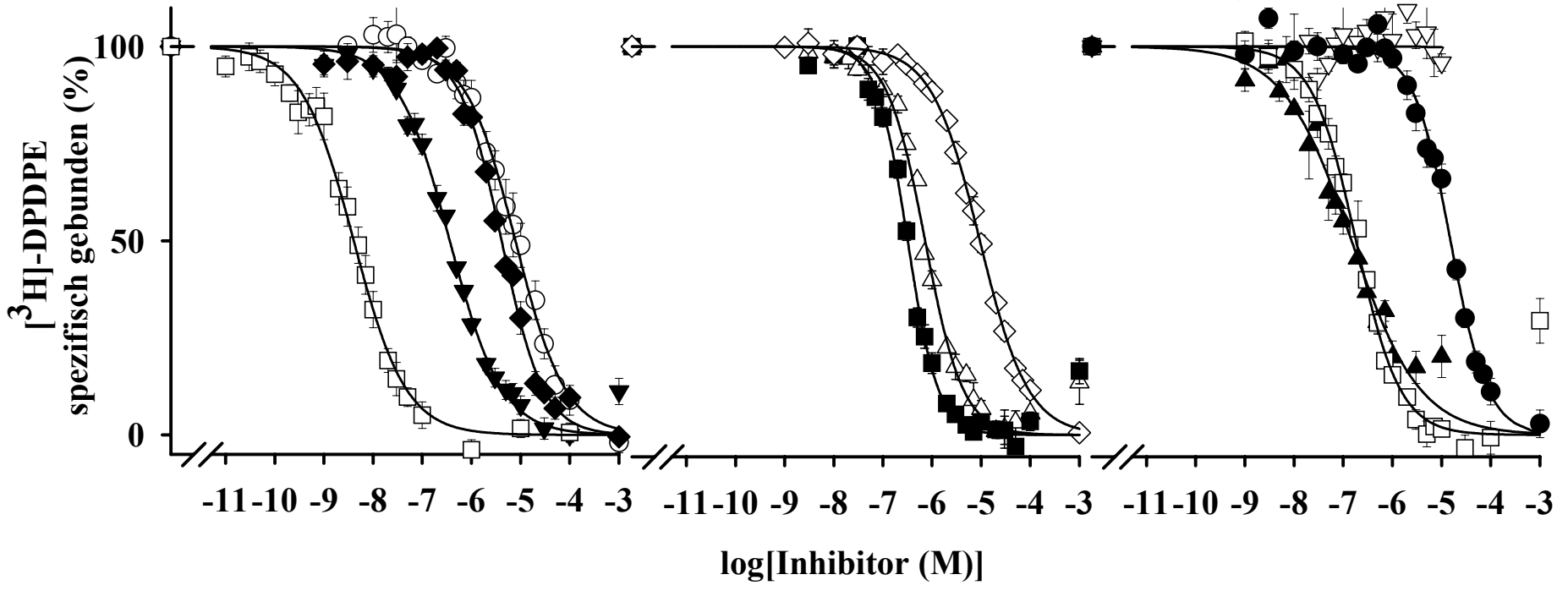
- |   |         |   |              |   |        |
|---|---------|---|--------------|---|--------|
| ○ | DHC     | △ | Methadon     | ▽ | DHM3G  |
| ◆ | DHC6G   | ■ | Levomethadon | ▲ | DHM6G  |
| ▼ | Morphin | ◇ | NDHC         | □ | DHM    |
| □ | DAMGO   |   |              | ● | Codein |



**Abbildung 6:** Kompetitionsisothermen von Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen an  $\delta$ -Opioid-Rezeptoren ( $\delta$ -OR) von Hirnmembranpräparationen des Meerschweinchens. Als radioaktiv markierter Ligand wurde [ $^3\text{H}$ ]-DPDPE in einer konstanten Konzentration von 1,0 nmol/l verwendet. Messpunkte repräsentieren den Median (SEM) von 4-7 unabhängigen Experimenten. Die Anpassung der Kurven an die ermittelten Daten erfolgte durch nichtlineare Regression anhand der sigmoidalen logistischen Funktion nach der im Abschnitt 2.7.2.2 angegebenen Gleichung.

In der zweidimensionalen Darstellung ist die eingesetzte Konzentration  $L_V$  der verdrängenden Substanzen logarithmisch in mol/l auf der Abszisse und die spezifische Radioligandenbindung  $B_{L\%}$  in Prozent auf der Ordinate aufgetragen.

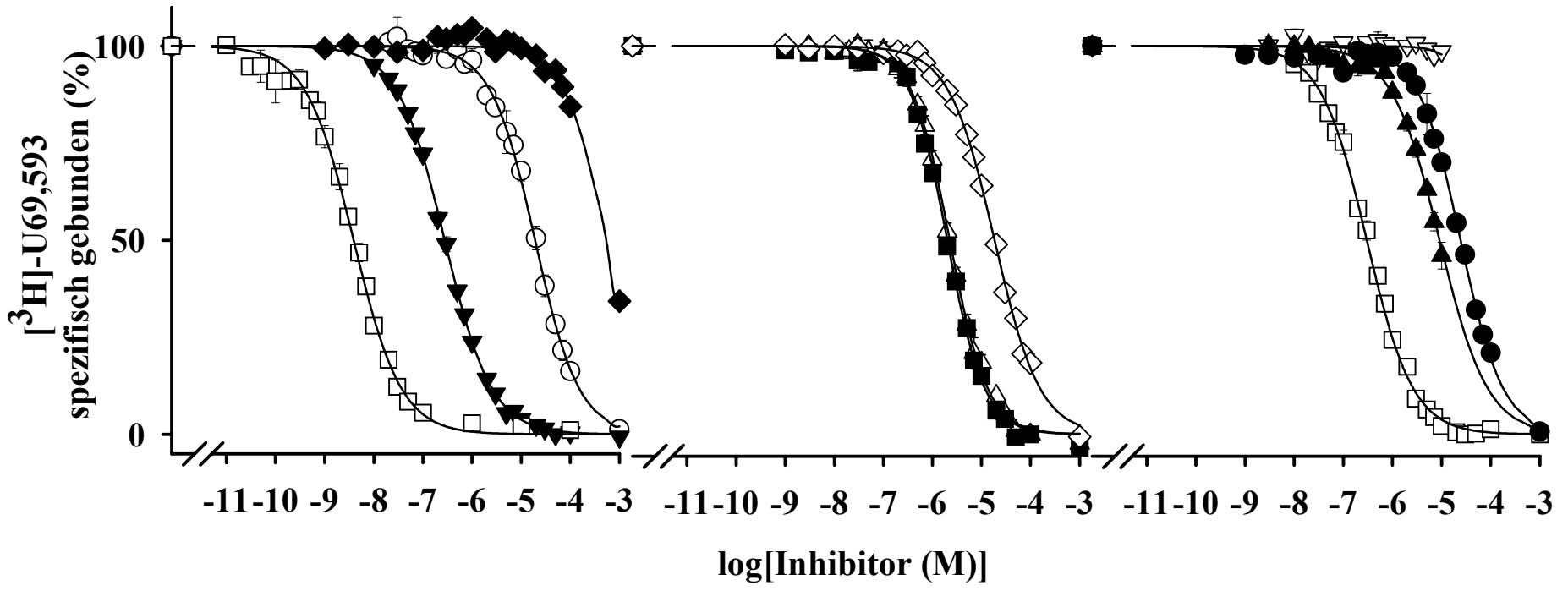
- |   |         |   |              |   |        |
|---|---------|---|--------------|---|--------|
| ○ | DHC     | △ | Methadon     | ▽ | DHM3G  |
| ◆ | DHC6G   | ■ | Levomethadon | ▲ | DHM6G  |
| ▼ | Morphin | ◇ | NDHC         | □ | DHM    |
| □ | DPDPE   |   |              | ● | Codein |



**Abbildung 7:** Kompetitionsisothermen von Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen an  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren ( $\kappa$ -OR) von Hirnmembranpräparationen des Meerschweinchens. Als radioaktiv markierter Ligand wurde [ $^3\text{H}$ ]-U69,593 in einer konstanten Konzentration von 1,0 nmol/l verwendet. Messpunkte repräsentieren den Median (SEM) von 3-8 unabhängigen Experimenten. Die Anpassung der Kurven an die ermittelten Daten erfolgte durch nichtlineare Regression anhand der sigmoidalen logistischen Funktion nach der im Abschnitt 2.7.2.2 angegebenen Gleichung.

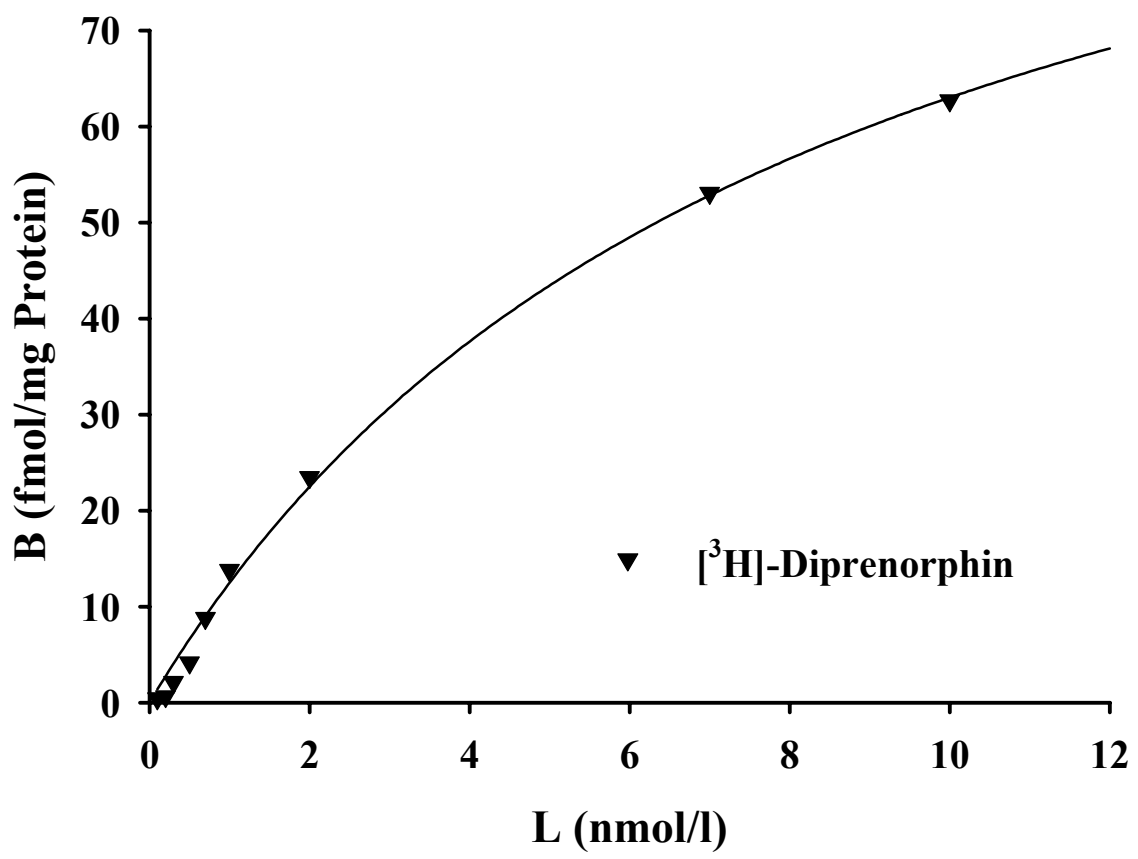
In der zweidimensionalen Darstellung ist die eingesetzte Konzentration  $L_V$  der verdrängenden Substanzen logarithmisch in mol/l auf der Abszisse und die spezifische Radioligandenbindung  $B_{L\%}$  in Prozent auf der Ordinate aufgetragen.

- |   |         |   |              |   |        |
|---|---------|---|--------------|---|--------|
| ○ | DHC     | △ | Methadon     | ▽ | DHM3G  |
| ◆ | DHC6G   | ■ | Levomethadon | ▲ | DHM6G  |
| ▼ | Morphin | ◇ | NDHC         | □ | DHM    |
| □ | U69,593 |   |              | ● | Codein |



**Abbildung 8:** Repräsentative Sättigungsisotherme des unspezifischen Antagonisten [<sup>3</sup>H]-Diprenorphin. Der unspezifische Antagonist wurde in Konzentrationen von 0,1 bis 10 nmol/l eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde durch Inkubation mit 10 μmol/l Diprenorphin bestimmt. Messpunkte entsprechen den Werten einer repräsentativen Messung. Die Anpassung der Kurve an die ermittelten Daten erfolgte durch nichtlineare Regression anhand der rektangulären hyperbolischen Funktion nach der im Abschnitt 2.7.1.1 angegebenen Gleichung (2).

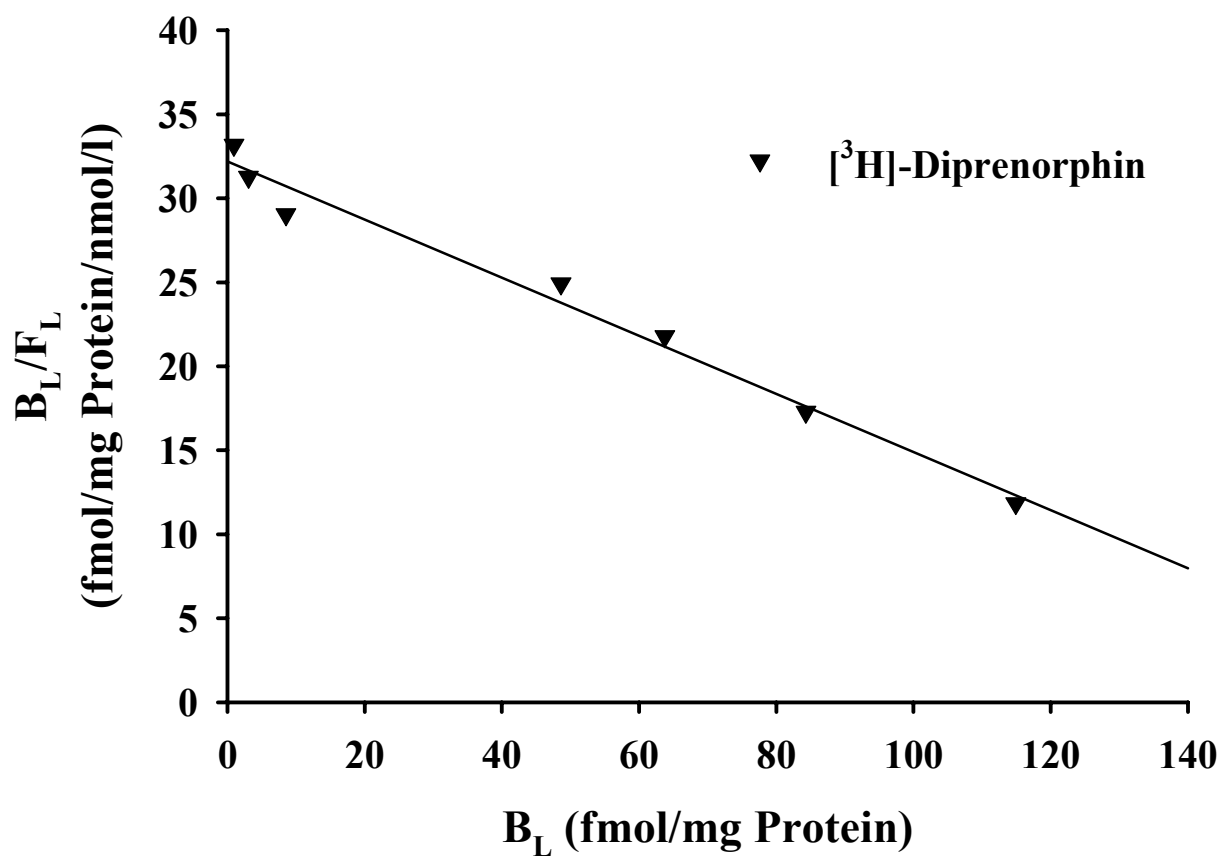
In der zweidimensionalen Darstellung ist die eingesetzte Konzentration  $L$  in nmol/l auf der Abszisse und die spezifische Bindung  $B_L$  in fmol/mg Protein auf der Ordinate aufgetragen.



**Abbildung 9:** Repräsentative Sättigungsisotherme des unspezifischen Antagonisten [<sup>3</sup>H]-Diprenorphin. Der unspezifische Antagonist wurde in Konzentrationen von 0,1 bis 10 nmol/l eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde durch Inkubation mit 10 μmol/l Diprenorphin bestimmt. Messpunkte entsprechen den Werten einer repräsentativen Messung. Die Anpassung der Geraden an die ermittelten Daten erfolgte durch lineare Regression anhand der im Abschnitt 2.7.1.2 angegebenen Geradengleichung (4) (Scatchard Plot).

In der zweidimensionalen Darstellung ist die spezifische Bindung  $B_L$  in fmol/mg Protein auf der Abszisse und der Quotient aus der spezifischen Bindung  $B_L$  und der freien, ungebundenen Radioaktivität  $F_L$  in fmol/mg Protein/nmol/l auf der Ordinate aufgetragen.





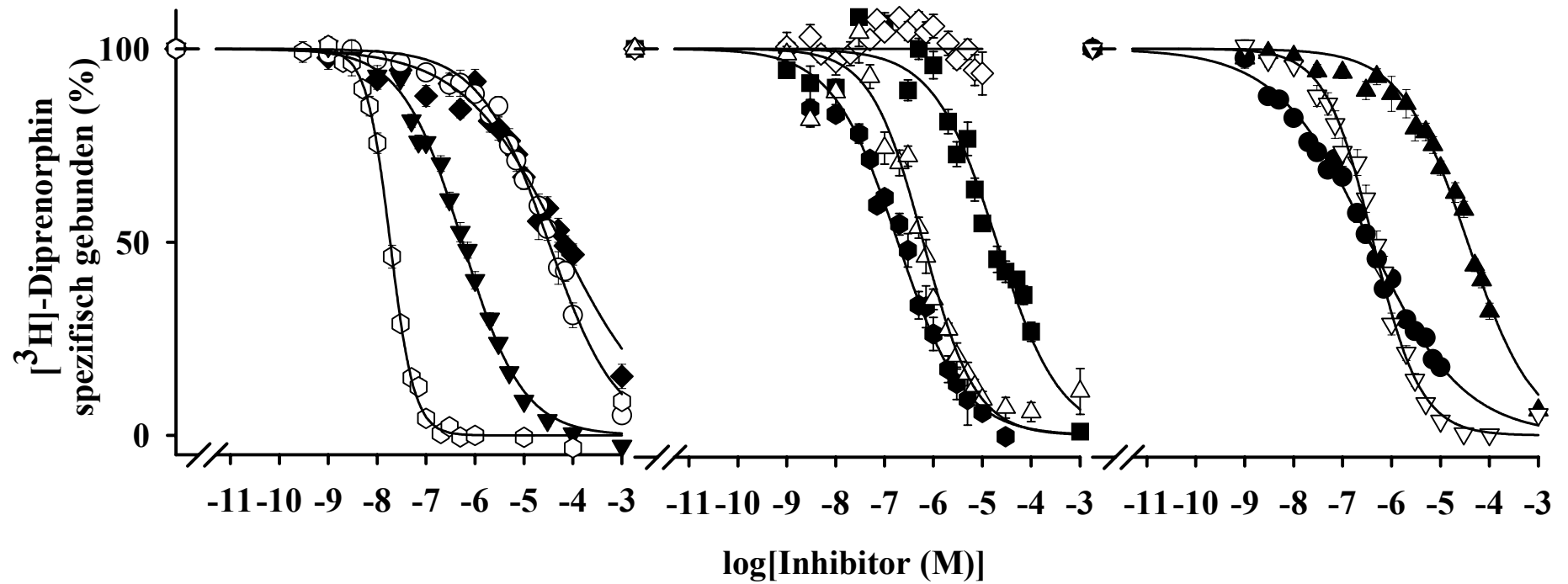
**Abbildung 10:** Kompetitionsisothermen von Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen an Opioid-Rezeptoren von intakten und ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. Als radioaktiv markierter Ligand wurde [<sup>3</sup>H]-Diprenorphin in einer konstanten Konzentration von 0,1 nmol/l verwendet. Messpunkte repräsentieren den Median (SEM) von 5-11 unabhängigen Experimenten. Die Anpassung der Kurven an die ermittelten Daten erfolgte durch nichtlineare Regression anhand der sigmoidalen logistischen Funktion nach der im Abschnitt 2.7.2.2 angegebenen Gleichung.

In der zweidimensionalen Darstellung ist die eingesetzte Konzentration  $L_V$  der verdrängenden Substanzen logarithmisch in mol/l auf der Abszisse und die spezifische Radioligandenbindung  $B_{L\%}$  in Prozent auf der Ordinate aufgetragen.

◆ DHC6G  
○ NDHC  
▼ Morphin  
◊ Diprenorphin

■ DHC  
● DHM  
◇ DHM3G  
△ Methadon

● DHM6G  
▲ Codein  
▽ Levomethadon



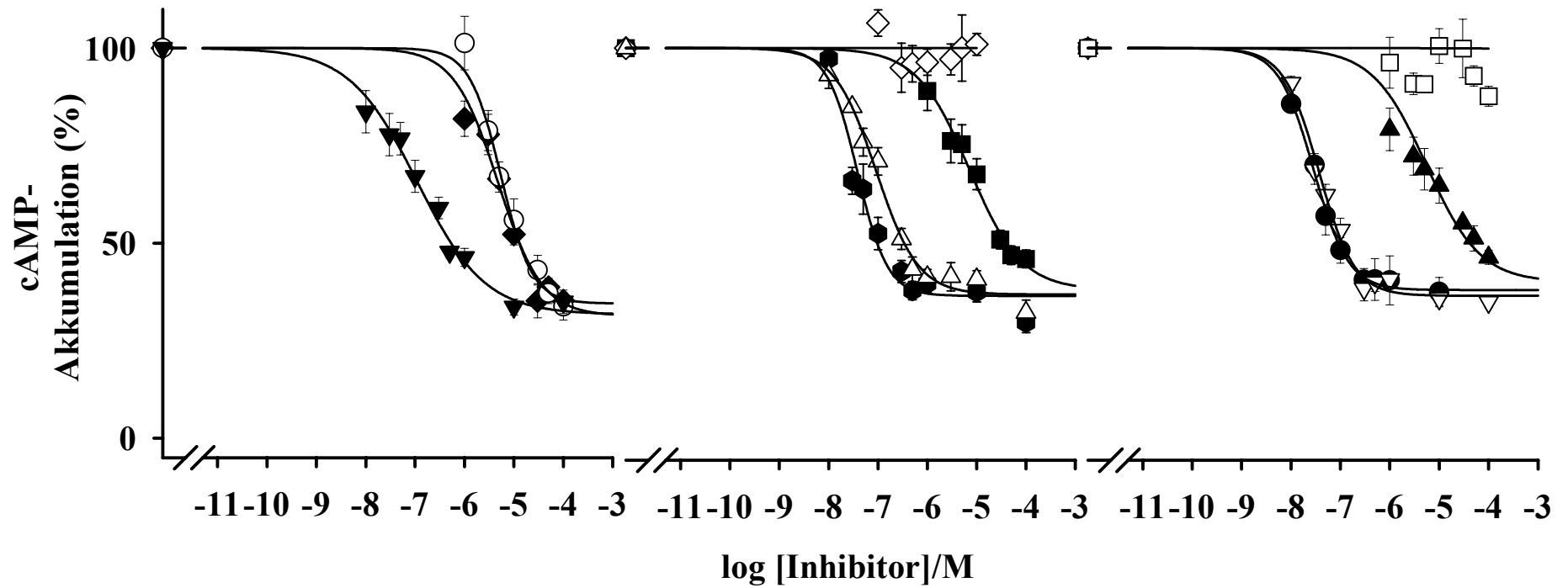
**Abbildung 11:** Inhibitionsisothermen der Forskolin stimulierten cAMP-Akkumulation durch Dihydrocodein, seinen Metaboliten und Kontrollsubstanzen in intakten, adhärenen und ausdifferenzierten SH-SY5Y-Zellen. Als Adenylatcyclase-Aktivator wurde Forskolin in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ , als unspezifischer Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX in einer Konzentration von 0,2 mmol/l verwendet. Messpunkte repräsentieren den Median (SEM) von 5-8 unabhängigen Experimenten. Die Anpassung der Kurven an die ermittelten Daten erfolgte durch nichtlineare Regression anhand der sigmoidalen logistischen Funktion nach der im Abschnitt 2.7.3 angegebenen Gleichung.

In der zweidimensionalen Darstellung ist die eingesetzte Konzentration  $L_V$  der verdrängenden Substanzen logarithmisch in mol/l auf der Abszisse und die cAMP-Akkumulation in Prozent auf der Ordinate aufgetragen.

◆ DHC6G  
○ NDHC  
▼ Morphin

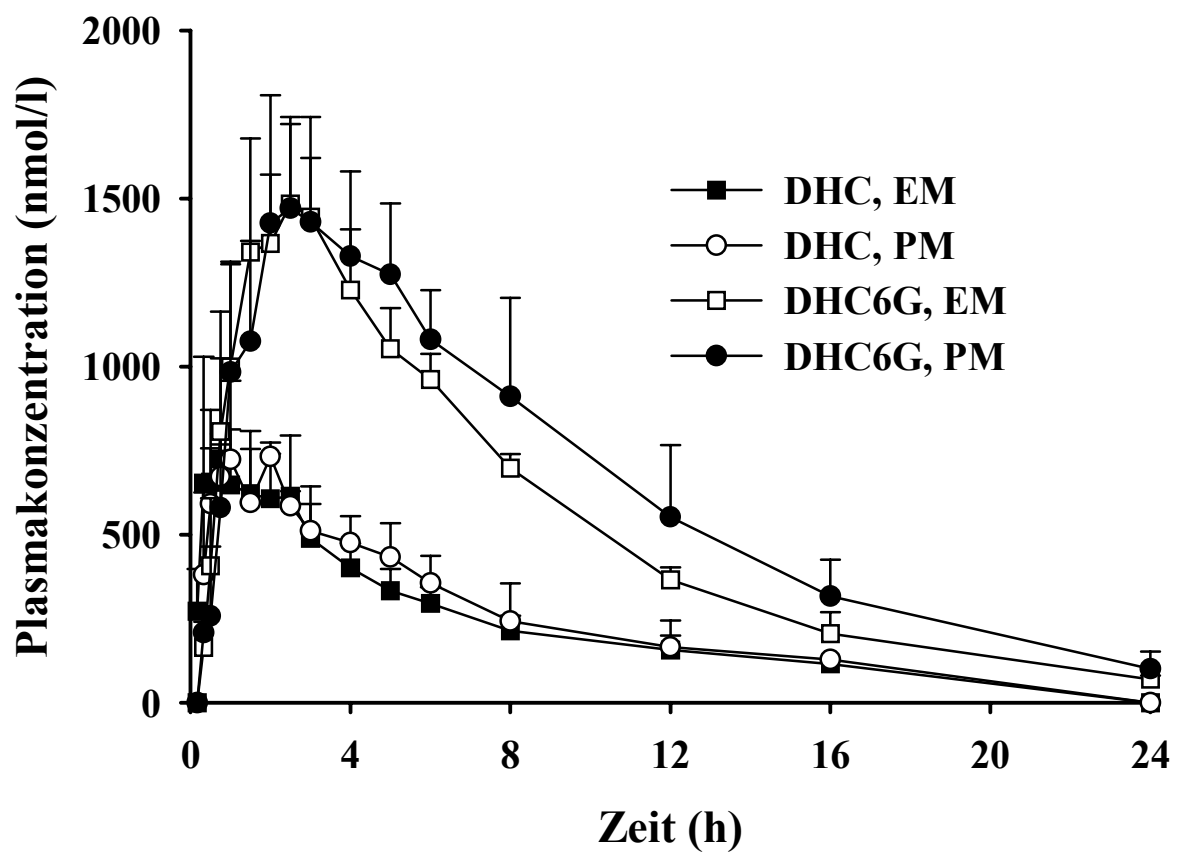
■ DHC  
● DHM  
◇ DHM3G  
△ Methadon

● DHM6G  
▲ Codein  
▽ Levomethadon  
□ Naloxon



**Abbildung 12:** Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von DHC und DHC6G in EM und PM für CYP2D6 nach Gabe einer Einzeldosis von 60 mg DHC. Messpunkte repräsentieren den Mittelwert + SD.

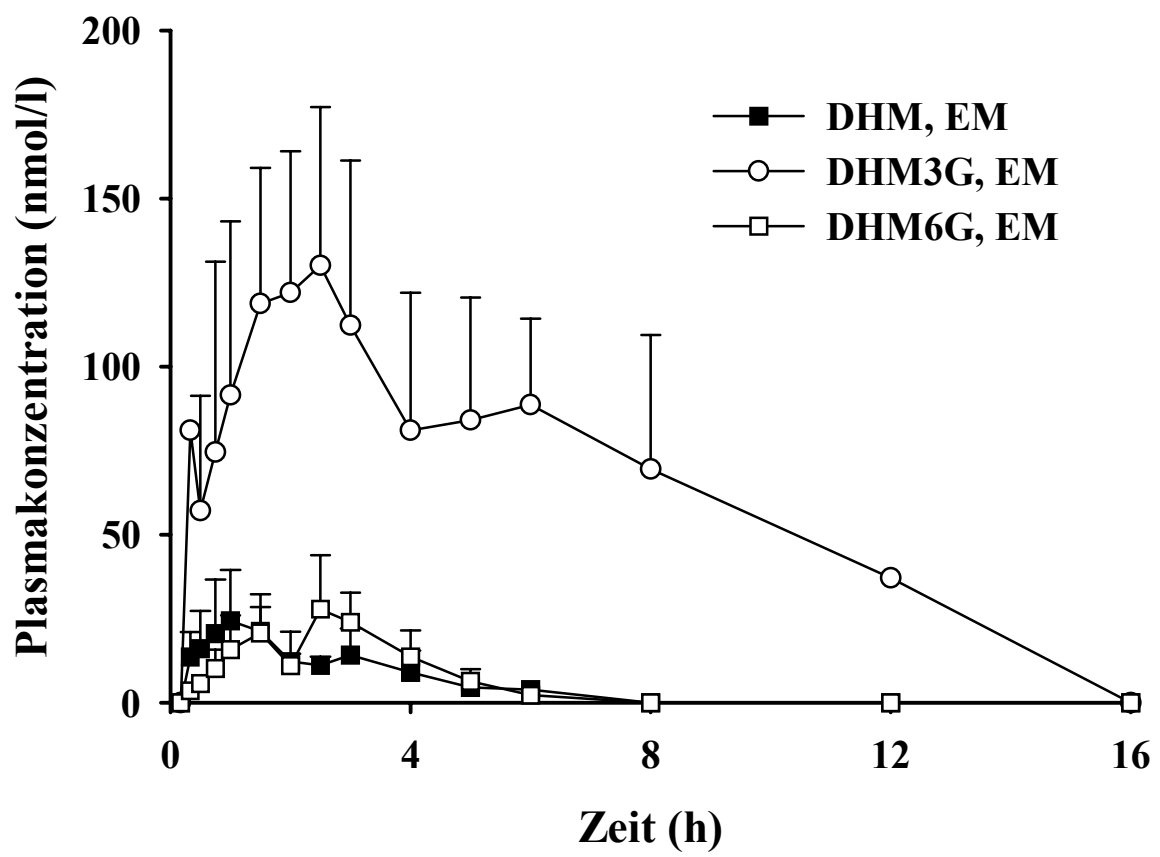
In der zweidimensionalen Darstellung ist die Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden auf der Abszisse und die Plasmakonzentration in nmol/l auf der Ordinate aufgetragen.



**Abbildung 13:** Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe von DHM, DHM3G und DHM6G in EM für CYP2D6 nach Gabe einer Einzeldosis von 60 mg DHC. Messpunkte repräsentieren den Mittelwert + SD.

In der zweidimensionalen Darstellung ist die Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden auf der Abszisse und die mittlere Plasmakonzentration in nmol/l auf der Ordinate aufgetragen.

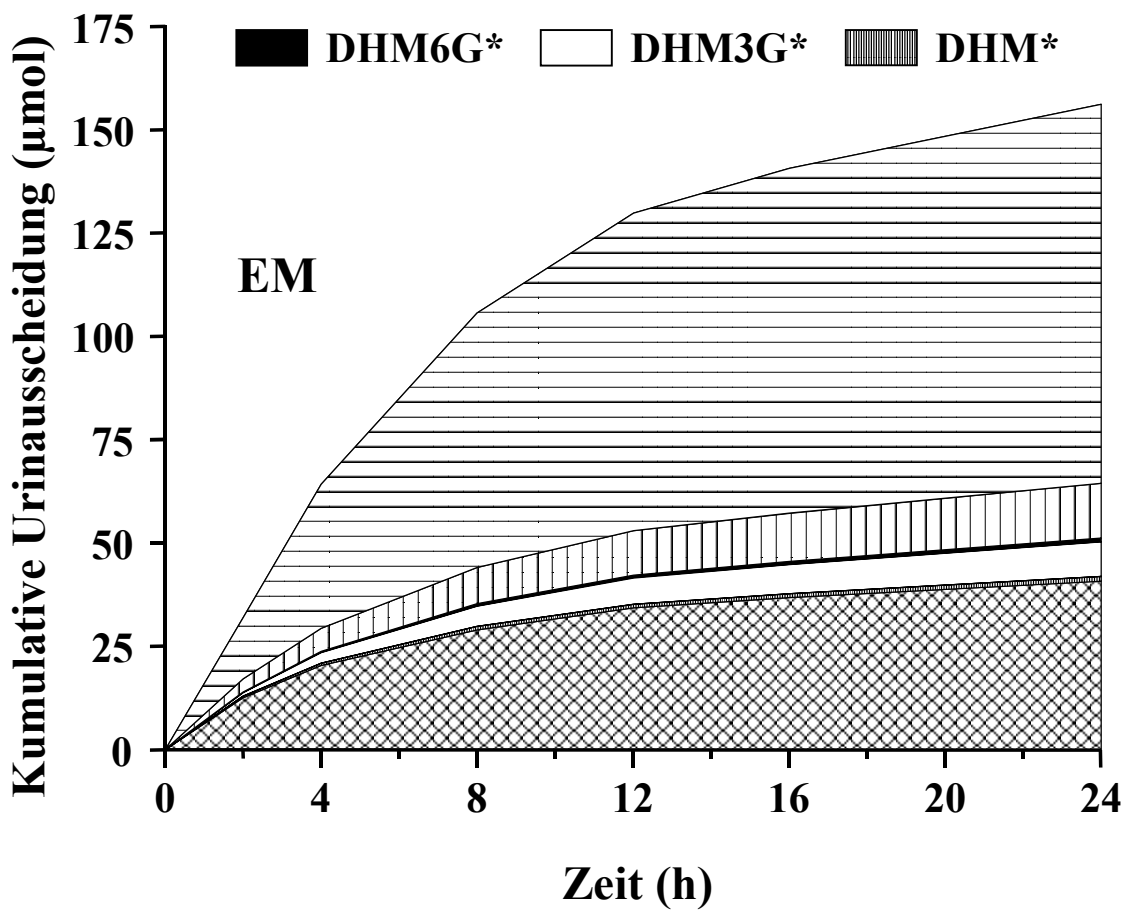
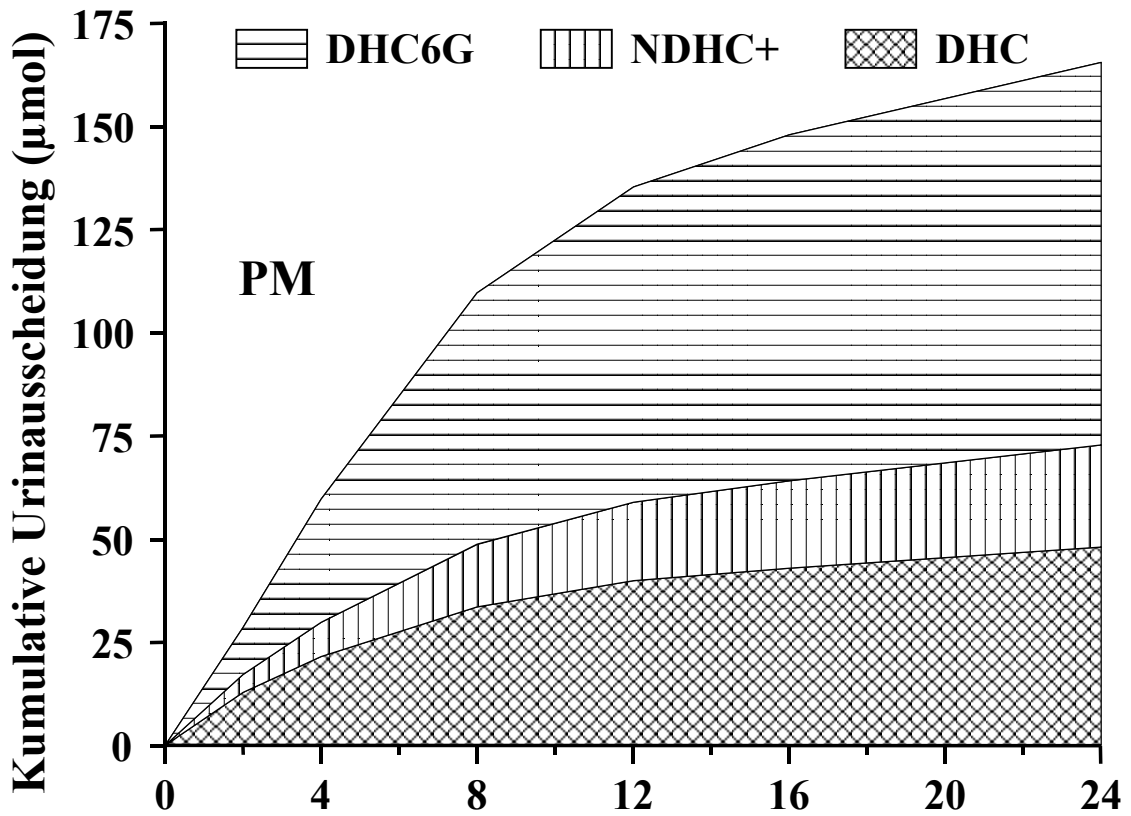




**Abbildung 14:** Mittlere kumulative Urinausscheidung von DHC und Metaboliten in EM und PM für CYP2D6 nach Gabe einer Einzeldosis von 60 mg DHC.

In der zweidimensionalen Darstellung ist die Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden auf der Abszisse und die kumulative Urinausscheidung in  $\mu\text{mol}$  auf der Ordinate aufgetragen.

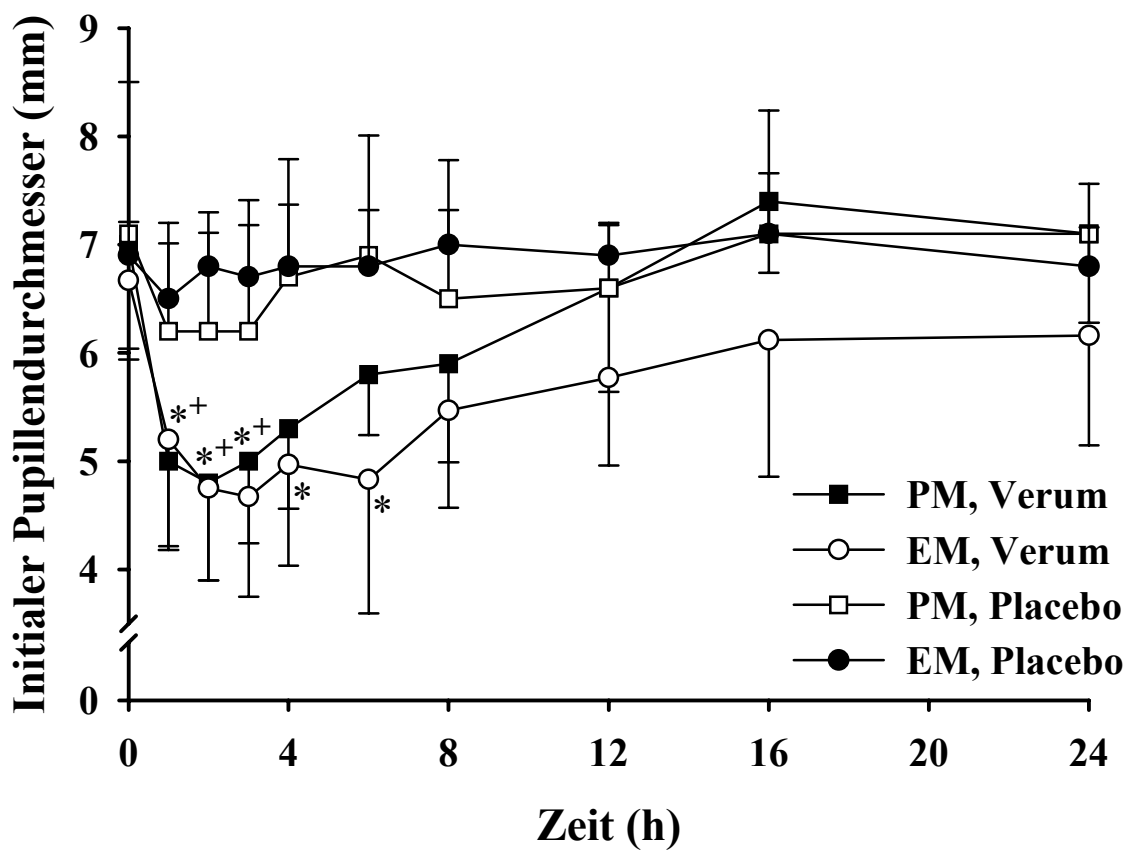
\* = signifikanter Unterschied zwischen EM and PM, + =  $p < 0,05$



**Abbildung 15:** Mittlerer (+ SD oder – SD) ursprünglicher Pupillendurchmesser vor und nach Applikation von Verum (60 mg DHC) oder Placebo in EM und PM für CYP2D6. Verum und Placebo wurden an jedem Zeitpunkt miteinander verglichen.

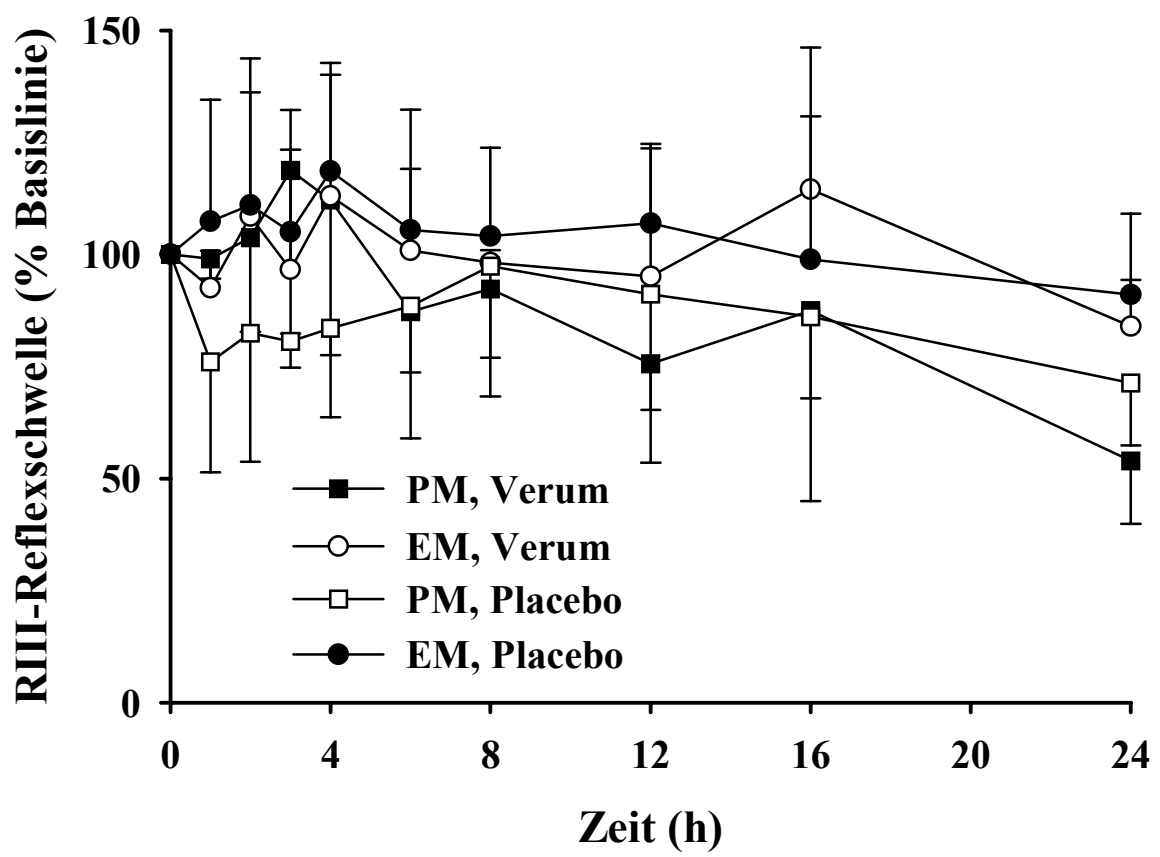
In der zweidimensionalen Darstellung ist die Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden auf der Abszisse und der ursprüngliche Pupillendurchmesser in mm auf der Ordinate aufgetragen.

\* =  $p < 0,05$  (EM); + =  $p < 0,05$  (PM).



**Abbildung 16:** Prozentuale Veränderung der Basislinie der R-III-Reflexschwelle vor und nach Applikation von Verum und Placebo in EM und PM.

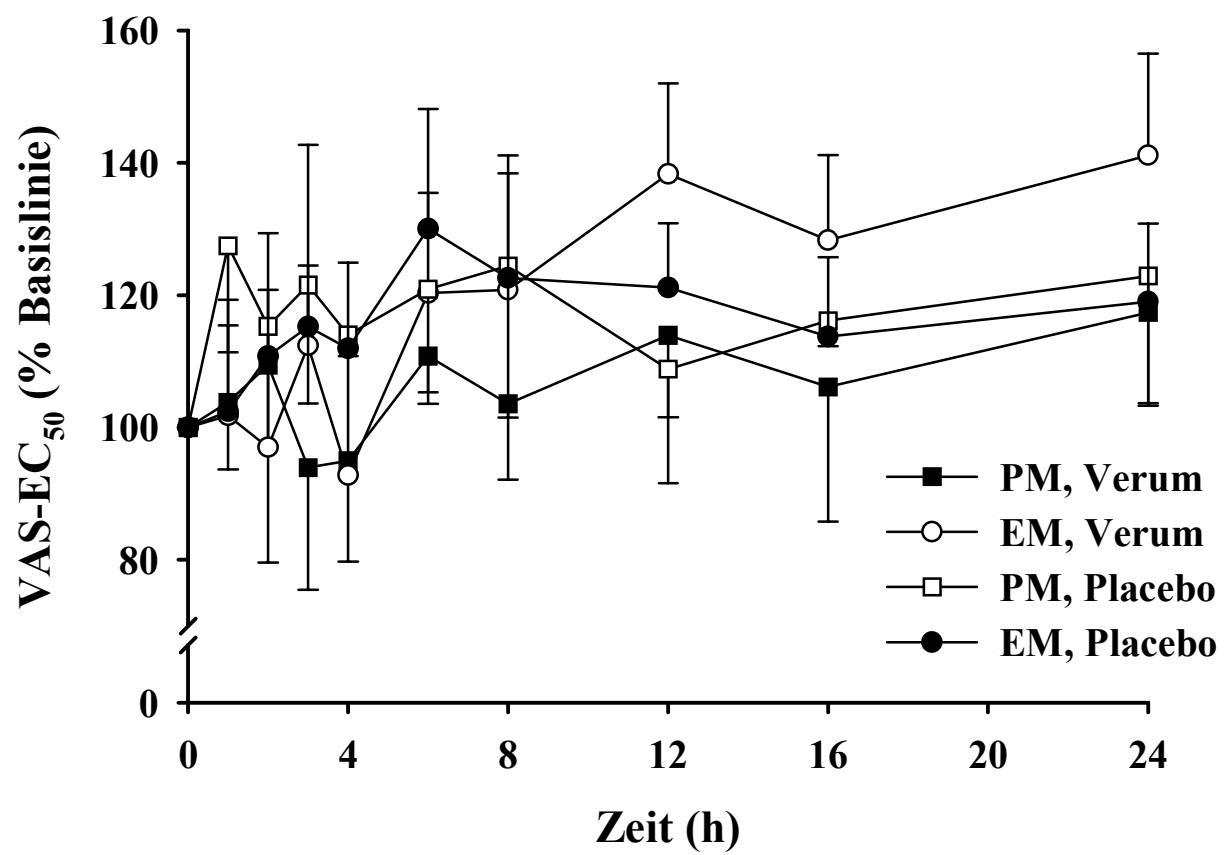
In der zweidimensionalen Darstellung ist die Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden auf der Abszisse und die R-III-Reflexschwelle in Prozent der Basislinie auf der Ordinate aufgetragen.



**Abbildung 17:** Prozentuale Veränderung der Basislinie des VAS-EC<sub>50</sub> vor und nach Applikation von Verum und Placebo in EM und PM.

In der zweidimensionalen Darstellung ist die Zeit nach Einnahme der Prüfmedikation in Stunden auf der Abszisse und der VAS-EC<sub>50</sub> in Prozent der Basislinie auf der Ordinate aufgetragen.





---

## 8 LITERATUR

---

- [1] Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, Okuda K, Nebert DW (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12:1-51
- [2] Martin WR (1967) Opioid antagonists. *Pharmacol Rev* 19:463-521
- [3] Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197:517-532
- [4] Paul D, Pick CG, Tive LA, Pasternak GW (1991) Pharmacological characterization of nalorphine, a kappa 3 analgesic. *J Pharmacol Exp Ther* 257:1-7
- [5] Kosterlitz HW, Paterson SJ (1981) Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH is a selective ligand for the  $\mu$ -opiate binding site. *Br J Pharmacol* 73:299P
- [6] Chang KJ, Lillian A, Hazum E, Cuatrecasas P, Chang JK (1981) Morphiceptin (NH<sub>4</sub>-tyr-pro-phe-pro-COHN<sub>2</sub>): a potent and specific agonist for morphine ( $\mu$ ) receptors. *Science* 212:75-77
- [7] Chang KJ, Wei ET, Killian A, Chang JK (1983) Potent morphiceptin analogs: structure activity relationships and morphine-like activities. *J Pharmacol Exp Ther* 227:403-408
- [8] Broccardo M, Erspamer V, Falconieri Erspamer G, Improta G, Linari G, Melchiorri P, Montecucchi PC (1981) Pharmacological data on dermorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin. *Br J Pharmacol* 73:625-631
- [9] Cotton R, Kosterlitz HW, Paterson SJ, Rance MJ, Traynor JR (1985) The use of [<sup>3</sup>H]-[D-Pen<sub>2</sub>,D-Pen<sub>5</sub>]enkephalin as a highly selective ligand for the delta-binding site. *Br J Pharmacol* 84:927-932
- [10] Mosberg HI, Hurst R, Hruby VJ, Gee K, Yamamura HI, Galligan JJ, Burks TF (1983) Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:5871-5874

- [11] Gacel G, Fournie-Zaluski MC, Roques BP (1980) D-Tyr--Ser-Gly--Phe--Leu--Thr, a highly preferential ligand for delta-opiate receptors. *FEBS Lett* 118:245-247
- [12] Delay-Goyet P, Seguin C, Gacel G, Roques BP (1988) [3H][D-Ser2(O-tert-butyl),Leu5]enkephalyl-Thr6 and [D-Ser2(O-tert-butyl),Leu5]enkephalyl-Thr6(O-tert-butyl). Two new enkephalin analogs with both a good selectivity and a high affinity toward delta-opioid binding sites. *J Biol Chem* 263:4124-4130
- [13] Erspamer V, Melchiorri P, Falconieri-Erspamer G, Negri L, Corsi R, Severini C, Barra D, Simmaco M, Kreil G (1989) Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5188-5192
- [14] Von Voigtlander PF, Lahti RA, Ludens JH (1983) U-50,488: a selective and structurally novel non-Mu (kappa) opioid agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 224:7-12
- [15] Lahti RA, Mickelson MM, McCall JM, Von Voigtlander PF (1985) [3H]U-69593 a highly selective ligand for the opioid kappa receptor. *Eur J Pharmacol* 109:281-284
- [16] Clark CR, Birchmore B, Sharif NA, Hunter JC, Hill RG, Hughes J (1988) PD117302: a selective agonist for the kappa-opioid receptor. *Br J Pharmacol* 93:618-626
- [17] Goldstein A, Nestor JJ, Jr., Naidu A, Newman SR (1988) "DAKLI": a multipurpose ligand with high affinity and selectivity for dynorphin (kappa opioid) binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7375-7379
- [18] Gairin JE, Jomary C, Pradayrol L, Cros J, Meunier JC (1986) 125I-DPDYN, monoiodo[D-Pro10]dynorphin(1-11): a highly radioactive and selective probe for the study of kappa opioid receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 134:1142-1150
- [19] Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71:741-747

- [20] Pählman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T (1984) Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ* 14:135-144
- [21] Yu VC, Eiger S, Duan DS, Lamah J, Sadée W (1990) Regulation of cyclic AMP by the mu-opioid receptor in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 55:1390-1396
- [22] Cheng J, Standifer KM, Tublin PR, Su W, Pasternak GW (1995) Demonstration of kappa 3-opioid receptors in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *J Neurochem* 65:170-175
- [23] Yu VC, Sadée W (1988) Efficacy and tolerance of narcotic analgesics at the mu opioid receptor in differentiated human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 245:350-355
- [24] Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981) Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:3363-3367
- [25] Kazmi SM, Mishra RK (1986) Opioid receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: evidence for distinct morphine (mu) and enkephalin (delta) binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 137:813-820
- [26] Yu VC, Richards ML, Sadée W (1986) A human neuroblastoma cell line expresses mu and delta opioid receptor sites. *J Biol Chem* 261:1065-1070
- [27] Kazmi SM, Mishra RK (1987) Comparative pharmacological properties and functional coupling of mu and delta opioid receptor sites in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol* 32:109-118
- [28] Kroemer HK, Eichelbaum M (1995) "It's the genes, stupid". Molecular bases and clinical consequences of genetic cytochrome P450 2D6 polymorphism. *Life Sci* 56:2285-2298

- [29] Meyer UA, Zanger UM (1997) Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:269-296
- [30] Dayer P, Desmeules J, Leemann T, Striberni R (1988) Bioactivation of the narcotic drug codeine in human liver is mediated by the polymorphic monooxygenase catalyzing debrisoquine 4-hydroxylation (cytochrome P-450 dbl/buff). *Biochem Biophys Res Commun* 152:411-416
- [31] Yue QY, Svensson JO, Alm C, Sjoqvist F, Säwe J (1989) Codeine O-demethylation co-segregates with polymorphic debrisoquine hydroxylation. *Br J Clin Pharmacol* 28:639-645
- [32] Fromm MF, Hofmann U, Griese EU, Mikus G (1995) Dihydrocodeine: a new opioid substrate for the polymorphic CYP2D6 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 58:374-382
- [33] Chen ZR, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F (1991) Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites. *Life Sci* 48:2165-2171
- [34] Korczyn AD (1987) The pupil and vigilance. *Funct Neurol* 2:539-544
- [35] Murray RB, Adler MW, Korczyn AD (1983) The pupillary effects of opioids. *Life Sci* 33:495-509
- [36] Dietrich H, Beneke M, Böttcher M, Horstmann R, Lüdtkke W, Seitz I (1992) Evaluation of drug effects on CNS by dynamic light evoked pupillometry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345 Suppl:R 5
- [37] Grünberger J, Linzmayer L, Cepko H, Saletu B (1987) Lichtevozierte dynamische Pupillometrie zur Differenzierung psychotroper Substanzen. *Arzneimittelforschung* 37:357-360
- [38] Freye E, Baranowski J, Latasch L (2001) Dose-related effects of controlled release dihydrocodeine on oro-cecal transit and pupillary light reflex. A study in human volunteers. *Arzneimittelforschung* 51:60-66

- [39] Willer JC (1984) Nociceptive flexion reflex as a physiological correlate of pain sensation in humans. In: Bromm B (ed) Pain Measurement in Man Neurophysiological correlated of pain. Elsevier Science Publishers, pp 87-110
- [40] Desmeules JA, Piguet V, Collart L, Dayer P (1996) Contribution of monoaminergic modulation to the analgesic effect of tramadol. *Br J Clin Pharmacol* 41:7-12
- [41] Schwanstecher M, Schaupp U, Löser S, Panten U (1992) The binding properties of the particulate and solubilized sulfonylurea receptor from cerebral cortex are modulated by the Mg<sup>2+</sup> complex of ATP. *J Neurochem* 59:1325-1335
- [42] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- [43] Klinder K, Skopp G, Mattern R, Aderjan R (1999) The detection of dihydrocodeine and its main metabolites in cases of fatal overdose. *Int J Legal Med* 112:155-158
- [44] Becker HGO, Domschke G, Fanghänel E, Fischer M, Gewalt K, Mayer R, Pavel D, Schmidt H, Schwetlick K (1986) *Organikum*. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, Germany
- [45] Munson PJ, Rodbard D (1980) Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107:220-239
- [46] Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-3108
- [47] von Hattingberg HM, Brockmeier D, Kreuter G (1977) A rotating iterative procedure (RIP) for estimating hybrid constants in multi-compartment analysis on desk computers. *Eur J Clin Pharmacol* 11:381-388
- [48] Leslie FM (1987) Methods used for the study of opioid receptors. *Pharmacol Rev* 39:197-249

- [49] Löser SV, Meyer J, Freudenthaler S, Sattler M, Desel C, Meineke I, Gundert-Remy U (1996) Morphine-6-O-beta-D-glucuronide but not morphine-3-O-beta-D-glucuronide binds to mu-, delta- and kappa- specific opioid binding sites in cerebral membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354:192-197
- [50] Mignat C, Wille U, Ziegler A (1995) Affinity profiles of morphine, codeine, dihydrocodeine and their glucuronides at opioid receptor subtypes. *Life Sci* 56:793-799
- [51] Bartlett SE, Smith MT (1995) The apparent affinity of morphine-3-glucuronide at mu1-opioid receptors results from morphine contamination: demonstration using HPLC and radioligand binding. *Life Sci* 57:609-615
- [52] Knapp RJ, Malatynska E, Collins N, Fang L, Wang JY, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI (1995) Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *Faseb J* 9:516-525
- [53] Barnard EA, Demoliou-Mason C (1983) Molecular properties of opioid receptors. *Br Med Bull* 39:37-45
- [54] Rodbard D (1979) Negative cooperativity: a positive finding? *Am J Physiol* 237:E203-205
- [55] Lambert DG, Atcheson R, Hirst RA, Rowbotham DJ (1993) Effects of morphine and its metabolites on opiate receptor binding, cAMP formation and [3H]noradrenaline release from SH-SY5Y cells. *Biochem Pharmacol* 46:1145-1150
- [56] Campbell DJ, Rowbotham DJ, Lambert DG (1995) Do nitrous oxide and halothane influence opioid receptor binding in SH-SY5Y human neuroblastoma cells? *Br J Anaesth* 75:752-755
- [57] Childers SR (1991) Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci* 48:1991-2003



- [58] Morgan AJ, Murray KJ, Challiss RA (1993) Comparison of the effect of isobutylmethylxanthine and phosphodiesterase-selective inhibitors on cAMP levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 45:2373-2380
- [59] Rowell FJ, Seymour RA, Rawlins MD (1983) Pharmacokinetics of intravenous and oral dihydrocodeine and its acid metabolites. *Eur J Clin Pharmacol* 25:419-424
- [60] Ammon S, Hofmann U, Griese EU, Gugeler N, Mikus G (1999) Pharmacokinetics of dihydrocodeine and its active metabolite after single and multiple oral dosing. *Br J Clin Pharmacol* 48:317-322
- [61] Wilder-Smith CH, Hufschmid E, Thormann W (1998) The visceral and somatic antinociceptive effects of dihydrocodeine and its metabolite, dihydromorphine. A cross-over study with extensive and quinidine-induced poor metabolizers. *Br J Clin Pharmacol* 45:575-581
- [62] Kirkwood LC, Nation RL, Somogyi AA (1997) Characterization of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of dihydrocodeine. *Br J Clin Pharmacol* 44:549-555
- [63] Eckhardt K, Nevo I, Levy R, Mikus G, Eichelbaum M, Vogel Z (2000) Morphine-related metabolites differentially activate adenylyl cyclase isozymes after acute and chronic administration. *FEBS Lett* 470:309-314
- [64] Wotherspoon HA, Kenny GN, McArdle CS (1991) Analgesic efficacy of controlled-release dihydrocodeine. A comparison of 60, 90 and 120 mg tablets in cold-induced pain. *Anaesthesia* 46:915-917
- [65] Jurna I, Kömen W, Baldauf J, Fleischer W (1997) Analgesia by dihydrocodeine is not due to formation of dihydromorphine: evidence from nociceptive activity in rat thalamus. *J Pharmacol Exp Ther* 281:1164-1170
- [66] Webb JA, Rostami-Hodjegan A, Abdul-Manap R, Hofmann U, Mikus G, Kamali F (2001) Contribution of dihydrocodeine and dihydromorphine to analgesia following

dihydrocodeine administration in man: a PK-PD modelling analysis. *Br J Clin Pharmacol* 52:35-43

- [67] Frießem DH, Täschner KL (1991) Codein und Dihydrocodein als Ausweich- und Ersatzdrogen. *Fortschr Neurol Psychiatr* 59:164-169
- [68] Mikus G, Ulmer A, Mörike K, Hofmann U (1998) Heroin substitution therapy: Pharmacokinetics of dihydrocodeine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 358 (Suppl2):P47.28
- [69] Kirkwood LC, Nation RL, Somogyi AA (1998) Glucuronidation of dihydrocodeine by human liver microsomes and the effect of inhibitors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:266-270

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. em. N. Rietbrock (ehemaliger Direktor des Institutes für Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. U. Fuhr (Leiter der Klinischen Pharmakologie, Universität Köln) danke ich für seine stete Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. T. Dinger mann (Direktor des Institutes für Pharmazeutische Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main) danke ich für die Zusammenarbeit.

Frau Prof. Dr. U. Gundert-Remy (ehemalige Leiterin der Abteilung für Klinische Pharmakologie, Georg August-Universität Göttingen) danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Hinblick auf die Radiorezeptorassays und für die Bereitstellung der Unterkunft in Göttingen.

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Geißlinger (Direktor des Institutes für Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) danke ich für die Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter und für die Möglichkeit, die Arbeit im Institut für Klinische Pharmakologie abzuschließen.

Herrn Prof. Dr. J. Pfeilschifter (Direktor des Institutes für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main) danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Hinblick auf die Zellkulturen.

Herrn Dr. S. V. Vormfelde (Abteilung für Klinische Pharmakologie, Georg August-Universität Göttingen) danke ich für die Einweisung in die Methodik des Radiorezeptorassays und für die Unterstützung in der Organisation und Durchführung der Probanden-Studie.

Herrn Dr. W. Linz, Herrn Dr. F. J. Hock und Mitarbeitern (Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main) danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zur Gewinnung der Hirnmembranpräparationen.

Herrn Dr. H. Ammer (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Universität München) danke ich für die Bereitstellung der SH-SY5Y-Zelllinie für die Affinitätsmessungen.

Herrn Dr. T. Hartmann and Frau H. Grimm (Zentrum für Molekulare Biologie (ZMBH), Universität Heidelberg) danke ich für die Bereitstellung der SH-SY5Y-Zelllinie für die Aktivitätsmessungen.

Herrn Prof. Dr. R. Aderjan, Frau Dr. G. Skopp und Herrn Dr. K. Klinder (Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin, Universität Heidelberg) danke ich für die quantitativen Bestimmungen von DHC und seinen Metaboliten in Plasma und Urin.

Herrn Dr. M. Böttcher und Herrn W. Lüdtke (Tropon GmbH, Köln) danke ich für die Einweisung und Bereitstellung des monokularen Pupillometers Pupilsan<sup>®</sup> für die pupillometrischen Bestimmungen im Rahmen der Probandenstudie.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des *pharmazentrum frankfurt* herzlich bedanken, die mir im Verlauf der Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben.

Dem Bundesministerium für Gesundheit danke ich für die finanzielle Unterstützung der vorliegenden Arbeit (Geschäftszeichen 322-1720/8).

## Lebenslauf

1. Dezember 1965	geboren in Darmstadt
1972-1976	Grundschule in Griesheim
1976-1985	Gymnasium in Darmstadt
Juni 1985	Allgemeine Hochschulreife
1985-1987	Lehranstalt für pharmazeutisch-technische Assistenten (PTA) Martin-Behaim-Schule in Darmstadt
1987-1988	Praktikum zum Beruf des PTA in der Kirschberg-Apotheke in Griesheim
Februar 1988	Erteilung der Berufserlaubnis PTA
1988-1989	Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr
1989-1993	Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe- Universität in Frankfurt am Main
September 1991	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1993	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1993-1994	Pharmaziepraktikum in der Kirschberg-Apotheke in Griesheim
November 1994	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 1994	Erteilung der Approbation als Apotheker
1994-1995	Angestellter Apotheker in der Falken-Apotheke in Griesheim
seit März 1995	Berufsschullehrer an der Berufsschule für pharmazeutisch- kaufmännische Angestellte (PKA) in Darmstadt
seit November 1995	Anfertigung der Promotionsarbeit im Institut für Klinische Pharmakologie im Universitätsklinikum Frankfurt am Main unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. U. Fuhr, Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln
seit 1999	wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Herrn Prof. Dr. Dr. G. Geißlinger im <i>pharmazentrum frankfurt</i> , Institut für Klinische Pharmakologie im Universitätsklinikum Frankfurt am Main