

Der Polymorphismus 1117C>T im Cytochrom P450 CYP1A2
beeinträchtigt die Metabolisierung von Theobromin beim
Beagle Hund

SABRINA COLLICA



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

**Der Polymorphismus 117C>T im Cytochrom P450 CYP1A2
beeinträchtigt die Metabolisierung von Theobromin
beim Beagle Hund**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



eingereicht von

Sabrina Collica

Tierärztin aus Solingen

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. J. Geyer
Prof. Dr. N. Mencke

Tag der Disputation: 28. Juni 2012

Zwischen Reden und Tun liegt das Meer -

Tra il dire e il fare c'è di mezzo il mare

Für meinen Opa und meine Oma

Gliederung

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

VERZEICHNIS DER TABELLEN

ABKÜRZUNGEN

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Biotransformation.....	1
1.2	Cytochrom P450 und Arzneistoffmetabolisierung.....	3
1.3	Polymorphismen in Cytochrom P450 Enzymen.....	4
1.4	Der CYP1A2 1117C>T Polymorphismus beim Hund	5
1.5	Methylxanthine	7
1.5.1	Theobromin.....	8
1.5.1.1	Klinische Wirkung	8
1.5.2	Metabolismus von Theobromin.....	10
1.5.3	Theobrominvergiftung beim Hund	12
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	17

2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Genotypisierung.....	18
2.1.1	Material.....	18
2.1.2	Methode	19
2.2	Kinetikstudie	23
2.2.1	Material.....	23
2.2.1.1	Tiere	23
2.2.1.2	Verwendete Prüfgegenstände.....	26
2.2.2	Methode	28
2.2.2.1	Versuchsaufbau	28
2.2.2.2	Applikation.....	31
2.2.2.3	Probenentnahme	32
2.3	Kreatinin.....	34
2.3.1	Kreatininbestimmung	35
2.4	Bestimmung der Methylxanthinkonzentrationen	35
2.4.1	Material.....	35
2.4.2	Methode 1	37
2.4.3	Methode 2	38
2.5	Berechnungen.....	39
2.5.1	Methylxanthinkonzentrationen.....	39
2.5.2	Pharmakokinetischer Parameter	40
2.5.3	Statistische Methoden.....	41
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Klinische Allgemeinuntersuchung	43
3.2	Genotypisierung.....	43
3.3	Methylxanthinkonzentrationen nach intravenöser Applikation	44
3.4	Methylxanthinkonzentrationen nach per oraler Applikation.....	46
3.5	Direkter Vergleich zwischen den Genotypen nach intravenöser Applikation	47
3.6	Direkter Vergleich zwischen den Genotypen nach per oraler Applikation	55
3.7	Pharmakokinetische Parameter.....	62

4	DISKUSSION	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	SUMMARY	77
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	78
8	DANKSAGUNG.....	85
9	ERKLÄRUNG.....	86

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

- Abb. 1.1: Schema der Biotransformation
Abb. 1.2: Cytochrom P450 1A2 1117C>T Polymorphismus
Abb. 1.3: Methylxanthine
Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Theobrominmetabolismus beim Hund
- Abb. 2.1: Absolute Quantifizierung 1117T/T
Abb. 2.2: Absolute Quantifizierung 1117C/C
Abb. 2.3: Absolute Quantifizierung 1117C/T
- Abb. 3.1: Ergebnis der CYP1A2 Genotypisierung von 270 Beagle Hunden
Abb. 3.2: Methylxanthinkonzentrationen im Plasma nach intravenöser Applikation
Abb. 3.3: Methylxanthinkonzentrationen im Urin nach intravenöser Applikation
Abb. 3.4: Methylxanthinkonzentrationen im Plasma nach per oraler Applikation
Abb. 3.5: Methylxanthinkonzentrationen im Urin nach per oraler Applikation
Abb. 3.6: Theobrominkonzentrationen im Plasma nach intravenöser Applikation
Abb. 3.7: 3-Methylxanthinkonzentrationen im Plasma nach intravenöser Applikation
Abb. 3.8: Theobrominkonzentrationen im Urin nach intravenöser Applikation
Abb. 3.9: 3-Methylxanthinkonzentrationen im Urin nach intravenöser Applikation
Abb. 3.10: 7-Methylxanthinkonzentrationen im Urin nach intravenöser Applikation
Abb. 3.11: 3,7-Dimethylharnsäurekonzentrationen im Urin nach intravenöser Applikation
Abb. 3.12: Theobrominkonzentrationen im Plasma nach per oraler Applikation
Abb. 3.13: 3-Methylxanthinkonzentrationen im Plasma nach per oraler Applikation
Abb. 3.14: Theobrominkonzentrationen im Urin nach per oraler Applikation
Abb. 3.15: 3-Methylxanthinkonzentrationen im Urin nach per oraler Applikation
Abb. 3.16: 7-Methylxanthinkonzentrationen im Urin nach per oraler Applikation
Abb. 3.17: 3,7-Dimethylharnsäurekonzentrationen im Urin nach per oraler Applikation
- Abb. 4.1: Theobrominmetabolismus

VERZEICHNIS DER TABELLEN

- Tab. 2.1: Kennzeichnung der eingesetzten Hunde
Tab. 2.2: Prüfgegenstand 1
Tab. 2.3: Prüfgegenstand 2
Tab. 2.4: Prüfgruppen
Tab. 2.5: Cross-over Studiendesign
Tab. 2.6: Randomisierung
Tab. 2.7: Blut- und Urinprobenentnahmezeitpunkte
- Tab. 3.1: Pharmakokinetische Parameter im Plasma nach per oraler Applikation
Tab. 3.2: Pharmakokinetische Parameter im Plasma nach intravenöser Applikation
Tab. 3.3: Pharmakokinetische Parameter im Urin nach per oraler Applikation
Tab. 3.4: Pharmakokinetische Parameter im Urin nach intravenöser Applikation

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Tab. 4.1: Unterschiede in der Allelfrequenz des caninen CYP1A2 1117C>T SNP
Tab. 4.2: Speziesunterschiede in der Metabolisierung von Theobromin
Tab. 4.3: Pharmakokinetische Parameter nach intravenöser Applikation
Tab. 4.4: Pharmakokinetische Parameter nach per oraler Applikation von Schokolade bzw. Kapseln

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AC	Animal Center
AUC _{inf}	Area under the curve from zero to infinity
BAH	Bayer Animal Health
Bp	Basenpaar
BV	Bioverfügbarkeit
°C	Grad Cesium
Cl _{obs}	Körperclearance der Substanz
C _{max}	maximale Konzentration
C _p	Konzentration in der Probe
CYP	Cytochrom
D	Dosis
Fläche	Peakfläche der Probe im Chromatogramm
g	Gramm
h	Stunde
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
<LLOQ	unterhalb der Nachweisgrenze
λ _z	Eliminationshalbwertzeit
MW	Mittelwert
MWÜ	Mann-Whitney Überlegenheitsmaß
N	Probenumfang
n. s.	no sample (keine Probe vorhanden)
PDE	Phosphodiesterase
PEG 200	Polyethylenglykol 200
p.o.	per oral
%	Prozent

PT	Prüftag
SOP	Standardarbeitsanweisung der Bayer AG
rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SEM	Standardfehler vom Mittelwert
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TFC-MS/MS	Turbulent Flow Chromatograph / Tandem Mass Spectrometer
ID	Identifikationsnummer
Tab.	Tabelle
T _{max}	Zeit bis zum Erreichen der maximalen Konzentration
T _{1/2}	Halbwertszeit
V _{End}	Endvolumen der Probe
VK	Variationskoeffizient
V _P	eingesetztes Probenvolumen
ZNS	Zentrales Nervensystem
TB	Theobromin
3-MX	3-Methylxanthin
7-MX	7-Methylxanthin
3,7-DMH	3,7-Dimethylharnsäure

1 EINLEITUNG

1.1 Biotransformation

Die Biotransformation ist ein Prozess, der in allen Lebewesen stattfindet. Der Begriff Biotransformation beschreibt die metabolische Umwandlung exogener (körperfremder) und endogener (körpereigener) Stoffe in einem Lebewesen. Metabolische Enzyme, die sich in Organen, Geweben oder Körperflüssigkeiten befinden, spielen in diesem Prozess eine entscheidende Rolle. Zu den exogenen Substanzen zählen unter anderen Arzneimittel oder pflanzliche Substanzen. Je lipophiler diese Substanzen sind, desto schlechter können sie über Urin und Faeces aus dem Körper ausgeschieden werden (Abb. 1.1). Geschieht dies nicht, kann sich eine Akkumulation dieser Substanzen schädlich auf den Körper auswirken. Auch viele Arzneistoffe werden über die Biotransformation in Metaboliten umgewandelt, welche schließlich aus dem Körper ausgeschieden werden. Die Biotransformation führt jedoch nicht immer zu einer Inaktivierung pharmakologisch wirksamer Substanzen. Mitunter können aktive Metaboliten entstehen, welche auch schädlich auf den Organismus wirken können. Bei sogenannten Prodrugs handelt es sich um Arzneimittel, welche erst durch die Biotransformation in aktive Metaboliten umgewandelt werden, die im Gegensatz zur Muttersubstanz pharmakologische Aktivität aufweisen (Josephy et al. 2005; Chasseaud und Hawkins 2007; Lu und Kacew 2009).

R.T. Williams teilte die Prozesse des Fremdstoffmetabolismus bereits vor über 40 Jahren in zwei Phasen ein. Phase I schließt Prozesse wie die Oxidation, Reduktion und Hydrolyse ein. In diesem Schritt werden meist funktionelle Gruppen in das zu metabolisierende Molekül eingebaut. In Phase II werden die gebildeten Intermediate dann mit körpereigenen Stoffen (z.B. Glucuronsäure, Schwefelsäure, oder Glutathion) konjugiert. Dies führt in der Regel zu einer Erhöhung der Wasserlöslichkeit und somit zu einer Verbesserung der Ausscheidbarkeit der Substanzen (Chasseaud und Hawkins 2007).

Da nicht jede dem Körper zugefügte Substanz die Phasen des Fremdstoffmetabolismus durchläuft ist diese Phaseneinteilung der Biotransformation nicht unumstritten. Einige Substanzen benötigen keine Phase I-Reaktion und können nach Konjugation ausgeschieden

werden. Andere Substanzen erreichen bereits nach Phase I eine ausreichende Polarität um ausgeschieden zu werden. Trotzdem vereinfacht diese Einteilung die Vorgänge der Biotransformation und wird heutzutage häufig genutzt (Josephy et al. 2005; Chasseaud und Hawkins 2007, Lu und Kacew 2009).

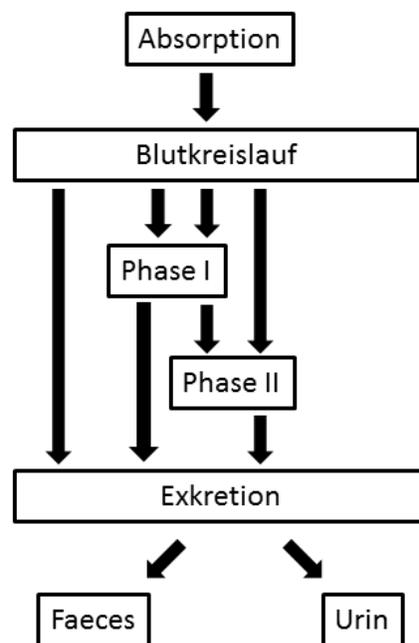


Abb.1.1 Schema der Biotransformation. Nach Absorption exogener (körperfremder) und endogener (körpereigener) Stoffe gelangen diese in den Blutkreislauf. Von dort aus werden sie unverstoffwechselt oder über metabolische Enzyme (Phase I oder Phase II) verstoffwechselt und über Urin und Faeces ausgeschieden.

1.2 Cytochrom P450 und Arzneistoffmetabolisierung

Im Allgemeinen wird die Biotransformation über in der Leber und anderen Geweben befindliche Enzyme katalysiert. Phase I-Reaktionen werden hauptsächlich durch Cytochrom P450-Enzyme über Oxidation bzw. Reduktion und Hydrolyse katalysiert, während in der Phase II Glucuronidierung, Sulfatierung und Acetylierung im Vordergrund stehen. Diese Prozesse verbessern die Polarität der resultierenden Metaboliten um sie leichter über Urin oder Galleflüssigkeit ausscheidbar zu machen (Wijnen et al. 2007).

Die Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) gehören zu einer Superfamilie physiologisch wichtiger Enzyme, die für die Metabolisierung endogener und exogener Substanzen verantwortlich sind. Cytochrome sind nach ihrer zellulären (Cyto) Lage und nach ihrer photometrischen Eigenschaft (Chrom) benannt. In Anwesenheit von Kohlenstoffmonoxid bilden die reduzierten Eisenmoleküle der Häm-Gruppe (Pigment) einen Komplex, der zu einem Absorptionsmaximum bei 450 nm führt. Beim Hund sind derzeit neun CYPs beschrieben: CYP1A1, CYP1A2, CYP2B11, CYP2C21, CYP2C41, CYP2D15, CYP2E1, CYP3A12, und CYP3A26 (Kamimura 2006). Im Vergleich zu anderen Spezies gibt es bisher allerdings nur wenige Informationen über das tatsächliche Substratspektrum dieser Cytochrom P450-Enzyme beim Hund (Graham et al. 2006).

Cytochrom P450-Enzyme sind aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologie in Familien und Subfamilien eingeteilt. Entsprechen sich die Aminosäuren zu über 40 %, spricht man von einer Familie, die als erste Ziffer in der Bezeichnung des Enzyms genannt wird. Liegt der Anteil gleicher Aminosäuren bei über 55 % gehören diese Cytochrome zu einer Subfamilie und werden als Großbuchstabe zusammengefasst. Die zweite Ziffer in der Bezeichnung des Enzyms stellt das Isoenzym dar. Humane CYPs der Familien 1-3 sind zu 70-80 % an Phase I-abhängigen Metabolisierungen von Arzneistoffen beteiligt und spielen auch eine Rolle im Metabolismus chemischer Substanzen. Einige CYP-Substrate können die Cytochrom-Aktivität hemmen (Inhibitoren), andere wiederum können die Expression von CYPs steigern (Inducer). Der Großteil der durch CYPs vermittelten Metabolisierungskapazität ist in der Leber lokalisiert. Extrahepatische CYPs sind darüber hinaus in einer Vielzahl von Geweben (zum Beispiel Jejunum (Dünndarm), Pankreas (Bauchspeicheldrüse), Cerebrum (Gehirn), Pulmo (Lunge), Ren

(Niere), Medulla Ossium (Knochenmark), Mastozyten (Mastzellen), Ovar (Eierstock), Testiculus (Hoden) identifiziert worden (Wijnen et al. 2007).

1.3 Polymorphismen in Cytochrom P450 Enzymen

Polymorphismen (griechisch „Vielgestaltigkeit“) sind verbreitet auftretende Genvariationen. Sie repräsentieren Sequenzvariationen mit dem Auftreten von zwei oder mehr Allelen an einem Genort mit einer Frequenz von $>1\%$ in einer bestimmten Population. Der häufigste genetische Polymorphismus ist der Single Nukleotid Polymorphismus (SNP). Er bezeichnet den Austausch eines einzelnen Nukleotides (Stojiljkovic et al. 2011).

Über Sequenzanalysen wurden bisher fünf der neun caninen Cytochrome als polymorph beschrieben: CYP1A2, CYP2C41, CYP2D15, CYP2E1 und CYP3A12. Allerdings ist über die Auswirkung dieser Polymorphismen auf die Arzneistoffmetabolisierung bisher nur wenig bekannt. Häufig werden Unterschiede in den Plasmakonzentrationen pharmakologisch wirksamer Substanzen und derer Metaboliten in pharmakokinetischen Studien oder Toxizitätsstudien bei Hunden beobachtet. Nur wenige Studien richteten hierbei ihr Augenmerk auf die Assoziation mit Polymorphismen (Kamimura 2006).

Polymorphismen können in präklinischen Studien, in denen Hunde als Versuchstiere eingesetzt werden, eine entscheidende Rolle spielen. So können sie nicht nur die Pharmakokinetik des Arzneistoffs beeinträchtigen, sondern auch zu einer unterschiedlichen Arzneistoffantwort führen. Dies kann wiederum über die Wirksamkeit und die Sicherheit eines Arzneistoffes mitentscheiden (Tenmizu et al. 2006; Fleischer et al. 2008).

Hunde repräsentieren nicht nur Patienten in der tierärztlichen Praxis oder Klinik, sondern werden auch im Rahmen von präklinischen Studien, insbesondere zur Pharmakokinetik neuer Wirkstoffe eingesetzt. Kamimura empfiehlt bereits im Jahre 2006 nur Gruppen von genetisch homogenen Beagle Hunden für diese Studien einzusetzen, um das Potential interindividueller Unterschiede zu minimieren (Kamimura 2006).

1.4 Der CYP1A2 1117C>T Polymorphismus beim Hund

Im CYP1A2 des Hundes wurde vor einigen Jahren ein Polymorphismus (CYP1A2 1117C>T) identifiziert, welcher in homozygoter Ausprägung zu einem Totalausfall dieses Enzymsystems führt (Tenmizu et al. 2004; Mise et al. 2004a). Dieser Polymorphismus ist in Exon 4 des CYP1A2-Gens des Hundes lokalisiert. Dort befindet sich beim Wildtyp die Base Cytosin, während polymorphe Hunde an dieser Stelle die Base Thymin aufweisen. Dadurch wird das für Arginin codierende Basen-Triplett CGA zu TGA, welches als Stopcodon fungiert und somit zu einem frühzeitigen Abbruch der Translation führt. Das entstehende trunkierte Protein ist nicht funktionsfähig und kann somit keine Metabolisierungsreaktionen katalysieren (Tenmizu et al. 2004, Abb. 1.2). Dieser CYP1A2-Polymorphismus und der damit verbundene Enzymausfall führt bei normalerweise über CYP1A2 metabolisierten Substraten zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Pharmakokinetik.

Das kinetische Verhalten einer oral verabreichten Substanz ist bestimmt von der Absorption (Aufnahme), Distribution (Verteilung) und der Eliminierung (Ausscheidung). Während die Aufnahme- und Umverteilungsphase nur wenig von Cytochrom-Polymorphismen beeinflusst werden, können diese in der Eliminierungsphase eine entscheidende Rolle spielen. Einige Substanzen werden hauptsächlich über Oxidationsreaktionen durch Cytochrome metabolisiert. Bereits im Jahre 2004 wurde beschrieben, dass der CYP1A2 1117C>T Polymorphismus zu einem signifikant unterschiedlichen pharmakokinetischen Verhalten zweier neuer Wirksubstanzen (YM64227 und AC3933) führt (Tenmizu et al. 2004; Mise et al. 2004a). Weiterhin gibt es Hinweise, dass dieser Polymorphismus für die großen interindividuellen Unterschiede im kinetischen Verhalten einer dritten Substanz (Celecoxib) mitverantwortlich ist (Kamimura 2006). Am Beispiel der Substanz AC3933 konnten Hunde als „poor metabolizer“ (PM) und „extensive metabolizer“ (EM) phänotypisiert werden (Mise et al. 2004a). Durch Immunoblotverfahren konnten dieselben Autoren später zeigen, dass PM-Hunde kein CYP1A2 in der Leber exprimieren (Mise et al. 2004b).

Obwohl bisher wenig über die möglichen toxischen Folgen von Cytochrom-Polymorphismen beim Hund berichtet wurde ist es möglich, dass Substanzen, welche hauptsächlich über Cytochrome metabolisiert werden, bei einem Enzymausfall toxisch wirken können (Kamimura 2006). Fleischer et al. weisen in einer Übersichtsarbeit darauf hin, dass es in Zukunft

möglicherweise Microarray-gestützte Testsysteme geben wird, mit welchen Hunde auf mögliche Polymorphismen getestet werden können. Entsprechende Testverfahren existieren in größerem Stil bereits für einige CYP-Polymorphismen beim Menschen (Fleischer et al. 2008).

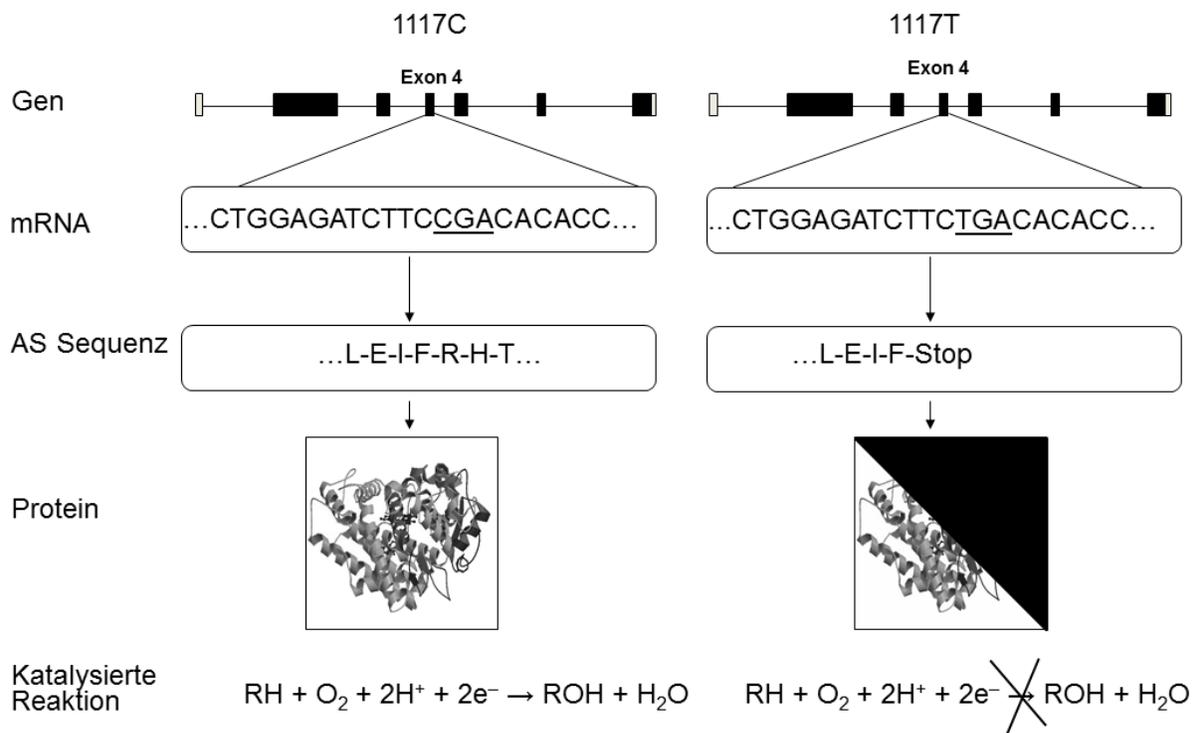


Abb. 1.2 Cytochrom P4501A2 1117C>T Polymorphismus beim Hund, modifiziert nach Aretz und Geyer 2010. Der Basenaustausch 1117C>T führt zu einem frühzeitigen Stopcodon und damit zu einem Abbrechen der Proteintranslation bei der CYP1A2-Proteinbiosynthese. Entsprechende sonst von CYP1A2 katalysierte Biotransformationsreaktionen können dann nicht mehr stattfinden.

1.5 Methylxanthine

Methylxanthine sind Xanthinderivate, die als natürliche Inhaltsstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Pflanzen vorkommen. Coffein (1,3,7-Trimethylxanthin), Theophyllin (1,3-Dimethylxanthin) und Theobromin (3,7-Dimethylxanthin) sind verwandte Methylxanthine, die eine ähnliche pharmakologische Wirkung aufweisen (Abb. 1.3). Methylxanthine liegen in Reinform als weiße Kristalle vor, die in Wasser schwer löslich sind, keinen Geruch, aber einen bitteren Geschmack aufweisen. Wegen ihrer nachweislichen pharmakologischen Wirkung waren sie seit jeher in der Medizin von Bedeutung (Matissek 1997). Coffein ist als anregender Inhaltsstoff das Hauptalkaloid in Kaffee, Theophyllin findet sich neben Coffein in Tee, Theobromin findet sich als Hauptalkaloid in Kakaopflanzen. Methylxanthine verteilen sich nach Aufnahme in allen Körperflüssigkeiten und akkumulieren aufgrund ihrer schnellen Verstoffwechslung nicht in Organen und Geweben. Hauptsächlich werden sie über Cytochrome in der Leber metabolisiert (Arnaud 2011).

Abhängig von der Tierart werden sie in unterschiedlichen prozentualen Anteilen über den Urin und die Faeces ausgeschieden. Miller et al. konnten in einer Studie 89 % des verabreichten radioaktiv markierten Theobromins im Urin und 4,5 % in den Faeces von Hunden nachweisen. 36,8 % des an Hunden verabreichten Theobromins wurde unverändert mit dem Urin ausgeschieden, 19,9 % als 3-Methylxanthin (3-MX), 3,4 % als 7-Methylxanthin (7-MX) und 0,4 % als 3,7-Dimethylharnsäure (3,7-DMH). Beim Hund konnte somit eine dominierende Aktivität der Demethylierung von Theobromin an der Bindungsstelle 7 aufgezeigt werden (Miller et al. 1984; Arnaud 2011).

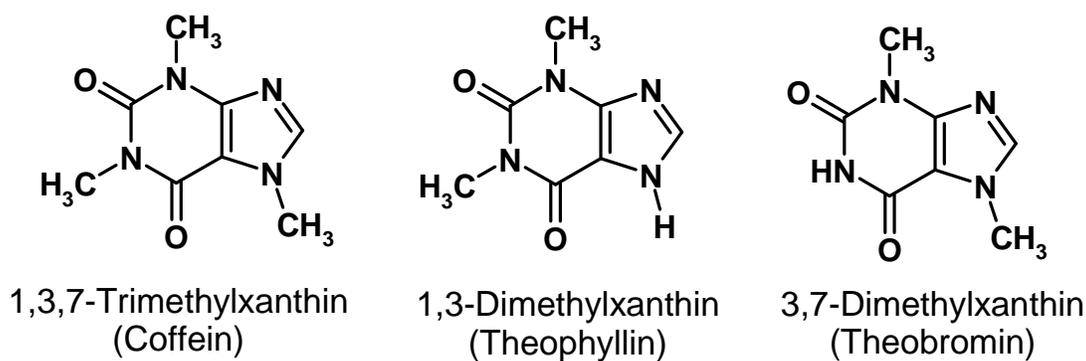


Abb. 1.3 Chemische Struktur und Klassifizierung der Methylxanthine.

1.5.1 Theobromin

Theobromin (griechisch „die Speise der Götter“) ist das Hauptalkaloid in Kakao (*Theobroma cacao*). Der Gehalt an Theobromin in Kakao und Schokolade wird durch viele Faktoren beeinflusst. Die Hauptfaktoren stellen hierbei die Bearbeitung, das Herstellungsverfahren, der Genotyp der Kakaopflanze, die geographische Abstammung und das Gewicht der Kakaobohne dar. Da Schokoladenprodukte in der Regel eine Mischung aus verschiedenen Kakaobohnen enthalten, lässt sich ein genauer Theobromingehalt in einem Fertigprodukt nicht mehr errechnen. Handelsübliche Milkschokolade enthält circa 0,184 %, Kakaobutter circa 0,006 % und weiße Schokolade circa 0,002 % Theobromin (Matissek 1997).

Shively et al. zeigten, dass die orale Bioverfügbarkeit von Theobromin in Schokolade (circa 80 %) geringer als die Bioverfügbarkeit einer oral applizierten Theobromin-Salz-Lösung ist (Shively et al. 1985). Mumford et al. verglichen jedoch in einer Studie die Absorption und Bioverfügbarkeit von Schokolade und oral verabreichten Theobromin in Kapseln. Hierbei war die orale Bioverfügbarkeit des Theobromins in der Schokolade höher als die der Kapseln. Auch wurden nach kürzerer Zeit höhere Konzentrationsmaxima nach der Verabreichung von Schokolade im Plasma nachgewiesen (Mumford et al. 1996). Die Autoren vermuteten, dass die applizierte Theobromin-Salz-Lösung, die Shively et al. 1985 verwendeten, die Theobrominabsorption verringern könnte.

1.5.1.1 Klinische Wirkung

Heutzutage gibt es in Deutschland kein zugelassenes Arzneimittel in der Tiermedizin, welches Theobromin als Monopräparat enthält. Seine leistungsfördernde Wirkung findet jedoch noch heute einen Missbrauch im Doping von Windhunden und Rennpferden (Loeffler 2000; Schaarschmidt 2008).

Diuretische Wirkung von Theobromin

Bereits um die Jahrhundertwende 1900 wurde eine verstärkte Urinausscheidung nach Aufnahme von Theobromin beobachtet. Die diuretische Wirkung wurde arzneilich genutzt (Diuretin[®], Theobromin-Natriumsalicylat), jedoch ging die Bedeutung durch die Einführung wirksamere

Diuretika im Jahre 1930 zurück (Rau 2001). Dorfman und Jarvik bestätigten 1970 die höhere Wirksamkeit von Coffein im Vergleich zu Theobromin, wogegen Czok im Jahre 1974 Theobromin die stärkere diuretische Wirkung zusprach (Dorfman und Jarvik 1970; Czok 1974). Der renale Blutkreislauf wird durch Adenosin α_1 - und α_2 -Rezeptoren reguliert (Vallon et al. 2006). Theobromin besitzt im Vergleich zu anderen Methylxanthinen zwar eine geringere Adenosin-Rezeptor-Affinität, zeichnet sich aber dennoch als nicht-selektiver Adenosin-Antagonist aus, wodurch die diuretische Wirkung zu erklären ist (Fredholm und Lindström 1999; Smit 2011).

Wirkungen von Theobromin auf den Respirationstrakt

Die Kontraktilität der glatten Muskulatur der Bronchien wird über adrenerge β_2 -Rezeptoren und Adenosin-Rezeptoren reguliert (Smit 2011). Aufgrund der relaxierenden Wirkung auf die glatte Bronchialmuskulatur wurde Theobromin auch in der Asthma-Therapie eingesetzt, jedoch durch das stärker wirkende Theophyllin ersetzt (Locher 1989). Theobromin unterdrückte in einer Vergleichsstudie mit Codein den Hustenreiz effektiver, wobei Theobromin deutlich weniger Nebenwirkungen aufwies (Usmani et al. 2005).

Sowohl die bronchodilatative als auch die antitussive Wirkung schreibt Smit gegenwärtig Theobromin als Adenosin-Rezeptor-Antagonist zu, jedoch sei die genaue Wirkweise ungeklärt (Smit 2011).

Kardiovaskuläre Wirkungen von Theobromin

Ein weiteres Anwendungsgebiet von Theobromin stellte die Therapie der Herzinsuffizienz dar (Batterman et al. 1959). Hierbei erwies sich Theobromin durch die Kombination aus diuretischer, vasodilatierender und positiv inotroper Wirkung als vorteilhaft (Heathcote 1920; Chapman und Miller 1974; Timson 1975).

In der Literatur finden sich jedoch auch Angaben, nach welchen Theobromin außer Magen-Darm-Reizungen keine pharmakologischen Wirkungen beim Menschen zuzusprechen sind (Dorfman und Jarvik 1970) und die therapeutische Nutzbarkeit daher bestritten wird (Tarka 1982).

1.5.2 Metabolismus von Theobromin

Die Stoffwechselwege von Theobromin wurden intensiv beim Menschen erforscht und beschrieben. Im Gegensatz zu Coffein und Theophyllin wird Theobromin nicht in andere Dimethylxanthine verstoffwechselt. Dagegen entsteht aus der Demethylierung von Coffein das Theobromin und aus Theophyllin entsteht das Paraxanthin (Smit 2011).

Eine vergleichende Studie zwischen fünf verschiedenen Säugetieren (Ratte, Maus, Hamster, Kaninchen und Hund) zeigte, dass alle untersuchten Spezies oral appliziertes Theobromin über Demethylierung, Ringoxidation und Ringteilung zu überwiegend gleichen Metaboliten verstoffwechseln. Jedoch ließen sich große Unterschiede im quantitativen Verhältnis der einzelnen Metaboliten erkennen, welche vor allem die Präferenz der Demethylierungsposition betreffen. Bei Hund und Ratte zeigte sich eine Präferenz für die Demethylierung an Position C7, wodurch der pharmakologisch wirksame Metabolit 3-Methylxanthin entsteht. Beim Menschen und vielen anderen untersuchten Spezies dominiert dagegen der Anteil des Metaboliten 7-Methylxanthin über 3-Methylxanthin, da hier die N-Demethylierung bevorzugt an Position C3 abläuft. Als quantitativ größter Anteil wurde von den meisten Spezies jedoch unverändertes Theobromin ausgeschieden (Miller et al. 1984; Arnaud 2011, Abb. 1.4).

Im Übrigen stellt Coffein eine Testsubstanz für die Messung der CYP1A2-Aktivität beim Menschen dar und wird daher zur Phenotypisierung bestimmter CYP1A2-Polymorphismen eingesetzt (Zanger et al. 2008).

Gates und Miners zeigten im Jahre 1999, dass neben CYP1A2 auch CYP2E1 am Metabolismus von Theobromin beim Menschen beteiligt ist. Dabei ist CYP1A2 an der Bildung von 7-Methylxanthin und CYP2E1 an der Bildung von 7-Methylxanthin, 3-Methylxanthin und 3,7-Dimethylharnsäure beteiligt. Als Testsubstanz für Aktivitätsmessungen von CYP1A2 und CYP2E1 wäre Theobromin jedoch nicht geeignet, da hier mehrere Enzyme in den einzelnen Metabolisierungsschritten beteiligt sind (Gates und Miners 1999). Dorne et al. beschreiben zudem die Beteiligung von CYP2A6 im Metabolismus von Theobromin beim Menschen (Dorne et al. 2001). Des Weiteren muss angemerkt werden, dass trotz hoher Sequenzhomologie zwischen einzelnen CYPs von Mensch und Hund, das Substratspektrum durchaus unterschiedlich ausfallen

kann (Fink-Gremmels 2008). So zeigten z.B. Mise et al. (2008), dass CYP1A2, anders als beim Menschen, im Metabolismus von Coffein beim Hund nicht beteiligt ist.

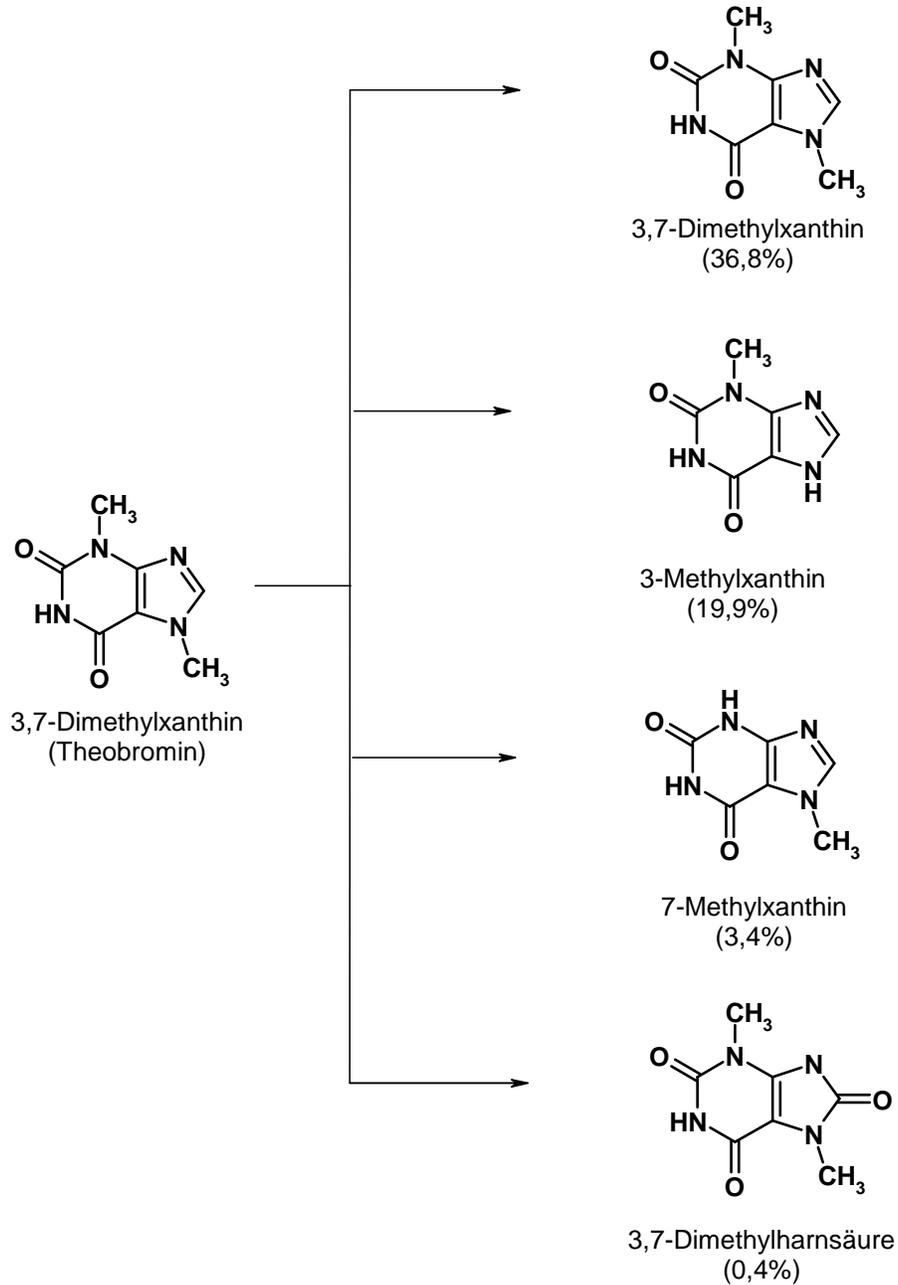


Abb. 1.4 Schematische Darstellung des Theobrominmetabolismus beim Hund. Die Prozentangaben beziehen sich auf den jeweiligen Anteil der Metabolite im Urin nach oraler Verabreichung von Theobromin. Angaben nach Miller et al. 1984.

1.5.3 Theobrominvergiftung beim Hund

Als therapeutische Dosis für den Hund werden in der Literatur für Theobromin 20 mg/kg Körpergewicht angegeben (Glauberg und Blumenthal 1983; Hornfeldt 1987). Erste klinische Anzeichen sind ab dieser therapeutischen Dosis von 20 mg/kg KG zu erwarten, schwere Anzeichen bereits ab 40-50 mg/kg KG und Anfälle ab 60 mg/kg KG (Gwaltney-Brant 2001). So traten Vergiftungserscheinungen beim Hund in der Vergangenheit bereits bei einer aufgenommenen Menge Theobromin von unter 100 mg/kg Körpergewicht auf (Jansson et al. 2001). Strachan und Bennett beschreiben 1994 eine Dosis von 100 mg/kg KG als letale Dosis für den Hund (Strachan und Bennett 1994).

Die Berichterstattung über Theobrominvergiftungen bei Tieren begann nach dem 2. Weltkrieg. Zu dieser Zeit waren Vergiftungen weit verbreitet, da Kakaobohnenschalen als Futterzusatz für Vitamin D bei Nutztieren verwendet wurden (Sutton 1981). In der Literatur erschienen Fallberichte von Vergiftungen bei Pferden (Hooser 1985), Schweinen, Geflügel (Blakemore und Shearer 1943), Kälbern (Curtis und Griffiths 1972), Hunden, Katzen, Ratten, Mäusen, Kaninchen, Meerschweinchen (Tarka 1982; Eteng et al. 1997), aber auch bei Hausfliegen (Srinivasau und Kesava 1979). Menschen hingegen verzehren seit jeher Schokolade wobei nie über gravierende Vergiftungserscheinungen berichtet wurde.

Fallberichte von Theobrominintoxikationen

Bei Haustieren, insbesondere dem Hund, wird immer wieder von Theobrominvergiftungen aufgrund von Schokoladenverzehr berichtet (Decker 1972; Sutton 1981; Tarka 1982; Glauberg und Blumenthal 1983; Hooser 1985; Hornfeldt 1987; Strachan und Bennett 1994; Sturgeon und Sutton 2008; Stosic et al. 2011), aber auch nach dem Verzehr von Kakaobohnenschalenmulch wurden Vergiftungssymptome beschrieben (Drolet et al. 1984; Hovda und Kingston 1994). Im Jahre 1942 starben sechs Hunde infolge der Verfütterung eines Futtermittels mit einem Theobromingehalt von 2 g/kg (Clough 1942). Durch achtlos weggeworfenen Müll verstarben zwei Wildtiere (Rotfuchs und Dachs) in Schweden vermutlich an einer Theobrominvergiftung (Jansson et al. 2001). Glauberg und Blumenthal berichteten im Jahre 1983 von einem 20,6 kg schweren Springer Spaniel, der einen Tag nach der Aufnahme von Milkschokolade mit einem

geschätzten Theobromingehalt von 1920 mg nach vorangehender Nervosität, Harninkontinenz, Tremor und generalisierten Krämpfen verstarb. Der Serumspiegel des verstorbenen Hundes betrug 133 mg Theobromin/l (Glauber und Blumenthal 1983).

Stidworthy et al. untersuchten einen Fall in dem ein Hundebesitzer eine geringe Menge dunkler Schokolade an vier englische Bulldoggen verfütterte. Zwei dieser Hunde kollabierten und starben, zwei der Hunde zeigten keine Symptome. Aufgrund des gleichzeitigen Todes zweier zuvor gesunder Hunde schlossen die Autoren auf eine Theobrominvergiftung und unterstützten hiermit die Beobachtung von Gans et al., die bereits 1980 über die individuelle Variabilität in der Pharmakokinetik von Theobromin bei Hunden berichteten (Gans et al. 1980; Stidworthy et al. 1997).

Hovda und Kingston beschreiben im Jahre 1994 drei Fälle von Theobrominvergiftungen bei Hunden infolge des Verzehrs von Kakaobohnenschalenmulch (Theobromingehalt: 0,2 - 3,0 %), der in Gartencentern zum Verkauf angeboten wird. Alle drei Hunde zeigten Vomitus, Nervosität und Tremor und wurden symptomatisch behandelt. Ein Hund zeigte nach 96 h keine deutliche Besserung der Symptome, die anderen beiden Hunde erholten sich nach 72 h vollständig (Hovda und Kingston 1994). Auch Drolet et al. berichten bereits im Jahre 1984 von einem ähnlichen Fall. Nach dem Verzehr großer Mengen Kakaobohnenschalen verstarb ein Labrador Retriever infolge von Konvulsionen (Drolet et al. 1984).

Strachan und Bennett verwiesen 1994 auf die Gefährlichkeit von Schokoladenprodukten indem sie über einen Fall von Kakaopulveraufnahme durch zwei Hunde berichteten, die am Folgetag verstarben. Eine anschließende Obduktion ergab einen Serumspiegel von 140 mg Theobromin / l (Strachan und Bennett 1994).

Sutton berichtete 1981 von einer Theobrominaufnahme durch einen Springer Spaniel in Form von einer Tasse Kakaogetränk. Auch dieser Hund verstarb am Folgetag gemäß Obduktion an akutem Herz-Kreislaufversagen (Sutton 1981).

Decker beschrieb den Fall eines Airedale Terriers, welcher Blockschokolade aufgenommen hatte und nach Vomitus, Tremor, Spasmen und zyanotischen Schleimhäuten einen komatösen Zustand aufwies. Der Hund verstarb unmittelbar nach der Ankunft in einer Tierklinik (Decker 1972).

Stosic et al. berichteten von einem Kavalier King Charles Spaniel, welcher etwa 25 Stunden vor Vorstellung in der tierärztlichen Klinik circa 200 g Vollmilchschokolade aufgenommen hatte. Dies entspricht einer errechneten, aufgenommenen Theobrominmenge von 200-400 mg bzw.

33-66 mg/kg KG. Die Besitzer des Hundes berichteten von Diarrhoe und Vomitus bei gestörtem Allgemeinbefinden. In der Klinik zeigte der Hund zudem Exzitationen, Tachykardie, Tachypnoe und Polyurie. Eine Bestimmung der Methylxanthinkonzentrationen mittels HPLC ergab 45 h nach Schokoladenaufnahme einen Serumspiegel von 108 mg Theobromin/l. Der Hund wurde nach fünftägiger umfangreicher Therapie mittels Infusionen, Aktivkohle, Esmolol und Atenolol mit gutem Allgemeinbefinden entlassen (Stosic et al. 2011).

Symptome einer Theobrominvergiftung werden in den oben genannten Berichten wie folgt zusammengefasst: Nervosität, Hyperaktivität, Tremor, Zyanose der Schleimhäute, Spasmen, Hyperthermie, Ataxie, Vomitus, Diarrhoe, Polyurie, Dehydratation, Harninkontinenz, Tachypnoe, beginnende Bradykardie bis Tachykardie, Arrhythmien, Koma, plötzliches Herz-Kreislauf-Versagen.

Offizielle Meldungen von Theobrominintoxikationen

Eine Analyse von Sturgeon und Sutton aus 3014 Fällen von Theobrominvergiftungen bei Hunden, die im Zeitraum von April 1992 bis Oktober 1997 im Veterinary Poisons Information Service in London gemeldet wurden, ergab eine hohe Morbidität, jedoch eine geringe Mortalität nach Theobrominaufnahme (Sturgeon und Sutton 2008).

Hooser berichtete über 77 Fälle von Theobrominvergiftungen bei Tieren, die im Jahr 1984 an das National Animal Poison Control Center der Universität Illinois gemeldet wurden und kam zu dem Ergebnis, dass in 97,4 % aller Anrufe die Aufnahme von Schokolade für Vergiftungssymptome verantwortlich war. Insgesamt starben zwei Hunde und zwei Pferde (Hooser 1985).

Toxikologische Studien mit Theobromin

Gans et al. führten 1980 eine Studie durch, in der Mischlingshunden unterschiedliche Mengen Theobromin in Kapseln verabreicht wurden. Nach einmaliger Applikation verstarb einer von vier Hunden bei einer Dosierung von 300 mg/kg Körpergewicht, sowie einer von acht Hunden bei 500 mg/kg Körpergewicht und einer von zwei Hunden bei 1000 mg/kg Körpergewicht. Symptome traten nicht dosisabhängig auf und äußerten sich in Hecheln, Nervosität und Tremor. Während der Langzeitapplikation von Theobromin in unterschiedlichen Dosierungen starben

sieben von zehn Hunden. Die verbliebenen drei Hunde wurden am Ende der Studie euthanasiert. In der Obduktion dieser zehn Hunden zeigten sich bei sechs Tieren fibrotische Myopathien des rechten Vorhofes, die ebenfalls nicht dosisabhängig auftraten (Gans et al. 1980).

Hodenatrophie (Friedmann et al. 1975; Tarka et al. 1981), sinkende Wachstumsgeschwindigkeit, Gewichtsverlust und Thymusatrophie (Tarka et al. 1979), wie sie in Rattenversuchen nach Applikation von Theobromin zu beobachten waren, traten bei Hunden nicht auf. Bei einer Verabreichung von Theobromin in einer Dosierung von unter 300 mg/kg traten unter den Studienbedingungen bei keinem Hund Symptome einer Vergiftung auf (Gans et al. 1980).

Therapie der Theobrominvergiftung beim Hund

Da kein spezifisches Antidot existiert, wurden in den berichteten Fällen von Theobrominvergiftungen symptomatische Therapien eingeleitet. Empfohlen werden induziertes Erbrechen, Magenspülungen und Verabreichung von Aktivkohle um die Resorption von Theobromin über den Magen-Darm-Trakt zu verhindern, wiederholte Diazepam-Injektionen gegen Krampfanfälle, bei langanhaltenden Krämpfen Anästhesien durch kurzwirkende Barbiturate oder Phenobarbital, Überwachung der Herzfunktionen und gegebenen Falles die Verabreichung von Propanolol beziehungsweise Lidocain (Glauberg und Blumenthal 1983; Hornfeldt 1987; Hovda und Kingston 1994; Strachan und Bennett 1994). Einige Hunde wurden vom Besitzer tot aufgefunden, andere starben trotz eingeleiteter Therapie an Herz-Kreislaufversagen. In einigen Fällen wurden die Hunde obduziert. Die ermittelten Diagnosen entsprachen dem klinischen Bild. Es zeigten sich Magenüberladungen mit schokoladeähnlichem Inhalt, geschwollene und gerötete Schleimhäute im Magen-Darm-Trakt, Zyanose, Leber-, Nieren-, Milzstauungen und diffuse Lungenstauung (Decker 1972; Sutton 1981; Drolet et al. 1984; Strachan und Bennett 1994).

Theobromin in Zusammenhang mit Doping

Aufgrund des stimulierenden und leistungsfördernden Effekts zählt Theobromin im Rennsport von Hunden und Pferden zu den doping-relevanten Substanzen (Loeffler 2000; Schaarschmid 2008).

Für den Pferdesport gibt die Deutsche Reiterliche Vereinigung (Bundesverband für Pferdesport und Pferdezucht) im Anhang I eine Liste der Dopingsubstanzen und verbotenen Methoden im

Wettkampf an. Hier liegt der Grenzwert für Theobromin im Urin bei 2 µg/ml. Im Schlittenhundesport gilt die Liste verbotener Substanzen und verbotener Methoden von 2011, herausgegeben von der International Federation of Sleddog Sports. Hier zählt Theobromin zu den Stimulantien und ist verboten.

Auch die FCI (Federation Canina International)-Sportordnung, die im Windhundesport (Rennen und Coursing) gilt, legt einen Grenzwert von 2 µg/ml Urin fest.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Polymorphismen in den Cytochrom P450-Enzymen (CYPs) des Menschen wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht. Viele von diesen, z.B. CYP2D6, CYP2C9 oder CYP2C19 haben einen erheblichen Einfluss auf die Metabolisierungsrate und damit auf das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Polymorphismen in den CYPs des Hundes sind weniger gut erforscht. Diese sind jedoch aus zweierlei Hinsicht von Interesse: So ist der Hund nicht zur Zielspezies der Arzneitherapie in der Veterinärmedizin, sondern im Falle des Beagle Hundes auch Modelltier für pharmakokinetische Untersuchungen im Rahmen der Arzneistoffentwicklung und -zulassung. Ein besseres Verständnis der genetischen Variabilität in den CYPs des Hundes würde dabei nicht nur die therapeutische Sicherheit vieler Arzneistoffe verbessern, sondern auch pharmakokinetische Daten aus Studien am Beagle Hund besser interpretierbar machen.

Derzeit wurden neun Cytochrom P450-Enzyme des Hundes identifiziert: CYP1A1, CYP1A2, CYP2B11, CYP2C21, CYP2C41, CYP2D15, CYP2E1, CYP3A12, und CYP3A26. Für einige der genannten CYPs wurden bereits polymorphe Sequenzen beschrieben. Darunter ein CYP1A2 1117C>T Polymorphismus, welcher in homozygoter Ausprägung zu einem Totalausfall des CYP1A2 führt. Dies äußert sich nicht nur in erheblichen Unterschieden in der Metabolisierung von Entwicklungssubstanzen (AC-3933, YM-64227) im Rahmen der Arzneistoffentwicklung, sondern könnte auch an der hohen Empfindlichkeit von Hunden gegenüber Methylxanthinen wie Theobromin beteiligt sein.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte Theobromin als mögliches CYP1A2-Substrat des Hundes identifiziert und die Metabolisierung sowie die renale Elimination von Theobromin nach oraler und intravenöser Einmalgabe in Abhängigkeit von der genetischen Disposition der eingesetzten Hunde untersucht werden. Das Ziel dieser Studie war eine CYP1A2 Genotyp-basierte pharmakokinetische Metabolismusstudie mit der wirksamen Substanz Theobromin. Da eine höhere Empfindlichkeit für toxische Reaktionen in der Gruppe der polymorphen CYP1A2 1117T/T Hunde erwartet wurde, wurde eine subtoxische Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht gewählt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Genotypisierung

2.1.1 Material

DNA-Gewinnung und -Isolierung

MasterAmp™ Buccal Swab Brush	Epicentre, Biotechnologies, Madison, USA
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ethanol, 100%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Heraeus Multifuge 3 L-R	Kendro Laboratory Products GmbH, Kernen, Deutschland
Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Genotypisierung

TaqMan Genotyping Master Mix	
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	
dNTP-Mix	
Reaktionspuffer	
TaqMan AD Assay	
Applied Biosystems 7300 Thermocycler	
7300 Real-Time PCR-System Sequence Detection Software (SDS) v1.4	
	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Methode

DNA-Gewinnung

Es wurden von der Maulschleimhaut Abstriche von 270 Beagle Hunden mit Hilfe von MasterAmp™ Buccal Swab Brushes (Epicentre, Biotechnologies, Madison, USA) entnommen und genomische DNA mittels QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

Um Verunreinigungen zu vermeiden wurden die Proben an nüchternen Tieren gewonnen. Nach Entnahme des Buccal Swab Brushes aus der sterilen Umverpackung wurde der Fang des Tieres geöffnet und das Stäbchen 10 x gründlich über die Schleimhaut gerieben. Dabei wurde das Stäbchen zusätzlich gedreht um möglichst viel Zellmaterial auf das Stäbchen zu übertragen.

Anschließend wurde das Stäbchen in ein gekennzeichnetes steriles Probengefäß verbracht. Die Proben wurden mindestens 2 Stunden getrocknet und bis zur DNA-Isolierung bei 4-8°C aufbewahrt.

DNA-Isolierung

Die DNA wurde mit Hilfe des QIAmp DNA Mini Kit, nach Vorgaben des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland, QIAmp DNA Mini and Blood Mini Handbuch) isoliert. Hierzu wurden die Buccal Swab Brushes (Epicentre, Biotechnologies, Madison, USA) in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und 500 µl phosphatgepufferte Salzlösung zugefügt. Nach Zugabe von 20 µl Protease (im Kit enthalten) und 500 µl Buffer AL (im Kit enthalten) wurde die Probe sofort mit Hilfe eines Schüttelgeräts (Vortex) 15 Sekunden vermischt. Danach wurde die Probe für 10 min in ein auf 56°C erwärmtes Wasserbad gestellt und im Anschluss 10 min bei Raumtemperatur (15-25°C) mit 3220 x g zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 L-R, Kendro Laboratory Products GmbH, Kernen, Deutschland). Anschließend wurden 500 µl Ethanol hinzugefügt und die Probe erneut mit einem Schüttelgerät gemischt. Danach wurden 700 µl des Reaktionsgemisches in eine QIAamp-Spinsäule (im Kit enthalten) überführt, 1 min mit 6.000 x g zentrifugiert und die QIAamp-Spinsäule in ein sauberes 2-ml-Reaktionsgefäß gesetzt. Mit den restlichen 700 µl des Reaktionsgemisches wurde ebenso verfahren. Im Anschluss wurde dem Reaktionsgemisch 500 µl Buffer AW1 (im Kit enthalten) zugefügt und 1 min mit 6.000 x g zentrifugiert. Die QIAamp-

Spinsäule wurde erneut in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gesetzt und daraufhin 500 µl Buffer AW2 (im Kit enthalten) zugefügt. Dieses Gemisch wurde 3 min mit 20.000 x g zentrifugiert und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß gesetzt. Der Säule wurden danach 150 µl Buffer AE (im Kit enthalten) zugefügt, bei Raumtemperatur 1 min inkubiert und mit 6.000 x g zentrifugiert. Die DNA-Lösung wurde bis zur PCR Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Genotypisierung

Die isolierte DNA wurde ohne vorherige Quantifizierung mit einem Volumen von 7,5 µl in die nachfolgende PCR-Reaktion zur CYP1A2-Genotypisierung eingesetzt. Dabei wurde eine Methode angewendet, die von Aretz und Geyer (2010) beschrieben wurde und die auf einer allel-spezifischen Bindung von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Oligonukleotidsonden an die DNA beruht.

Das Pipettieren der PCR-Ansätze (7,5 µl DNA-Lösung, 12,5 µl TaqMan Master Mix, 0,625 µl des Gemischs aus Primern und allel-spezifischen Sonden, 4,375 µl DNase-freies Wasser, Gesamtvolumen 25 µl) als auch die Durchführung der Reaktionen wurden nach Anweisung des Herstellers (Applied Biosystems) durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer (vorwärts: 5'-CCT TAA TGG AGG CCT TCA TCC T-3'; rückwärts: 5'-CAG AAG AAG CAG GCC TTA CCT-3', Applied Biosystems) waren spezifisch gegen das CYP1A2-Gen gerichtet und lieferten ein 89 bp großes, den 1117C>T SNP enthaltendes Amplifikationsprodukt. Die beiden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (VIC und FAM) gekoppelten Sonden (Applied Biosystems) unterscheiden sich in ihrer Sequenz nur an einer Position (siehe Unterstreichung) entsprechend dem zu untersuchenden SNP im CYP1A2-Gen (1117C-Allel: VIC-5'-ATC TTC CGA CAC ACC T-3' und 1117T-Allel: FAM-5'-ATC TTC TGA CAC ACC T-3'). Am 3' der Sonden wurde ein Quencher gekoppelt, welcher die Eigenfluoreszenz der Sonden unterdrückt. Solange die Fluoreszenzfarbstoffe mit dem Quencher in räumlich naher Verbindung stehen, geht die Anregungsenergie auf den Quencher über, so dass keine Fluoreszenz detektiert werden kann. Trifft aber die Polymerase bei der Elongation ausgehend von dem Vorwärtsprimer auf die Sonde, so baut sie über ihre 5' Exonuklease-Aktivität die Sondennukleotide ab. Dabei wird der Fluoreszenzmarker frei und kann bei Anregung Licht emittieren. Diese Fluoreszenz wird im Rahmen einer real-time PCR-Reaktion aufgezeichnet.

Die in einer 96-well Platte befindlichen PCR-Ansätze wurden mit einem Applied Biosystems 7300 Thermocycler (Applied Biosystems) amplifiziert. Dabei wurde eine initiale Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen aus Denaturierung bei 92°C für 15 Sekunden und Bindung bzw. DNA-Synthese bei 60°C für eine Minute durchgeführt. Nach Beendigung der PCR wurde in einem post-run Fluoreszenzread die Fluoreszenz beider Sondenfarbstoffe bestimmt und über die Sequence Detection Software (SDS) v1.4 automatisch der entsprechende Genotyp zugewiesen (Allelische Diskriminierung). Der im Rahmen der absoluten Quantifizierung während der real-time PCR gemessene Fluoreszenzzuwachs pro Zyklus diente zur Qualitätskontrolle des PCR-Laufs. Die Zuweisung der Genotypen erfolgte auf folgender Grundlage: Wird nur der mit der CYP1A2 1117C-Sonde gekoppelte Farbstoff FAM freigesetzt, liegt das C-Allel homozygot vor (Abb. 2.1). Wenn jedoch nur der an die CYP1A2 1117T-Sonde gekoppelte Farbstoff VIC freigesetzt wird, stammt die DNA-Probe von einem Hund der homozygot das T-Allel trägt (Abb. 2.2). Werden beide Farbstoffe freigesetzt, liegt ein heterozygoter Genotyp CYP1A2 C/T vor (Abb. 2.3).

Bei automatischer software-gestützter allelischer Diskriminierung stellt sich folgendes Bild dar: Die nach dem PCR-Lauf gemessenen Fluoreszenzen von VIC und FAM werden gegeneinander aufgetragen. No template control (NTC) Proben, welche keine genomische DNA enthalten, zeigen nur Hintergrundfluoreszenz für VIC und FAM. Proben homozygot für das T-Allel werden nur im FAM-Kanal registriert, Proben homozygot für das C-Allel nur im VIC-Kanal. Heterozygote Proben liegen auf einer gedachten Winkelhalbierenden; hier wird Fluoreszenz in beiden Kanälen für FAM und VIC detektiert. Die Zuordnung der Genotypen C/C, C/T und T/T erfolgte automatisch durch die Software.

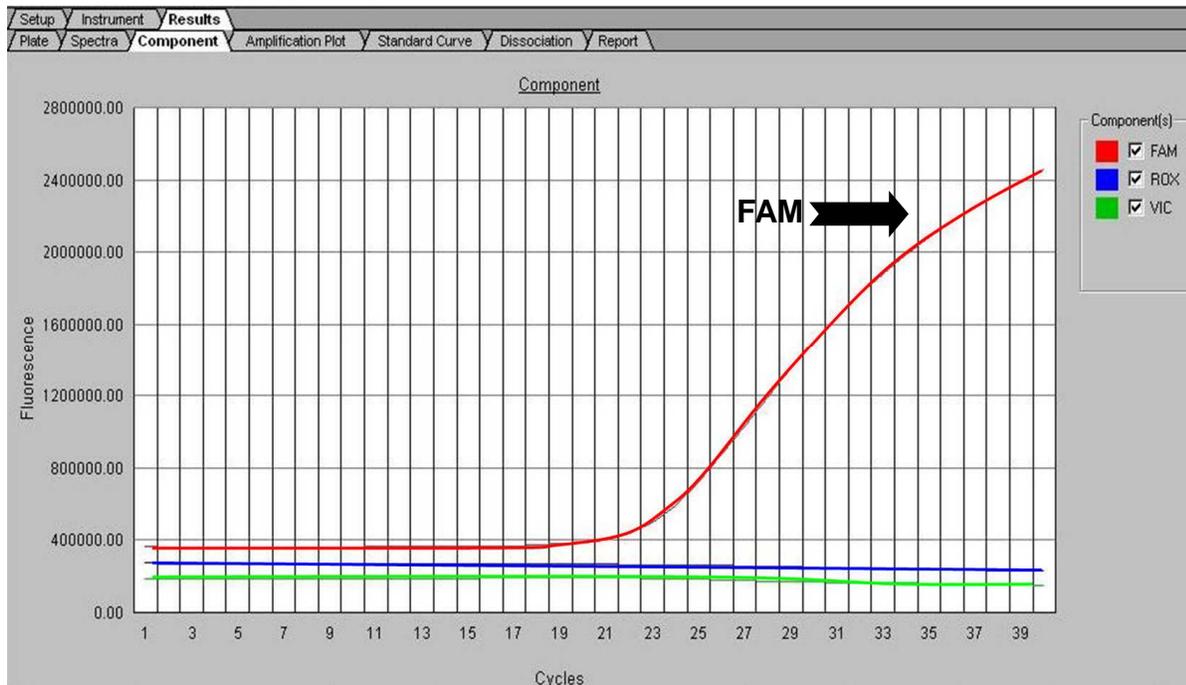


Abb. 2.1 Repräsentative Darstellung eines real-time PCR Laufes für einen homozygoten CYP1A2 1117T/T Hund. Es wurde nur ein Fluoreszenzzuwachs für den Farbstoff FAM detektiert.

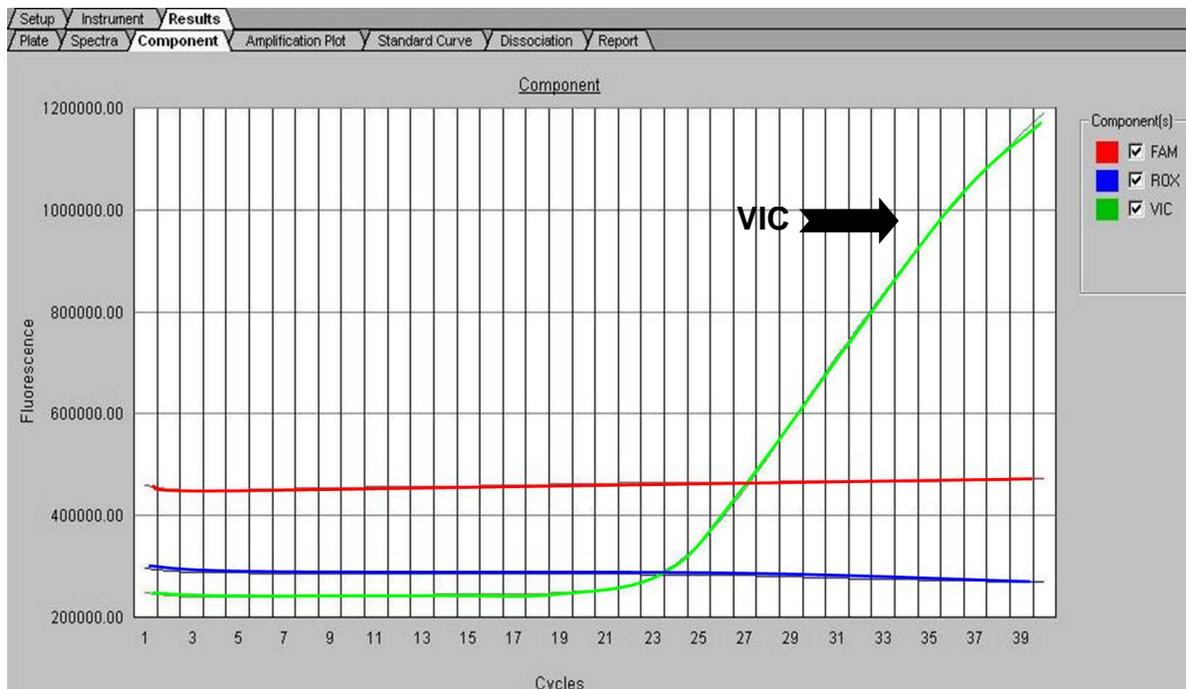


Abb. 2.2 Repräsentative Darstellung eines real-time PCR Laufes für einen homozygoten CYP1A2 1117C/C Hund. Es wurde nur ein Fluoreszenzzuwachs für den Farbstoff VIC detektiert.

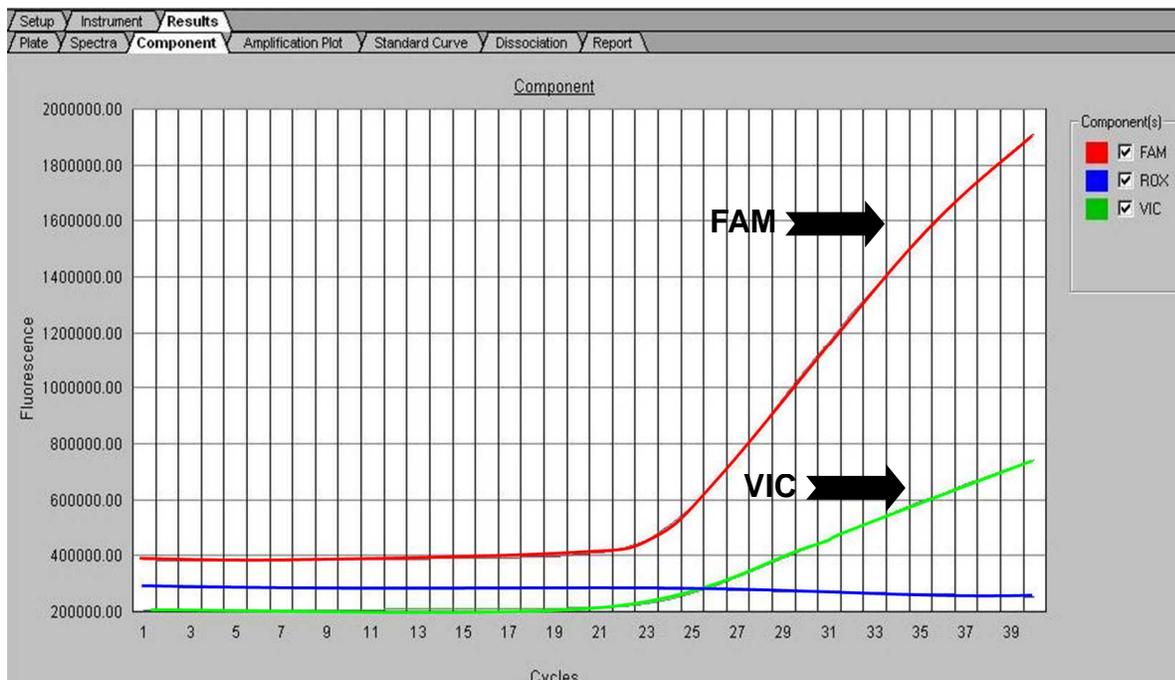


Abb. 2.3 Repräsentative Darstellung eines real-time PCR Laufes für einen heterozygoten CYP1A2 1117C/T Hund. Es wurde ein Fluoreszenzzuwachs für beide Farbstoffe, FAM und VIC, detektiert.

2.2 Kinetikstudie

2.2.1 Material

2.2.1.1 Tiere

Charakterisierung der Prüftiere

In der Prüfung wurden 10 Hunde der Rasse Beagle aus dem Bestand der Bayer Animal Health GmbH (Monheim am Rhein, Deutschland), gezüchtet bei Harlan Winkelmann (Eystrup, Deutschland) eingesetzt.

Vor Studienbeginn wurden 270 Hunde auf einen Polymorphismus im Cytochrom P4501A2-Gen getestet und entsprechend ihres Genotyps unterschieden. Fünf ausgewählte Hunde wiesen den

genannten Polymorphismus auf, während fünf Hunde keinen Polymorphismus zeigten. Diese zehn Hunde wurden vor Studienbeginn zur Sicherheit ein zweites Mal typisiert.

Die Hunde wurden entsprechend den gesetzlichen Vorschriften durch eine permanente Tätowierung im Ohr unveränderlich und individuell, sowie durch eine laufende Nummer gekennzeichnet. Die Charakteristika der eingesetzten Hunde sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tab. 2.1 Kennzeichnung der eingesetzten Hunde

Genotyp	laufende Nummer	Geschlecht	Genotyp	laufende Nummer	Geschlecht
C/C	1	♀	T/T	6	♂
T/T	2	♂	T/T	7	♂
T/T	3	♂	T/T	8	♀
C/C	4	♀	C/C	9	♂
C/C	5	♀	C/C	10	♀

Eingewöhnungsphase vor Prüfungsbeginn

Die für die Prüfung vorgesehenen Tiere waren zu Beginn der Prüfung bereits an die Prüfeinrichtung gewöhnt.

Einschlusskriterien

In die Prüfung wurden nur Hunde eingeschlossen, die in der Einschlussuntersuchung am Prüftag (PT) -4 klinisch unauffällig waren. Die Tiere durften mindestens zwei Monate vor der Applikation von Theobromin nicht mit Methylxanthinen behandelt worden sein. Die Einschlussuntersuchung wurde von mir vorgenommen und in den Rohdaten dokumentiert.

Ausschlusskriterien vor Einschluss in die Prüfung

Tiere mit gestörtem Allgemeinbefinden oder Symptomen einer schwerwiegenden Erkrankung zum Zeitpunkt der Einschlussuntersuchung wurden nicht in die Prüfung eingeschlossen.

Verbleib der Tiere nach Prüfungsende

Nach Beendigung der Prüfung gingen die Hunde wieder in den Bestand des Bayer Animal Centers, Monheim am Rhein, Deutschland über.

Haltungsbedingungen

Die Hunde waren in der Prüfeinrichtung des Bayer Animal Centers untergebracht. Die Hunde wurden einzeln in Zwingern gehalten. Die Käfige waren mit einem Fliesenboden, Futternäpfen und Nippel-Selbsttränken ausgestattet. Die Größe eines Zwingers betrug mindestens 6m². Es wurde eine Luftfeuchtigkeit von 40-85 % und eine Lufttemperatur von 18-23°C angestrebt. Die Tierhaltungsräume wurden täglich für 12 Stunden von circa 6.00-18.00 Uhr künstlich beleuchtet.

Fütterung und Tränke

Die Tiere wurden einmal täglich bedarfsgerecht mit einem handelsüblichen Alleinfutter für Hunde (Firma Ssniff, extrudiert, Alleinfutter für Hunde, Ssniff-Spezialdiäten GmbH, 59494 Soest, Deutschland) gefüttert. Die Fütterungszeitpunkte wurden in den Rohdaten dokumentiert. An den Tagen vor der Applikation wurde die Futteraufnahme zeitlich begrenzt. Der Zeitpunkt des Futterentzugs wurde dokumentiert. An den Applikationstagen erfolgte die Fütterung 4 h nach der Applikation.

Trinkwasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Wasseraufnahme wurde nicht dokumentiert und Wasserproben wurden nicht genommen.

Hygienemaßnahmen

Die Reinigung der Zwinger erfolgte mindestens einmal täglich.

2.2.1.2 Verwendete Prüfgegenstände

Material

Analysenwaage Mettler AM 100	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Waage Mettler PM 4800 DeltaRange	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad Transsonic 460	Elma, Singen, Deutschland
Filter Millipore Sterivex TM GP 0,22 µm	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
FluroTec Stopfen (03)	West Pharmaceutical Services, Eschweiler, Deutschland
Polyethylenglykol 200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hartgelatine-Leerkapseln	Küpper-Primax GmbH, Troisdorf, Deutschland
Natronhydroxid Plätzchen	KMF Laborchemie Handels GmbH, Leipzig, Deutschland
Methansulfonsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

Methode

Herstellung der Kapseln

Um eine exakte per orale Applikation der intendierten Theobromindosis zu gewährleisten, wurde die individuell erforderliche Menge des Theobromins mit Hilfe des dokumentierten Körpergewichtes berechnet, am Tag der Applikation für jedes oral zu behandelnde Tier individuell in Hartgelatine-Leerkapseln gefüllt und in separaten mit der Tier ID beschrifteten Behältern aufbewahrt. Als Hilfsstoff wurde PEG 200 im Verhältnis 1:1 verwendet.

Tab. 2.2 Prüfgegenstand 1

Bezeichnung	Theobromin-Hart-Gelatine-Kapseln, Größe 4, farblos, klar, transparent
Wirkstoff	Theobromin-Polyethylenglykol 200 im Verhältnis 1:1 individuell eingewogen
Hilfsstoffe	Polyethylenglykol 200
Chargenbezeichnung	BII-442-0-1
Behälter	50 ml Injektionsflasche mit Bördelkappe
Herkunft	Bayer Animal Health, Formulation Technology, Monheim am Rhein, Deutschland
Lagerung	Raumtemperatur und Lichtschutz

Herstellung der Injektionslösung

Am Tag der Applikation wurde eine 5 molare NaOH Lösung mit Hilfe eines NaOH Plätzchens und Bidestwasser angesetzt. Es wurden 40 g Bidestwasser vorgelegt, 2 g Theobromin zugefügt und mit Hilfe eines Schüttelgeräts (Heidolph MR 3001 K) vermischt. Da man auf diese Weise keine klare Lösung erhielt, wurden 3 g NaOH Lösung zugetropft bis die Lösung klar vorlag und einen pH-Wert von 12,5 aufwies. Im Anschluss wurde der pH-Wert durch 0,2 g Methansulfonsäure auf 11,5 eingestellt. In einem Messkolben wurde die Lösung auf 50 ml aufgefüllt und durch einen Spritzenvorsatzfilter (Millipore Sterivex TM GP 0,22 µm) in eine 50 ml Klarglasflasche (Glasart I) steril filtriert. Die Glasflasche wurde mit einem Silikonstopfen und einer Bördelkappe verschlossen.

Tab. 2.3 Prüfgegenstand 2

Bezeichnung	Theobromin-Injektionslösung
Wirkstoff	Theobromin
Wirkstoffgehalt	4 g in 100 ml (4%)
Hilfsstoffe	Bidestwasser, NaOH 5N, Methansulfonsäure
Chargenbezeichnung	BII-441-0-6
Herkunft	Bayer Animal Health, Formulation Technology, Monheim am Rhein, Deutschland
Behälter	50 ml Klarglasinjektionsflasche Glasart I mit Teflonstopfen und Bördelkappe
Lagerung	Raumtemperatur und Lichtschutz

2.2.2 Methode

2.2.2.1 Versuchsaufbau

Die Studie wurde als kinetische Studie im 2x2 cross-over Design unter Berücksichtigung des Standards von “Good Scientific Practice Studies”, der Richtlinie für die Durchführung von pharmakokinetische Studien (EMEA/CVMP/133/99-Final, vom 08. September 2000) und den europäischen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

Im Rahmen dieser Studie sollte Theobromin als mögliches CYP1A2-Substrat identifiziert und die Metabolisierung sowie die renale Elimination von Theobromin nach per oraler und intravenöser Einmalgabe in Abhängigkeit von dem CYP1A2 1117 Genotyp der eingesetzten Hunde untersucht werden.

Dazu wurden zehn adulte Hunde der Rasse Beagle vor Studienbeginn auf den CYP1A2 1117C>T Polymorphismus untersucht und entsprechend ihres Genotyps unterschieden. Fünf Hunde davon

wiesen den genannten Polymorphismus 1117T/T homozygot auf, fünf Hunde waren CYP1A2 intakt mit dem Genotyp 1117C/C.

Allen Tieren wurde Theobromin per oral in Kapselform (Prüfgegenstand 1) und intravenös als Injektionslösung (Prüfgegenstand 2) mit einer dazwischen liegenden Auswaschphase verabreicht.

Nach Behandlung mit dem jeweiligen Prüfgegenstand wurden zur Bestimmung des plasmapharmakokinetischen Profils, der oralen Bioverfügbarkeit und der Clearance zu festgelegten Zeitpunkten Blutproben entnommen.

Für die Feststellung des renalen Ausscheidungsverhaltens der Prüfgegenstände wurde in regelmäßigen Intervallen vor und nach Applikation Urin gesammelt.

Alle Proben wurden mittels Flüssigkeitschromatographie mit tandem-massenspektrometrischer Detektion (LC-MS/MS) bzw. Tubulent Flow Chromatographie mit tandem-massenspektrometrischer Detektion (TFC-MS/MS) auf ihren Gehalt an Theobromin sowie seiner Metaboliten 3-MX, 7-MX und 3,7-DMH untersucht.

Tab. 2.4 Prüfgruppen

Prüfgruppe	Tier lfd. Nr.	Applikation	Dosis	Prüfgegenstand
1	1 – 10	per oral	10 mg/kg KG	Theobromin-Kapsel
2	1 – 10	intravenös	10 mg/kg KG	Theobromin-Injektionslösung

Gruppenaufteilung (cross-over Schema)

Da die Prüfung im cross-over Design durchgeführt wurde, waren alle 10 Hunde in den beiden Prüfgruppen 1 und 2 enthalten. Im Folgenden sind die aus dem cross-over Schema entstehenden Behandlungs-Sequenzen aufgelistet.

Tab. 2.5 Cross-over Studiendesign

	Periode 1	Periode 2
Sequenz 1 (Hunde mit Nummer 1 bis 5)	Prüfgegenstand 1 10 mg/kg per oral (2 1117T/T Tiere / 3 1117C/C Tiere)	Prüfgegenstand 2 10 mg/kg intravenös (2 1117T/T Tiere / 3 1117C/C Tiere)
Sequenz 2 (Hunde mit Nummer 6 bis 10)	Prüfgegenstand 2 10 mg/kg intravenös (3 1117T/T Tiere / 2 1117C/C Tiere)	Prüfgegenstand 1 10 mg/kg per oral (3 1117T/T Tiere / 2 1117C/C Tiere)

Randomisierung

Nach Durchführung der Einschlussuntersuchung am PT-4 wurden die Prüftiere den Prüfgruppen mittels Würfeln randomisiert zugeordnet. In den Prüfgruppen sollte das Verhältnis von Tieren mit und ohne Polymorphismus 1:1 betragen, so dass bei der Randomisierung nach Genotyp geblockt wurde.

Die Hunde wurden nach Ohrtattoonummern (Tier ID) aufsteigend sortiert. Danach wurden die Tiere aufgrund der gewürfelten Augenzahl den zwei Sequenzen zugeordnet, beginnend bei der niedrigsten Tattoonummer. War die gewürfelte laufende Nummer oder der Genotyp in der Sequenz bereits vergeben, wurde das nächste Tier auf der Liste mit passendem Genotyp in die nächste Sequenz unter der entsprechenden laufenden Nummer einsortiert. Es wurde solange erneut gewürfelt, bis eine noch „freie“ Augenzahl erschien.

Tab. 2.6 Randomisierung

Zuordnung der Augenzahl zu den laufenden Nummern und Sequenzen

Sequenz 1		Sequenz 2	
Laufende Nummer	Augenzahl	Laufende Nummer	Augenzahl
1	1	6	1
2	2	7	2
3	3	8	3
4	4	9	4
5	5	10	5

Die Tiere blieben während der gesamten Prüfung den laufenden Nummern zugeordnet.

Vorbereitung der Tiere

Am Versuchstag wurde den Hündinnen vor Applikation der Formulierung mit Hilfe eines geschlitzten Spekulum und den Rüden durch Vorlagerung der Glans penis ein Harnkatheter (Wiruthan, Rüschi-Ballonkatheter aus Polyurethan, Größe 8, Teleflex Medical, Kernen, Deutschland) eingeführt. Das Ende des Katheters wurde mit Hilfe eines Stopfens verschlossen und durch Einzelhefte an der Haut fixiert. Die Hunde trugen einen Plastikhalskragen um das Herausziehen und eine Beschädigung der Katheter durch die Hunde zu verhindern. Im Falle der intravenösen Applikation wurde eine Venenverweilkanüle (Größe 22G, 0,9 x 25 mm der Firma B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die rechte oder linke Vena cephalica antebrachii gelegt.

2.2.2.2 Applikation

Prüfgegenstand 1 wurde in Form von Hartgelatinekapselformen verabreicht. Dazu wurde der Prüfgegenstand auf den Zungengrund der Hunde gegeben und der Fang solange geschlossen gehalten, bis das Abschlucken erfolgt war. Im Anschluss wurde den Tieren eine ausreichende Menge Wasser eingegeben. Die verabreichte Substanz wurde von allen Tieren vollständig aufgenommen. Erbrechen oder Regurgitieren wurde nicht beobachtet.

Prüfgegenstand 2 wurde intravenös verabreicht. Zur Applikation wurden geeignete Einmalspritzen (1 ml Spritze mit exentrischem Luer Konus, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, oder 3 ml Spritze mit exentrischem Luer Konus, Becton Dickinson EDC, Temse, Belgien) verwendet, mit denen das berechnete Volumen der Prüfgegenstände möglichst genau aufgezogen werden konnte. Die intravenöse Applikation erfolgte durch Punktion der rechten oder linken Vena cephalica antebrachii mit Hilfe eines Venenverweilkatheters.

2.2.2.3 Probenentnahme

Material

Heraeus Multifuge 3 L-R	Kendro Laboratory Products GmbH, Kernen, Deutschland
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
S-Monovette® 4,9 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Neolus Einmal Kanülen	Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
1 ml Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
3 ml Spritze	Becton Dickinson EDC, Temse, Belgien
Venenverweilkatheter	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Rüsch-Ballonkatheter, Wiruthan	Teleflex Medical, Kernen, Deutschland

Die Blut- und Urinprobenentnahmezeitpunkte wurden so gewählt, dass sie den gesamten Konzentrations-Zeitverlauf von Absorption, Distribution und Eliminierung der aktiven Substanz Theobromin und seiner Hauptmetaboliten 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin und 3,7-Dimethylharnsäure im Plasma der Hunde abbildeten. Zusätzlich wurde eine Blutprobe und eine Urinprobe vor jeder Applikation entnommen (Nullwert) um die Abwesenheit der aktiven Substanzen im Plasma und Urin zu überprüfen. Alle eingesetzten Probengefäße zur Blut- und Uringewinnung waren etikettiert. Auf jedem Etikett wurden Prüfnummer, Tieridentifikationsnummer, Datum, Prüftag, Entnahmezeitpunkt und Art des Probenmaterials vermerkt.

Die gewählten Probenentnahmezeitpunkte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 2.7 Blut- und Urinprobenentnahmezeitpunkte

<u>Prüftage je Prüfperiode</u>		<u>Entnahmezeiten Blut</u>		<u>Entnahmezeiten Urin</u>	
1	2	per oral	intravenös	per oral	intravenös
-1	27	0 h ¹⁾	0 h ¹⁾		
0	28	30, 60, 90 min	5; 10; 15;	0h ¹⁾ , 30, 60 min	0h ¹⁾ , 30, 60 min
		2; 3; 4; 6; 8; 10 h	30; 45; 60,	2; 3; 4; 6; 8; 2; 3; 4; 6; 8;	2; 3; 4; 6; 8;
			90 min	10 h	10 h
			2; 3; 4; 6; 8;		
			10 h		
1	29	24; 34 h	24; 34 h	30 h	30 h
2	30	48 h	48 h	54 h	54 h
3	31	72 h	72 h	78 h	78 h
4	32	96 h	96 h	96 h	96 h

¹⁾0 h ist die Blutentnahme bzw. Urinentnahme vor Applikation = Nullwert

Blutprobenentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten durch Punktion der linken oder rechten Vena jugularis mit Hilfe eines geeigneten Plasma-Blutentnahmesystems (S-Monovette[®] 4,9 ml Firma Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) und Einwegkanülen (Neolus Einmal Kanülen, Größe: 0,8 x 25 mm, Firma Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien). Zu den in Tab. 2.7 aufgeführten Zeitpunkten wurden Blutproben mit einem Volumen von circa 4,0 ml entnommen. Die Blutproben wurden zur Plasmagewinnung 10 min bei 4°C mit 3220 x g zentrifugiert (Heraeus Multifuge 3 L-R, Kendro Laboratory Products GmbH, Kernen, Deutschland) und der Überstand in Probengefäße (Reaktionsgefäße: 2 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abpipettiert. Hierbei wurden die Proben für die Einlagerung einer zusätzlichen Rückstellprobe geteilt. Das überschüssige Plasma des Nullwertes wurde gepoolt und zum Zweck der Validierung der analytischen Methode dieser Prüfung verwendet. Auf jedem Etikett wurden Prüfnummer, Tieridentifikationsnummer, Datum, Prüftag, Entnahmezeitpunkt und Art des Probenmaterials vermerkt.

Die Gesamtanzahl der Proben pro Hund betrug nach per oraler Verabreichung 16 und nach intravenöser Verabreichung 19 Proben.

Urinprobenentnahme

Für die Urinsammlungen wurden den Hunden vor der Applikation Ballonharnkatheter (Wiruthan, Rüsich Gold, Größe 8) in die Harnröhre gelegt, fixiert und verschlossen. Bei jeder Urinentnahme wurde der in der Harnblase befindliche Urin soweit möglich abgelassen. Zu den in Tab. 2.7 aufgeführten Zeitpunkten wurde 4 ml Urin gewonnen. Davon wurden zwei Aliquots in geeignete Probengefäße (Reaktionsgefäß 2 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abgefüllt. Der Probenrest wurde verworfen. Ein Aliquot wurde zur Analyse weitergegeben. Das andere Aliquot wurde tiefgefroren, verblieb als Rückstellprobe im Labor und wurde nach Fertigstellung der Analyse verworfen.

Die Gesamtanzahl der Urinproben pro Hund betrug nach per oraler Verabreichung 12 und nach intravenöser Verabreichung 13 Proben.

2.3 Kreatinin

Kreatinin stammt als Abbauprodukt von Kreatin bzw. Kreatininphosphat aus den Stoffwechselprozessen der Muskelzellen, wird nicht tubulär rückresorbiert und mit dem Urin ausgeschieden. Somit stellt Kreatinin eine Meßgröße bei der Beurteilung der Urinkonzentration dar. Zur Ermittlung einer diureseunabhängigen renalen Stoffausscheidung wurde als Normierungsverfahren der Kreatininquotient gewählt. Der Bezug auf den Kreatiningehalt der Urinprobe gilt als übliches Normierungsverfahren um den störenden Einfluss unterschiedlich konzentrierten Urins bei der Beurteilung von Stoffgehalten im Urin auszugleichen (Carrieri et al. 2001; Braun et al. 2003; Arndt 2007).

2.3.1 Kreatininbestimmung

Kreatinin wurde auf dem Vetest[®] Chemie-Analysegerät 8008, Version 8.25A (IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers bestimmt. Hierzu wurden die Urinproben 10 min bei 4°C mit 4000 x g zentrifugiert. 10 µl der Urinprobe wurden mit 200 µl Wasser in einem Probengefäß vermischt und nach Angaben des Herstellers in das Gerät überführt.

2.4 Bestimmung der Methylxanthinkonzentrationen

Die Entwicklung der analytischen Methode und die Bestimmung der Methylxanthinkonzentrationen wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Ralph Krebber, Mitarbeiter der Bayer CropScience AG, Monheim am Rhein, Deutschland durchgeführt.

2.4.1 Material

Reagenzien

Formuliertchnik:

Theobromin, 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natronhydroxid Plätzchen	KMF Laborchemie Handels GmbH, Leipzig, Deutschland
Methansulfonsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Millipore Sterivex TM-GP	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Analytik:

Theobromin, 99 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
3-Methylxanthin, 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
7-Methylxanthin, 98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
3,7-Dimethylharnsäure, 95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natronhydroxid Plätzchen	KMF Laborchemie Handels GmbH, Leipzig, Deutschland

Reinstwasser Milli-Q plus	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Acetonitril	Optigrade Promochem, Wesel, Deutschland
Ameisensäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetrahydrofuran	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triethylamin purum	Riedel- de Haen, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Lösungen

Stammlösungen Analyten (1.000 µg/l)

- Theobromin
- 3-Methylxanthin
- 7-Methylxanthin
- 3,7-Dimethylharnsäure

Lösemittel

Triethylamin 1 % / Tetrahydrofuran 98,75:1,25 (v/v)

Geräte

Formulierteknik:

Waage Mettler PM 4800 DeltaRange	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Vortex	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Analysenwaage Mettler AM 100	Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Ultraschallbad Transsonic 460	Elma, Singen, Deutschland
Kaliumhydrogensulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Analytik:

Zentrifuge Biofuge Fresco 13.000 rpm	Kendro Laboratory Products GmbH, Kernen, Deutschland
Vibrationsmischer Vibrofix	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Hochdruckflüssigkeitschromatographie	Serie 1100, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Autoinjektor CTC HTS PAL, CTC	Analytics AG, Sprockhövel, Deutschland
Turbolent Flow Chromatographiesystem 2300 HTLC™	Cohesive Technologies Inc.
Tandem-Massenspektrometer EP10+, IONICS (aufgerüstetes AB Sciex 365)	

2.4.2 Methode 1

Für das erste Verfahren wurden alle Plasmaproben vorab deproteinisiert. Hierzu wurden den Plasmaproben Ammoniumacetat, Ameisensäure und Acetonitril hinzugefügt und anschließend zentrifugiert. Die Proben wurden mittels Flüssigkeitschromatographie mit tandem-massenspektrometrischer Detektion (LC-MS/MS) untersucht. Die Bestimmungsgrenze lag bei 75 µl.

Detektion

Theobromin:

Übergang vom Molekülion $m/z = 181$ ($[M + H]^+$) zum Produktion $m/z = 108$

3- und 7-Methylxanthin:

Übergang vom Molekülion $m/z = 167$ ($[M + H]^+$) zum Produktion $m/z = 124$

3,7-Dimethylharnsäure:

Übergang vom Molekülion $m/z = 197$ ($[M + H]^+$) zum Produktion $m/z = 126$

Analytische Säulen: Zorbax Bonus RP, 4,6 x 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies

Injektionsvolumen: 50 µl

Isokratische Pumpe:

Mobile Phase A: Wasser + Acetonitril (1+1, v/v) + 0,1 ml Ameisensäure

Flow rate: 1 ml/min

Binäre Pumpe:

Mobile Phase A: Wasser + 0,1 ml Ameisensäure

Mobile Phase B: Acetonitril + 0,1 ml Ameisensäure

Retentionszeiten: 4,6 min (Theobromin)
 4,4 min (3-Methylxanthin)
 4,3 min (7-Methylxanthin)
 4,5 min (3,7-Dimethylharnsäure)

Bestimmungsgrenze: 75 μ l

2.4.3 Methode 2

Da die zuerst gewählte Methode eine zu geringe Empfindlichkeit für die Urinanalyse aufwies, wurden die Proben mittels Tubulent Flow Chromatographie mit Tandem-massenspektrometrischer Detektion (TFC-MS/MS) analysiert. Hierbei ist eine effizientere Trennung niedermolekularer Analyten von der hochmolekularen bzw. salzhaltigen Matrix (Urin) möglich.

Es wurde eine Online-Probenvorbereitung (Trennung nach chemischen Wechselwirkungen und Molekülgröße) durchgeführt. Vorab wurden alle Proben zentrifugiert und direkt in das Gerät injiziert. Die Bestimmungsgrenze in diesem Verfahren lag bei 25 μ l.

Detektion

Theobromin:

Übergang vom Molekülion $m/z = 181$ ($[M + H]^+$) Produktion $m/z = 108$

3- und 7-Methylxanthin:

Übergang vom Molekülion $m/z = 167$ ($[M + H]^+$) zum Produktion $m/z = 124$

3,7-Dimethylharnsäure:

Übergang vom Molekülion $m/z = 197$ ($[M + H]^+$) zum Produktion $m/z = 126$

Extraktionssäulen: Oasis HLB 2,1 x 20 mm, 25 μ m (Waters GmbH, Eschborn)

Analytische Säulen: Zorbax Bonus RP, 4,6 x 150 mm, 5 μ m, Agilent Technologies

Injektionsvolumen: 20 μ l

Beladungspumpe:

Mobile Phase A: Wasser + 0,1 ml / l Ameisensäure

Mobile Phase B: Wasser + Acetonitril (1+1, v / v) + Ameisensäure / l

Elutionspumpe:

Mobile Phase C: Wasser + 0,1 ml / l Ameisensäure

Mobile Phase D: Acetonitril + 0,1 ml / l Ameisensäure

Retentionszeiten: 3,7 min (Theobromin)
 3,3 min (3-Methylxanthin)
 3,1 min (7-Methylxanthin)
 3,4 min (3,7-Dimethylharnsäure)

Bestimmungsgrenze: 25 μ l

2.5 Berechnungen

2.5.1 Methylxanthinkonzentrationen

Bei einer linearen Regression der entsprechend $y = ax + b$ mit a = Steigung und b = Achsenabschnitt erfolgt die Berechnung nach folgender Formel:

$$C_P = \frac{\text{Fläche Probe} - \text{Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}} \cdot \frac{V_{\text{End}}}{V_P}$$

C_P = Konzentration in der Probe

Fläche = Peakfläche der Probe im Chromatogramm

V_{End} = Endvolumen der Probe

V_P = eingesetztes Probenvolumen

2.5.2 Pharmakokinetische Parameter

Alle pharmakokinetischen Parameter wurden unter Verwendung der Standardsoftware WinNonlin[®], Version 5.3 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA) berechnet. Hierzu zählen: Konzentrationsmaximum (C_{max}), Zeit bis zum Erreichen des Konzentrationsmaximums (T_{max}), Halbwertszeit ($T_{1/2}$), die Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve (AUC) und die Eliminationshalbwertszeit (λ_Z). Nach intravenöser Applikation wurden zusätzlich die Gesamtkörper-Clearance (Cl) und die orale Bioverfügbarkeit (BV) von Theobromin berechnet.

$$BV = \frac{AUC_{\text{inf p.o.}}}{AUC_{\text{inf i.v.}}} \times 100$$

$$Cl = \frac{D}{AUC_{\text{inf}}}$$

$$\lambda_Z = \frac{1}{T_{\text{max}}}$$

$$AUC = AUC_{(0-t_{\text{last}})} + \frac{C_{\text{last, calc.}}}{\lambda_Z}$$

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_Z}$$

2.5.3 Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dipl.-Stat. Marion Ocak, MD Research, Pullach im Isartal. Verwendet wurde hierzu das Statistikprogramm TESTIMATE Version 6.5.0 (idv, Datenanalyse und Versuchsplanung). Die graphischen Abbildungen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism[®], Version 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) und Science GraphX Version 4.9.30 erstellt.

Zur Deskription der Daten wurden Mittelwerte (MW) mit Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Variationskoeffizienten (SD/MW) und Probenumfang (n) der vorab berechneten pharmakokinetischen Parameter bestimmt.

Aufgrund der kleinen Stichprobenumfänge und des nicht-gesicherten Vorliegens einer Normalverteilung wurden signifikante Unterschiede in den pharmakokinetischen Parametern der beiden Gruppen mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-U Test (nicht-parametrischer Test) geprüft. Die medizinische Relevanz der Gruppenunterschiede wird mit Hilfe des dazugehörigen Relevanzmaßes, des Mann-Whitney-Überlegenheitsmaß (MWÜ) und seinem zweiseitigen 95,0%-igen Konfidenzintervall (KI) untersucht. Das MWÜ-Maß (0.0 bis 1.0) gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein zufällig ausgewähltes Tier aus der Gruppe der CYP 1117T/T Hunde einen jeweils besseren Wert hat als ein zufällig ausgewähltes Tier der CYP 1117C/C Hunde.

Die allgemein anerkannten Grenzwerte sind (Colditz et al. 1988):

- 0.36 mittlere Unterlegenheit
- 0.44 kleine Unterlegenheit
- 0.50 Gleichheit
- 0.56 kleine Überlegenheit
- 0.64 mittlere (relevante) Überlegenheit
- 0.71 große Überlegenheit

Zur Beurteilung eines Gruppenunterschiedes wurden alle getesteten Parameter herangezogen (C_{\max} , T_{\max} , $T_{1/2}$, AUC_{inf} sowie CI, soweit vorhanden), da die Interpretation der Testergebnisse

deskriptiv vorgenommen werden kann und ein Zusammenspiel aller Parameter erst einen sinnvollen Überblick zulässt. Als Signifikanzniveau wurde ein $\alpha = 0,05$ (zwei-seitig) definiert, so dass Ergebnisse mit $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurden. Wenn kein exakter p-Wert angegeben ist um die statistische Signifikanz zwischen den Gruppen zu belegen, wurden Zahlenwerte oder Diagrammbalken mit Sternchen gekennzeichnet, um auf die folgenden p-Werte hinzuweisen: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klinische Allgemeinuntersuchung

Im Rahmen der Einschlussuntersuchung sowie zu Beginn der zweiten Prüfperiode und am Ende der jeweiligen Prüfperioden wurden die folgenden klinischen Parameter erfasst und in den Rohdaten dokumentiert: Allgemeinbefinden, Ernährungszustand, Haut und Haarkleid, Schleimhäute, Atmungsapparat, Kotbeschaffenheit, Bewegungsapparat, Rektaltemperatur.

Alle Tiere waren am Tag der Einschlussuntersuchung vor Studienbeginn klinisch unauffällig und wurden in die Studie eingeschlossen. Nach Einschluss der Tiere in die Studie wurden keine Hunde aus gesundheitlichen oder tierschutzrechtlichen Gründen vorzeitig ausgeschlossen.

3.2 Genotypisierung

Zwecks Genotypisierung wurden Abstriche von der Maulschleimhaut von 270 Beagle Hunden entnommen und genomische DNA isoliert. Diese Beagle stammten aus zwei verschiedenen Zuchtlinien und wurden zufällig ausgewählt: 192 Hunde stammen aus der Zucht Harlan Winkelmann (Eystrup, Deutschland), 78 Tiere stammten aus der Zucht Marshall BioResources (North Rose, NY, USA). Ein direktes Verwandtschaftsverhältnis kann nicht ausgeschlossen werden. Die Genotypisierung erfolgte über allelspezifische Sonden mit gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen in einer real-time PCR.

Im Folgenden werden Hunde mit homozygotem CYP1A2 1117C/C Genotyp als C/C-Hunde und Hunde mit homozygotem CYP1A2 1117T/T Genotyp als T/T-Hunde bezeichnet.

Bei der Genotypisierung wurde für 187 (69 %) Hunde der homozygote Wildtyp (C/C) ermittelt, 77 (29 %) Hunde wiesen das T-Allel heterozygot (C/T) auf, und 6 (2 %) Hunde wiesen homozygot das T-Allel (T/T) auf (Abb. 3.1). Aufgrund dieser Ergebnisse ließ sich bei den untersuchten Beagle Hunden eine Allelfrequenz für das T-Allel von 17 % berechnen.

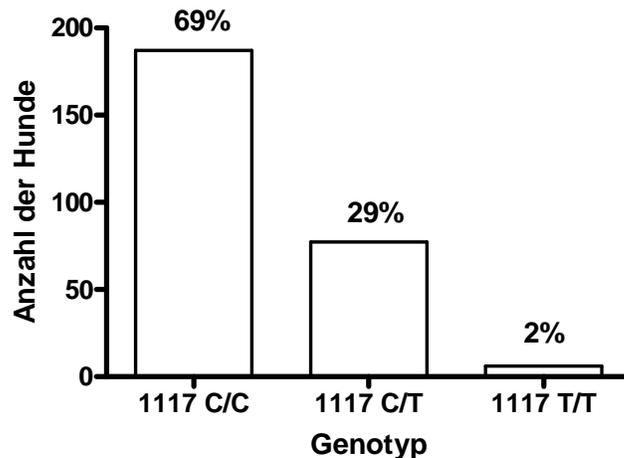


Abb. 3.1 Ergebnis der CYP1A2 Genotypisierung von 270 Beagle Hunden. Insgesamt wiesen 6 Hunde den homozygoten CYP1A2 1117T/T Genotyp auf und waren daher für die vorliegende Studie geeignet. Entsprechende 1117C/C Hunde konnten für die Studie aus insgesamt 187 typisierten Beagles ausgewählt werden.

3.3 Methylxanthinkonzentrationen nach intravenöser Applikation

Nach intravenöser Applikation von 10 mg/kg Körpergewicht Theobromin konnten im Plasma über 96 Stunden Theobromin (\emptyset 92,3 %) und 3-Methylxanthin (\emptyset 7,7 %) bei einer Nachweisgrenze von 75 μ g/l mittels Flüssigkeitschromatographie mit tandem-massenspektrometrischer Detektion (LC-MS/MS) nachgewiesen werden. Im Urin konnten Theobromin (\emptyset 62,8 %), 3-Methylxanthin (\emptyset 34,8 %), 7-Methylxanthin (\emptyset 2,2 %) und 3,7-Dimethylharnsäure (\emptyset 0,2 %) bei einer Nachweisgrenze von 25 μ g/l mittels Tubulent Flow Chromatographie mit Tandem-massenspektrometrischer Detektion (TFC-MS/MS) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind für die Plasmakonzentrationen in Abb. 3.2 und für die Urinkonzentrationen in Abb. 3.3 getrennt nach CYP1A2 Genotyp zusammengefasst. An dieser Stelle wurden noch keine Vergleiche zwischen den Genotypengruppen vorgenommen, dieser erfolgt ab Kapitel 3.5. Insgesamt wurde Theobromin an jeweils fünf Hunde jeden Genotyps appliziert. In der ersten Prüfphase verlief die geplante intravenöse Applikation bei jeweils zwei Hunden aus beiden Gruppen jedoch nicht vollständig intravenös. Das Konzentrationsmaximum einer intravenös applizierten Substanz ist unmittelbar nach Applikation zu erwarten. So konnte bei sechs Tieren zum Zeitpunkt der ersten Blutprobenentnahme ein Konzentrationsmaximum für

Theobromin berechnet werden. Bei vier Tieren wurde jedoch eine Zeit bis zum Erreichen des Konzentrationsmaximums von 1,5 h ermittelt. Aus diesem Grund wurden diese Tiere nicht in den Berechnungen und graphischen Darstellungen berücksichtigt, so dass die Daten auf einer Gruppengröße von n=3 basieren.

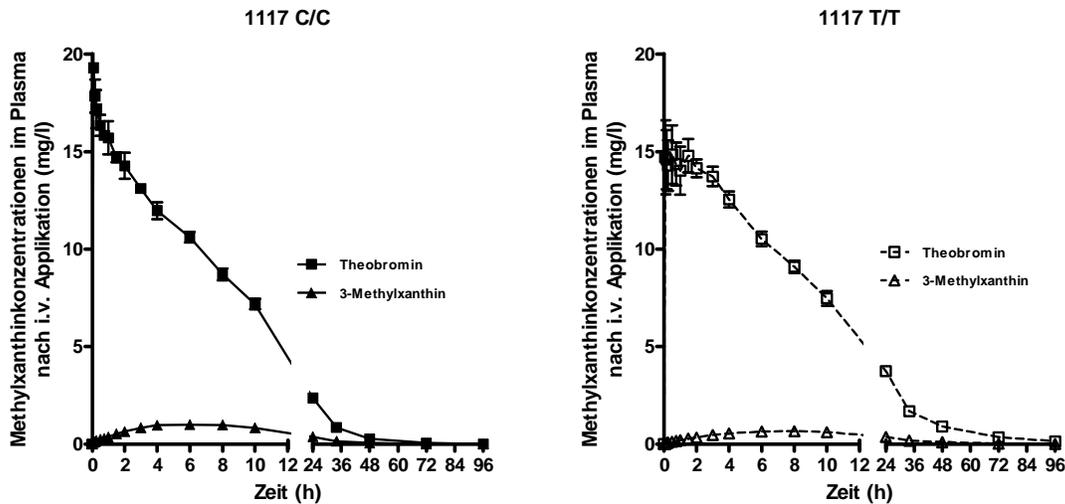


Abb. 3.2 Plasmakonzentration-Zeit-Diagramm für Theobromin und 3-Methylxanthin nach intravenöser Applikation (n=3) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

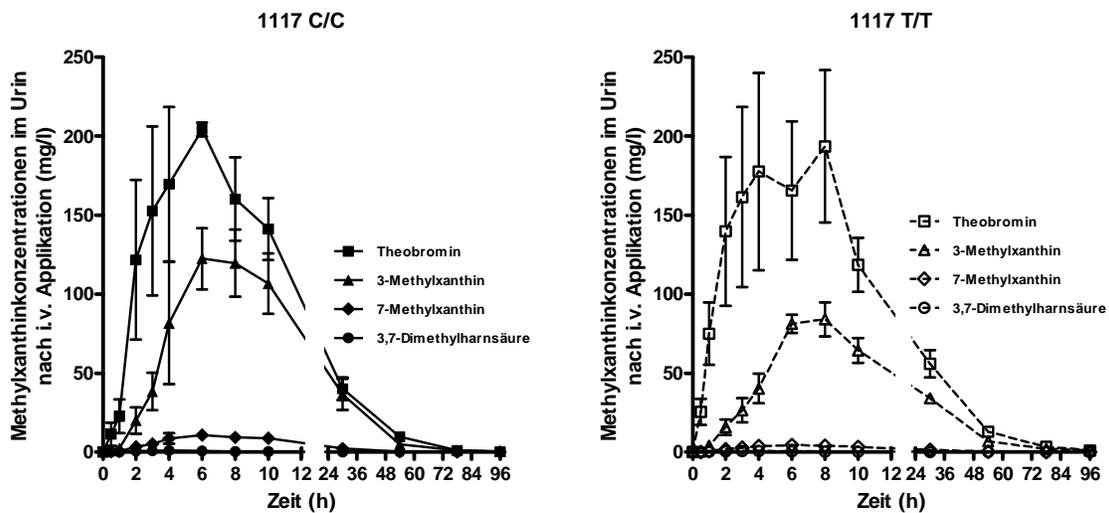


Abb. 3.3 Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für Theobromin sowie 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin und 3,7-Dimethylharnsäure nach intravenöser Applikation (n=3) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.4 Methylxanthinkonzentrationen nach per oraler Applikation

Auch nach per oraler Applikation von 10 mg/kg Körpergewicht Theobromin konnten im Plasma Theobromin ($\bar{\varnothing}$ 92,8 %) und der Metabolit 3-Methylxanthin ($\bar{\varnothing}$ 7,2 %) nachgewiesen werden (Abb. 3.4), im Urin ebenfalls Theobromin ($\bar{\varnothing}$ 65,7 %) und 3-Methylxanthin ($\bar{\varnothing}$ 31,9 %) sowie zusätzlich 7-Methylxanthin ($\bar{\varnothing}$ 2,1 %) und 3,7-Dimethylharnsäure ($\bar{\varnothing}$ 0,3 %) (Abb. 3.5). Die per orale Applikation war nach den Studienvorgaben für alle Hunde erfolgreich, sodass für jeden Genotyp Daten von jeweils fünf Hunden in die Auswertung eingeflossen sind.

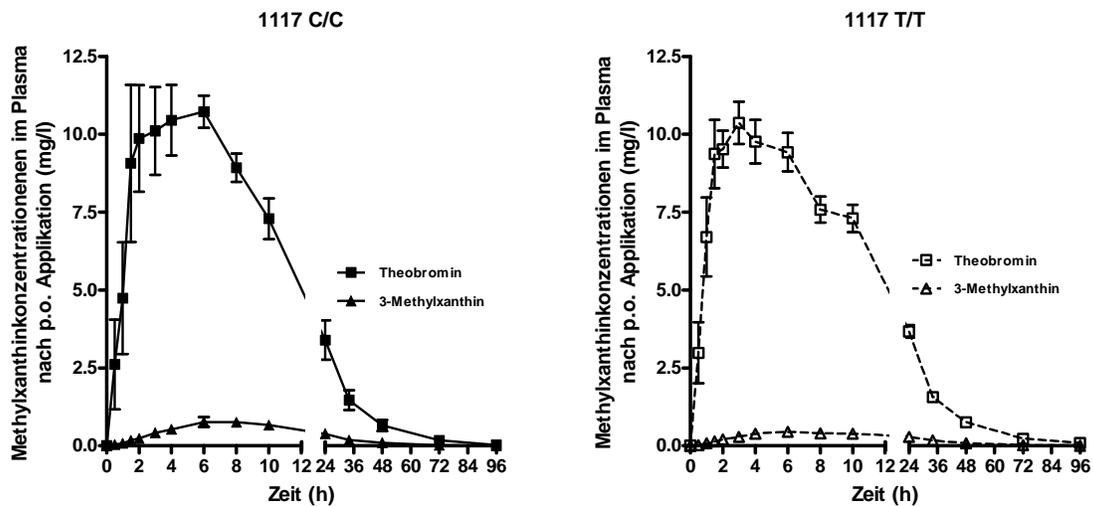


Abb. 3.4 Plasmakonzentration-Zeit-Diagramm für Theobromin und 3-Methylxanthin nach per oraler Applikation ($n=5$) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

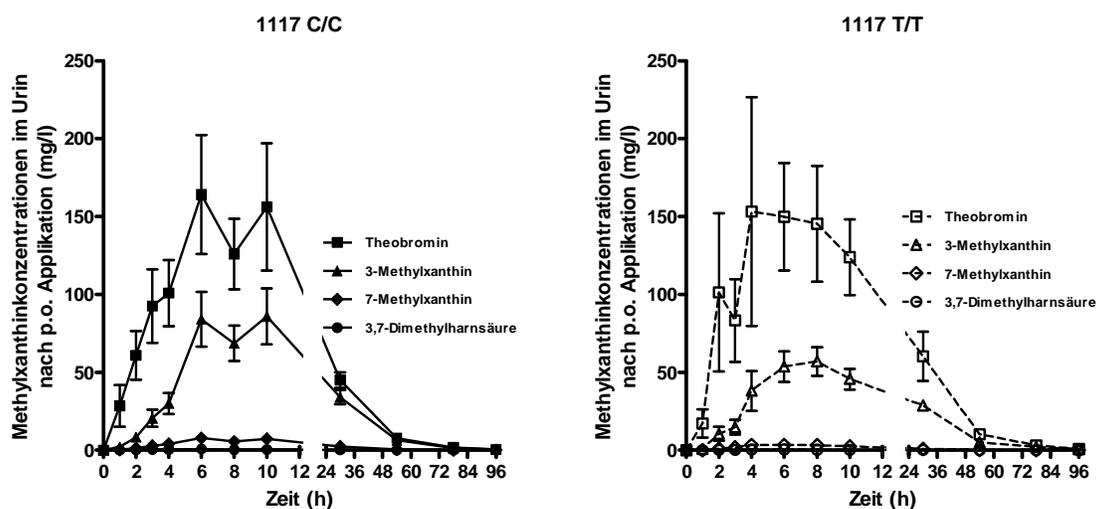


Abb. 3.5 Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für Theobromin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin und 3,7-Dimethylharnsäure nach per oraler Applikation ($n=5$) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.5 Direkter Vergleich zwischen den Genotypen nach intravenöser Applikation

Nach intravenöser Applikation von 10 mg/kg Theobromin konnten im Plasma Theobromin und 3-Methylxanthin sowie im Urin Theobromin, 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin und 3,7-Dimethylharnsäure nachgewiesen werden. Sowohl im Plasma als auch im Urin zeigten sich dabei signifikante Unterschiede zwischen den beiden CYP1A2-Genotypen, welche im Folgenden dargestellt werden sollen. Die folgenden Darstellungen beschreiben den Konzentrationsverlauf jeweils nur eines Analyten für beide Genotypen; hierbei sind Diagramme für die jeweilige Area-under-curve (AUC) eingebettet (a). Zusätzlich zum Konzentrations-Zeit-Diagramm wurde die statistische Auswertung der pharmakokinetischen Parameter mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-U Test graphisch dargestellt (b). Diese Graphiken beinhalten das Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß und den exakten p-Wert für das Konzentrationsmaximum (C_{max}), die Zeit bis zum Erreichen des Konzentrationsmaximums (T_{max}), die AUC und die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) jedes Analyten, sowie die Körperclearance (Cl) für Theobromin im Plasma.

Für den Theobrominkonzentrationsverlauf im Plasma lag die AUC in der C/C-Gruppe (211,22 mg*h/l) signifikant unter der AUC in der T/T-Gruppe (283,08 mg*h/l, Abb. 3.6). Darüber hinaus war die Halbwertszeit für Theobromin in der T/T-Gruppe (16,18 h) gegenüber der

C/C-Gruppe (9,14 h) signifikant verlängert (Abb. 3.6). Dies spiegelt sich auch in der signifikant unterschiedlichen Gesamtkörperclearance für Theobromin wieder, welche in der T/T-Gruppe mit 0,50 ml/min/kg und in der C/C-Gruppe mit 0,83 ml/min/kg berechnet wurde ($p = 0,0339$). Auch im Urin zeigten sich signifikante Unterschiede in der Halbwertszeit für Theobromin ($p = 0,0495$). Der vorliegende Gruppenunterschied im Konzentrationsverlauf für 3-Methylxanthin im Plasma konnte statistisch bewiesen werden. So lag die Halbwertszeit bei den CYP1A2 defizienten Hunden bei durchschnittlich 17 h und bei den Wildtyp Hunden bei 9 h ($p = 0,0495$). Aufgrund der kleinen Probenanzahl und der großen Streuung konnten weitere Unterschiede in den pharmakokinetischen Parametern statistisch nicht bewiesen werden. Trotzdem lässt sich über das Mann-Whitney-Überlegenheitsmaß verdeutlichen, dass das Konzentrationsmaximum für 3-Methylxanthin in der T/T-Gruppe eine Unterlegenheit (MWÜ: 0,111) gegenüber der C/C-Gruppe aufweist (Abb. 3.7). Im Urin konnten Unterschiede im Konzentrationsverlauf von 3-Methylxanthin ebenfalls statistisch bewiesen werden. So liegt das Konzentrationsmaximum in der Gruppe der C/C Hunde signifikant über dem Konzentrationsmaximum der T/T-Gruppe ($p = 0,0495$). Zudem zeigt das Mann-Whitney-Überlegenheitsmaß, dass die Länge der Halbwertszeit für 3-Methylxanthin im Urin in der Gruppe der T/T-Hunde eine große Überlegenheit (MWÜ: 0,8889) gegenüber der C/C-Hunde aufweist, die aufgrund des kleinen Probenumfangs statistisch nicht bewiesen werden konnte, aber eine klinische Relevanz zeigt (Abb. 3.9).

Das Konzentrationsmaximum für 7-Methylxanthin war in der C/C-Gruppe signifikant höher als in der T/T-Gruppe (12,32 mg/l vs. 4,76 mg/l, $p = 0,0495$). Dies spiegelt sich auch in der statistisch signifikant höheren AUC für die CYP1A2 Wildtyp-Hunde wieder (215,96 vs. 101,87 mg*h/l, $p = 0,0495$) sowie der signifikant verlängerten Halbwertszeit (14,92 h vs 10,52 h) in der CYP1A2 defizienten Gruppe (Abb. 3.10).

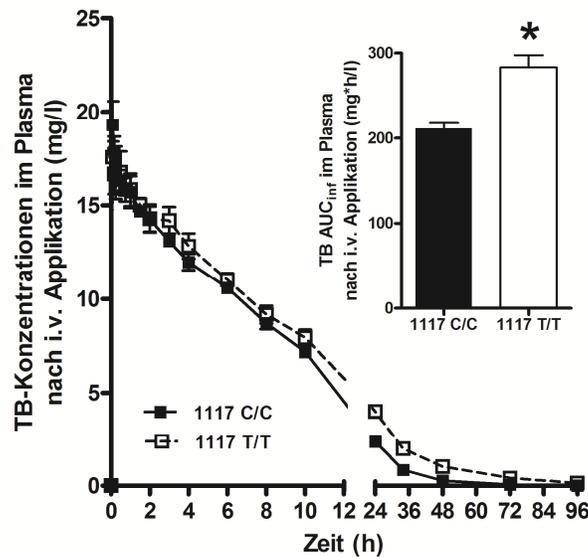
Für den Metaboliten 3,7-Dimethylharnsäure konnten keine Gruppenunterschiede statistisch bewiesen werden, jedoch lässt sich mit Hilfe des Mann-Whitney-Überlegenheitsmaß (MWÜ: 0,8889) ein deutlicher Unterschied in der Halbwertszeit erkennen (Abb. 3.11). Die Halbwertszeit betrug in der T/T-Gruppe im Mittelwert 31 h, während in der Gruppe der C/C-Hunde ein Wert von durchschnittlich 18 h erreicht wurde.

Somit zeigte sich sowohl im Plasma als auch im Urin, dass die T/T-Hunde deutlich weniger Theobromin-Metabolite gebildet haben als die C/C-Hunde. Dies spiegelt sich auch in der oben

bereits erwähnten höheren AUC und geringeren Clearance für Theobromin bei den T/T-Hunden wieder. Insbesondere zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich der Konzentrationsverläufe für 7-Methylxanthin, die trotz eines kleinen Stichprobenumfangs (n=3) statistisch bewiesen werden konnten.

Theobromin / Plasma / i.v.

a



b

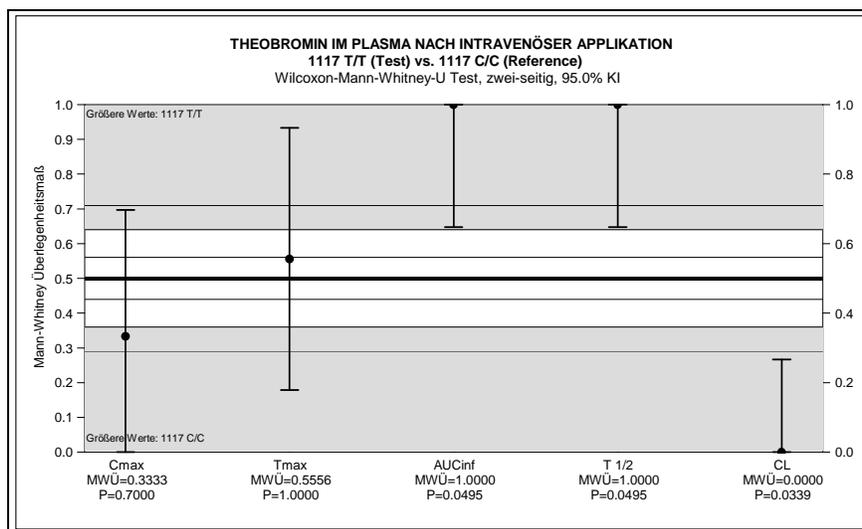


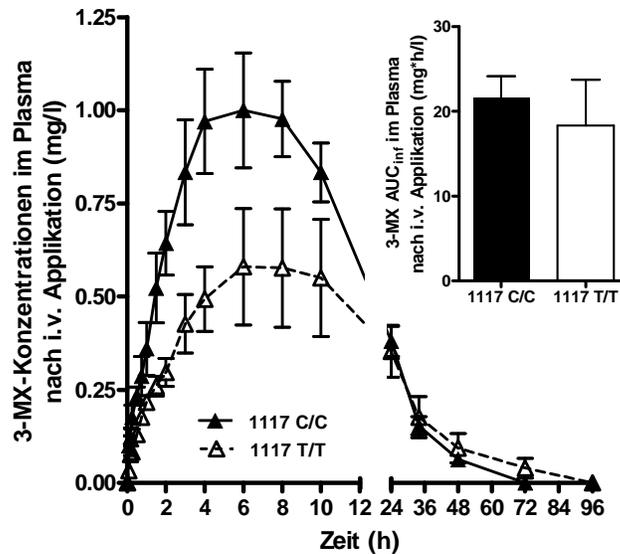
Abb. 3.6

a Plasmakonzentration-Zeit-Diagramm für TB und AUC_{inf} nach intravenöser Applikation (n=3) von 10 mg/kg KG Theobromin. * Statistisch signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

3-Methylxanthin / Plasma / i.v.

a



b

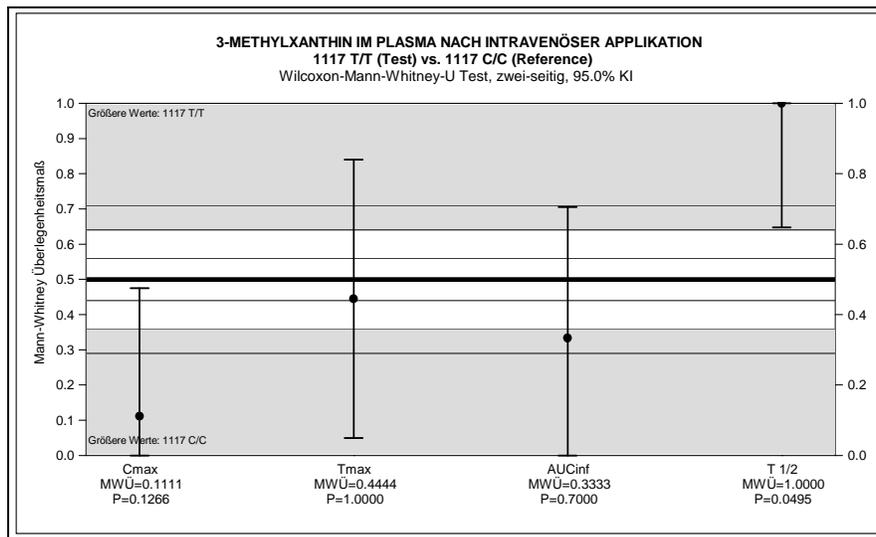


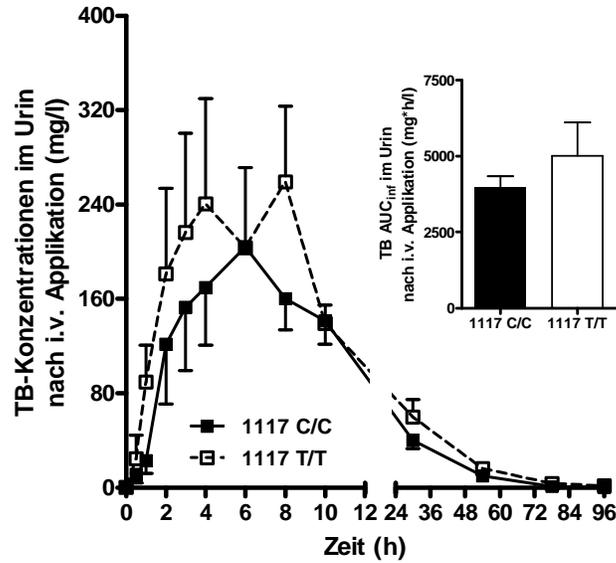
Abb. 3.7

a Plasmakonzentration-Zeit-Diagramm für 3-MX und AUC_{inf} nach intravenöser Applikation (n=3) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

Theobromin / Urin / i.v.

a



b

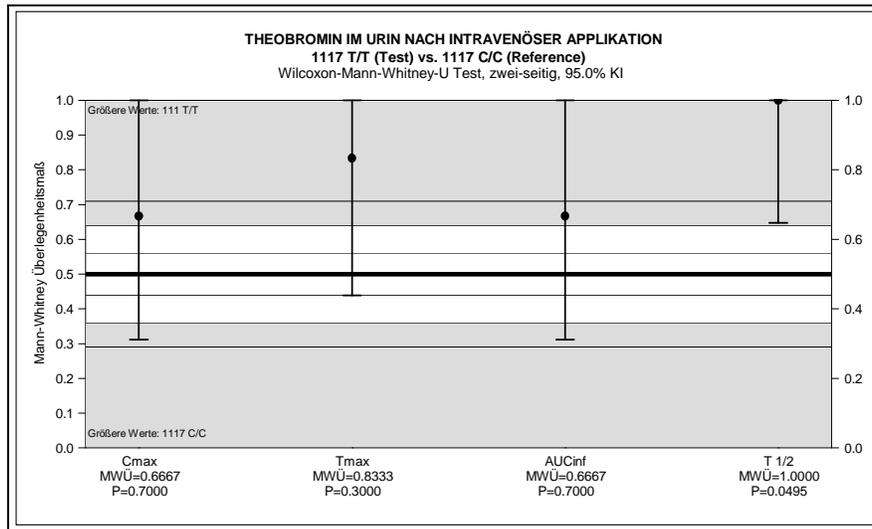


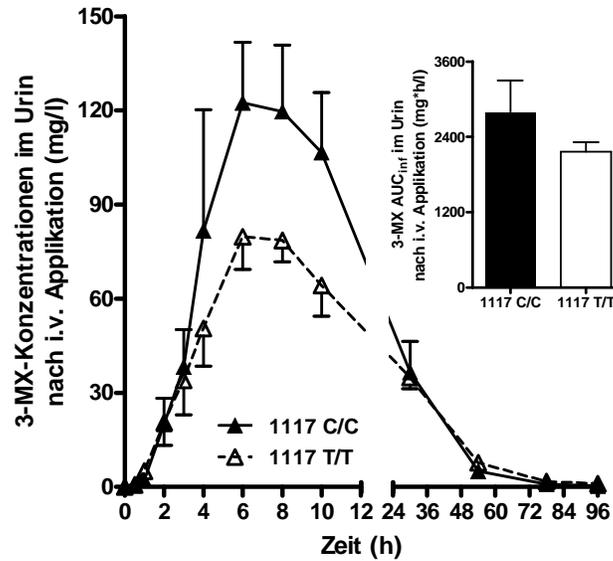
Abb. 3.8

a Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für TB und AUC_{inf} nach intravenöser Applikation ($n=3$) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

3-Methylxanthin / Urin / i.v.

a



b

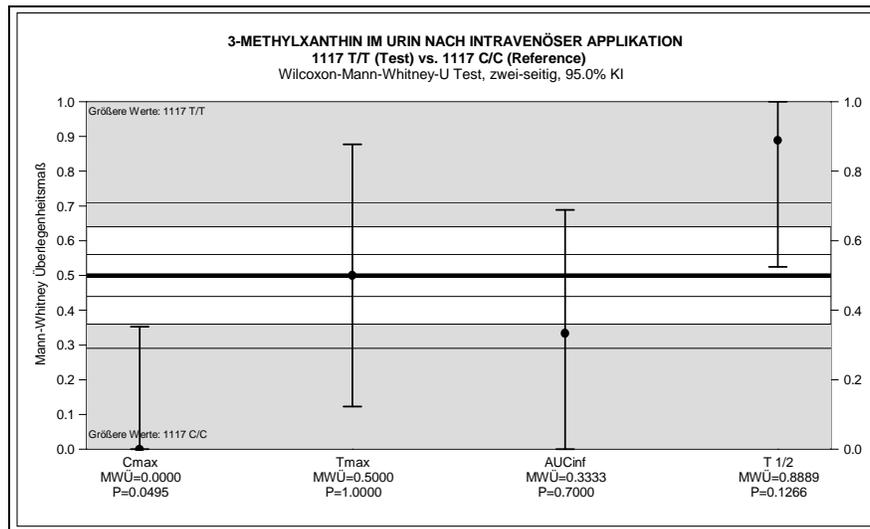


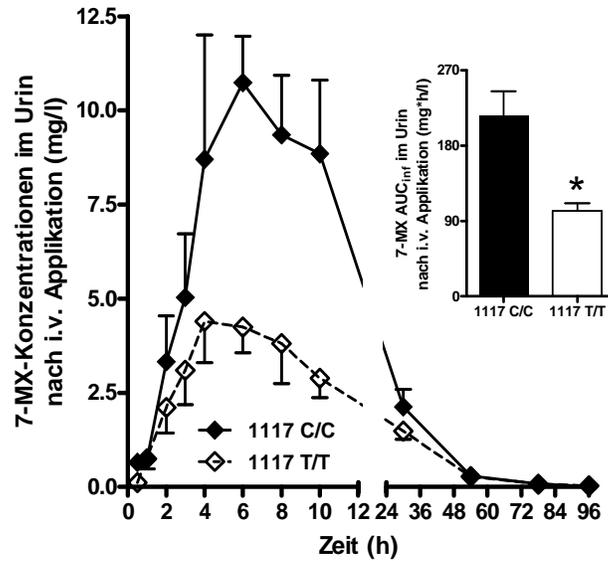
Abb. 3.9

a Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für 3-MX und AUC_{inf} nach intravenöser Applikation ($n=3$) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

7-Methylxanthin / Urin / i.v.

a



b

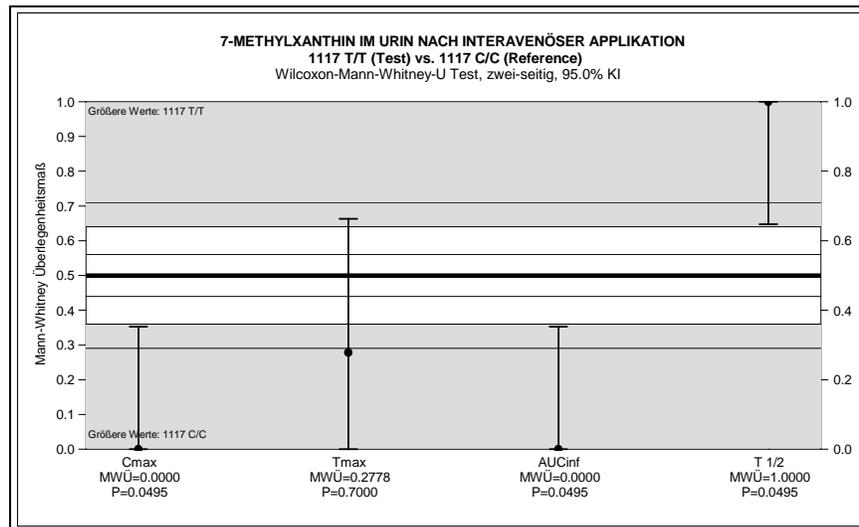


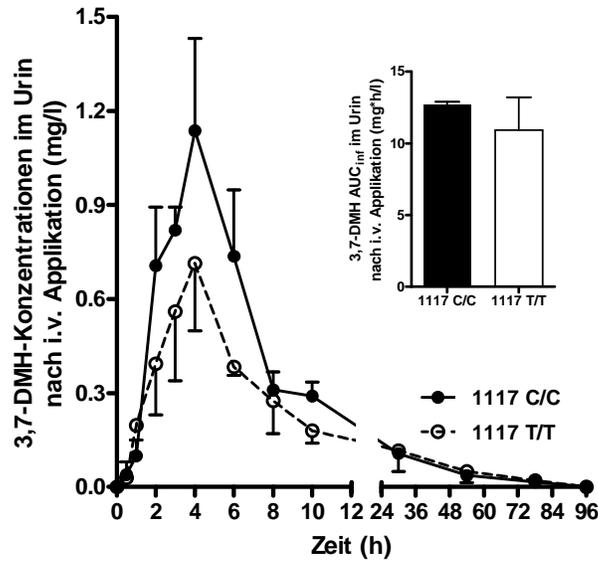
Abb. 3.10

a Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für 7-MX und AUC_{inf} nach intravenöser Applikation (n=3) von 10 mg/kg KG Theobromin. * Statistisch signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

3,7-Dimethylharnsäure / Urin / i.v.

a



b

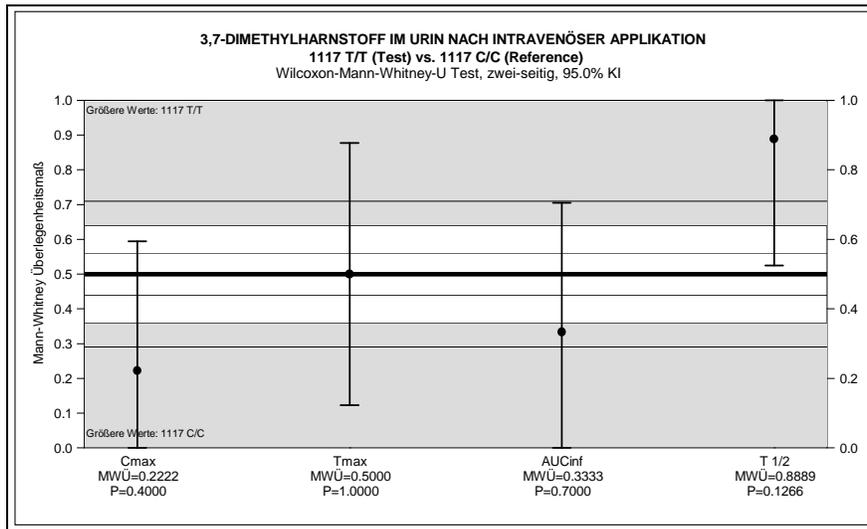


Abb. 3.11

a Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für 3,7-DMH und AUC_{inf} nach intravenöser Applikation ($n=3$) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

3.6 Direkter Vergleich zwischen den Genotypen nach per oraler Applikation

Nach per oraler Applikation konnten die gleichen Substanzen wie nach intravenöser Applikation im Plasma und Urin nachgewiesen werden. Die orale Bioverfügbarkeit unterschied sich in den beiden Genotypengruppe nicht wesentlich (C/C-Hunde: 86 % vs. T/T-Hunde: 82 %).

Keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Genotypengruppen lagen bei den Parametern für Theobromin im Plasma und Urin vor (Abb. 3.12 und Abb. 3.14).

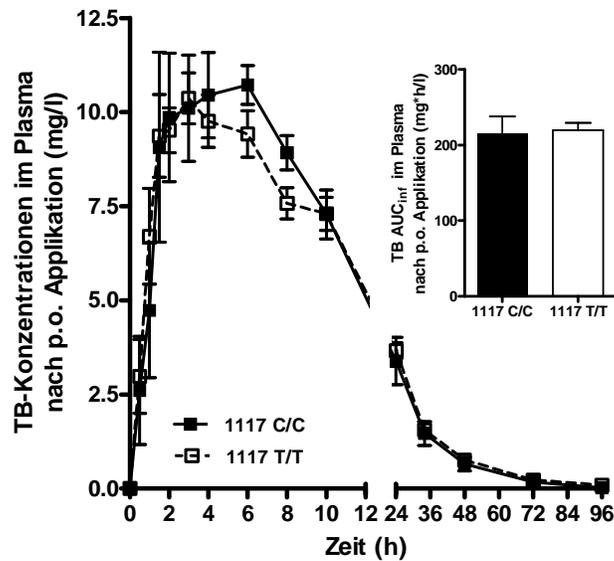
Hingegen lag das Konzentrationsmaximum für 3-Methylxanthin nach identischer Zeit (\emptyset 7,2 Stunden) in der polymorphen T/T-Gruppe bei 0,46 mg/l statistisch signifikant unter dem Konzentrationsmaximum von 0,83 mg/l in der C/C-Gruppe ($p = 0,0079$, Abb. 3.13). Im Urin konnten bei den T/T-Hunden im gleichen Zeitraum erniedrigte Konzentrationsmaxima für 3-Methylxanthin (94,03 vs. 56,54 mg/l) nachgewiesen werden. Dies spiegelt sich auch in der signifikant erniedrigten AUC bei den T/T-Hunden wieder (2319,17 vs. 1620,67 mg*h/l, Abb. 3.15).

Es zeigten sich auch signifikante Unterschiede in den Konzentrationsmaxima und der AUC für 7-Methylxanthin im Urin. In der T/T-Gruppe wurde ein Konzentrationsmaximum von 3,58 mg/l ermittelt und lag damit signifikant unter dem erreichten Konzentrationsmaximum von 8,03 mg/l in der C/C-Gruppe ($p = 0,0079$). Die AUC für 7-Methylxanthin lag in der T/T-Gruppe (75,64 mg*h/l) ebenfalls signifikant unter der AUC der C/C-Gruppe (188,57 mg*h/l), ($p = 0,0159$). Mit Hilfe des Mann-Whitney-Überlegenheitsmaß zeigte sich für 7-Methylxanthin eine verlängerte Halbwertszeit in der T/T-Gruppe (MWÜ: 0,9333, Abb. 3.16), welche das Signifikanzniveau nicht ganz erreichte ($p = 0,0526$).

Wie schon bei der intravenösen Applikation, ließ sich auch nach der per oralen Applikation kein signifikanter Unterschied in den pharmakokinetischen Parameter für 3,7-Dimethylharnsäure ermitteln (Abb. 3.17). Damit lassen sich nach oraler Applikation vor allem die signifikantesten Unterschiede in den Genotypengruppen bei den Metaboliten 3-Methylxanthin und 7-Methylxanthin hervorheben.

Theobromin / Plasma / p.o.

a



b

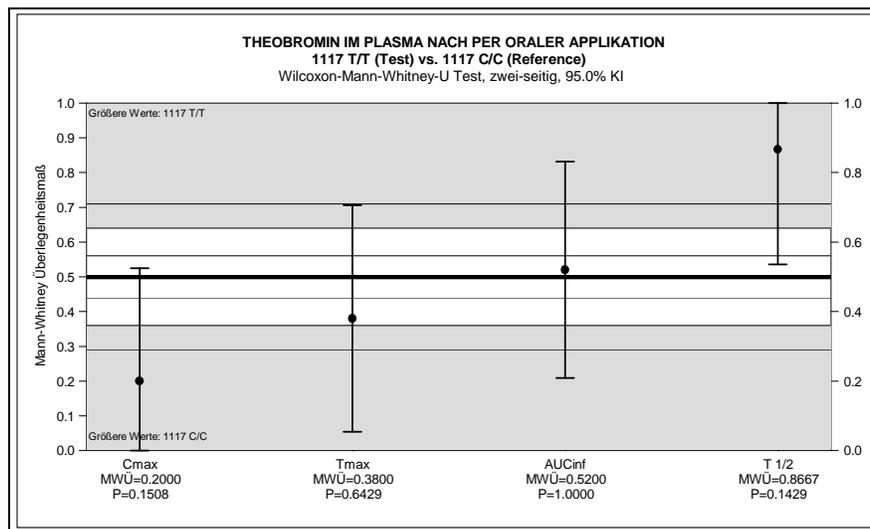


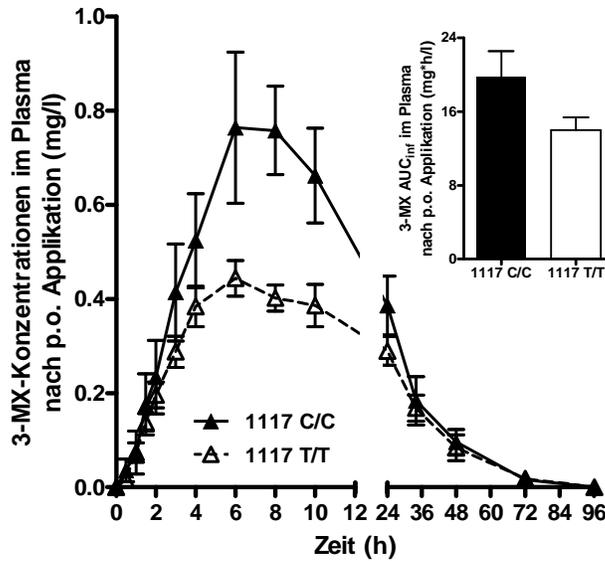
Abb. 3.12

a Plasmakonzentration-Zeit-Diagramm für TB und AUC_{inf} nach per oraler Applikation ($n=5$) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

3-Methylxanthin / Plasma / p.o.

a



b

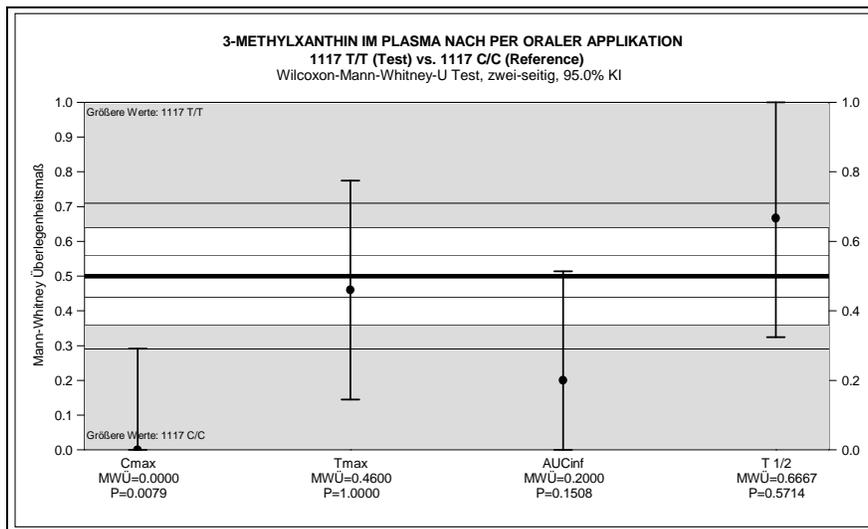


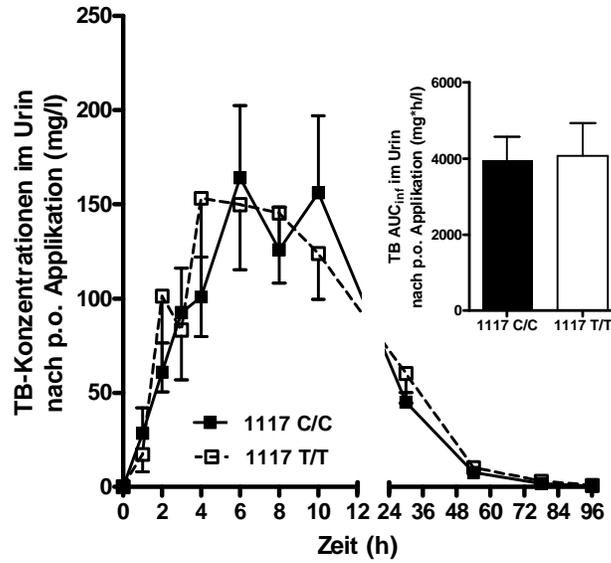
Abb. 3.13

a Plasmakonzentration-Zeit-Diagramm für 3-MX und AUC_{inf} nach per oraler Applikation (n=5) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

Theobromin / Urin / p.o.

a



b

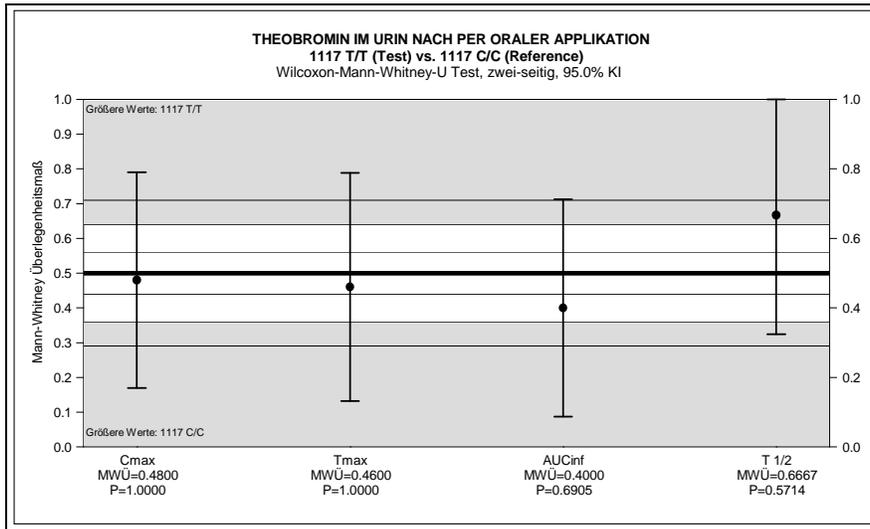


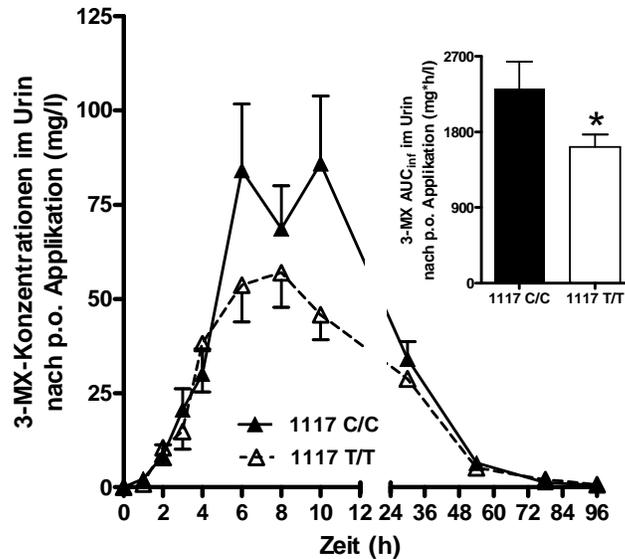
Abb. 3.14

a Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für TB und AUC_{inf} nach per oraler Applikation (n=5) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

3-Methylxanthin / Urin / p.o.

a



b

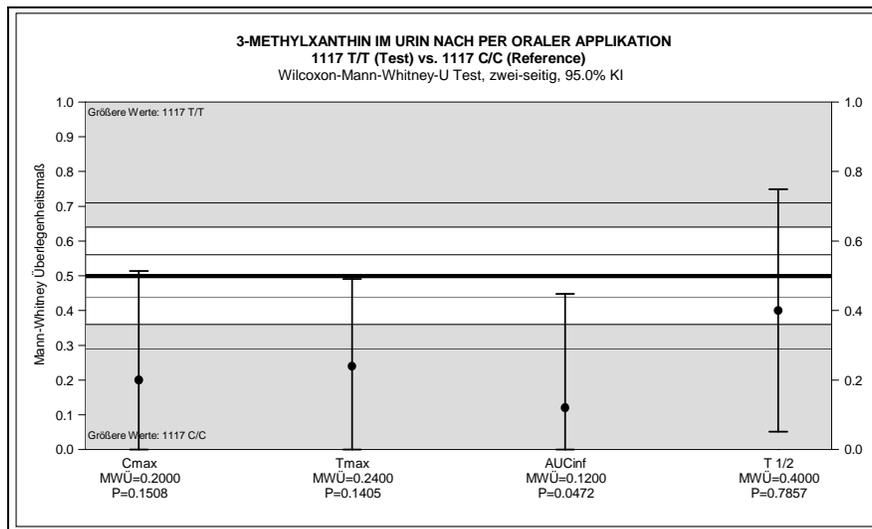


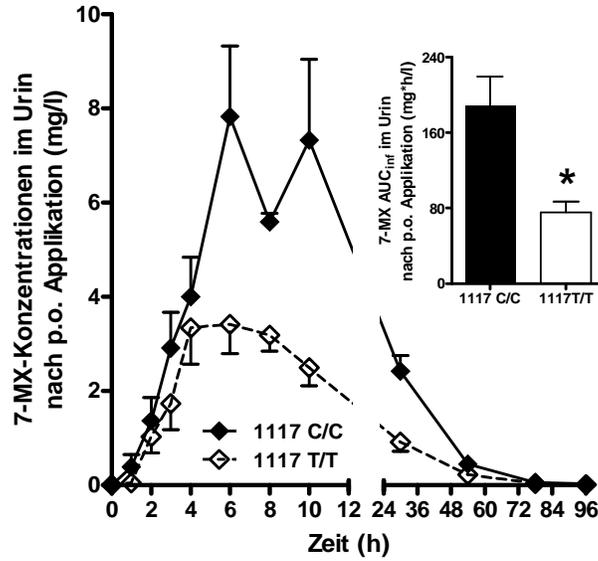
Abb. 3.15

a Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für 3-MX und AUC_{inf} nach per oraler Applikation ($n=5$) von 10 mg/kg KG Theobromin. * Statistisch signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

7-Methylxanthin / Urin / p.o.

a



b

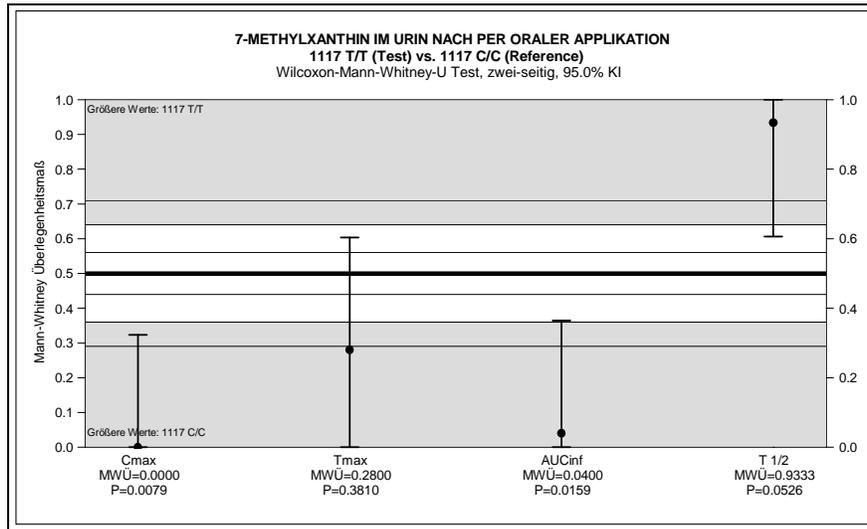


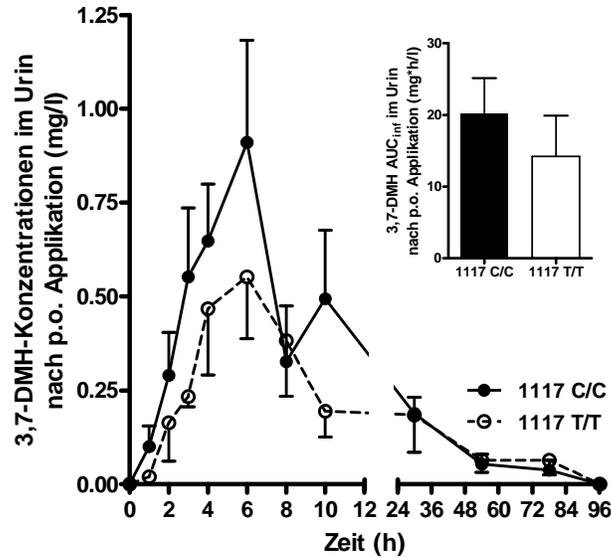
Abb. 3.16

a Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für 7-MX und AUC_{inf} nach per oraler Applikation ($n=5$) von 10 mg/kg KG Theobromin. * Statistisch signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

3,7-Dimethylharnsäure / Urin / p.o.

a



b

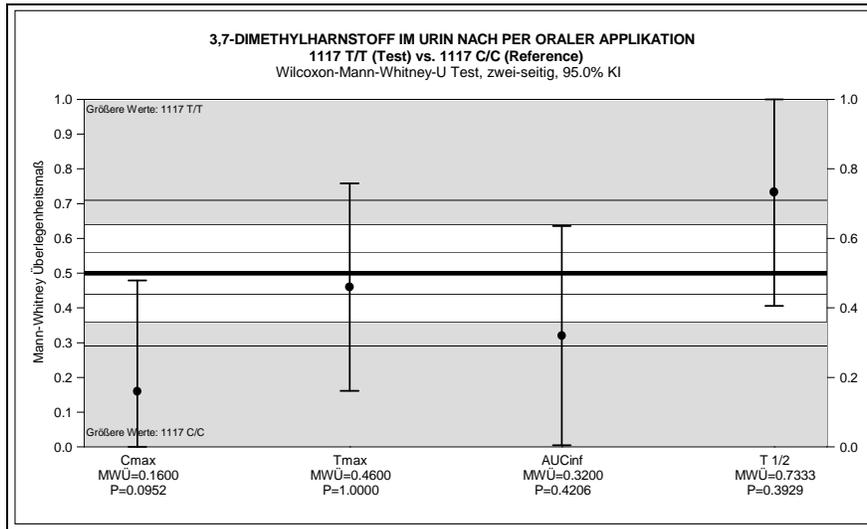


Abb. 3.17

a Urinkonzentration-Zeit-Diagramm für 3,7-DMH und AUC_{inf} nach per oraler Applikation ($n=5$) von 10 mg/kg KG Theobromin. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

b Graphische Darstellung des Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests für die pharmakokinetische Parameter. Dargestellt sind das 95%ige Konfidenzintervall (KI), das Mann-Whitney Überlegenheitsmaß (MWÜ) und exakte p-Werte.

3.7 Pharmakokinetische Parameter

Alle pharmakokinetischen Parameter für die unter 3.6 – 3.17 gezeigten Diagramme wurden unter Verwendung der Software WinNonlin[®], Version 5.3 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA) berechnet.

Tab. 3.1 Pharmakokinetische Parameter im Plasma nach per oraler Applikation von Theobromin. Jeder Wert repräsentiert den MW \pm SD bei n = 5 Versuchstieren pro Genotyp. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen C/C- und T/T-Hunden wurden über die Durchführung eines Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests ermittelt und sind mit ** (p < 0,01) gekennzeichnet.

Substanz	C _{max} (mg/l)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	AUC _{inf} (mg*h/l)
TB, T/T	10,53 \pm 1,57	2,60 \pm 1,08	15,04 \pm 1,94	219,57 \pm 21,81
TB, C/C	12,64 \pm 2,42	3,30 \pm 1,79	12,22 \pm 2,69	215,37 \pm 50,31
3-MX, T/T	0,46 \pm 0,08 **	7,20 \pm 1,79	13,85 \pm 3,12	14,01 \pm 3,13
3-MX, C/C	0,83 \pm 0,30	7,20 \pm 1,10	12,82 \pm 0,95	19,79 \pm 6,23

Tab. 3.2 Pharmakokinetische Parameter im Plasma nach intravenöser Applikation von Theobromin. Jeder Wert repräsentiert den MW \pm SD bei n = 3 Versuchstieren pro Genotyp. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen C/C- und T/T-Hunden wurden über die Durchführung eines Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests ermittelt und sind mit * (p < 0,05) gekennzeichnet.

Substanz	C _{max} (mg/l)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	AUC _{inf} (mg*h/l)	Cl _{obs} (ml/min/kg)
	MW \pm SD				
TB, T/T	18,27 \pm 1,07	0,22 \pm 0,24	16,18 \pm 4,03 *	283,08 \pm 25,15 *	0,50 \pm 0,17 *
TB, C/C	19,37 \pm 2,11	0,11 \pm 0,05	9,14 \pm 0,48	211,22 \pm 11,06	0,83 \pm 0,00
3-MX, T/T	0,60 \pm 0,26	6,67 \pm 3,06	17,00 \pm 5,66 *	18,34 \pm 9,41	
3-MX, C/C	1,02 \pm 0,23	6,67 \pm 1,15	9,35 \pm 0,43	21,63 \pm 4,36	

Tab. 3.3 Pharmakokinetische Parameter im Urin nach per oraler Applikation von Theobromin. Jeder Wert repräsentiert den MW \pm SD bei n = 5 Versuchstieren pro Genotyp. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen C/C- und T/T-Hunden wurden über die Durchführung eines Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests ermittelt und sind mit * (p < 0,05) oder ** (p < 0,01) gekennzeichnet.

Substanz	C _{max} (mg/l)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	AUC _{inf} (mg*h/l)
	MW \pm SD			
TB, T/T	179,81 \pm 112,10	6,80 \pm 3,03	11,48 \pm 1,90	4075,28 \pm 1924,08
TB, C/C	178,98 \pm 77,58	7,20 \pm 2,28	10,03 \pm 1,07	3950,60 \pm 1383,19
3-MX, T/T	56,54 \pm 18,76	6,80 \pm 1,79	13,48 \pm 3,60	1620,67 \pm 333,31 *
3-MX, C/C	94,03 \pm 36,66	8,40 \pm 1,67	12,44 \pm 3,03	2319,17 \pm 707,24
7-MX, T/T	3,58 \pm 1,33 **	5,60 \pm 1,67	14,94 \pm 6,41	75,64 \pm 25,12 *
7-MX, C/C	8,03 \pm 3,20	7,20 \pm 2,28	9,44 \pm 2,35	188,57 \pm 69,10
3,7-DMH, T/T	0,58 \pm 0,36	4,80 \pm 1,10	31,55 \pm 17,27	14,19 \pm 12,73
3,7-DMH, C/C	1,11 \pm 0,46	5,00 \pm 1,41	27,81 \pm 15,27	20,26 \pm 10,89

Tab. 3.4 Pharmakokinetische Parameter im Urin nach intravenöser Applikation von Theobromin. Jeder Wert repräsentiert den MW \pm SD bei n = 3 Versuchstieren pro Genotyp. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen C/C- und T/T-Hunden wurden über die Durchführung eines Wilcoxon-Mann-Whitney-U Tests ermittelt und sind mit * (p < 0,05) gekennzeichnet.

Substanz	C _{max} (mg/l)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	AUC _{inf} (mg*h/l)
	MW \pm SD			
TB, T/T	264,12 \pm 122,98	7,33 \pm 3,06	12,46 \pm 0,52 *	5006,73 \pm 1906,10
TB, C/C	226,74 \pm 25,52	4,33 \pm 1,53	8,19 \pm 1,03	3978,67 \pm 621,17
3-MX, T/T	80,34 \pm 16,97 *	7,33 \pm 2,31	14,95 \pm 2,89	2163,02 \pm 263,48
3-MX, C/C	129,17 \pm 30,17	7,33 \pm 2,31	11,08 \pm 2,24	2795,50 \pm 874,78
7-MX, T/T	4,76 \pm 1,28 *	4,67 \pm 1,15	14,92 \pm 3,35 *	101,87 \pm 16,12 *
7-MX, C/C	12,32 \pm 1,94	6,67 \pm 3,06	10,52 \pm 1,30	215,96 \pm 50,50
3,7-DMH, T/T	0,72 \pm 0,37	4,67 \pm 1,15	31,10 \pm 15,31	10,92 \pm 3,93
3,7-DMH, C/C	1,20 \pm 0,48	4,67 \pm 1,15	18,24 \pm 3,49	12,68 \pm 0,37

4 DISKUSSION

Es ist bereits bekannt, dass Cytochrom P450 Enzyme am Metabolismus von Methylxanthinen beteiligt sind. Vor einigen Jahren wurde im CYP1A2 des Hundes ein Polymorphismus (CYP1A2 1117C>T) identifiziert, welcher in homozygoter Ausprägung zu einem Totalausfall dieses Enzymsystems führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine CYP1A2 Genotyp-basierte pharmakokinetische Metabolismusstudie mit der wirksamen Substanz Theobromin durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass CYP1A2 defiziente Hunde im Vergleich zu Wildtyp Hunden deutliche Unterschiede in wichtigen pharmakokinetischen Parametern (z.B. Halbwertszeit, Clearance, AUC) für die Muttersubstanz Theobromin aufweisen und der CYP1A2 Genotyp darüber hinaus einen signifikanten Einfluss auf die Metabolisierung von Theobromin zu 3-Methylxanthin und 7-Methylxanthin hat. Somit wurde Theobromin in der vorliegenden *in vivo* Studie als Substrat von CYP1A2 des Hundes identifiziert.

I Genotypisierung

Das Vorkommen des CYP1A2 1117C>T Polymorphismus wurde in der vorliegenden Arbeit an 270 Beagle Hunden untersucht, welche aus zwei unterschiedlichen Zuchtlinien (Harlan Winkelmann und Marshall BioResources) stammten und hatte primär das Ziel mindestens fünf homozygote 1117T/T Hunde in einer Zuchtlinie zu identifizieren, welche für die anschließende pharmakokinetische Studie genutzt werden konnten. Darüber hinaus ist aber auch von Interesse die Allelfrequenz für das mutierte 1117T Allel in der untersuchten Studienpopulation mit den Daten aus frühere Publikationen zu vergleichen (Tab. 4.1). Ähnlich wie in der vorliegenden Studie wurde in der Publikation von Aretz und Geyer (2010) in 30 untersuchten Beagle Hunden eine 1117T Allelfrequenz von 15 % ermittelt und in einer Studie von Whiterock et al. (2007) eine Allelfrequenz von 13 % an 79 untersuchten Hunden. Allerdings wurde in zwei japanische Studien von Mise et al. (2004a) und Tenmizu et al. (2004) bei Beagle Hunden deutlich höhere Frequenzen von 37 - 39 % ermittelt, so dass es regionale Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens dieses Polymorphismus zu geben scheint. Auch der Vergleich der Allelfrequenz für

das CYP1A2 1117T Allel in 14 verschiedenen Hunderassen ergab eine große Variabilität (Aretz und Geyer 2010). Damit scheinen Unterschiede in der Allelfrequenz sowohl bei verschiedenen Hunderassen als auch innerhalb einer Rasse zu bestehen. Allerdings ist anzumerken, dass in allen früheren Studien zum CYP1A2 1117C>T Polymorphismus deutlich weniger Hunde untersucht wurden als in der vorliegenden Studie.

Tab. 4.1 Unterschiede in der Allelfrequenz des caninen CYP1A2 1117C>T SNP

Probenumfang	Allelfrequenz 1117T	Literatur
149	37 %	Mise et al. 2004a
65	39 %	Tenmizu et al. 2004
79	13 %	Whiterock et al. 2007
30	15 %	Aretz und Geyer 2010
270	17 %	Vorliegende Arbeit

II Pharmakokinetische Studie

Basierend auf der Genotypisierung von 270 Beagle Hunden wurden zehn Hunde in die pharmakokinetische Studie mit der Substanz Theobromin eingeschlossen. Fünf Hunde zeigten eine homozygote (T/T) Ausprägung des CYP1A2 1117C>T Polymorphismus und waren damit CYP1A2 defizient, während fünf weitere Hunde mit dem homozygoten 1117C/C Genotyp die Wildtyp Kontrollgruppe darstellten. In dieser Studie wurden allen Tieren in einem cross-over Design einmalig 10 mg Theobromin pro kg Körpergewicht oral und intravenös verabreicht sowie Plasma- und Urinproben über einen Zeitraum von 96 Stunden gesammelt, um daraus individuelle Konzentrations-Zeit-Profile der Muttersubstanz und der Metaboliten 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin und 3,7-Dimethylharnsäure zu berechnen. Diese Studie war bewusst als pharmakokinetische Metabolismusstudie angelegt; daher wurde mit 10 mg/kg Theobromin eine erwartungsgemäß auch bei 1117T/T Hunden subtoxische Dosierung gewählt. Tatsächlich zeigte im gesamten Studienverlauf keiner der Hunde nach Applikation klinische Symptome einer Theobromin-Vergiftung.

Sowohl nach per oraler als auch nach intravenöser Applikation zeigten sich jedoch große Unterschiede im Metabolismus von Theobromin bei den CYP1A2 defizienten T/T-Hunden. Damit ist gezeigt, dass Theobromin beim Hund ein Substrat des caninen CYP1A2 Enzyms ist. Allerdings lassen die Ergebnisse dieser Arbeit auch darauf schließen, dass neben CYP1A2 weitere metabolisierende Enzyme beteiligt sind. So ist die Bildung der Metabolite 3-Methylxanthin und 7-Methylxanthin bei den 1117T/T-Hunden zwar signifikant reduziert, jedoch immer noch deutlich messbar. Um welche Enzyme es sich hier im Einzelnen handelt muss in weiteren Studien herausgefunden werden. Verschiedene Autoren zeigten, dass beim Menschen neben CYP1A2 auch CYP2A6 und CYP2E1 am Metabolismus von Theobromin beteiligt sind (Gates und Miners 1999, Dorne et al. 2001). Dabei soll CYP1A2 an der Bildung von 7-Methylxanthin und CYP2E1 an der Bildung von 7-Methylxanthin, 3-Methylxanthin und 3,7-Dimethylharnsäure beteiligt sein (Gates und Miners 1999).

III Speziesunterschiede in der Metabolisierung von Methylxanthinen

Die Stoffwechselrouten der Methylxanthine, insbesondere von Coffein wurden in der Vergangenheit weitestgehend beim Menschen untersucht. Die Bedeutung von CYP1A2 am Metabolismus von Methylxanthinen zeigt sich schon allein an der Tatsache, dass Coffein als Prüfsubstrat für die phänotypische Charakterisierung der CYP1A2-Aktivität beim Menschen herangezogen wird (Zanger et al. 2008). Allerdings zeigten Mise et al. (2008), dass das CYP1A2-Enzym im Vergleich von Mensch und Hund nicht die identische Substratspezifität aufweist, so dass Daten für CYP1A2 nicht unkritisch von dem Menschen auf den Hund übertragen werden dürfen. So zeigten Mise et al. (2008) durch Metabolismusstudien an Lebermikrosomen von CYP1A2 1117 C/C-, C/T- und T/T-Hunden, dass CYP1A2 in diesem Versuchsansatz nicht am Metabolismus von Coffein beteiligt ist.

Neben Coffein, gilt auch Theobromin als klassisches Substrat von CYP1A2 beim Menschen. Da in diesem Fall aber auch CYP2A6 und CYP2E1 am Metabolismus beteiligt sind, gilt Theobromin als Prüfsubstrat für phänotypische Studien zur Messung der CYP1A2-Aktivität beim Menschen als unbrauchbar (Gates und Miners 1999; Dorne et al. 2001).

In einer Studie von Cornish und Christman im Jahr 1957 wurde nach per oraler Applikation von 1000 mg Theobromin/Mensch mittels Papierchromatographie Theobromin und entstandene

Metabolite analysiert (Tab. 4.2). Inaktives 7-Methylxanthin stellte in dieser Studie den Hauptmetaboliten im Urin des Menschen dar (Cornish und Christman 1957; Miller et al. 1984).

Theobromin wird maßgeblich (90 % der per oralen Applikation beim Menschen) über CYP-vermittelten Reaktionen metabolisiert: so stellen die wichtigsten Metabolisierungsreaktionen die 3-N-Demethylierung zu 7-Methylxanthin (>60 %) und die 7-N-Demethylierung zu 3-Methylxanthin (20 %) dar; eine untergeordnete Rolle spielt die C-8-Oxidation zu 3,7-Dimethylharnsäure (<15 %) (Dorne et al. 2001).

In einer vergleichenden Studie von Miller et al. mit fünf verschiedenen Säugetieren verstoffwechselten Hunde und Ratten nach per oraler Applikation von 5 mg/kg KG radioaktiv markierten Theobromins, im Gegensatz zu allen getesteten Tierarten wie Kaninchen, Maus und Hamster, Theobromin vor allem zu 3-Methylxanthin. Sowohl Theobromin als auch 3-Methylxanthin werden aber als aktive Substanzen bewertet und können somit toxisch für Hunde sein. In dieser Studie wurden Theobromin und seine Metabolite mittels HPLC analysiert (Miller et al. 1984). Im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit konnte in der beschriebenen Studie von Miller et al. prozentual deutlich weniger Theobromin und Metabolite ermittelt werden, wobei das Verhältnis der Analyten untereinander sich jedoch ähnlich verhält. Hierbei ist zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit jedoch im doppelten Zeitraum (96 h vs. 48 h) Urin gesammelt und analysiert wurde um den vollständigen Metabolismus von Theobromin darzustellen.

Vergleicht man also direkt den Theobrominmetabolismus von Mensch und Hund, fallen die folgenden beiden Unterschiede auf: (I) Hunde scheiden Theobromin mit 37 % hauptsächlich über den Urin aus, während der Mensch mit 11-12 % bedeutend weniger unverändertes Theobromin über diesen Ausscheidungsweg eliminiert. (II) Beim Hund stellt das noch wirksame 3-Methylxanthin mit 20 % den Hauptmetabolit dar, wohingegen der Mensch mit 30 % hauptsächlich den inaktiven Metabolit 7-Methylxanthin ausscheidet.

Im Falle der Aufnahme höherer Dosen an Theobromin, wie sie im Rahmen einer Schokoladenvergiftung bei Hunden auftreten kann, können Theobromin und 3-Methylxanthin im Körper akkumulieren und so auch zu lebensbedrohlichen Zuständen führen. Hunde gehören aufgrund dieser Besonderheit im Metabolismus zu den theobrominempfindlichen Spezies.

Neben dieser generell hohen Theobromin-Empfindlichkeit des Hundes, zeigen jedoch zahlreiche Fallberichte in der Literatur, dass zusätzlich starke interindividuelle Unterschiede in der

Theobromintoxizität beim Hund existieren, welche bisher nicht erklärt werden konnten (Gans et al. 1980; Stidworthy et al. 1997).

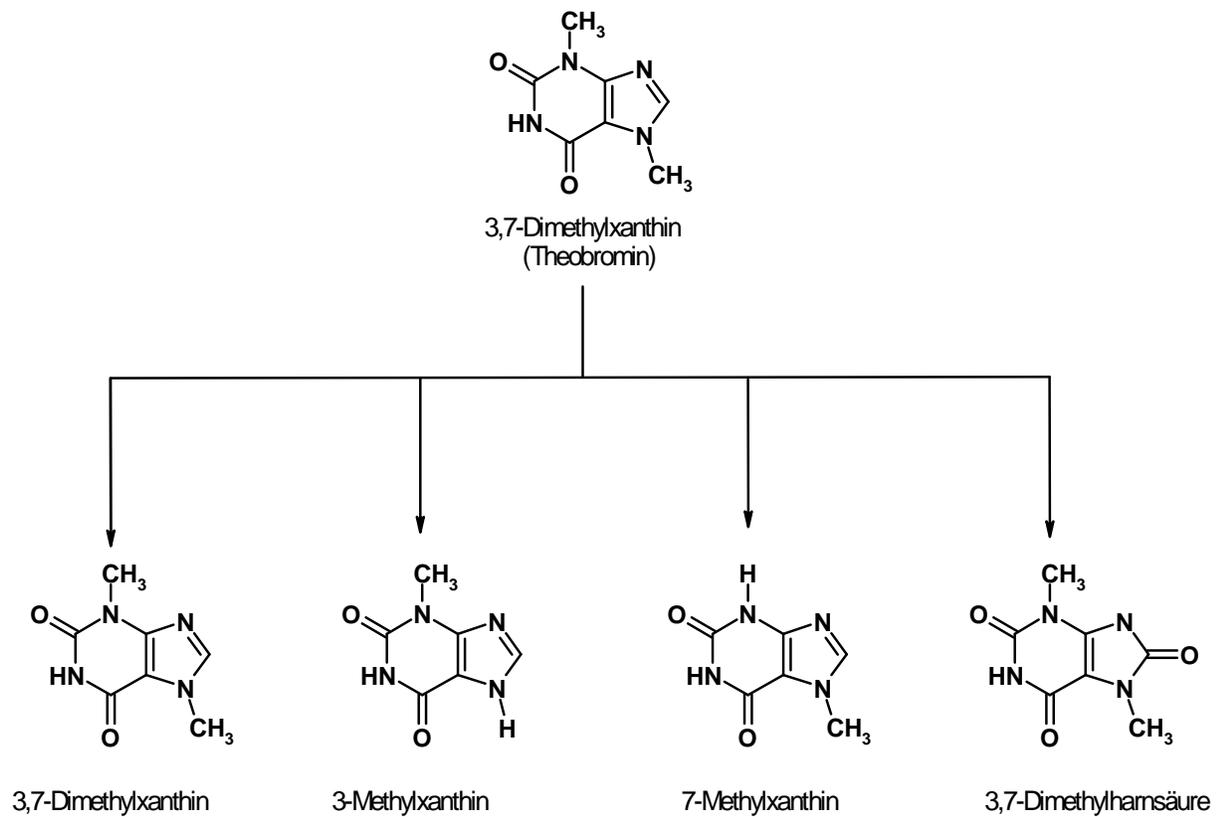


Abb. 4.1 *Theobrominmetabolismus. Theobromin wird bei den meisten Spezies über N-Demethylierungsreaktionen zu 3-Methylxanthin (3-MX), 7-Methylxanthin (7-MX) und über Oxidation zu 3,7-Dimethylharnsäure (3,7-DMH) verstoffwechselt. Diese Metaboliten werden zum größten Teil über den Urin ausgeschieden. Zwischen einzelnen Spezies gibt es jedoch große Unterschiede in den Anteilen einzelner Metaboliten an der ausgeschiedenen Gesamtmenge.*

Tab. 4.2 Speziesunterschiede in der Metabolisierung von Theobromin: Die folgenden prozentualen Anteile an der applizierten Gesamtsubstanz wurden in der vorliegenden Arbeit über 96 h mit dem Urin ausgeschieden. In der Studie von Miller et al. sowie Cornish und Christman wurden die prozentualen Anteile im Urin über 48 h bestimmt.

	Theobromin	3-Methylxanthin	7-Methylxanthin	3,7-Dimethylharnsäure	Sonstige Metabolite	Literatur
Mensch (per oral: 1000mg)	11-12 %	14-21 %	28-30 %	nicht ermittelt	3-4 %	Cornish and Christman 1957
Hund (per oral: 5mg/kg)	36,8 %	19,9 %	3,4 %	0,4 %	5,3 %	Miller et al. 1984
Hund (per oral: 10mg/kg)	65,7 %	31,9 %	2,1 %	0,3 %	nicht ermittelt	Vorliegende Arbeit
	Muttersubstanz	aktiver Metabolit	inaktive Metaboliten			

V Theobrominvergiftungen bei Hunden

Theobromin wird in der Veterinärmedizin nicht mehr als Monopräparat eingesetzt. Allerdings werden in der Literatur Theobrominvergiftungen infolge von Schokoladenverzehr und anderen Kakaoprodukten bei Hunden vielfach beschrieben (Clough 1942; Decker 1972; Sutton 1981; Glauberg und Blumenthal 1983; Drolet et al. 1984; Hooser 1985; Hornfeldt 1987; Hovda und Kingston 1994; Strachan und Benett 1994; Sturgeon und Sutton 2008).

Eine Theobrominvergiftung beim Hund ist durch Symptome wie Nervosität, Bradykardie, Tachykardie, Herzrhythmusstörungen, Vomitus, Diarrhoe, gesteigerte Diurese, Harninkontinenz und Krämpfe gekennzeichnet und kann sogar zum Tod durch Herz-Kreislaufversagen (Decker 1972; Strachan und Benett 1994), infolge von Nierenversagen (Sturgeon und Sutton 2008) oder akutem Kreislaufversagen (Sutton 1981) führen. Da kein Antidot zur Verfügung steht, ist eine

symptomatische Therapie mit Magen-Spülungen, Aktivkohle, Diazepam, Barbiturate, Verapamil, sowie Propanolol indiziert (Hornfeldt 1987). Gwaltney-Brant weist im Jahre 2001 jedoch darauf hin, dass es sich bei Propanolol um einen unselektiven β -Blocker handelt, welcher die renale Theobrominausscheidung hemmt und empfiehlt deshalb Metoprolol (Gwaltney-Brant 2001; Stosic et al. 2011).

In einer toxikologischen Studie aus dem Jahr 1980 wiesen die Autoren bereits individuelle Unterschiede in der Theobrominverträglichkeit zwischen einzelnen Hunden nach (Gans et al. 1980). In der Studie wurde Mischlingshunden Theobromin in verschiedenen Dosierungen oral verabreicht. Nach einmaliger Applikation verstarb einer von vier Hunden bei einer Dosierung von 300 mg/kg Körpergewicht (KG), sowie einer von acht Hunden bei 500 mg/kg KG und einer von zwei Hunden bei 1000 mg/kg KG. Bei der Verabreichung von Theobromin in einer Dosierung von unter 300 mg/kg KG traten bei keinem Hund Symptome einer Vergiftung auf.

Allerdings wurde in anderen Publikationen bereits nach Applikation von 100 mg Theobromin/kg BW über Vergiftungssymptomen bei Hunden berichtet (Strachan und Benett 1994). In einem anderen veröffentlichten Fall wurden vier englische Bulldoggen mit einer kleinen Menge dunkler Schokolade gefüttert (Stidworthy et al. 1997). Zwei dieser Hunde kollabierten und starben, während zwei Hunde keine Symptome zeigten. Der gleichzeitige Tod zweier zuvor gesunder Hunde ließ die Autorin über eine Theobrominvergiftung spekulieren und unterstützt die individuelle pharmakokinetische Variabilität, die bereits von Gans et al. im Jahre 1980 beschrieben wurde, da die anderen beiden Hunde nach der Aufnahme der gleichen Menge Schokolade symptomlos waren.

Mumford et al. (1996) verglichen die Absorptionsrate von oral appliziertem Theobromin in Form von Kapseln und in Form von Schokolade bei Menschen. Die Autoren zeigten, dass die Plasmakonzentrationen von Theobromin nach Schokoladenkonsum höher lagen und die maximale Plasmakonzentration bereits eine Stunde früher erreicht wurde (2 h vs. 3 h) als bei Applikation in Kapselform. Allerdings berichteten Shively et al. (1985) von einer geringeren Absorptionsrate von oral verabreichtem Theobromin in Schokolade als von Theobromin in Lösung, so dass sowohl beim Menschen als auch beim Hund weitere Studien erforderlich sind, um verlässliche Aussagen über die orale Bioverfügbarkeit von Theobromin aus Kakao-Produkten treffen zu können.

IV Der canine CYP1A2 1117C>T Polymorphismus

Von den neun bisher beim Hund identifizierten CYPs sind bereits fünf als polymorph beschrieben: CYP1A2, CYP2C41, CYP2D15, CYP2E1 und CYP3A12. Allerdings ist bis heute noch sehr schlecht erforscht, welche Konsequenzen diese Polymorphismen in der tierärztlichen Praxis wirklich für die Sicherheit und Wirksamkeit der Arzneitherapie haben. Häufig wurden entsprechende Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten einzelner Arzneistoffe im Rahmen von präklinischen Metabolismus- oder Toxizitätsstudien bei Beagle Hunden beobachtet. Nur wenige Publikationen richten hierbei jedoch ihr Augenmerk auf mögliche Assoziationen mit Polymorphismen in arzneistoffmetabolisierenden Enzymen (Kamimura 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, ob und wenn ja in welchem Ausmaß der CYP1A2 1117C>T Polymorphismus einen Einfluss auf die Pharmakokinetik und den Metabolismus von Theobromin beim Hund hat. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass zwischen CYP1A2 defizienten Hunden und Wildtyp Hunden signifikante Unterschiede in wichtigen pharmakokinetischen Parametern (z.B. Halbwertszeit, Clearance, AUC) für die Muttersubstanz Theobromin bestehen und der CYP1A2 Genotyp darüber hinaus einen signifikanten Einfluss auf die Metabolisierung von Theobromin zu 3-Methylxanthin und 7-Methylxanthin hat. So zeigten die CYP1A2 1117T/T Hunde im Vergleich zu den 1117C/C Hunden eine signifikant niedrigere Plasma-Clearance von Theobromin (0,50 ml/min/kg vs. 0,83 ml/min/kg). Diese liegt bereits für CYP1A2 intakte Hunde unter der Theobromin-Clearance des Menschen, i.e. 0,88 - 1,2 ml/min/kg, und ist für die T/T Hunde sogar fast 50 % geringer als beim Menschen (Shively et al. 1985; Lelo et al. 1986). Damit haben 1117T/T Hunde bei gegebener Dosis eine deutlich höhere Exposition mit Theobromin im Vergleich zu den C/C Hunden und dem Menschen, was die individuell sehr unterschiedliche Verträglichkeit von Schokolade zwischen verschiedenen Hunden erklären könnte. Darüber hinaus war die AUC_{inf} für Theobromin im Plasma nach intravenöser Applikation in der T/T-Gruppe signifikant höher als in der C/C-Gruppe. Im Urin wurden sowohl nach intravenöser als auch nach per oraler Applikation signifikant niedrigere Konzentrationsmaxima und AUC_{inf} Werte für 7-Methylxanthine in der T/T-Gruppe ermittelt.

Bereits in früheren Studien konnte die wichtige Bedeutung von CYP1A2 beim Hund im Metabolismus bestimmter pharmakologisch wirksamer Substanzen gezeigt werden, wobei wie in der vorliegenden Studie pharmakokinetische Untersuchungen an CYP1A2 C/C und T/T Hunden durchgeführt wurden. Dies betrifft einen neuen partiellen inversen Agonisten des Benzodiazepin-Rezeptors (AC-3933) (Mise et al. 2004b) und einen neuen Phosphodiesterase Typ 4-Inhibitor (YM-64227) (Tenmizu et al. 2006).

VI Vergleich der Ergebnisse mit einer früheren kinetischen TB-Studie

Loeffler (2000) führte eine pharmakokinetische Studie mit sechs Beagle Hündinnen unbekanntem CYP1A2 Genotyps durch, um aufgrund der nachgewiesenen Methylxanthinkonzentrationen im Plasma und Urin auf das applizierte Methylxanthin zu schließen und um zu klären welche Fertigarzneimittel bzw. Nahrungsmittel dopingrelevante Plasma- und Urinkonzentrationen verursachen. Hierzu wurde den Hunden in einem cross-over Schema mit dazwischen liegender Auswaschperiode von zwei Wochen 5 mg/kg KG Theobromin in Form einer Injektionslösung intravenös und per oral in Form von Schokolade verabreicht. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie wurden die Hunde nicht auf einen CYP1A2 1117C>T Polymorphismus untersucht. Plasma- und Urinproben wurden bis zu einem Zeitpunkt von 36 Stunden nach Applikation gesammelt und mittels HPLC analysiert. Nach intravenöser Applikation von 5 mg/kg KG Theobromin wurde eine Halbwertszeit von $6,5 \pm 0,6$ h ermittelt. Die Halbwertszeit für Theobromin in der vorliegenden Studie lag in der Gruppe der C/C-Hunde bei $9,1 \pm 0,5$ h, in der Gruppe der T/T-Hunde im Vergleich jedoch bei $16,2 \pm 4,0$ h. Die geringe Halbwertszeit von Theobromin in der Kinetikstudie von Loeffler und geringe Standardabweichungen lassen darauf schließen, dass in diesem Versuch nur C/C-Hunde verwendet wurden. Auch bei der Betrachtung der ermittelten pharmakokinetischen Parameter im Urin zeigt sich für die Zeit bis zum Erreichen des Konzentrationsmaximums (T_{max}) ein vergleichbarer Wert in der von Loeffler publizierten Studie mit der Gruppe der C/C-Hunde ($3,0 \pm 0,0$ h vs. $4,3 \pm 1,5$ h). Bei den T/T-Hunden war der T_{max} mit $7,3 \pm 3,3$ h jedoch deutlich höher. Da in der früheren Studie über einen Zeitraum von 36 h und in der vorliegenden Studie über einen Zeitraum von 96 h Proben gesammelt wurden, sind die berechneten AUC-Werte nicht miteinander vergleichbar. Die orale Bioverfügbarkeit der verabreichten Schokolade lag bei 77 %, wogegen die mit Theobromin gefüllten Kapseln eine

Bioverfügbarkeit von durchschnittlich 84 % aufwiesen. Nach per oraler Applikation mittels Kapseln lag die Halbwertszeit in der vorliegenden Studie deutlich über der Halbwertszeit von Theobromin nach Applikation von Schokolade (T/T-Hunde: $15,0 \pm 1,9$ h, C/C-Hunde: $12,2 \pm 2,7$ h vs. $6,8 \pm 2,8$ h), wobei zu beachten ist, dass auch bei der Verabreichung von Schokolade eine Dosierung von 5 mg/kg KG gewählt wurde. Da es sich bei der Studie von Loeffler nicht um eine Metabolismusstudie handelt, wurden keine Metaboliten ermittelt.

Tab. 4.3 Pharmakokinetische Parameter nach intravenöser Applikation von Theobromin im direkten Vergleich zweier Studien

	Loeffler 2000	Vorliegende Arbeit	
		T/T	C/C
Plasma			
C_{\max} (mg/l)	$41,9 \pm 11,0$	$18,3 \pm 1,1$	$19,4 \pm 2,1$
$T_{1/2}$ (h)	$6,5 \pm 0,6$	$16,2 \pm 4,0$	$9,1 \pm 0,5$
Urin			
C_{\max} (mg/l)	$409,7 \pm 245,0$	$264,1 \pm 123,0$	$226,7 \pm 25,5$
T_{\max} (h)	$3,0 \pm 0,0$	$7,3 \pm 3,0$	$4,3 \pm 1,5$

Tab. 4.4 Pharmakokinetische Parameter nach per oraler Applikation von Schokolade bzw. Theobromin-Kapseln im direkten Vergleich zweier Studien

	Loeffler 2000	Vorliegende Arbeit	
		T/T	C/C
Plasma			
C_{\max} (mg/l)	$20,5 \pm 2,7$	$10,5 \pm 1,6$	$12,6 \pm 2,4$
$T_{1/2}$ (h)	$6,8 \pm 2,8$	$15,0 \pm 1,9$	$12,2 \pm 2,7$
BV (%)	77	82	86
Urin			
C_{\max} (mg/l)	$178,2 \pm 47,4$	$179,8 \pm 112,1$	$179,0 \pm 77,6$
T_{\max} (h)	$2,0 \pm 0,3$	$6,8 \pm 3,0$	$7,2 \pm 2,3$

VII Relevanz von Cytochrom Polymorphismen beim Hund in der pharmazeutischen Industrie

Hunde stellen nicht nur eine wichtige Gruppe an Patienten in der tierärztlichen Praxis und Klinik dar, sondern werden in der pharmazeutischen Industrie auch als Non-Rodent-Spezies für präklinische Toxizitäts- und Sicherheitsstudien sowie Wirksamkeitsprüfungen zur Bewertung neuer chemischer Wirkstoffe eingesetzt (Fink-Gremmels 2008). Für solche Studien werden i.d.R. homologe Tiergruppen bevorzugt um interindividuelle Unterschiede zu verringern. Wenn neue Wirkstoffkandidaten durch Cytochrom P450-Enzyme metabolisiert werden, welche bekanntermaßen Polymorphismen tragen, könnte die vorherige Genotypisierung dieser Polymorphismen in Zukunft helfen, die interindividuelle Variabilität in der Pharmakokinetik und dem Metabolismus solcher neuen Wirkstoffe zu vermindern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) sind an der Metabolisierung körpereigener und körperfremder Substanzen beteiligt. Hierbei spielen Polymorphismen in einzelnen CYPs, welche zu einem Ausfall der Enzymfunktion führen, eine wichtige Rolle bei bekannten interindividuellen Unterschieden im pharmakokinetischen Profil bestimmter Arznei- und Fremdstoffe. In präklinischen Studien, in denen Hunde als Versuchstiere eingesetzt werden, aber auch in der tierärztlichen Praxis kann dadurch sowohl die Wirksamkeit als auch die Verträglichkeit der Arzneitherapie beeinflusst sein.

Das humane CYP1A2 ist an der Metabolisierung von Methylxanthinen wie Coffein und Theobromin beteiligt, jedoch lässt dies nicht auf eine identische Substratspezifität bei Hunden schließen. Theobrominvergiftungen bei Hunden, insbesondere als Folge von Schokoladenverzehr werden häufig in der tierärztlichen Praxis vorgestellt und sind in der Literatur vielfach beschrieben. Der Hund stellt im Vergleich zu anderen Tierarten und dem Menschen eine Spezies mit besonderer Empfindlichkeit gegenüber Theobromin dar. Dies ergibt sich aus speziesspezifischen Unterschieden in der Präferenz der Demethylierungsposition bei der Metabolisierung von Theobromin. Allerdings wurde darüber hinaus von einer interindividuell sehr unterschiedlichen Verträglichkeit von Theobromin beim Hund berichtet. Es wurde vermutet, dass hierfür ein CYP1A2 1117C>T Polymorphismus verantwortlich sein könnten, welcher in homozygoter Ausprägung zu einem Totalausfall der CYP1A2 Enzymaktivität führt.

Das Ziel dieser Studie war es, mögliche Unterschiede im Metabolismus und der Pharmakokinetik von Theobromin bei CYP1A2 1117C/C (Wildtyp) und 1117T/T (CYP1A2 defizient) Beagle Hunden zu ermitteln. Sowohl die intravenöse als auch die per orale Applikation von Theobromin führte zu signifikanten Unterschieden im metabolischen Profil der getesteten Hunde und legt die Beteiligung des caninen CYP1A2 bei der Metabolisierung von Theobromin beim Hund nahe. CYP1A2 defiziente Hunde wiesen signifikant höhere Plasma-AUC-Werte und eine längere Halbwertszeit für Theobromin auf. Sowohl im Plasma als auch im Urin konnten niedrigere Konzentrationen der Metaboliten 3-Methylxanthin, 7-Methylxanthin und 3,7-Dimethylharnsäure nachgewiesen werden. Die signifikant verminderte Körperclearance von Theobromin bei den

CYP1A2 defizienten Hunden weist auf einen längeren Verbleib der Substanz im Körper hin und lässt die Schlussfolgerung zu, dass CYP1A2 1117T/T-Hunde bei Aufnahme höherer Dosen empfindlicher auf Theobromin reagieren als CYP1A2 1117C/C-Hunde. Daher könnte der CYP1A2 1117 Genotyp an der interindividuell unterschiedlichen Empfindlichkeit von Hunden gegenüber Schokolade beteiligt sein.

6 SUMMARY

Cytochrome P450 enzymes (CYPs) are involved in the metabolism of endogenous and exogenous substances. CYP polymorphisms are known to cause inter-individual differences in pharmacokinetic profiles of certain drugs and xenobiotics. In preclinical studies with dogs, these polymorphisms influence the efficacy and safety of new chemical entities, and confound the efforts to study these chemicals under controlled conditions.

Human CYP1A2 is involved in the metabolism of caffeine and theobromine, however it does not predict substrate specificity in dogs. Dogs are uniquely sensitive to theobromine, and theobromine toxicity in dogs due to consumption of chocolate is frequently reported in the literature. Furthermore, individual dogs are differently sensitive against chocolate consumption and this observation has made it difficult for researchers to fully understand chocolate toxicity in dogs. In the present study we hypothesized that the CYP1A2 1117 C>T polymorphism, which leads to a complete loss of enzyme function, may be involved in the individual theobromine tolerance in dogs.

Therefore, we aimed to analyse potential differences in the metabolism and pharmacokinetics of theobromine in CYP1A2 1117C/C (wild-type) and 1117T/T (CYP1A2 deficient) Beagle dogs. Both, intravenous and oral administrations of theobromine indicated significant differences in the metabolic profiles of theobromine and confirmed that canine CYP1A2 is involved in theobromine metabolism. CYP1A2 deficient dogs showed higher plasma AUC values and longer half-lives of theobromine compared with CYP1A2 wild-type dogs. In plasma and urine lower concentrations of the metabolites 3-methylxanthine, 7-methylxanthine and 3,7-dimethyluricacid were detected in the 1117T/T dogs. Furthermore, the body clearance of theobromine was significantly reduced in the group of CYP1A2 deficient dogs, leading to longer retention times in the body. Based on this data we assume that consumption of higher doses of theobromine may result in more pronounced accumulation and more severe toxicosis of theobromine in the 1117T/T dogs. In conclusion, these results support the hypothesis that polymorphisms in the canine CYP1A2 are at least in part responsible for the well-known inter-individual differences in the sensitivity against theobromine and even chocolate in dogs.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aretz JS and Geyer J (2010) Detection of the CYP1A2 1117C>T polymorphism in 14 dog breeds. *J Vet Pharmacol Ther* 34: 98-100

Arnaud MJ (2011) Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Methylxanthines, Handbook of experimental pharmacology* 200, Springer Verlag, Stockholm

Arndt T (2007) Urin-Kreatininkonzentration: Kenngröße zur Prüfung auf Probenverwerbarkeit? Kritische Überlegungen aus ca. 25000 Urin-Kreatininbestimmungen in einem klinisch-chemischen Labor. *T + K* 74(2): 94-99

Batterman RC, Grossman AJ, Dubinsky J, and Mouratoff G (1959) Reevaluation of the usefulness of theobromine calcium gluconate for the management of congestive heart failure and anginal syndrome. *Int Rec Med Gen Pract Clin* 172(6): 318-323

Blakemore F and Shearer GD (1943) The poisoning of livestock by cacao products. *Vet Rec* 55: 165

Braun JP, Lefebvre HP, and Watson ADJ (2003) Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol.* 32: 162-179

Carrieri M, Trevisan A, and Bartolucci GB (2001) Adjustment to concentration-dilution of spot urine samples: correlation between specific gravity and creatinine. *Int Arch Occup Environ Health* 74: 63-67

Chapman RA and Miller DJ (1974) Structure-activity relations for caffeine: a comparative study of the inotropic effects of the methylxanthines, imidazoles and related compounds on the frog heart's. *J Physiol* 242: 615-634

Chasseaud LF and Hawkins DR (2007) Biotransformation of drugs. In: *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Swarbrick J (ed.), Informa Healthcare, New York, USA

- Clough GW (1942)** Theobromine poisoning in the dog. *Vet J* 74: 196
- Colditz GA, Miller JN, and Mosteller F (1988)** Measuring gain in the evaluation of medical technology. The probability of a better outcome. *Int J Technol Assess Healthcare* 4(4):637-42
- Cornish HH and Christman AA (1957)** A study of the metabolism of theobromine, theophylline, and caffeine in man. *J Biol Chem* 228: 315-323
- Curtis PE and Griffiths JE (1972)** Suspected chocolate poisoning of calves. *Vet Rec* 90: 313-314
- Czok G (1974)** Zur Frage der biologischen Wirksamkeit von Methylxanthinen in Kakaoprodukten. *Z Ernährungswiss* 13: 165-171
- Decker RA (1972)** Theobromine poisoning in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 161(2): 198-199
- Dorfman LJ and Jarvik ME (1970)** Comparative stimulant and diuretic actions of caffeine and theobromine in man. *Clin Pharmacol Ther* 11(6): 869-872
- Dorne JL, Walton K, and Renwick AG (2001)** Uncertainty factors for chemical risk assessment: human variability in the pharmacokinetics of CYP1A2 probe substrates. *Food Chem Toxicol* 39: 681-696
- Drolet R, DVM, MSc, Arendt TD, BS, and Stowe SM (1984)** Cacao bean shell poisoning in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 185(8): 902
- Eteng MU, Eyong EU, Akpanyung EO, Agiang MA, and Aremu CY (1997)** Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant Foods Hum Nutr* 51: 231-243
- Fink-Gremmels J (2008)** Implications of hepatic cytochrome P450-related biotransformation process in veterinary science. *Eur J Pharmacol* 585: 502-509
- Fleischer S, Sharkey M, Mealey K, Ostrander EA, and Martinez M (2008)** Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinic animal model. *The AAPS Journal* 10(1): 110-119

- Fredholm BB and Lindström K (1999)** Autoradiographic comparison of the potency of several structurally unrelated adenosine receptor antagonists at adenosine A₁ and A_{2A} receptors. *Eur J Pharmacol* 380: 197-202
- Friedman L, Weinberger MA, and Peters EL (1975)** Testicular atrophy and aspermatogenesis in rats fed caffeine or theobromine in the presence or absence of sodium nitrite. *Fed Proc Fed Amer Soc Exp Biol* 32: 228
- Gans JH, Korson R, Cater MR, and Ackerly CC (1980)** Effect of short-term and long-term theobromine administration to male dogs. *Toxicol Appl Pharmacol* 53: 481-496
- Gates S and Miners JO (1999)** Cytochrome P450 selectivity in human hepatic theobromine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 47: 299-305
- Glauber A and Blumenthal HP (1983)** Chocolate poisoning in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 19: 246-248
- Graham RA, Tyler LO, Krol WL, Silver IS, Webster LO, Clark P, Chen L, Banks T, and LeCluyse EL (2006)** Temporal kinetics and concentration-response relationships for induction of CYP1A, CYP2B, and CYP3A in primary cultures of beagle dog hepatocytes. *J Biochem Molecular Toxicology* 20(2): 69-78
- Gwaltney-Brant S (2001)** Chocolate intoxication. *Vet Med* 96:108-111
- Heathcote R ST A (1920)** The action of caffeine, theobromine and theophylline on the mammalian and batrachian heart. *J Pharmacol Exp Ther* 16(5): 327-344
- Hooser SB (1985)** Methylxanthines (theobromine, caffeine, theophylline) toxicosis in animals – a review of 1984 cases at the NAPCC. *Vet Hum Toxicol* 28: 313
- Hornfeldt CS (1987)** Chocolate toxicity in dogs. *Mod Vet Pract* 68: 552-554
- Hovda LR and Kingston RL (1994)** Cocoa bean mulch poisoning in dogs. *Vet Hum Toxicol* 36(4): 357

- Jansson DS, Galgan V, Schubert B, and Hard af Segerstad C (2001)** Theobromine intoxication in a red fox and a European badger in Sweden. *J Wildl Dis* 37(2): 362-365
- Josephy PD, Guengerich FP, and Miners JO (2005)** “Phase I” and “Phase II” drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metab Rev* 37: 575-580
- Kamimura H (2006)** Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagles: possible influence of CYP1A2 deficiency on toxicological evaluations. *Arch Toxicol* 80: 732-738
- Locher W (1989)** Theophyllin - die Geschichte eines Wirkstoffes im Wandel der Anwendung, Cygnus Verlag, München
- Löffler BMN (2000)** Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Coffein, Theophyllin und Theobromin beim Hund nach Aufnahme von Kaffee, Tee und Schokolade. Dissertationsschrift am Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
- Löffler B, Kluge K, Ungemach FR (2000)** [Concentrations of caffeine, theophylline and theobromine in plasma and urine of dogs after application of coffee, tea and chocolate and its relevance to doping]. *Tierärztl Prax (K)* 28: 79-85
- Lu FC and Kacew S (2009)** Lu’s basic toxicology: fundamentals, target organs, and risk assessment, 5th edition, Informa Healthcare, New York
- Matissek R (1997)** Review: Evaluation of xanthine derivatives in chocolate – nutritional and chemical aspects. *Z Lebensm Unters Forsch A* 205: 175-184
- Miller GE, Radulovic LL, Dewit RH, Brabec MJ, Tarka SM, and Cornish HH (1984)** Comparative theobromine metabolism in five mammalian species. *Drug Metab Dispos* 12(2): 154-160
- Mise M, Hashizume T, Matsumoto S, Terauchi Y, and Fujii T (2004a)** Identification of non-functional allelic variant of CYP1A2 in dogs. *Pharmacogenetics* 14: 769-773

- Mise M, Yadera S, Matsuda M, Hashizume T, Matsumoto S, Terauchi Y, and Fujii T (2004b)** Polymorphic expression of CYP1A2 leading to interindividual variability in metabolism of a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist in dogs. *Drug Metab Dispos* 32: 240-245
- Mise M, Hashizume T, and Komuro S (2008)** Characterization of substrate specificity of dog CYP1A2 using CYP1A2-deficient and wild-type dog liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 36: 1903-1908
- Mumford GK, Benowitz NL, Evans SM, Kaminski BJ, Preston KL, Sannerud CA, Silverman K, Griffith RR (1996)** Absorption rate of methylxanthines following capsules, cola and chocolate. *Eur J Clin Pharmacol* 51: 319-325
- Rau S (2001)** Vom Coffein zum Furosemid: Entdeckung, Erforschung und Entwicklung der Diuretika im 19. und 20. Jahrhundert, Peter Lang Verlag, Frankfurt am Main
- Schaarschmidt C (2008)** Theobromin - Zur Geschichte und Gegenwart eines Wirkstoffs. Dissertationsschrift am Institut für Geschichte der Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Shively CA, Tarka SM Jr, Arnaud MJ, Dvorchik BH, Passananti GT, Vesell ES (1985)** High levels of methylxanthines in chocolate do not alter theobromine disposition. *Clin Pharmacol Ther* 37(4): 415-424
- Smit HJ (2011)** Theobromine and the pharmacology of cocoa. In: *Methylxanthines, Handbook of Experimental Pharmacology* 200, Fredholm BB (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Srinivasau AP and Kesava C (1979)** Housefly test in toxicological studies. *Indian J Exp Biol* 17: 319-320
- Stidworthy MF, Bleakley JS, Cheeseman MT, and Kelly DF (1997)** Chocolate poisoning in dogs. *Vet Rec* 141: 28
- Stojiljkovic M, Patrinos GP, and Pavlovic S (2011)** Clinical applicability of sequence variations in genes related to drug metabolism. *Curr Drug Metab* 12: 445-454

- Stosic A, Ondreka N, Henrich E, Hassdenteufel E, and Schneider M (2011)** [Chocolate intoxication in a dog]. *Tierärztl Prax* 39(K): 111-115
- Strachan ER and Bennett A (1994)** Theobromine poisoning in dogs. *Vet Rec* 134: 284
- Sturgeon K and Sutton NM (2008)** Theobromine toxicity in dogs – is it exaggerated? *Clin Toxicol* 46(5): 384
- Sutton RH (1981)** Cocoa poisoning in a dog. *Vet Rec* 109: 563-565
- Tarka SM Jr, Zoumas BL and Gans JH (1979)** Short-term effects of graded levels of theobromine in laboratory rodents. *Toxicol Appl Pharmacol* 49: 127-149
- Tarka SM Jr, Zoumas BL and Gans JH (1981)** Effects of continuous administration of dietary theobromine on rat testicular weight and morphology. *Toxicol Appl Pharmacol* 58: 76-82
- Tarka SM Jr (1982)** The toxicology of cacao and methylxanthines: a review of the literature. *Crit Rev Toxicol* 9: 275-312
- Tenmizu D, Endo Y, Noguchi K, and Kamimura H (2004)** Identification of the novel canine CYP1A2 1117 C > T SNP causing protein deletion. *Xenobiotica* 34(9): 835-46
- Tenmizu D, Noguchi K, Kamimura H, Ohtani H, and Sawada Y (2006)** The canine CYP1A2 deficiency polymorphism dramatically affects the pharmacokinetics of 4-cyclohexyl-1-ethyl-7-methylpyrido[2,3-D]-pyrimidine-2-(1H)-one (YM-64227), a phosphodiesterase type 4 inhibitor. *Drug Metab Dispos* 34: 800-806
- Timson J (1975)** Theobromine and theophylline. *Mutat Res* 32: 169-178
- Usmani OS, Belvisi MG, Patel HJ, Crispino N, Birrell MA, Korbonits M, Korbonits D, and Barnes PJ (2005)** Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough. *FASEB J* 19: 231-233
- Vallon V, Mühlbauer B and Oswald H (2006)** Adenosin and kidney function. *Physiol Rev* 86: 901-940

- Whiterock VJ, Delmonte TA, Hui Le, Orcutt TL, and Sinz MW (2007)** Frequency of CYP1A2 polymorphism in beagle dogs. *Drug Metab Lett* 1: 163-165
- Wijnen PA, Op den Buijsch RA, Drent M, Kuijpers PM, Neef C, Bast A, Bekers O, and Koek GH (2007)** Review article: the prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther* 26(2): 211-219
- Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, and Schwab M (2008)** Functional pharmacogenetics genomics of human cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Anal Bioanal Chem* 392: 1093-1108

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben. Einen herzlichen Dank richte ich an Prof. Dr. Joachim Geyer für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit meine Ergebnisse auf einem Symposium zu präsentieren.

Vielen Dank an Bayer Animal Health und Prof. Dr. Norbert Mencke für die Möglichkeit die Dissertation in seiner Abteilung anzufertigen und die schnelle Durchsicht der Arbeit, an Kristine Fraatz und Eva Maria Krüdewagen für die Studienplanung, an Iris Heep, Nina-Kristin Kopp und Nadia Fioschi bezüglich der Formuliertchnik, sowie Ralph Krebber und Frank Ruttman für die Unterstützung in der Analytik.

Einen herzlichen Dank richte ich an meine fleißigen Helfer: Karin Baumgarten, Michael Keller, Michael Papageorgiou, Claudia Heyder, Marion Hilgers, Jörg Fahle, Rainer Koswall, Sandra Lindemann, Christiane Smetonat, Christian Stein, Albert Begon, Udo Krempel, Jörg Neumann, Ulrich Frielingsdorf, Regina Leidolf, Katrin Strube, Carolin Ludwig, Julia Aretz und insbesondere Karin Weber und Angela Schulten. Mit breitem Wissen unterstützten mich Andreas Kampkötter und Ernst Plass, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Außerdem danke ich Henning Bembenek für die große Hilfe bei der Formatierung und die freundliche Unterstützung von Inge Bork und Monika Zahradnik-Schauß bei der Literaturrecherche in der Universitätsbibliothek Gießen.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und insbesondere meinem Freund, die mich während dieses Lebensabschnittes begleitet haben und mich immer unterstützt haben.

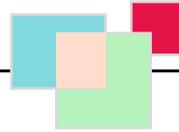
9 ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

„Der Polymorphismus 1117C>T im Cytochrom P450 CYP1A2 beeinträchtigt die Metabolisierung von Theobromin beim Beagle Hund“

selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Sabrina Collica



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5916-3



9 783835 195916 3