





Neue therapeutische Ansätze zur  
Behandlung der Diuretikaresistenz unter  
differenzierter Betrachtung von Bumetanid,  
Furosemid und Indapamid

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Christina Isabel Veiel

Tag der mündlichen Prüfung:

11.06.2001

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. T. Risler

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. K.-A. Kovar

Meinen Eltern

„Though this be madness,  
yet there is method in it.“

W. Shakespeare, Hamlet



Teile dieser Arbeit wurden oder werden veröffentlicht bzw. vorgestellt:

- Veiel CI, Heyne N, Kovar K-A, Risler T: Loop diuretic efficiency in resistant states – evidence for substance specific differences. Posterpräsentation und Postervortrag; Kongreß für Nephrologie in Wien (02. – 05.09.2000) und Abstract-Veröffentlichung in *Kidney & Blood Pressure Research*. 2000; 23 (3-5): 271.
- Heyne N, Veiel CI, Kovar K-A, Risler T: Tubular transport and loop diuretic efficiency: Evidence for substance specific differences. Posterpräsentation; Congress of the American Society of Nephrology (ASN) in Toronto, (11. – 16.10.2000) und Abstract-Veröffentlichung in *JASN*. 2000; 11: 62A, Abstract 338.
- Veiel CI, Heyne N, Hilt F, Kovar K-A, Risler T: Indapamide improves renal hemodynamics and loop diuretic response in congestive heart failure. Vortrag; 38. Kongreß der ERA (European Renal Association) in Wien, Juni 2001.
- Veiel CI, Heyne N, Kovar K-A, Risler T: Loop diuretic efficiency in resistant states – evidence for substance specific differences. *Kidney International*. 2001, (eingereicht).

In Vorbereitung:

- Heyne N, Veiel CI, Kovar K-A, Risler T: Indapamide improves renal hemodynamics and loop diuretic response in congestive heart failure. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*.

Weitere Veröffentlichung:

- Heyne N, Veiel CI, Erley CM, Risler T: Aktuelle Diuretikatherapie. *Der Internist*. 2000; 8: 768–775.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. T. Risler der Medizinischen Klinik, Abteilung III für Innere Medizin und unter wissenschaftlicher Mitbetreuung von Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar in der Zeit vom November 1997 bis Juni 2001 an der Medizinischen Klinik und dem Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. T. Risler danke ich für die unkomplizierte Bereitstellung des Themas und die freundliche Begleitung während dieser Arbeit und meiner Zeit an der Medizinischen Klinik.

Für die entgegengebrachte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie die offene Aufnahme in den Arbeitskreis mit wertvollen Anregungen danke ich Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar.

Herrn Dr. N. Heyne (Medizinische Klinik) danke ich für die freundschaftliche, engagierte stets konstruktive und tatkräftige Betreuung bei der Umsetzung dieses Projektes.

Frau J. Smykowski und Frau A. Raiser (Nephrologisch-Pharmakologisches Labor) danke ich für die Messung der klinischen Parameter und für die kameradschaftlich, heitere Atmosphäre im Labor – zusammen mit Frau M. Klaußner.

Jens Reinhard danke ich für die initiativen Schritte zum Antritt dieser Arbeit.

Christopher Fietzek und meiner Familie danke ich für die immerzu motivierende, emotionale sowie aufbauende Unterstützung während dieser Arbeit.





# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung und Rationale</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Diuretika</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Schleifendiuretika .....	4
2.1.1.1 Beeinflussung der Nierenfunktion durch Schleifendiuretika .....	8
2.1.1.2 Furosemid .....	9
2.1.1.3 Bumetanid.....	10
2.1.2 Indapamid.....	11
<b>2.2 Diuretikaresistenz</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Klinische Studien und Zielsetzung</b> .....	<b>16</b>
2.3.1 Studie I .....	16
2.3.2 Studie II .....	18
<b>3 Methodik</b> .....	<b>21</b>
<b>A Klinisch</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Studie I</b> .....	<b>21</b>
3.1.1 Studiendesign/-ablauf.....	22
3.1.2 Studienmedikation.....	23
3.1.2.1 Furosemid .....	23
3.1.2.2 Bumetanid.....	24
3.1.2.3 Probenecid.....	26
3.1.3 Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen .....	27
3.1.3.1 Probenhandling.....	29
3.1.4 Untersuchungsparameter .....	30

---

<b>3.2 Studie II.....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Studiendesign/-ablauf.....	32
3.2.2 Studienmedikation.....	33
3.2.2.1 Furosemid.....	33
3.2.2.2 Indapamid.....	33
3.2.3 Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen.....	34
3.2.3.1 Probenhandling.....	36
3.2.4 Untersuchungsparameter.....	37
<b>B Analytisch.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3 Grundlagen der chromatographischen Trennung und Detektion.....</b>	<b>39</b>
3.3.1 Allgemeines.....	39
3.3.2 Säulen.....	40
3.3.3 Vorsäulen.....	41
<b>3.4 Quantitative Analytik – Methodenvorlage/-auswahl.....</b>	<b>41</b>
3.4.1 Furosemid.....	41
3.4.2 Bumetanid.....	43
3.4.3 Indapamid.....	43
<b>3.5 Optimierung chromatographischer Parameter.....</b>	<b>45</b>
3.5.1 Furosemid/Plasma.....	45
3.5.1.1 Mobile Phase.....	45
3.5.1.2 Säule.....	45
3.5.1.3 Flußrate.....	46
3.5.1.4 Übersicht.....	46
3.5.1.5 HPLC-Chromatogramm.....	47
3.5.2 Furosemid/Urin.....	47
3.5.2.1 Mobile Phase.....	47
3.5.2.2 Säule.....	48
3.5.2.3 Flußrate.....	49
3.5.2.4 Übersicht.....	49
3.5.2.5 HPLC-Chromatogramm.....	50

---

3.5.3	Bumetanid/Plasma .....	51
3.5.3.1	Mobile Phase .....	51
3.5.3.2	Säule.....	51
3.5.3.3	Flußrate.....	52
3.5.3.4	Übersicht.....	52
3.5.3.5	HPLC-Chromatogramm .....	53
3.5.4	Bumetanid/Urin.....	54
3.5.4.1	Mobile Phase .....	54
3.5.4.2	Säule.....	54
3.5.4.3	Flußrate.....	54
3.5.4.4	Übersicht.....	55
3.5.4.5	HPLC-Chromatogramm .....	55
3.5.5	Indapamid/Vollblut.....	56
3.5.5.1	Mobile Phase .....	56
3.5.5.2	Säule.....	58
3.5.5.3	Flußrate.....	59
3.5.5.4	Übersicht.....	60
3.5.5.5	HPLC-Chromatogramm .....	60
<b>3.6</b>	<b>Optimierung bei der Probenaufarbeitung.....</b>	<b>62</b>
3.6.1	Proteinfällung .....	62
3.6.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion .....	63
3.6.2.1	Flüssig-Flüssig-Extraktion von Furosemid aus Urin .....	65
3.6.2.2	Flüssig-Flüssig-Extraktion von Indapamid aus Vollblut.....	66
<b>3.7</b>	<b>Interner Standard.....</b>	<b>66</b>
<b>3.8</b>	<b>HPLC-UV-Kopplung.....</b>	<b>68</b>
3.8.1	Allgemeines.....	68
3.8.2	Indapamid.....	69
<b>3.9</b>	<b>HPLC-FL-Kopplung.....</b>	<b>70</b>
3.9.1	Allgemeines/Grundlagen .....	70
3.9.2	Fluoreszenz, Chromophore, Bestimmung .....	71
3.9.3	Furosemid .....	73
3.9.4	Bumetanid .....	73

<b>3.10 Arzneistoff-Interferenzen .....</b>	<b>74</b>
<b>3.11 Gemessene Größen.....</b>	<b>78</b>
3.11.1 Diuretikakonzentrationen in Plasma/Vollblut und Urin.....	78
3.11.2 Elektrolyte, Osmolarität, Inulin, PAH, Aldosteron, .....	
Plasmareninaktivität, ANP .....	78
3.11.2.1 Elektrolyte .....	78
3.11.2.2 Osmolarität .....	79
3.11.2.3 Inulin .....	79
3.11.2.4 PAH .....	80
3.11.2.5 Aldosteron.....	81
3.11.2.6 Plasmareninaktivität (PRA) .....	82
3.11.2.7 ANP .....	83
3.11.3 Linksventrikuläre Funktion (LVF).....	84
<b>3.12 Berechnete Größen .....</b>	<b>84</b>
3.12.1 Clearance.....	84
3.12.2 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	85
3.12.3 Systemische Hämodynamik.....	86
3.12.3.1 Arterieller Mitteldruck (MAP) .....	86
3.12.4 Renale Hämodynamik.....	86
3.12.4.1 Effektiver Renaler Plasmafluß (ERPF).....	86
3.12.4.2 Renaler Blutfluß (RBF).....	87
3.12.4.3 Filtrationsfraktion (FF).....	87
3.12.4.4 Renovaskulärer Widerstand (RVR).....	88
3.12.5 Tubuläre Parameter .....	88
3.12.5.1 Natriumausscheidung ( $E_{Na}$ )/ Diuretikumausscheidung ( $E_{Diu}$ ) .....	88
3.12.5.2 Fraktionelle Natriumausscheidung ( $FE_{Na}$ )/ .....	
Fraktionelle Diuretikumausscheidung ( $FE_{Diu}$ ).....	89
3.12.5.3 Kumulative Natriumausscheidung ( $EC_{Na}$ )/ .....	
Kumulative Diuretikumausscheidung ( $EC_{Diu}$ ) .....	89
3.12.5.4 Natriuretische Effizienz ( $EC_{Na/Diu}$ ).....	90
<b>3.13 Statistik .....</b>	<b>90</b>

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchung der Plasma/Vollblut- und Urinproben aus den klinischen Studien</b>	<b>93</b>
4.1.1	Pharmakologische Grundlagen	93
4.1.2	Identifizierung	94
4.1.3	Quantifizierung	95
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse Studie I</b>	<b>96</b>
4.2.1	Ausgangsparameter	96
4.2.1.1	MAP, Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase	96
4.2.2	Ergebnisse Pharmakokinetik	97
4.2.2.1	Plasmaspiegelkurven von Bumetanid	98
4.2.2.2	Plasmaspiegelkurven von Furosemid	99
4.2.2.3	Urinkonzentrationen von Bumetanid	100
4.2.2.4	Urinkonzentrationen von Furosemid	101
4.2.2.5	Zusammenfassende pharmakokinetische Betrachtung	102
4.2.3	Ergebnisse Pharmakodynamik	106
4.2.3.1	Renale Hämodynamik und Natriumausscheidung	106
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse Studie II</b>	<b>111</b>
4.3.1	Ausgangsparameter	111
4.3.1.1	MAP, Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase	111
4.3.1.2	Herzfunktion	112
4.3.2	Ergebnisse Pharmakokinetik	113
4.3.2.1	Indapamid	113
4.3.2.2	Furosemid Plasmakonzentrationen	114
4.3.2.3	Furosemid Urinkonzentrationen	116
4.3.2.4	Zusammenfassende pharmakokinetische Betrachtung	117
4.3.3	Ergebnisse Pharmakodynamik	121
4.3.3.1	Renale Hämodynamik	121
4.3.3.2	Natriurese	123
<b>5</b>	<b>Diskussion und Schlußfolgerung</b>	<b>129</b>
<b>A</b>	<b>Klinisch</b>	<b>129</b>
<b>B</b>	<b>Analytisch</b>	<b>140</b>

---

<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil – Analytik</b>	<b>147</b>
<b>6.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>147</b>
6.1.1	Chemikalien und Reagenzien	147
6.1.2	Säulen	148
6.1.3	Geräte	148
6.1.3.1	HPLC-UV und HPLC-Fluoreszenz	148
6.1.4	Humane Proben	149
<b>6.2</b>	<b>Aufarbeitungsmethode zur Quantifizierung aus Plasma/Vollblut und Urin</b>	<b>149</b>
6.2.1	Proteinfällung	149
6.2.1.1	Furosemid	150
6.2.1.2	Bumetanid	150
6.2.2	Extraktion	150
6.2.2.1	Furosemid (Studie I)	151
6.2.2.2	Furosemid (Studie II)	151
6.2.2.3	Indapamid	151
6.2.3	HPLC-FL-Bestimmung	152
6.2.3.1	Furosemid	152
6.2.3.2	Bumetanid	153
6.2.4	HPLC-UV-Bestimmung	155
6.2.4.1	Indapamid	155
<b>6.3</b>	<b>Validierung</b>	<b>156</b>
6.3.1	Kalibrierung	156
6.3.1.1	Festlegung der Arbeitsbereiche	158
6.3.1.2	Linearität	159
6.3.1.3	Wiederfindung	162
6.3.1.4	Varianzhomogenität	163
6.3.1.5	Präzision	166
6.3.1.6	Richtigkeit	168
6.3.1.7	Bestimmungsgrenze	170
6.3.1.8	Nachweisgrenze	172

---

<b>6.4 Einzelwerte der Probanden und Patienten .....</b>	<b>174</b>
6.4.1 Studie I .....	174
6.4.1.1 Bumetanid/Plasma – Studie I .....	175
6.4.1.2 Bumetanid/Urin – Studie I .....	176
6.4.1.3 Furosemid/Plasma – Studie I .....	177
6.4.1.4 Furosemid/Urin – Studie I .....	178
6.4.2 Studie II .....	179
6.4.2.1 Furosemid/Plasma (Placebo) – Studie II .....	180
6.4.2.2 Furosemid/Urin (Placebo) – Studie II .....	181
6.4.2.3 Furosemid/Plasma (Indapamid) – Studie II .....	182
6.4.2.4 Furosemid/Urin (Indapamid) – Studie II .....	183
6.4.2.5 Indapamid/Vollblut – Studie II .....	184
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>185</b>



## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption des Lichtes
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACP	Acetophenon (interner Standard)
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ASS	Acetylsalicylsäure
AT <sub>1</sub>	Angiotensin I
AUC	Peakfläche ( <b>area under the curve</b> )
AUC <sub>0-180</sub>	Peakfläche von t = 0–180 min
BBM	Bürstensaum Membran ( <b>brush border membrane</b> )
BLM	Basolaterale Membran
BUM	Bumetanid
c	Konzentration einer Substanz in der Probenlösung
cGMP	Cyclo-Guanosinmonophosphat
c <sub>max</sub>	Maximale Konzentration
Cl	Clearance
Cl <sub>Diu</sub>	Diuretika-Clearance
C <sub>p</sub>	Plasmakonzentration
CSE	Chloesterin Synthese Enzym
d <sub>1</sub>	Schichtdicke der Lösung im Strahlengang (= Durchmesser der Kuvette)
ε	Molarer Absorptionskoeffizient
E <sub>Diu</sub>	Diuretikumausscheidung
E <sub>Na</sub>	Natriumausscheidung
EC <sub>Diu</sub>	Kumulative Diuretikumausscheidung
EC <sub>Na</sub>	Kumulative Natriumausscheidung
EC <sub>Na/Diu</sub>	Natriuretische Effizienz
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ERPF	Effektiver renaler Plasmafluß
EZV	Extrazellularvolumen
FE <sub>Na</sub>	Fraktionelle Natriumausscheidung
FE <sub>Na</sub> max	Maximale fraktionelle Natriumausscheidung
FF	Filtrationsfraktion
FL	Fluoreszenz
FS	Verkürzungsfraktion ( <b>fractional shortening</b> )

FURO	Furosemid
$\gamma$ -GT	Gammaglutamyltransferase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLIP	Glipizid (interner Standard)
GI-Trakt	Gastrointestinal-Trakt
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HF	Harnfluß
Hk	Hämatokrit
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
iKO	Individuelle Körperoberfläche
i.v.	intravenös
$I_\lambda$	Fluoreszenzintensität
I.R.	Sofortige Freigabe ( <b>immediate release</b> )
$I_0$	Intensität des Anregungslichtes
INDA	Indapamid
$K_G$	Gerätekonstante
KG	Körpergewicht
LVF	Linksventrikuläre Funktion
MAP	Arterieller Mitteldruck ( <b>mean arterial pressure</b> )
NPX	Naproxen (interner Standard)
NYHA	New York Heart Association
OAT	Organischer Anionentransporter
p.a.	pro analysi
p.o.	per os
PAH	Paraamminohippursäure
PIR	Piretanid (interner Standard)
PRA	Plasmareninaktivität
PTT	Partielle Thromboplastinzeit ( <b>partial thromboplastin time</b> )
Q	Fluoreszenzquantenausbeute
RBF	Renaler Blutfluß
RVR	Renovaskulärer Widerstand ( <b>renovascular resistance</b> )
S.R.	Verzögerte Freigabe ( <b>sustained release</b> )
$t_{\max}$	Zeitpunkt maximaler Konzentration
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Upm	Umdrehungen pro Minuten
UV	Ultraviolett
Vd	Verteilungsvolumen ( <b>volume of distribution</b> )
Vk	Verteilungskoeffizient
[...]	Konzentration bzw. Stoffmenge

**Kapitel 6**

$\alpha$	Signifikanzniveau ( $\alpha = 1-P$ (%))
$a_0$	y-Achsenabschnitt
$a_1$	Steigung
BG	Bestimmungsgrenze
$d_{rel}$	Relative Abweichung; Richtigkeit
$DS^2$	Varianzendifferenz
$f$	Freiheitsgrad
$F_t$	Tabellierter F-Wert
$H_0$	Nullhypothese
MW	Mittelwert
N	Anzahl (der Konzentrationsbestimmungen, der Parallelbestimmungen, etc...)
NG	Nachweisgrenze
OAG	Obere Arbeitsbereichsgrenze
P	Statistische Wahrscheinlichkeit (%)
PG	Prüfgröße
PW	Prüfwert
$r$	Korrelationskoeffizient
$s_a$	Standardabweichung an der Arbeitsbereichsgrenze a
$s_b$	Standardabweichung an der Arbeitsbereichsgrenze b
sdv	Standardabweichung (standard deviation)
$s_{rel}$	Relative Standardabweichung
$s_{x0}$	Verfahrensstandardabweichung
$s_y$	Reststandardabweichung
t	Student-t-Faktor
UAG	Untere Arbeitsbereichsgrenze
V/V	Volumenanteile
VK	Variationskoeffizient
$V_{x0}\%$	Relative Verfahrensstandardabweichung
W	Wiederfindungsrate
$\bar{x}$	Mittelwert der Daten
$x_{soll}$	Wahrer Wert bzw. richtiger Wert
$x_W$	Wahrer Wert
XB	Theoretische Bestimmungsgrenze
XN	Theoretische Nachweisgrenze



# 1 Zusammenfassung

Unter Diuretikaresistenz, als häufigem klinischen Problem bei chronischer Diuretika-therapie versteht man einen zunehmenden Wirkungsverlust in Form einer verminderten Natrium- und Flüssigkeitsausscheidung bei gleichbleibender Diuretikadosis. Ursachen können sowohl pharmakokinetischer und/oder -dynamischer Natur sein. Bisherige Behandlungsansätze beinhalten entweder eine stetige Dosissteigerung mit der Gefahr erhöhter Nebenwirkungen oder eine Kombinationstherapie verschiedener Diuretika (sequentielle Nephronblockade). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der Diuretikaresistenz zu entwickeln.

Zur quantitativen Analyse der Diuretikakonzentrationen in Plasma/Vollblut und Urin wurden chromatographische Trennverfahren (HPLC mit gekoppelter UV- bzw. Fluoreszenz-Detektion) weiterentwickelt (Schleifendiuretika) bzw. aufgebaut (Indapamid). Es wurden fünf verschiedene, validierte Analyseverfahren etabliert, anhand derer die jeweiligen Konzentrationen in den authentischen Proben bestimmt wurden.

In der ersten Studie wurde am Modell der pharmakokinetischen Diuretikaresistenz intraindividuell die Wirkung der Schleifendiuretika Bumetanid und Furosemid bei zunehmender Hemmung der tubulären Sekretionskapazität verglichen. Hierbei ergaben sich deutliche substanzspezifische Unterschiede. Während sich die Pharmakokinetik beider Arzneistoffe gleichartig änderte, führte Bumetanid unabhängig vom Grad der Sekretionshemmung zu einer höheren fraktionellen Natriumausscheidung und einer effizienteren Natriuresis. Dies ist durch eine intratubulär höhere Affinität von Bumetanid am  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -Kotransporter erklärt. Bei Patienten mit eingeschränkter tubulärer Sekretionskapazität und pharmakokinetischer Diuretikaresistenz kann dies von Vorteil sein.

In einer zweiten Studie wurde bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz placebo-kontrolliert die Wirkung des Vasodilatators und Thiazid-Analogons Indapamid (1,5 mg S.R.) auf renale Hämodynamik und natriuretische Wirksamkeit von Furosemid geprüft. Bei unveränderter systemischer Hämodynamik zeigte sich unter Indapamid eine Zunahme von GFR und renalem Blutfluß sowie eine verringerte Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Furosemid. Dies ist am ehesten durch eine afferente Vasodilatation – sowohl direkt als auch durch eine fehlende Aktivierung der tubulo-glomerulären Rückkopplung – mit nachfolgend erhöhtem Natriumangebot am Wirkort der Schleifendiuretika bedingt. Somit stellt Indapamid bei chronischer Herzinsuffizienz eine vielversprechende, neue therapeutische Option dar, die in weiteren klinischen Studien geprüft werden sollte.



## 2 Einleitung und Rationale

### 2.1 Diuretika

Diuretika stellen eine Basistherapie bei der medikamentösen Behandlung von Regulations- und Funktionsstörungen der Niere bei Herz- oder Niereninsuffizienz, arterieller Hypertonie oder chronischen Lebererkrankungen dar. Die Arzneistoffgruppe der Diuretika bewirkt primär eine gesteigerte Ausscheidung von Flüssigkeit und Elektrolyten; insbesondere die verminderte Reabsorption von Natriumionen führt zu einer gesteigerten Exkretion von Wasser. Diuretika werden therapeutisch dazu genutzt, Elektrolyt- und Wasserbewegungen im Organismus zu beeinflussen und die Homöostase im Körper aufrechtzuerhalten.

Aufgrund des Angriffsortes an verschiedenen funktionellen Abschnitten (Segmenten) des Nephrons, läßt sich für die Diuretika eine Einteilung in verschiedene Untergruppen vornehmen. Die verschiedenen Diuretikaklassen unterscheiden sich hinsichtlich Wirkungseintritt, -dauer und -stärke. Betrachtet man die fraktionelle Natriumausscheidung als ein Maß für die renale Wirksamkeit, so treten neben Carboanhydratasehemmern, kaliumsparenden Diuretika und Thiaziden die Schleifendiuretika als besonders schnell wirksame und effiziente Diuretikaklasse in Erscheinung. Sie sind in der Lage etwa 30% des filtrierte Natriums zu beeinflussen, wodurch ein temporärer Anstieg der fraktionellen Natriumausscheidung von 1% auf etwa 20 – 25% möglich ist. Klinisch kommen Schleifendiuretika zum Einsatz, wenn andere Diuretika nicht mehr wirken oder wenn akut eine forcierte Diurese erforderlich ist.

### 2.1.1 Schleifendiuretika

Schleifendiuretika entfalten ihre Wirkung durch Blockade des  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporters an der luminalen Seite des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle'schen Schleife. Durch diese Bindung am Kotransport-System wird die Reabsorption von Natrium-, Kalium-, und Chloridionen in diesem Abschnitt des Tubulusapparates gehemmt.

Aufgrund ihres Wirkortes an der luminalen Membran der Tubuluszellen, müssen die Wirkstoffe zunächst aus der Blutbahn in die Tubulusflüssigkeit gelangen. Da diese Gruppe der Diuretika eine starke Plasmaeiweißbindung von etwa 95% aufweist, ist der Weg der Filtration im Glomerulum der Niere stark eingeschränkt; die Diuretika-Protein-Komplexe werden nicht glomerulär filtriert, so daß nur der freie Anteil filtriert werden kann [1].

Für Furosemid, Bumetanid und andere Schleifendiuretika wurde bekannt, daß sie ihren Wirkort außer über glomeruläre Filtration hauptsächlich über aktive Sekretion im proximalen Tubulus erreichen, indem sie den unspezifischen Sekretionsweg organischer Säuren (Anionentransporter, Antiport) benutzen. Dieses Transportsystem ermöglicht es die nötige Menge Arzneistoff an den Wirkort zu befördern (Abb. 2-1) [1].

Der aktive Transport über den organischen Anionentransporter verläuft unter Energieverbrauch (ATP-abhängig), ist sättigbar und kann durch andere Stoffe kompetitiv gehemmt werden. So kann bei einer vorliegenden Niereninsuffizienz der Sekretionsprozeß durch kumulierte organische Säuren ( $\text{oA}^-$ ), die hier mit dem Diuretikum um die Bindungsstelle (2) konkurrieren, eingeschränkt sein (s. Abb. 2-1).

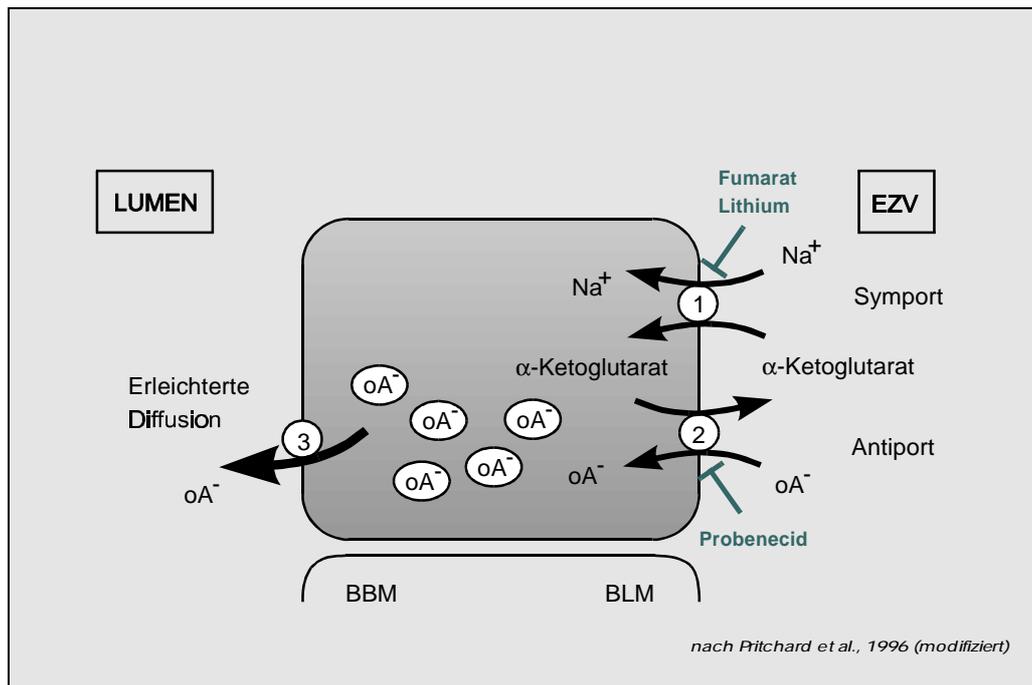


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der tubulären Sekretion organischer Anionen

Entscheidend für die natriuretische Wirksamkeit eines Schleifen-  
diuretikums ist somit zum einen der Anteil an tubulär sezerniertem  
Wirkstoff [2]. Zum anderen trägt insbesondere der zeitliche Verlauf der  
Sekretion einen wesentlichen Anteil zu einer effizienten natriuretischen  
Antwort bei [3]. Hieraus wird deutlich, daß nicht die Blutspiegel-  
konzentration des Arzneistoffes, sondern die pro Zeiteinheit im Urin  
vorliegende Diuretikamenge die wirksame Größe darstellt.

Wie bei allen Diuretika wird auch hier die spezielle Verflechtung der  
Pharmakodynamik mit der Pharmakokinetik dieser Arzneistoffklasse  
deutlich, da die diuretische Wirkung unmittelbare Folge ihrer renalen Aus-  
scheidung ist.

Ebenso gilt, daß jeder Anteil des Diuretikums, der bei der Bio-  
transformation zu einem inaktiven Metaboliten verändert wird oder die

biliäre Ausscheidung durchläuft, keinen saluretischen Effekt mehr erzielen kann.

Diuretika vom Typ der Schleifendiuretika lösen dosisabhängig eine starke Diurese aus. Sie zählen zu den High-ceiling-Diuretika, welche über einen weiten Dosisbereich eine nahezu lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung aufweisen, wodurch bei Dosissteigerung eine immer stärkere Diurese erreicht werden kann. Für alle Schleifendiuretika gilt jedoch: bei Erreichen eines gewissen Plateaus ist auch bei erneuter Dosissteigerung keine Zunahme der Diurese zu erwarten, statt dessen kommt es zu einem Anstieg des Nebenwirkungspotentials. Dennoch ist das Erreichen der Maximalwirkung nicht ausschließlich vom verwendeten Diuretikum abhängig, sondern ebenso von der Nierenfunktion, Alter und dem Krankheitszustand des Patienten.

Der Zusammenhang zwischen diuretischer Wirksamkeit gemessen als fraktionelle Ausscheidung von Natrium (Verhältnis ausgeschiedener zu glomerulär filtrierter Menge) und aktiver Wirkstoffmenge am Wirkort, dargestellt als Ausscheidungsrate des Diuretikums, kann als sigmoidaler Kurvenverlauf beschrieben werden (Abb. 2-2).

Die jeweilige Diuresestärke oder Effektivität eines Diuretikums kann anhand dieser Kurve ermittelt werden. Der Bereich des Wirkungsoptimums mit ausgeprägter Wirkung bei möglichst geringer Nebenwirkung liegt um den Wendepunkt der Kurve vor.

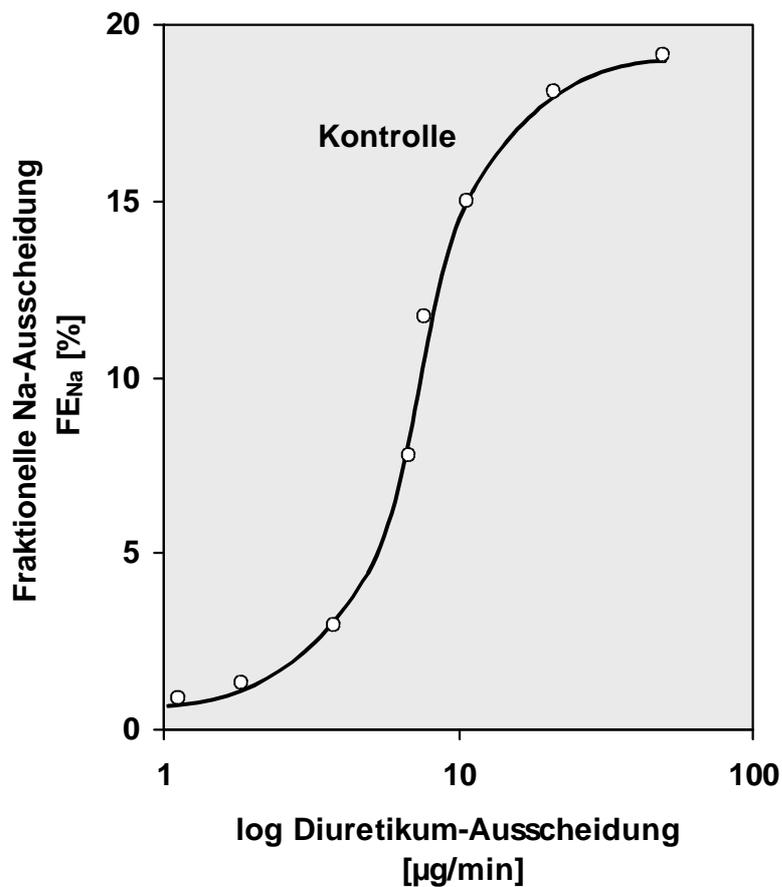


Abb. 2-2: Schematische Abbildung der Dosis-Wirkungs-Beziehung modifiziert nach Brater et al., 1987

Für das Erreichen des Wirkungsoptimums werden bei den verschiedenen Schleifendiuretika unterschiedliche Arzneistoffdosen benötigt.

Wenn diejenige Dosis bestimmt werden soll, die benötigt wird, um eine vergleichbare Natriumausscheidung hervorzurufen, so erhält man nach oraler Gabe beim Gesunden folgende Anhaltswerte [4], [5]:

≈ 1 mg	Bumetanid
≈ 12 mg	Piretanid
≈ 10-20 mg	Torasemid
≈ 40 mg	Furosemid

### 2.1.1.1 Beeinflussung der Nierenfunktion durch Schleifendiuretika

Die Niere bestimmt die Kinetik der Diuretika; andererseits jedoch beeinflussen diese Arzneistoffe ihrerseits die Nierenfunktion.

Für die Aufrechterhaltung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes des Körpers ist nicht nur die tubuläre Rückresorption als wichtiger renaler Grundprozeß verantwortlich, sondern auch die glomeruläre Filtration, die sich durch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ausdrückt.

Die glomeruläre Filtrationsrate wird als Schutz vor Hypovolämie und Elektrolytverlust durch einen Rückkopplungsmechanismus der tubulären Reabsorption angepaßt, so daß die Kapazität der Rückresorption von Elektrolyten und Wasser in den Tubuli nicht überschritten wird. Entscheidend für diesen Rückkopplungsmechanismus ist der juxtaglomeruläre Apparat, welcher sich aus Vas afferens, Vas efferens, Macula-densa-Zellen und dem zum Glomerulum rückführenden Teil des distalen Schenkels der Henle'schen Schleife zusammensetzt.

Die Macula-densa-Zellen erfassen über den in diesem Bereich vorliegenden, eigenständigen  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Carrier die momentane Zusammensetzung der Tubulusflüssigkeit. Hieraufhin kann eine Verminderung oder Steigerung der GFR folgen, die unter anderem lokal über Adenosin- und Reninfreisetzung gesteuert wird [6].

Die meisten Diuretika (u.a. Thiazide) führen zu einem Anstieg der  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen an der Macula densa, was die Aktivierung des tubuloglomerulären Feedbacks und somit eine Abnahme der GFR zur Folge hat. Dies führt insbesondere zu einer Limitierung der diuretischen Antwort des Diuretikums.

Schleifendiuretika zeigen hier ein abweichendes Verhalten zu den anderen Diuretika. Ihrem Wirkmechanismus entsprechend blockieren sie nicht nur die  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporter an der luminalen Seite des distalen Teils der Henle'schen Schleife, sondern auch jene der Macula-densa-Zellen [7].

Die starke diuretische Wirkung von Schleifendiuretika ist zurückzuführen auf diese Hemmung der tubulo-glomerulären Rückkopplung, da hierbei durch Aufrechterhaltung des Glomerulumfiltrates die diuretische Wirkung nicht abgeschwächt wird. Die glomeruläre Filtrationsrate wird demnach unvermindert beibehalten; dies führt zu einem Vorteil bei der Diuretika-behandlung von Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion.

### 2.1.1.2 Furosemid

Furosemid wurde 1959 von der Firma Hoechst als diuretisch wirksame Substanz entdeckt und kam 1964 unter der Bezeichnung Lasix<sup>®</sup> auf den Markt. Das hochwirksame Schleifendiuretikum mit seinem schnellen Wirkungseintritt hat sich seine Aktualität bis heute als Standarddiuretikum in der Therapie bewahrt.

Durch die Hemmung des  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransportsystems im aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife kommt es unter Furosemidgabe zu einer Steigerung der renalen Natriumausscheidung von bis zu 35% der glomerulär filtrierte Menge [8].

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird durch die Gabe von Furosemid nicht beeinflusst. Der tubulo-glomeruläre Rückkopplungsmechanismus, ausgelöst durch Informationsvermittlung an der Macula densa (Teil des juxtaglomerulären Apparates), wird durch Furosemid blockiert.

Des Weiteren vermag Furosemid die Prostaglandinsynthese zu stimulieren ( $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ), was in Folge einer afferenten Vasodilatation zu einer Zunahme des renalen Blutflusses führt. Durch die angeregte Prostaglandinsynthese scheint Furosemid außerdem bei Herzinsuffizienz akut zu einer Senkung der Vorlast des Herzens durch Erweiterung der venösen Kapazitätsgefäße zu führen [8].

Durch eine gesteigerte  $\text{NaCl}$ -Ausscheidung, eine reduzierte Reagibilität der glatten Gefäßmuskulatur auf vasokonstriktische Reize, sowie

infolge einer Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens trägt Furosemid zur Senkung des Blutdrucks bei.

Anwendungsgebiete für Furosemid sind daher die Akut- und Dauertherapie von Ödemen als Folge von Erkrankungen des Herzens und der Niere, von arterieller Hypertonie und der Einsatz zur forcierten Diurese bei Intoxikation.

### **2.1.1.3 Bumetanid**

Bumetanid ist eine stark natriuretisch und diuretisch wirksame Substanz, die in den 70er Jahren nach Etacrynsäure und Furosemid auf den Markt gebracht wurde und mit das stärkste verfügbare Schleifendiuretikum darstellt.

Ebenfalls zu der Gruppe der Schleifendiuretika gehörend, teilt Bumetanid gleichermaßen den Mechanismus der Blockade des  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporters am dicken aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife und führt zu einer bis maximal 35% erhöhten fraktionellen Natriumauscheidung.

Nach Applikation von Bumetanid bleibt die GFR auch bei Patienten mit Niereninsuffizienz unbeeinflusst [9].

Weitere Auswirkungen auf die Nierenfunktion sind ein verbesserter renaler Blutfluß und ein erhöhtes Nierenvolumen. Diese Vorgänge sowie eine Senkung der Vorlast des Herzens durch Erweiterung der Kapazitätsgefäße gehen der Diurese voraus und werden wahrscheinlich durch die lokale Wirkung von Prostaglandinen vermittelt (Bumetanid-aktivierte Stimulierung der Prostaglandinsynthese [10], [11]).

Die antihypertensive Wirkung von Bumetanid wird durch die initiale Verminderung des Extrazellulärvolumens sowie Verringerung des peripheren Widerstandes, die spätere Senkung der Natriumkonzentration

in den Gefäßwänden und die dadurch herabgesetzte Ansprechbarkeit (→Vasokonstriktion) gegenüber Noradrenalin erklärt.

Aus den beschriebenen pharmakodynamischen Eigenschaften ergeben sich die therapeutischen Einsatzgebiete von Bumetanid für die Behandlung von kardialen sowie nephrogenen Ödemen.

### 2.1.2 Indapamid

Indapamid zählt formal zu den Diuretika und wird der Gruppe der Benzothiadiazine (Thiazide) zugeordnet.

Indapamid, das strukturell ein Indolinderivat des Chlorsulfonamids ist, unterscheidet sich jedoch in zwei Aspekten von den typischen Arzneistoffen der Benzothiadiazidgruppe. Zum einen ist sein Indolinring im Vergleich 5 bis 80mal stärker lipophil und zum anderen hat es nur eine Sulfonamid-Gruppe und kein sogenanntes „Thiazid-Ringsystem“. Indapamid weist eine dosisabhängige Wirkung auf den proximalen Teil des distalen Tubulus auf, die sich jedoch bei einer therapeutischen Normdosis von 2,5 mg (Natrlix® I.R. – immediate release) beziehungsweise 1,5 mg (Natrlix® S.R. – sustained release) am Tag kaum auswirkt [12] – [15].

Im Unterschied zu den übrigen Thiazid-Diuretika, die eine Abnahme des Plasmavolumens, der glomerulären Filtrationsrate und eine Änderung des Plasmaflusses bewirken, zeigt sich Indapamid als eine Substanz mit geringer Einflußnahme auf diese Parameter [16], [17]. Indapamid zeigt weder Einfluß auf die Harnsäurespiegel, noch eine Beeinflussung der Glucosetoleranz [18], [19]. Im Gegensatz zu anderen Diuretika, insbesondere der Thiazide, zeigt Indapamid keine unerwünschten Wirkungen auf das Lipid-Lipoprotein-Profil [20].

Es ist die ausgeprägte Lipophilie des Arzneistoffes, die andere spezifische Eigenschaften mit sich bringt, und welche Indapamid in der therapeutischen Anwendung als Antihypertensivum von den anderen klassischen Diuretika unterscheidet.

Der stark lipophile Charakter des Indolinringes führt zu einem vereinfachten, erleichterten Eindringen des Arzneistoffes in die Gefäßwand, wo es zu einer Normalisierung der Gefäßempfindlichkeit bei Patienten mit arterieller Hypertonie kommt. Die gesteigerte Empfindlichkeit der Gefäße auf vasopressorische Substanzen wie Angiotensin II und Noradrenalin wird normalisiert und Indapamid erzielt eine Vasorelaxation [21]. Weitere Untersuchungen zeigen eine inhibitorische Wirkung von Indapamid auf die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur. Indapamid bewirkt hierbei eine Regulierung des Calcium-Einstromes in die Muskelzelle und führt zu einer Blockade der Calcium-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Reticulum [22], [23].

Es konnte ferner gezeigt werden, daß Indapamid in hoher Dosierung die Synthese des vasodilatativ wirksamen Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in der Niere steigert [24]. Es scheint, daß diese Wirkung des Indapamids zu intrarenalen hämodynamischen Veränderungen führt und dadurch zur antihypertensiven Wirkung beiträgt.

Nicht zuletzt wegen dieses erweiterten pharmakodynamischen Wirkungsspektrums und seines geringen Nebenwirkungsprofils wird Indapamid in niedriger Dosierung therapeutisch in erster Linie als Antihypertensivum mit gefäßaktiver Wirkung eingesetzt und weniger als Diuretikum mit dem Ziel einer gesteigerten Diurese.

## 2.2 Diuretikaresistenz

Beim therapeutischen Einsatz der Diuretika zur Regulierung des Flüssigkeitshaushaltes im Körper (Homöostase), kann das Problem der Diuretikaresistenz die natriuretische Wirkung des eingesetzten Diuretikums stark vermindern. Der therapeutische Erfolg der Behandlung mit dieser Arzneistoffklasse wird hierdurch erheblich eingeschränkt.

Unter Diuretikaresistenz versteht man einen fortschreitenden Wirkungsverlust einer festen, definierten Dosis eines Diuretikums, der durch Steigerung der Wirkstoffmenge nicht überwunden werden kann [25]. Bleibt nun trotz unveränderter Einnahme des Medikaments die Wirkung aus, so zeigt sich hier das klinische Bild der Diuretikaresistenz.

Dies äußert sich bei chronischer Gabe durch eine zunehmend verminderte renale Ausscheidung von Elektrolyt- und Flüssigkeitsmengen.

Pharmakologisch führt die Diuretikaresistenz zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve (Sensitivitätsminderung) sowie zu einer Herabsetzung der maximal erreichbaren Wirkung („Wirkungsplateau“, intrinsische Aktivität) wie in Abb. 2-3 dargestellt.

Abhängig vom zugrundeliegenden Krankheitsbild gibt es verschiedene Ursachen die zu einer Diuretikaresistenz führen können. Hierbei können sowohl pharmakokinetische, als auch pharmakodynamische Faktoren sowie deren Kombination eine Rolle spielen [26].

Betrachtet man die pharmakokinetischen Ursachen, so kann neben einer ungenügenden Resorption, erhöhtem Verteilungsvolumen und Proteinbindung [27], vor allem eine mangelnde, beziehungsweise nicht ausreichende Sekretion des Diuretikums in das Tubulolumen eine entscheidende Rolle für das Auftreten einer Diuretikaresistenz darstellen. Die aktive Wirksubstanz erreicht dann nur verzögert und in unzureichendem Ausmaß ihren Wirkort [25].

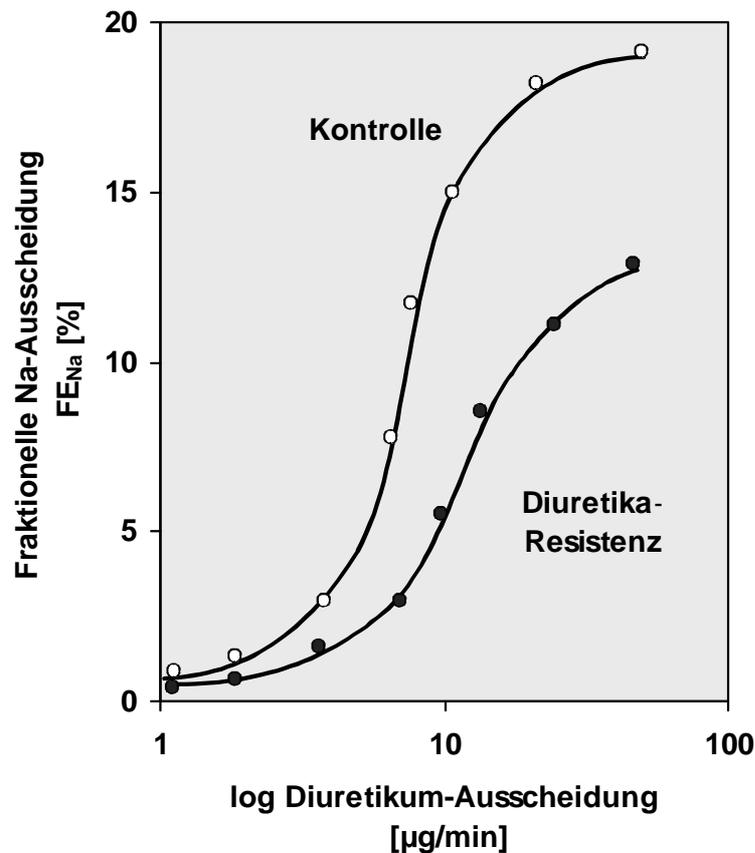


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung modifiziert nach Brater et al., 1987. Verhältnis der Wirkung ( $FE_{Na}$ ) zur Dosis ( $\log E_{Diu}$ ) bei Diuretikaresistenz („Rechtsverschiebung“ und „Plateauabsenkung“) und unter Kontrollbedingungen.

Im Unterschied dazu wird das Diuretikum bei der pharmakodynamischen Diuretikaresistenz in ausreichender Menge an seinen Wirkort auf der luminalen Seite des Tubulus sezerniert, kann aber dort seine diuretische Wirkung nicht voll entfalten. Grund hierfür kann zum einen eine unzureichende Menge an vorhandenem Filtrat sein, wie es bei einer Exsikkose der Fall ist. Zum anderen kann ein zu geringes Vorliegen an Natrium (Hyponatriämie) im Tubuluslumen die natriuretische Wirkung in entsprechendem Maße reduzieren [26].

Zusätzlich können Adaptationsvorgänge innerhalb der Niere, wie die hormonelle Gegenregulation über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) [28] oder eine Hypertrophie im distalen Tubulus [29] mit kompensatorisch vermehrter Reabsorption von Flüssigkeit und Soluta, zu einer scheinbaren Diuretikaresistenz führen [30].

Je nach zugrundeliegender Ursache gibt es verschiedene therapeutische Ansätze.

Eine primär pharmakokinetisch bedingte Diuretikaresistenz findet sich zum Beispiel bei chronischer Niereninsuffizienz. Hierbei kommt es zu einem Untergang von Nephren in der Niere, wobei die Zahl funktionstüchtiger Nephren reduziert wird und dadurch auch die tubuläre Sekretionskapazität in entsprechendem Maße eingeschränkt wird. Die gesamt-diuretische Leistung hängt somit von der Zahl der noch verbleibenden funktionstüchtigen Nephren ab [31], [32]. Um weiterhin eine ausreichende und effiziente Diurese zu erhalten, muß die Dosis des Diuretikums zunehmend gesteigert werden, damit auch bei vorliegender eingeschränkter tubulärer Sekretionskapazität eine ausreichende Konzentration an Arzneistoff an der luminalen Membran der Tubuluszellen vorliegt.

Im Gegensatz dazu findet man eine primär pharmakodynamische Diuretikaresistenz unter anderem bei der chronischen Herzinsuffizienz.

Aufgrund des stark verminderten Herzminutenvolumens kommt es zu einer Mangelperfusion der Niere mit entsprechend erniedrigtem Glomerulumfiltrat. Die Niere retiniert bereits alles verfügbare Natrium im Bereich des proximalen Tubulus, so daß im nachfolgenden Teil der Henle'schen Schleife dem Wirkort der Schleifendiuretika nur ein unzureichendes Natriumangebot zur Verfügung steht. Ein ausreichendes Natriumangebot ist jedoch maßgebend für den Wirkmechanismus der Schleifendiuretika und eine effiziente natriuretische Wirkung. Zur Erzielung einer verbesserten Wirksamkeit der Diuretika, muß hier nun zunächst die Nierendurchblutung verbessert werden. Des weiteren kann durch Gabe

von Acetazolamid oder auch indirekt über ACE-Hemmer die Hemmung der proximalen Natriumreabsorption herbeigeführt werden, so daß im darauffolgenden aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife die Natriumkonzentration im Tubuluslumen wieder erhöht ist. In beiden Fällen kann es, über einen weiten Bereich der Nierenfunktionseinschränkung, zudem sinnvoll sein, ein niedrigdosiertes, distal angreifendes Thiazid-Diuretikum mit einem Schleifendiuretikum zu kombinieren. Solch eine verabreichte Diuretika-Kombination führt zu einer „sequentiellen Nephronblockade“ und als Folge zu einer Erhöhung der gesamt-natriuretischen Wirkung [33]. Jedoch führen Thiazid-Diuretika über eine Aktivierung der tubulo-glomerulären Rückkopplung häufig zu einer weiteren Abnahme der glomerulären Filtrationsrate, welche dosisabhängig, auch in Kombination mit Schleifendiuretika, die natriuretische Wirksamkeit einschränken kann.

## **2.3 Klinische Studien und Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollen, anhand zweier klinischer Studien mit speziell ausgerichtetem Studiendesign auf die betreffenden Formen der Diuretikaresistenz (pharmakokinetisch/pharmakodynamisch), neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der Diuretikaresistenz erstellt und geprüft werden.

### **2.3.1 Studie I**

Die erste Studie befaßt sich mit der pharmakokinetischen Diuretikaresistenz, deren Ursache eine verminderte Diuretikazufuhr an den Wirkort ist und die somit eine unzureichende diuretische Wirkung zur Folge hat.

Für die Durchführung der klinischen Studie wurden Furosemid und Bumetanid als die auf ihre pharmakologische Wirkung zu prüfenden Arzneistoffe aus der Gruppe der Schleifendiuretika eingesetzt.

Alle Schleifendiuretika teilen den gleichen Wirkmechanismus, indem sie den  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporter am dicken aufsteigendem Teil der Henle'schen Schleife blockieren. In ihrer maximal erreichbaren Wirkung unterscheiden sich Schleifendiuretika nicht; dennoch müssen für eine vergleichbare natriuretische Antwort unterschiedliche Substanzmengen an Schleifendiuretikum in das Tubuluslumen sezerniert werden.

Aus bisherigen Studien wurde bekannt, daß für eine gleichwertige diuretische Antwort die zu verabreichende Arzneistoffmenge von Bumetanid nur  $\frac{1}{40}$  der Dosis von Furosemid entspricht (s. Kap. 2.1.1) [4], [5]. Dieses unterschiedliche Substanz-Mengen-Verhältnis könnte bei einer vorliegenden eingeschränkten tubulären Sekretionskapazität eine entscheidende Rolle für den Transport des Schleifendiuretikums durch den organischen Anionentransporter in das Tubuluslumen spielen.

In der vorliegenden klinischen Prüfung soll nun die Bedeutung der tubulären Sekretionskapazität für Wirkprofil und -dauer zweier unterschiedlicher Schleifendiuretika charakterisiert werden. Hierbei soll insbesondere geklärt werden, ob bei eingeschränkter tubulärer Transportkapazität eventuelle substanzspezifische Unterschiede beziehungsweise Vorteile bestehen, zwischen Schleifendiuretika, die bereits mit einer geringen Wirkstoffmenge eine hohe diuretische Wirkung erreichen (Bumetanid) und solchen, die hierfür eine höhere Wirkstoffmenge benötigen (Furosemid).

Um den Zusammenhang zwischen tubulärer Transportrate (und somit transportierter Menge an Wirksubstanz) und diuretischer Wirkung unabhängig von Veränderungen anderer Einflußgrößen (glomeruläre Filtrationsrate, Eiweißbindung, Verteilungsvolumen u.a.) näher zu beschreiben, soll bei gesunden Probanden der Einfluß einer vorübergehenden, medikamentösen Sekretionshemmung durch Probenecid auf

Wirkprofil und Ausscheidung von Bumetanid und Furosemid untersucht werden. Probenecid erweist sich hier als geeigneter Arzneistoff, da er wie die Diuretika den selben organischen Anionentransporter an der basolateralen Seite des Tubulus verwendet und somit als kompetitiver Antagonist um diesen Transportweg in das Tubuluslumen konkurriert.

Will man eine Aussage über die am Wirkort vorliegenden Mengenverhältnisse der Diuretika treffen, so ist es von entscheidender Bedeutung die genauen Konzentrationen des betreffenden Arzneistoffes in Plasma und Urin quantitativ zu ermitteln. Die quantitative Analyse zur Bestimmung der bei dieser Studie eingesetzten Schleifendiuretika, Furosemid und Bumetanid, erfolgt mittels der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). Hierzu sollen aus der Literatur entnommene HPLC-Methoden als Grundlage für die Erarbeitung neuer modifizierter und optimierter Analyseverfahren dienen.

Die Ergebnisse dieser Studie sollen zu einem besseren Verständnis für den Ausscheidungsmechanismus der genannten Arzneistoffe bei normaler und eingeschränkter Nierenfunktion beitragen, potentielle substanzspezifische Vorteile aufzeigen und somit die Entwicklung verbesserter Behandlungskonzepte bei der pharmakokinetischen Diuretikaresistenz ermöglichen.

### **2.3.2 Studie II**

In einer zweiten klinischen Studie soll auf das Problem der pharmakodynamischen Diuretikaresistenz näher eingegangen werden, wie es bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz häufig beobachtet wird [34]. Hier können die eingesetzten Diuretika trotz unveränderter Sekretion ihre intrinsische Aktivität am Wirkort nicht entfalten. Dies ist, wie oben angeführt, durch eine glomeruläre Hypoperfusion und -filtration sowie eine

verstärkt proximal-tubuläre Reabsorption von Natrium bedingt (s. Kap. 2.2).

Ziel der vorliegenden Studie ist es zu prüfen, ob durch die Gabe von Indapamid als Vasodilatator (in einer primär vasodilatativen Dosis: 1,5 mg/die) die renale Hämodynamik sowie die natriuretische Antwort auf Furosemid günstig beeinflusst werden kann. Furosemid soll hierbei als Standardtherapeutikum zur Herbeiführung der Diurese eingesetzt werden. Es soll insbesondere untersucht werden, inwiefern Indapamid, zu einer Verbesserung der renalen Hämodynamik und einem vermehrten Angebot von Natrium in der Henle'schen Schleife führt.

Zu diesem Zweck wurden bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Stadium NYHA II-III Nierenfunktion und natriuretische Wirkung eines Furosemid-Bolus nach einer 10-tägigen Vorbehandlung mit Indapamid oder Placebo verglichen.

Für die pharmakokinetische und pharmakodynamische Auswertung, müssen die Konzentrationen der beiden verwendeten Arzneistoffe in der biologischen Matrix quantitativ bestimmt werden. Die Bestimmung von Furosemid aus Plasma- und Urinproben soll anhand einer auch für die Studie I benötigten HPLC-Analysemethode erfolgen (s. Kap. 2.3.1).

Die quantitative Analyse von Indapamid soll mit Hilfe eines nach Literaturangaben ausgerichteten und modifizierten HPLC-Trennverfahrens durchgeführt werden.

Die Auswertung der Studie soll Aufklärung über die pharmakologische Wirkung bzw. mögliche additiv-synergistische Effekte zweier verabreichter Medikamente bei der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz bringen. Ziel dieser Studie ist es durch hierbei gewonnene Erkenntnisse neue therapeutische Ansätze bei der Behandlung der pharmakodynamischen Diuretikaresistenz zu konzipieren.



## **3 Methodik**

### **A Klinisch**

#### **3.1 Studie I**

Die erste klinische Studie wurde als prospektiver, intraindividueller, randomisierter Vergleich nach einem zweifach Cross-over-Protokoll konzipiert. Es wurden 12 gesunde Probanden beiderlei Geschlechts eingeschlossen, die folgenden Ein- und Ausschlusskriterien entsprechen mußten. Das Alter sollte zwischen 18 und 45 Jahren liegen, und die Probanden sollten eine normale Nierenfunktion mit einem Serumkreatinin  $< 1,3$  mg/dl vorweisen. Dazu sollte am Untersuchungstag ein ausgeglichener Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt vorliegen, definiert als: ein Urinvolumen von jeweils mindestens 1000 ml/24h in zwei vorausgegangenen 24-h-Sammelurinen, einer Natriumausscheidung zwischen 100 – 220 mval/24h und einer Kaliumausscheidung zwischen 30 – 70 mval/24h.

Als Ausschlusskriterien galten klinische relevante renale oder extrarenale Erkrankungen, Kontraindikationen oder Überempfindlichkeit gegen die Prüfmedikamente, Schwangerschaft und Stillzeit, Drogen-, Medikamenten- oder Alkoholabusus, mangelnde Compliance sowie die Teilnahme an einer anderen Studie innerhalb der letzten drei Monate.

Alle Probanden wurden ausführlich über Ablauf und Ziele der Studie sowie mögliche Nebenwirkungen informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen gebilligt.

### 3.1.1 Studiendesign/-ablauf

Die Probanden wurden an zwei Untersuchungstagen im Abstand von mindestens acht Tagen in die Medizinische Klinik Tübingen einbestellt. Nach einer flüssigkeitsbilanzierten Run-in-Phase von vier Tagen Dauer erfolgte am fünften Tag die Randomisierung zu einer der beiden Behandlungssequenzen (Abb. 3-1) und die erste Clearanceuntersuchung.

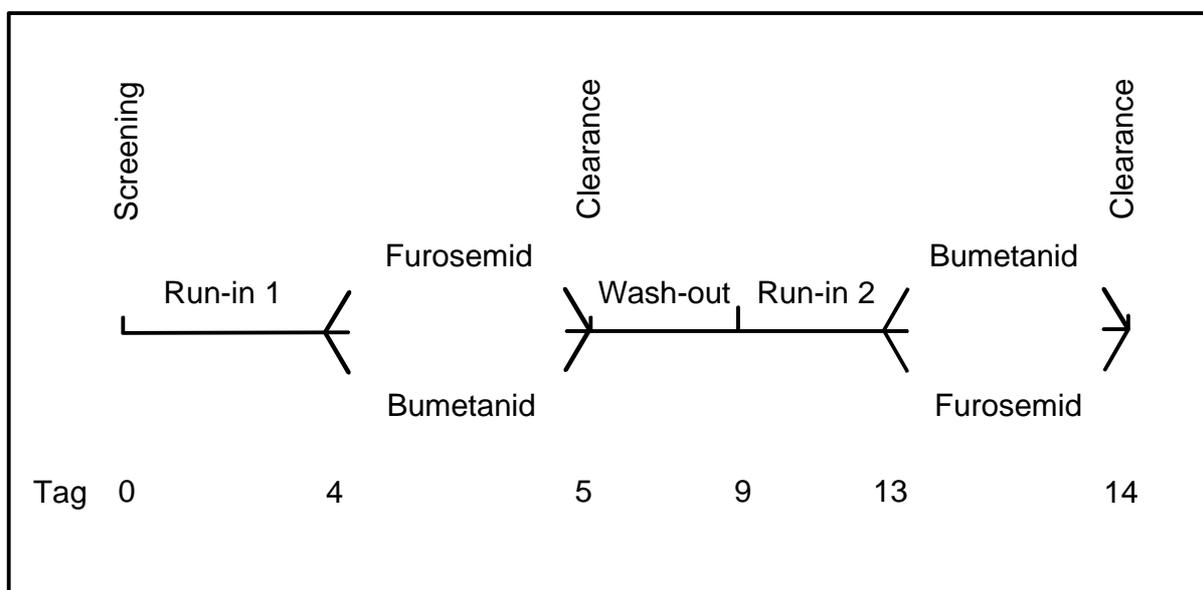


Abb. 3-1: Schematische Darstellung des Studienablaufs – Studie I

Nach einer mindestens viertägigen Wash-out-Phase folgten erneut vier Tage einer flüssigkeitsbilanzierten Run-in-Phase sowie an Tag 14 die zweite Clearanceuntersuchung.

## 3.1.2 Studienmedikation

Es wurden folgende Medikamente eingesetzt:

- Lasix<sup>®</sup> 20 mg Ampullen (Furosemid)
- Burinex<sup>®</sup> 1 mg Ampullen (Bumetanid)

sowie als Diagnostikum:

- Probenecid-Weimer<sup>®</sup> 1 g Tabletten (Probenecid)

### 3.1.2.1 Furosemid

Furosemid gehört zu den stark wirksamen High-ceiling-Schleifendiuretika (s. Kap. 2.1.1.2). Chemisch stellt Furosemid eine Benzosulfonamido-carbonsäure mit einer Furylmethylamino-Gruppe in Position 2 und einem Chlorid-Substituenten in Position 4 dar (Abb. 3-2).

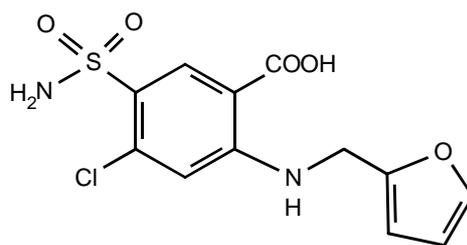


Abb. 3-2: Furosemid

Seine diuretische Wirkung erzielt Furosemid durch die Hemmung der Natriumreabsorption im distalen Teil der Henle'schen Schleife. Aufgrund

des vermehrten Natriumangebotes erfolgt im spät-distalen Tubulus ein verstärkter Natrium-Kalium-Austausch, wodurch es zu erhöhten Kaliumverlusten kommt.

Bei einer intravenösen Gabe setzt die diuretische Wirkung innerhalb weniger Minuten ein und hält etwa 2 Stunden an; bei oraler Gabe wird das Wirkungsmaximum nach 20 – 30 Minuten erreicht und die Wirkung ist nach 4 – 6 Stunden abgeschlossen [8]. Die Halbwertszeit nach i.v.-Applikation beträgt etwa 50 – 70 Minuten.

Für Furosemid wurde eine hohe Plasmaeiweißbindung von bis zu 96% gefunden. Es wird rasch aus dem Gastrointestinal-Trakt resorbiert und weist eine Bioverfügbarkeit von 50 – 65% auf. Eine Nahrungsaufnahme verzögert die Resorption [35].

Furosemid wird vorwiegend renal ausgeschieden und nur etwa 20 – 30% werden biotransformiert, wobei keine leberabhängige Oxidation, sondern lediglich eine Glukuronidierung als Phase-II-Reaktion stattfindet [36]. 50 – 60% einer i.v. applizierten Dosis werden unverändert renal eliminiert; nur etwa 10% der Arzneistoffgabe werden biliär sezerniert.

### 3.1.2.2 Bumetanid

Bumetanid stellt einen weiteren Vertreter der Gruppe der Schleifendiuretika dar (s. Kap. 2.1.1.3). Bumetanid ist ein 4fach substituiertes Derivat der Sulfamoyl-Benzoesäure und ähnelt in seiner chemischen Struktur den anderen Diuretika dieses Typs (Abb. 3-3).

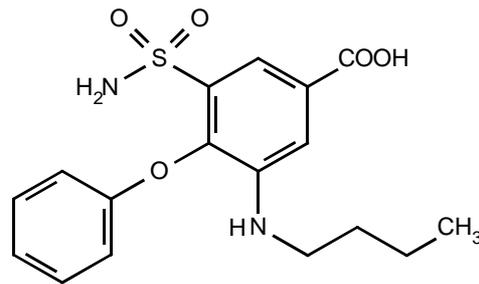


Abb. 3-3: Bumetanid

Nach proximaler Sekretion in den Tubulus und Angriffsort am Kotransporter-System im aufsteigenden Teil der Henle'schen Schleife hat Bumetanid eine gesteigerte Natriumausscheidung zur Folge. Es kann hierbei (s.o. Furosemid) zu einem Kaliummangel bedingt durch kompensatorische Ausscheidung von Kalium im distalen Tubulus kommen.

Bumetanid läßt innerhalb von 30 Minuten nach oraler Gabe den Beginn der Diurese erkennen, welche ihr Maximum nach 60 bis 180 Minuten erreicht und eine Gesamtdauer von 4 – 6 Stunden aufweist. Nach intravenöser Gabe kommt es innerhalb von 10 Minuten zu einer diuretischen Wirkung mit einem Höhepunkt nach 15 – 45 Minuten. Die Halbwertszeit von Bumetanid liegt je nach verabreichter Dosis zwischen 50 – 120 Minuten [37].

Die Bumetanidreabsorption nach oraler Einnahme erfolgt rasch und fast vollständig mit einer Bioverfügbarkeit von 80 – 95%, des weiteren weist Bumetanid eine Plasmaeiweißbindung von 93 – 95% auf [38] – [40].

Die Biotransformation von Bumetanid erfolgt vor allem in der Seitenkette. Sämtliche Metabolite sind unwirksam. Beim Menschen werden rund 40% der verabfolgten Substanz metabolisch inaktiviert [41].

Für die renale Ausscheidung wurde ein Wert von bis zu 80% (48h) der verabreichten Dosis gefunden, wovon die Hälfte unverändertes Bumetanid darstellt. Weitere 10 – 20% unterliegen der biliären Ausscheidung [42].

### 3.1.2.3 Probenecid

Probenecid wird therapeutisch bei der Intervallbehandlung der Gicht eingesetzt. Es zählt zu der Arzneistoffgruppe der Urikosurika und gilt als Hemmstoff für die tubuläre Reabsorption der Harnsäure.

Die chemische Struktur von Probenecid weist ein N,N-disubstituiertes Sulfonamid mit einer freien Carboxy-Gruppe in *p*-Stellung auf. Der Stickstoff ist hierbei mit zwei Propyl-Resten substituiert (Abb. 3-4).

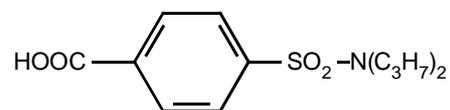


Abb. 3-4: Probenecid

Probenecid wird bei oraler Einnahme relativ rasch aus dem Gastrointestinal-Trakt resorbiert und erreicht seine maximalen Plasmaspiegel nach 2 – 3 Stunden. Im Plasma liegt Probenecid zu 83 – 94% an Proteine gebunden vor. Halbwertszeit und Wirkdauer betragen etwa 4 – 12 Stunden. 80% der Dosis werden renal ausgeschieden – davon aber nur 5 – 11% in nichtmetabolisierter Form [43], [44].

Probenecid wird glomerulär filtriert und im proximalen Tubulus über einen organischen Anionentransporter (OAT) aktiv sezerniert. Dies ist unabdingbar für das Vorliegen des Pharmakons in ausreichender Menge im Tubuluslumen und somit für die therapeutische Wirkung als Urikosurikum.

Durch diese Pharmakokinetik ergeben sich jedoch auch Interaktionen mit anderen Arzneistoffen. Durch Hemmung der tubulären Sekretion verzögert Probenecid die Ausscheidung einer Reihe anderer Pharmaka, insbesondere derjenigen, die als organische Säuren ebenfalls den gleichen Anionentransporter zur Sezernierung in den Tubulus verwenden [45].

Probenecid wirkt hier als „kompetitiver Antagonist“ am organischen Anionentransporter und bewirkt somit eine konzentrationsabhängige Hemmung der renalen Ausscheidung sowohl endogener als auch exogener Substanzen.

Diese pharmakokinetische Besonderheit führt überdies zu einer weiteren Indikation, nämlich der Gabe von Probenecid in Kombination mit speziellen *b*-Lactamantibiotika zur Verzögerung ihrer renalen Ausscheidung.

Im Hinblick auf die Hemmung der renalen Sekretion anderer Arzneisubstanzen wurde Probenecid bei der Studie I als Diagnostikum eingesetzt. Probenecid induzierte hierbei eine künstlich und reversibel herbeigeführte, fortschreitende Sekretionsinsuffizienz in der Niere.

### 3.1.3 Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen

Im Rahmen einer Eingangsuntersuchung wurden zunächst die Ein- und Ausschlußkriterien überprüft. Das Vorhandensein einer ausgeglichenen Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz wurde an den letzten zwei Tagen der Run-in-Phase durch Messung der ausgeschiedenen Menge an Elektrolyten in je einem 24-h-Sammelurin verifiziert.

Bei Erfüllung aller Einschlusskriterien, wurde dem Probanden randomisiert eine Behandlungssequenz zugeordnet und mit der ersten Clearanceuntersuchung begonnen. Die Behandlungssequenzen Bumetanid → Furosemid bzw. Furosemid → Bumetanid wurden durch Losentscheid ermittelt und von jeweils der gleichen Anzahl Probanden durchlaufen.

An den zwei Untersuchungstagen wurde am nüchternen Probanden je eine Clearanceuntersuchung zur Bestimmung der Nierenfunktion durchgeführt. Über einen venösen Zugang (Verweilkanüle) wurde eine Markersubstanz (Inulin) zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

infundiert. Hierzu wurde dessen Konzentrationsverhältnis in regelmäßigen Abständen (30 min) in Blut- und Urinproben bestimmt.

Über diesen Zugang wurde zudem über einen Perfusor ein Bolus sowie eine Erhaltungsinfusion der beiden Studienmedikamente gegeben. Hierbei waren folgende Dosen vorgesehen: Bumetanid: 3,0 µg/kg KG Bolus und 2,6 µg/kg/h, Furosemid 115 µg/kg KG Bolus und 86 µg/kg/h. Diese Dosen hatten sich bereits in unterschiedlichen klinischen Prüfungen als äquipotent und gut tolerabel erwiesen.

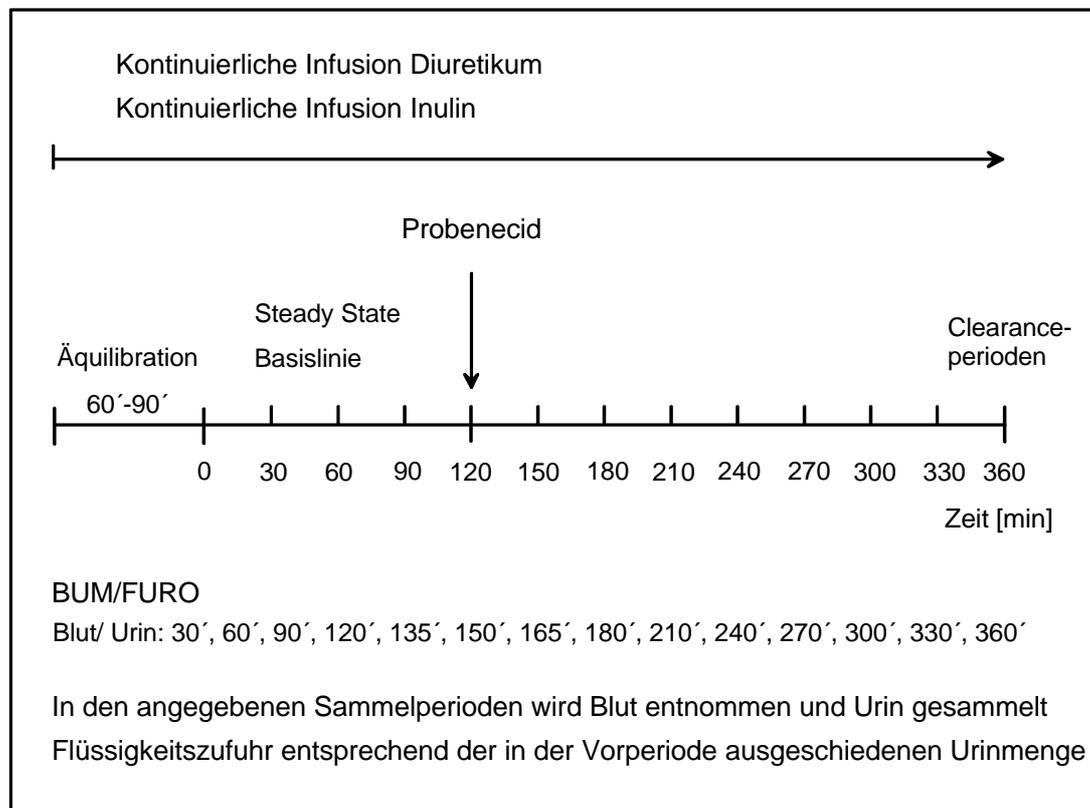


Abb. 3-5: Zeitlicher Ablauf der Clearanceuntersuchungen – Studie I

Nach einer Äquilibrationsphase von 60 – 90 Minuten folgten vier Sammelperioden von je 30 Minuten Dauer, in denen Ausscheidung und diuretische Wirkung der Studienmedikamente unter Ausgangsbedingungen untersucht wurden. Im Anschluß an die vierte Sammelperiode

erhielten alle Probanden Probenecid (2g p.o.), danach folgten acht weitere Sammelperioden gleicher Dauer (Abb. 3-5).

Am Ende einer jeden Sammelperiode wurde eine Urinprobe durch spontanes Wasserlassen gewonnen; zur Mitte der Sammelperioden wurde eine Blutprobe aus einer Verweilkanüle entnommen. Während der Clearanceuntersuchung erfolgte konstant eine intravenöse Volumensubstitution mit physiologischer Kochsalzlösung. Zusätzlich erhielten die Probanden Mineralwasser zu trinken, so daß jeweils die in der Vorperiode ausgeschiedene Flüssigkeitsmenge (mindestens jedoch 250 ml) zugeführt wurde und am Ende der Untersuchung eine ausgeglichene Flüssigkeitsbilanz vorlag.

### 3.1.3.1 Probenhandling

Die authentischen Proben wurden am Untersuchungstag nach einem zuvor festgelegten Abnahmeplan gewonnen (Abb. 3-5). Alle Proben wurden unmittelbar nach Abnahme aufgearbeitet.

Die Blutproben wurden in EDTA-Röhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation der Blutproben wurde das Plasma abgehoben und in Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Bei den Urinproben wurde zunächst das Urinvolumen der Sammelperiode abgelesen und sodann, ebenfalls in Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert. Für alle Proben in denen Furosemid enthalten war wurde auf sorgsame Lichtprotektion von der Proben-gewinnung bis zur späteren Analyse geachtet.

Alle Proben wurden am Tag der Analyse bei Raumtemperatur aufgetaut und anhand eines für die Methode optimierten Probenaufarbeitungsplans aufgearbeitet (s. Kap. 3.6).

### 3.1.4 Untersuchungsparameter

Folgende Parameter wurden untersucht:

#### Messung im 24-h-Sammelurin (Run-in-Phasen):

Es wurde die Konzentrationen von Natrium, Kalium und Kreatinin in zwei aufeinanderfolgenden 24-h-Sammelurinen gemessen.

#### Messungen im Rahmen der Eingangsuntersuchung und einmalig vor jeder Clearanceuntersuchung (Plasma):

Die Sicherheitslaborparameter wie Blutbild, Quick-Wert, PTT, GPT,  $\gamma$ -GT, Gesamteiweiß, Serumkreatinin, Harnsäure, Harnstoff, Natrium und Kalium wurden geprüft, sowie die Plasmareninaktivität und Plasmaspiegel von Aldosteron und ANP gemessen.

#### Messungen einmalig bei Abschluß jeder Clearanceuntersuchung (Plasma):

Nach Beendigung der Untersuchungen wurden bei den Probanden Harnsäure-, Natrium- und Kaliumwerte kontrolliert.

#### Messungen in den Clearanceproben (Plasma und Urin):

Aus den an den Untersuchungstagen erhaltenen Clearanceproben wurden die Konzentrationen von Furosemid oder Bumetanid, sowie von Natrium, Kalium und Inulin ermittelt; zudem wurde die Osmolarität sowie der pH-Wert des Urins bestimmt.

## 3.2 Studie II

### INDIURE-Studie

(INDAPAMIDE IN DIURETIC RESISTANCE)

Die zweite klinische Studie wurde als ein prospektiver, randomisierter, doppelt blinder, placebokontrollierter, intraindividueller, Cross-over-Vergleich konzipiert.

Eingeschlossen wurden 12 Patienten im Alter zwischen 18 und 65 Jahren mit dilatativer Kardiomyopathie und einer chronischen Herzinsuffizienz im Stadium NYHA II-III, (Ejektionsfraktion nach Teichholz von  $30 \pm 5\%$ ). Alle Patienten erhielten eine Standard-Basistherapie, bestehend aus einem ACE-Hemmer oder Angiotensin AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten, einem Diuretikum sowie fakultativ einem *b*-Blocker und/oder Herzglykosiden.

Als Ausschlußkriterien galten eine höher- oder geringgradigere Einschränkung der linksventrikulären Funktion ( $25\% < \text{LVF} < 35\%$ ), hämodynamisch relevante Klappenvitien, manifeste koronare Herzerkrankung, instabile Angina pectoris, hypotensive Kreislaufdysregulation mit einem Mitteldruck unter 75 mmHg sowie ein Myokardinfarkt innerhalb der letzten 6 Monate vor Einschluß in die Studie. Als weitere Ausschlußkriterien wurden definiert: Eine Einschränkung der Nierenfunktion mit einem Serumkreatinin  $> 2 \text{ mg/dl}$ , Leber- oder Stoffwechselerkrankungen, Elektrolytstörungen, Hyperurikämie, Kontraindikationen oder bekannte Überempfindlichkeit gegenüber den Prüfmedikamenten, Alkoholabusus sowie Schwangerschaft und Laktationsperiode.

Alle Patienten wurden ausführlich über Ablauf und Ziele der Studie sowie mögliche Nebenwirkungen informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen gebilligt.

### 3.2.1 Studiendesign/-ablauf

Nach einer ausführlichen Eingangsuntersuchung wurden die Patienten randomisiert nach einem Cross-over-Protokoll einer der beiden Behandlungssequenzen zugeordnet. Hierbei erhielten die Patienten im Rahmen einer Vorbehandlung jeweils über zehn Tage sowie am Studientag selbst Indapamid oder Placebo, zusätzlich zur fortgeführten Basistherapie. Die beiden Studienperioden (10-tägige Vorbehandlung Indapamid bzw. Placebo und Tag der Untersuchung) waren von einer einwöchigen Auswaschphase unterbrochen. Alle Tabletten der Studienmedikation wurden zuvor in gleichaussehenden Gelatinekapselformen verblindet. Der Studienablauf ist in Abb. 3-6 dargestellt. Am Ende der jeweiligen Behandlungsphasen wurden die renale Hämodynamik sowie die natriuretische Antwort auf Furosemid in einer Clearanceuntersuchung ermittelt.

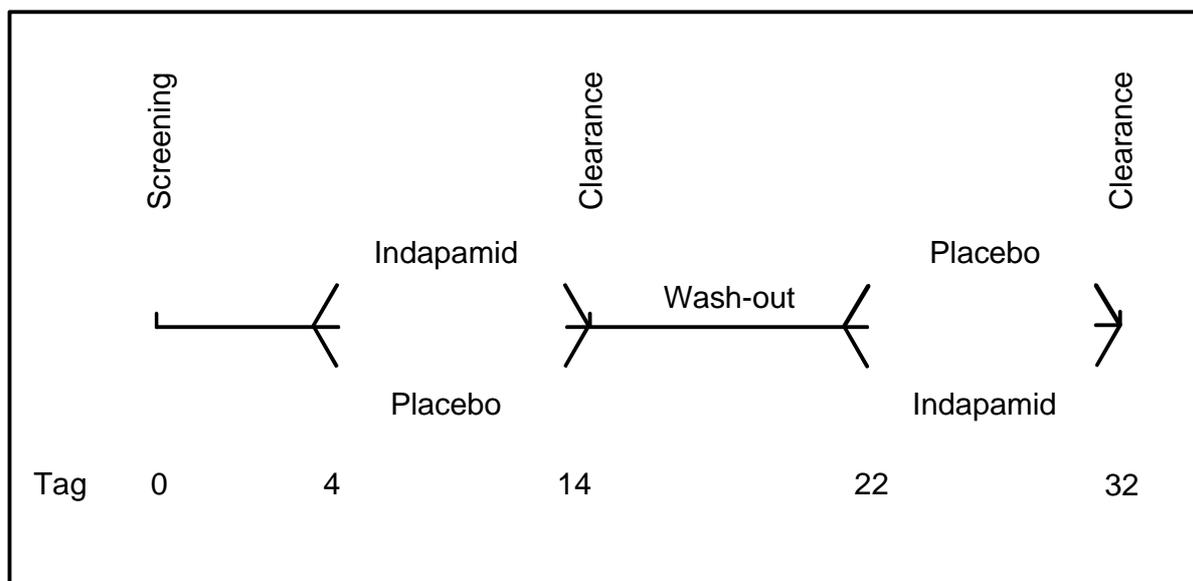


Abb. 3-6: Schematische Darstellung des Studienablaufs – Studie II

## 3.2.2 Studienmedikation

Es wurden folgende Medikamente eingesetzt:

- Lasix<sup>®</sup> 20 mg Ampullen (Furosemid)
- Natrilix<sup>®</sup> S.R. 1,5 mg Tabletten (Indapamid)
- Placebo Tabletten (Lactulose)

### 3.2.2.1 Furosemid

Siehe Studie I, Kapitel 3.1.2.1.

### 3.2.2.2 Indapamid

Indapamid aus der Gruppe der Thiazide stellt ein Benzosulfonamido-carbonsäureamid dar. Im Gegensatz zu den klassischen Thiaziden (Hydrochlorothiazid), die als Disulfonamide zwei *m*-ständige Sulfamoyl-Gruppen aufweisen, zeigt Indapamid nur eine Sulfamoyl-Gruppe. Die zweite ist durch eine substituierte Carbonyl-Gruppe ersetzt (Abb. 3-7).

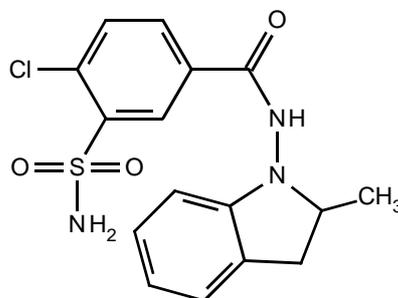


Abb. 3-7: Indapamid

Nach oraler Applikation wird Indapamid rasch und vollständig aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert, wobei die Bioverfügbarkeit 93% beträgt.

Neben einer Plasmaeiweißbindung von 79% weist Indapamid aufgrund einer ausgeprägten Kopplung an die erythrozytäre Carboanhydrase eine hohe Bindung (90%) an Erythrozyten auf [46].

Die maximale Konzentration von Indapamid ist nach oraler Gabe von 2,5 mg I.R. [47], [48] nach etwa 1 – 2 Stunden und nach Gabe von 1,5 mg S.R. [49] nach 10 – 12 Stunden erreicht. Die Eliminationshalbwertszeit liegt zwischen 14 und 24 Stunden mit einem Mittel bei 17 Stunden. Bereits nach vier beziehungsweise fünf Tagesdosen (2,5 mg I.R. [48] und 1,5 mg S.R. [50]) ist eine Steady-State-Konzentration zu verzeichnen. Die biliäre Ausscheidung liegt bei 23%, wohingegen die renale Elimination etwa 70% beträgt. Bis zu 7% des Arzneistoffes werden unverändert renal eliminiert [46]. Indapamid wird in großem Ausmaß metabolisiert, so konnten im Urin 19 unterschiedliche Metabolite festgestellt werden.

Da der Anteil des nichtmetabolisierten Arzneistoffes im Urin ausgesprochen gering ist, gilt die renale Wirkung von Indapamid durch die etwas vermehrte Natrium- und Chloridausscheidung vielmehr als unterstützende Maßnahme für die Diurese.

### **3.2.3 Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen**

An den beiden Untersuchungstagen wurden die Patienten in die Medizinische Klinik einbestellt. Das Vorhandensein einer ausgeglichenen Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz wurde anhand von Urinvolumen und Elektrolytausscheidung in 24-h-Sammelurinen der beiden vorausgegangenen Tage verifiziert. Alle Medikamente, bis auf das Diuretikum und Acetylsalicylsäure (ASS), wurden am Morgen des Unter-

suchungstages eingenommen (s. Kap. 3.10). Die Untersuchung erfolgte am nüchternen Patienten.

Alle Patienten erhielten zwei venöse Zugänge (Verweilkanülen) zur Infusion der beiden Markersubstanzen sowie kontralateral zur Blutentnahme. Nach einem Bolus zur Aufsättigung wurden Inulin und PAH kontinuierlich infundiert. Zur Ermittlung von GFR und renalem Plasmafluß wurde deren Konzentrationsverhältnis in Blut und Urin in regelmäßigen Abständen bestimmt.

Nach einer Äquilibrationsphase von 60 Minuten folgten zwei Clearanceperioden von je 30 Minuten Dauer, in denen die renale Hämodynamik unter Ausgangsbedingungen untersucht wurden. Im Anschluß erhielten alle Patienten 20 mg Furosemid i.v. als Bolus-Injektion über 20 Sekunden. Danach wurden weitere acht Clearanceperioden durchgeführt; zusätzlich wurden zu festgelegten Zeitpunkten die Konzentrationen von Furosemid in Plasma und Urin bestimmt. Der zeitliche Ablauf ist in (Abb. 3-8) dargestellt.

Während der Clearanceuntersuchung wurde pro Zeiteinheit das in der Vorperiode ausgeschiedenen Flüssigkeitsvolumen oral substituiert, so daß bis zum Ende der Untersuchung eine ausgeglichene Flüssigkeitsbilanz vorlag.

Am Tag der Clearanceuntersuchung wurde zudem ein EKG sowie eine Echokardiographie zur Bestimmung der linksventrikulären Funktion (Ejektionsfraktion nach Teichholz, Verkürzungsfraktion) durchgeführt.

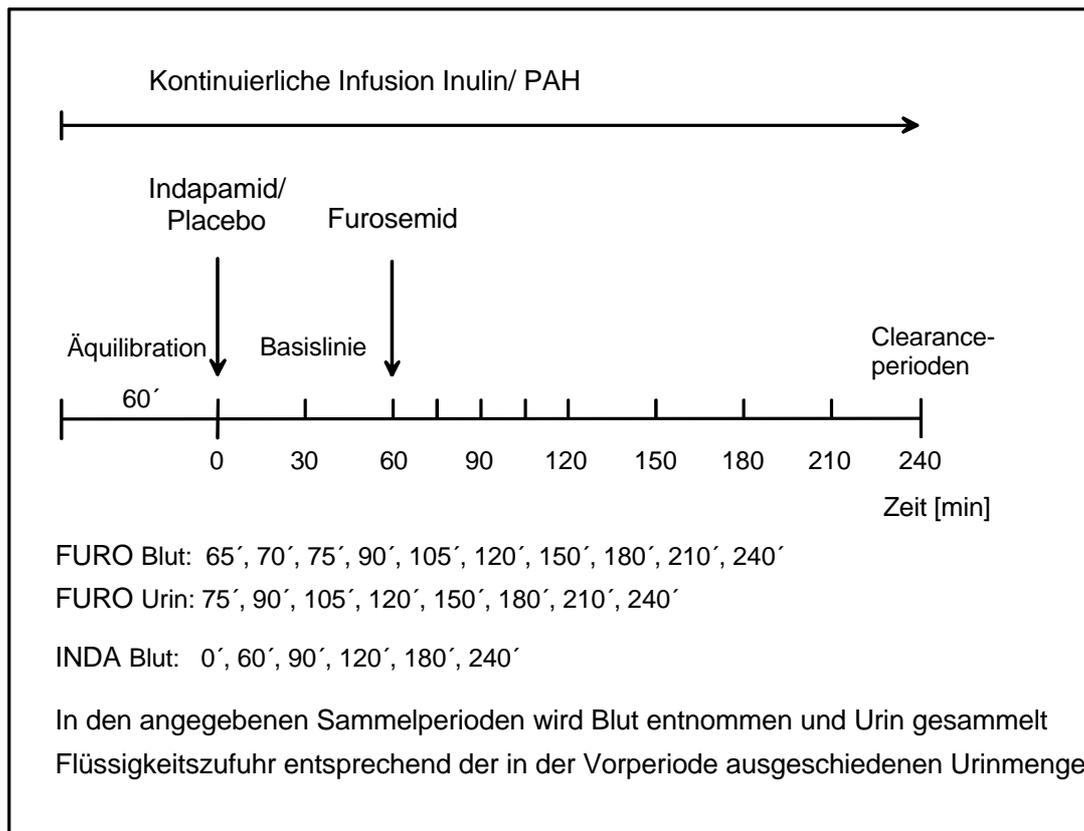


Abb. 3-8: Zeitlicher Ablauf der Clearanceuntersuchungen – Studie II

### 3.2.3.1 Probenhandling

Die Probenabnahme erfolgte am Tag der Clearanceuntersuchung anhand des oben beschriebenen zeitlichen Ablaufplans (Abb. 3-8).

Die authentischen Proben für Furosemid wurden dem selben Schema der Probenkonservierung wie in Studie I unterzogen (s. Kap. 3.1.3.1). Eine durchgehende Lichtprotektion der Furosemid enthaltenden Proben wurde gewährleistet.

Die quantitative Analyse zur Prüfung des „trough-levels“ (Talspiegel vor erneuter Arzneistoffaufnahme) und der Pharmakokinetik von Indapamid in Vollblut wurde stets am Untersuchungstag durchgeführt, um ein Einfrieren der Blutproben zu umgehen. Durch dieses Vorgehen wurde am Tag der

Untersuchung gleichzeitig eine „on-line“-Kontrolle in Hinblick auf das Erreichen des therapeutischen Wirkspiegels geschaffen. Die Blutproben zur Indapamid-Bestimmung wurden in Serum-Röhrchen abgenommen und vor der Probenaufarbeitung auf einem Rotationsrad homogen durchmischt.

### 3.2.4 Untersuchungsparameter

Folgende Parameter wurden untersucht:

#### Messung im 24-h-Sammelurin:

Es wurde die Konzentrationen von Natrium, Kalium und Kreatinin in zwei aufeinanderfolgenden 24-h-Sammelurinen gemessen.

#### Messungen im Rahmen der Eingangsuntersuchung und einmalig vor jeder Clearanceuntersuchung (Plasma):

Die Sicherheitslaborparameter wie Blutbild, Quick-Wert, PTT, GPT,  $\gamma$ -GT, Gesamteiweiß, Serumkreatinin, Harnsäure, Harnstoff, Natrium und Kalium wurden geprüft, sowie die Plasmareninaktivität und Aldosteronkonzentration im Plasma.

#### Messungen einmalig bei Abschluß jeder Clearanceuntersuchung (Plasma):

Nach Beendigung der Untersuchungen wurden bei den Patienten die Natrium- und Kaliumwerte kontrolliert.

### Messungen in den Clearanceproben (Plasma und Urin):

Aus den an den Untersuchungstagen erhaltenen Clearanceproben wurden die Konzentrationen von Furosemid oder Indapamid, sowie von Natrium, Kalium, Inulin und PAH ermittelt; zudem wurden Osmolarität sowie pH-Wert des Urins bestimmt.

### Bestimmung der linksventrikulären Funktion:

An den Untersuchungstagen wurde bei jedem Patienten eine echokardiographische Beurteilung der linksventrikulären Funktion (LV-Funktion) anhand der Bestimmung von Ejektions- und Verkürzungsfraktion durchgeführt.

## **B Analytisch**

### **3.3 Grundlagen der chromatographischen Trennung und Detektion**

#### **3.3.1 Allgemeines**

Der Begriff "Chromatographie" ist die allgemeine Bezeichnung für eine Vielzahl von physikalisch-chemischen Trennverfahren, die auf der Verteilung eines Stoffes zwischen einer mobilen und einer stationären Phase beruhen. Die Einteilung der unterschiedlichen Chromatographie-Arten richtet sich dabei nach dem jeweiligen Aggregatzustand dieser beiden Phasen.

Vor 1970 waren nur wenige chromatographische Methoden kommerzialisiert. In den 70er Jahren wurden die meisten chemischen Trennungen mit Verfahren wie Säulen-Chromatographie, Dünnschicht-Chromatographie oder Papier-Chromatographie durchgeführt. Diese Methoden waren aber nicht zur Quantifizierung bzw. zur Bestimmung ähnlicher Substanzen geeignet.

Erst Mitte der 70er Jahre wurde aus der klassischen Säulen-Chromatographie die Hochleistungs-Flüssigchromatographie HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) entwickelt, wobei das Laufmittel mit Druck auf die chromatographische Säule aufgebracht wird.

Die HPLC ist eine Methode zur Analyse löslicher fester und flüssiger Substanzgemische. Sie dient zur:

- Trennung von Substanzgemischen
- Qualitativen Analyse, d.h. Identifizierung von Einzelkomponenten
- Quantitativen Analyse, d.h. Konzentrationsbestimmung der Einzelkomponenten

Um die aus der Trennsäule eluierten Substanzen zu erkennen und zu bestimmen, muß der Säule ein Detektions-System nachgeschaltet sein. Die eluierte Substanz wird dann durch meßbare Signale angezeigt.

### 3.3.2 Säulen

Für die HPLC werden Säulen aus Stahl verwendet, die eine unterschiedliche Säulenfüllung aufweisen können. Wichtige Parameter, die hier eine Rolle spielen, sind Korngröße, Korngrößenverteilung, Partikelmaterial und Beschaffenheit der Oberfläche. Bedeutend zur Ermittlung der Trennstufenzahl und somit zur Erstellung einer Aussage über die Güte der Trennleistung ist der Teilchendurchmesser. Es gilt, je niedriger der Teilchendurchmesser, desto höher die Trennstufenzahl und desto besser die Trennleistung.

Als Trennmaterialien erweisen sich Stoffe mit großer Oberfläche und Stabilität bei hoher Druckeinwirkung als besonders geeignet.

Die Trennung kann an polaren, unbehandelten Normalphasen oder an unpolaren, chemisch modifizierten Umkehrphasen (Reversed Phase) durchgeführt werden.

Bei Säulen mit einer polaren Oberfläche (Normalphasen) erfolgt die Trennung hauptsächlich aufgrund von Polaritätsunterschieden.

An Umkehrphasen, bei denen die ursprünglich polare Oberfläche des Trägers durch Umsetzen mit Alkylreagenzien hydrophobiert wurde, erfolgt die Trennung hauptsächlich aufgrund von Löslichkeitsunterschieden in Wasser. Als Elutionsmittel wird hierbei meist Wasser im Gemisch mit Methanol oder Acetonitril verwendet, wobei es zu einer Umkehr der eluotropen Reihe kommt. Die Reversed-Phase-Chromatographie erweist sich als geeignete Methode zur Trennung von polaren Substanzen und wurde für die chromatographische Bestimmung der in den klinischen Studien verwendeten Diuretika eingesetzt [51].

### **3.3.3 Vorsäulen**

Bei der chromatographischen Trennung von Substanzen aus biologischem Material erweist sich eine Verwendung von Vorsäulen als vorteilhaft. Ein Einsatz von kurzen Vorsäulen zwischen Probenaufgabe und Trennsäule dient dem Schutz und der Lebensdauer der Hauptsäule. Diese Schutzsäulen sind mit identischen oder chemisch ähnlichen stationären Phasen wie die Hauptsäule gefüllt und halten Verunreinigungen der Probenlösung und retardierte Stoffe zurück. Eine Schutzsäule beeinträchtigt die Trennleistung beim chromatographischen Verfahren nicht und wird, um eine maximale Lebensdauer der Trennsäule zu erreichen, in regelmäßigen Abständen ersetzt.

## **3.4 Quantitative Analytik – Methodenvorlage/ -auswahl**

Für die Quantifizierung der Substanzen Bumetanid, Furosemid und Indapamid soll eine empfindliche und selektive Nachweis- und Bestimmungsmethode erbracht werden. Die Proben werden aus humanen Körperflüssigkeiten wie Vollblut, Plasma und Urin gewonnen.

### **3.4.1 Furosemid**

Zur Konzentrationsbestimmung von Furosemid in biologischen Flüssigkeiten (hier: Plasma und Urin) sind eine Vielzahl von verschiedenen Arbeitsvorschriften mittels HPLC bekannt. Nicht alle eignen sich für eine einfache und schnelle Probenbestimmung, da oft eine zu aufwendige

Probenaufarbeitung im Vorfeld oder mangelnde Selektivität vorliegen. Zur Bestimmung von Furosemid aus den authentischen Plasmaproben wurde daher eine neu erarbeitete Analysemethode, auf Basis der Arbeiten von Rapaka et al. [52] und Sidhu et al. [53], erstellt. Arbeitsschritte aus den publizierten Methoden wurden kombiniert und entscheidend verändert. Eine Optimierung erfolgte insbesondere in Hinblick auf verwendete Säule, anteilmäßige Zusammensetzung der mobilen Phase, Flußrate, Anregungs- und Emissionswellenlänge der FL-Detektion sowie Wahl des internen Standards.

Bestimmungen der Furosemidkonzentrationen aus authentischen Urinproben erfolgten anhand eines HPLC-Analyseverfahrens, das nach den kombinierten Vorschriften von Russel et al. [54] und Carr et al. [55] erstellt sowie weiterentwickelt und verbessert wurde.

Bei der Methode nach Russel et al. wird eine sehr aufwendige und zeitraubende Festphasenextraktion zur Probenaufarbeitung beschrieben. Über eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (s. Kap. 3.6.2) gelang es jedoch Furosemid schneller, einfacher und nahezu vollständig aus dem vorliegenden Urinvolumen zu extrahieren.

Auf den Einsatz der beschriebene Säulenofentemperatur von 40°C konnte ebenfalls verzichtet werden, und der Methanolanteil der mobilen Phase wurde zu Gunsten besserer Peakqualität und kürzerer Retentionszeiten erhöht.

Probenaufarbeitung und Lagerung sämtlicher Proben, die Furosemid enthalten, erforderten sorgfältige Protektion vor Lichteinfall. Wird Furosemid Licht ausgesetzt, so tritt schnell Hydrolyse ein und es werden Zerfallsprodukte gebildet, die die genaue Bestimmung von Furosemid erschweren [56].

### 3.4.2 Bumetanid

Zur Bestimmung von Bumetanid in humaner, biologischer Flüssigkeit liegt eine deutlich geringere Anzahl an publizierten analytischen Trennverfahren vor. Aufgrund der niedrigen, im unteren Nanogrammbereich angesiedelten Bumetanidkonzentrationen im Plasma und Urin, eignen sich nur wenige der bekannten HPLC-Methoden [57] – [60] zur Quantifizierung des Diuretikums innerhalb des verwendeten Studienprotokolls. Die Methoden nach Wells et al. [57] und Gradeen et al. [58] beinhalten jedoch aufwendige und zeitraubende Extraktions- beziehungsweise Derivatisierungsschritte. Die schließlich erarbeitete Analyse-methode wurde daher in Anlehnung an die Arbeit von Smith [60] erstellt, da sie sich als besonders schnelle, selektive, spezifische, sensitive und zuverlässige Methode zur Konzentrationsbestimmung von Bumetanid auszeichnet. Es wurden dennoch mehrere chromatographische Parameter verändert, um das Verfahren auf das bestehende HPLC-System anzupassen und zu optimieren. Weitergehende und veränderte Schritte in der Probenaufarbeitung, Abwandlungen in der Zusammensetzung der mobilen Phase, Wahl einer anderen Säule, Änderungen der Flußrate und Verwendung eines anderen internen Standards erbrachten dann ein jeweils optimiertes und validiertes Analyseverfahren für die Bestimmung von Bumetanid aus authentischen Plasma- und Urinproben.

### 3.4.3 Indapamid

Eine vergleichsweise geringe Anzahl analytischer Methoden zur quantitativen Bestimmung von Indapamid mittels HPLC sind derzeit bekannt [61] – [68]. Einige dieser Trennverfahren sind jedoch ungeeignet für die Quantifizierung des Arzneistoffes aus biologischem Material. Sie beschreiben die Gehaltsbestimmung von Indapamid aus festen Arznei-

stoffformulierungen [62], [63] oder eine Determination basierend auf der mobilen Phase als Probenmatrix [64]. Die meisten der beschriebenen chromatographischen Analyseverfahren beschränken sich jedoch auf eine Quantifizierung von Indapamid im Mikrogrammbereich und sind daher für die Erfassung von Indapamid aus biologischen Flüssigkeiten nach oraler Einnahme nicht geeignet. Die Konzentrationsverhältnisse im Blut liegen hier bei Werten im Nanogrammbereich. Darüber hinaus beinhaltet die Aufarbeitung aus biologischem Material das Problem von koelutierenden endogenen Störprodukten. Bei der Entwicklung einer HPLC-Methode muß daher die Probenmatrix des zu untersuchenden Analyten mitberücksichtigt werden.

Weitere in der Literatur beschriebene Methoden umfassen die Indapamidbestimmung aus Vollblut bzw. aus Urin. Neben einer Methode, basierend auf der fluorimetrischen Analyse unter Einsatz von Alkalibasen (NaOH) und einer substanzbelastenden einstündigen Temperaturbehandlung bei 100°C [65], besteht ein weiteres Analyseverfahren (nach Choi et al. [66]), welches bei der Probenaufarbeitung langwierige und aufwendige Extraktionsschritte einschließt. Neben einer komplizierten, fehleranfälligen und weitschweifigen Probenvorbereitung, ist beiden Methoden ein zu geringes Detektionslimit gemein.

Die von Miller et al. [68] publizierte Methode erweist sich als geeigneter Ausgangspunkt für die Erarbeitung eines auf die klinische Studie abgestimmten analytischen Verfahrens zur Quantifizierung von Indapamid (Natlilix<sup>®</sup> S.R.; 1,5 mg). Um die Methode an das bestehende HPLC-System anzupassen, mußten zunächst einige chromatographische Parameter sowie entscheidende Schritte bei der Probenaufarbeitung verändert werden.

## 3.5 Optimierung chromatographischer Parameter

### 3.5.1 Furosemid/Plasma

#### 3.5.1.1 Mobile Phase

Die Auswahl der Lösungsmittelzusammensetzung der mobilen Phase erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Rapaka et al. [52]. Das Laufmittel basiert hierbei auf einer anteilmäßigen Zusammensetzung von 37,5 Volumenteilen Acetonitril zu 62,5 Volumenteilen *o*-Phosphorsäure (0,08M; pH2). Das von Sidhu et al. [53] verwendete Laufmittel – aus den selben stofflichen Bestandteilen bestehend, aber in einem Verhältnis von 46/54 (V/V) zusammengesetzt – eignete sich nicht für das entwickelte analytische Trennverfahren. Durch den hohen Anteil an Acetonitril waren die Elutionszeiten zu stark verkürzt, so daß eine Trennung des Analyten von der Probenmatrix nicht möglich war.

#### 3.5.1.2 Säule

In beiden vorliegenden Methodenvorschriften [Rapaka, Sidhu], wird eine Bondapack C18-Säule, 300 x 4,6 mm bzw. 300 x 3,9 mm, mit einem Teilchendurchmesser von 10 µm als Reversed-Phase-Säule eingesetzt. Bei der Wahl der Säule soll nun durch Herabsetzung der Partikelgröße eine Verbesserung bei der Güte der Trennleistung erreicht werden. Für eine Optimierung der Methode wurde daher eine Gromsil-Säule 120 ODS-3CP, 250 x 4,6 mm mit einem auf die Hälfte reduzierten Teilchendurchmesser von 5 µm verwendet. Dazu wurde der Hauptsäule eine Vorsäule mit gleichem Füllmaterial vorgeschaltet, um störende Einflüsse der Probenmatrix zu minimieren.

### 3.5.1.3 Flußrate

Um eine optimale Trennleistung und eine hohe Peakgüte zu erhalten, wurde eine ideale Flußrate von 1,35 ml/min gefunden. Die Auswahl der optimalen Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase erfolgte empirisch.

### 3.5.1.4 Übersicht

Tab. 3-1: Modifizierung der chromatographischen Parameter bei der HPLC-Methode von Furosemid/Plasma

Chromatographische Parameter			
	Vorschrift nach Rapaka	Vorschrift nach Sidhu	Modifikation
Mobile Phase	Acetonitril: o-Phosphorsäure (0,08M)  37,5 : 62,5 (V/V)	Acetonitril: o-Phosphorsäure (0,08M; pH2)  46 : 54 (V/V)	Acetonitril: o-Phosphorsäure (0,08M; pH2)  37,5 : 62,5 (V/V)
Säule	Bondapack C18, 300 x 4,6 mm; 10 µm	Bondapack C18, 300 x 3,9 mm; 10 µm	Gromsil 120 ODS- 3CP, 250 x 4,6 mm; 5 µm  + Vorsäule
Flußrate	2,0 ml/min	1,10 ml/min	1,35 ml/min
Injektionsvolumen	Bis zu 300 µl	20 µl	50 µl

### 3.5.1.5 HPLC-Chromatogramm

Nachfolgende Abbildung (Abb. 3-9) stellt – exemplarisch für die entwickelte Methode – das HPLC-Chromatogramm einer mit 1,4 µg Furosemid pro Milliliter Plasma gespikten Probe dar. Die Detektion erfolgte anhand eines Fluoreszenz-Detektors. Der Probe wurde Naproxen (NPX) als interner Standard zugefügt.

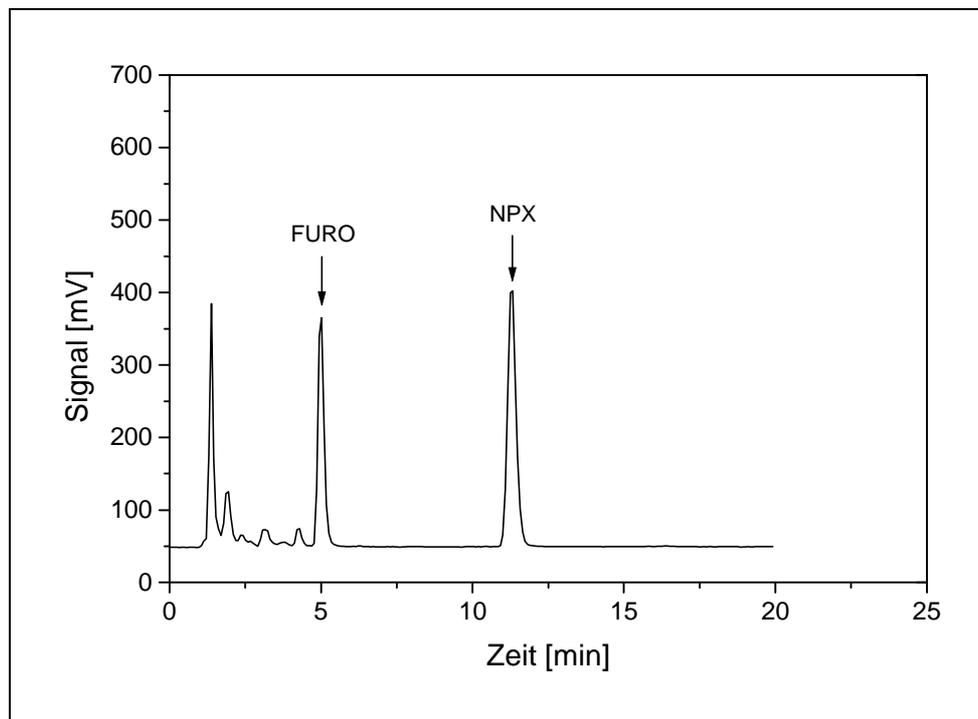


Abb. 3-9: HPLC-Chromatogramm von Furosemid in Plasma, FL-Detektion, Konzentration FURO: 1,4 µg/ml

## 3.5.2 Furosemid/Urin

### 3.5.2.1 Mobile Phase

Die zwei unterschiedlichen von Russel et al. [54] und Carr et al. [55] beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Bumetanid in Urin mittels HPLC lieferten die Grundlage für die Erstellung einer eigenen HPLC-

Methode. Ein Vergleich beider Quellen zeigt Unterschiede in der Zusammenstellung der mobilen Phase. Während die mobile Phase bei Russel aus Methanol/Phosphatpuffer (0,02M; pH3) besteht, verwendet Carr ein Gemisch aus Methanol, Wasser und Eisessig. Zur Gewährleistung stabiler pH-Verhältnisse wurde daher ein Laufmittel in Anlehnung an das von Russel beschriebene eingesetzt. Durch weitere Erhöhung des Methanolanteils in der mobilen Phase wurden schmälere Peaks erzielt, was zu einer verbesserten Peakgüte führte.

Darüber hinaus verkürzten sich die Retentionszeiten des internen Standards (Piretanid) und somit der zeitliche Trennabstand zum Analyten.

### 3.5.2.2 Säule

Das Verfahren von Carr beinhaltet die Verwendung einer Bondapack C18-Säule mit den Maßen 300 x 3,9 mm und einem Teilchendurchmesser von 10 µm. Die von Russel eingesetzte Säule ist eine im Vergleich kürzere LiChrosorb RP-18-Säule mit 150 x 4,6 mm und einem kleinerem Teilchendurchmesser von 5 µm; bei dieser Arbeitsvorschrift ist der Analyt jedoch dem thermischen Einfluß einer Säulenofentemperatur von 40°C ausgesetzt.

Bei der neu erstellten HPLC-Methode erwies sich eine Säule mit einem Partikeldurchmesser von 5 µm als günstig. Zudem wurde, im Vergleich zu den beiden genannten Säulen, eine Säule mittlerer Länge und kleineren Durchmessers gewählt (Gromsil 120 ODS-3CP, 5 µm, 250 x 4,0 mm). Das Vorschalten einer Vorsäule zum Erhalt der Lebensdauer der Hauptsäule und Elimination störender endogener Begleitsubstanzen aus der Probenmatrix, zeigte keinen Einfluß auf die Qualität der chromatographischen Trennung.

### 3.5.2.3 Flußrate

Eine Flußrate von 1,0 ml/min konnte als optimale Laufmittelgeschwindigkeit für die Quantifizierung von Furosemid aus Urin im Rahmen der erarbeiteten HPLC-Methode ermittelt werden.

### 3.5.2.4 Übersicht

Tab. 3-2: Modifizierung der chromatographischen Parameter bei der HPLC-Methode von Furosemid/Urin

Chromatographische Parameter			
	Vorschrift nach Russel	Vorschrift nach Carr	Modifikation
Mobile Phase	Methanol: Phosphatpuffer (0,02M; pH3)  48 : 52 (V/V)	Methanol : Wasser : Eisessig  34 : 46 : 3 (V/V)	Methanol: Phosphatpuffer (0,02M; pH3)  54 : 46 (V/V)
Säule	LiChrosorb RP-18, 150 x 4,6 mm; 5 µm  40°C Temp.	Bondapak C18, 300 x 3,9 mm; 10 µm	Gromsil 120 ODS- 3CP, 250 x 4,0 mm; 5 µm  + Vorsäule
Flußrate	1,0 ml/min	2,0 ml/min	1,0 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl	40 – 100 µl	50 µl

### 3.5.2.5 HPLC-Chromatogramm

Als Beispiel für die chromatographische Trennung von Furosemid in Urin ist in nachfolgender Abbildung (Abb. 3-10) das HPLC-FL-Chromatogramm der oben beschriebenen Methode dargestellt. Die Urinprobe wurde mit Furosemid sowie mit Piretanid (PIR) als internem Standard gespikt. Die Konzentration von Furosemid betrug hierbei  $2,5 \mu\text{g}$  pro Milliliter Urin.

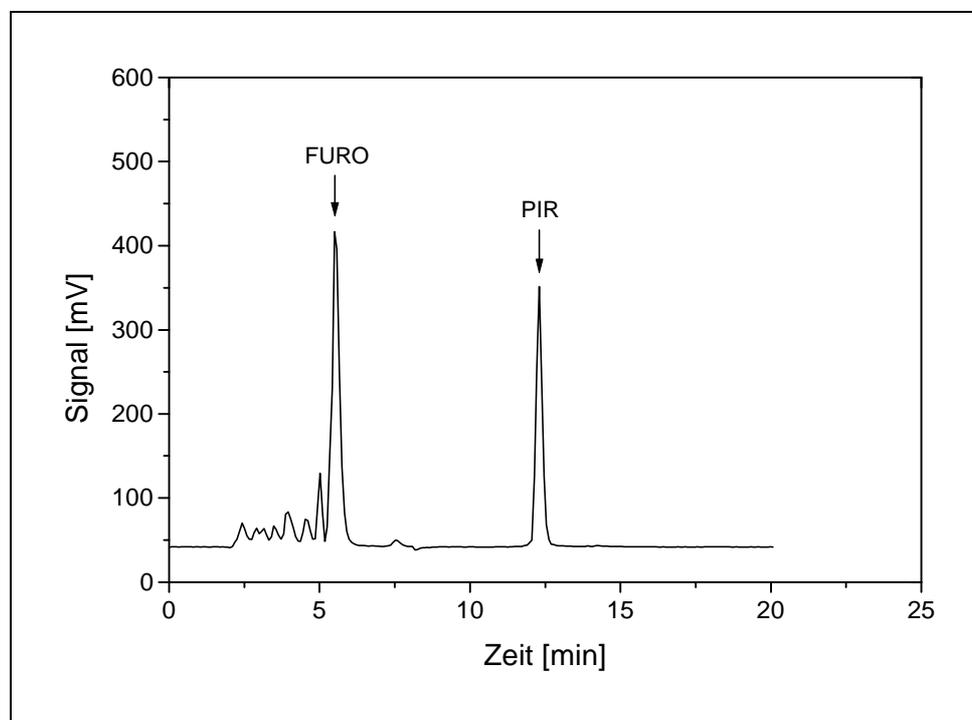


Abb. 3-10: HPLC-Chromatogramm von Furosemid in Urin, FL-Detektion, Konzentration FURO:  $2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$

### **3.5.3 Bumetanid/Plasma**

#### **3.5.3.1 Mobile Phase**

Eine mobile Phase bestehend aus Methanol/Wasser/Eisessig (70/30/1; V/V), wie in der Arbeit von Smith [60] angeführt, stellte sich als sinnvolle Laufmittelkomposition dar. Das Verhältnis der Komponenten Methanol und Wasser wurde jedoch zu Gunsten von Wasser (33 Volumenteile) variiert. Durch den Zusatz von Eisessig als Bestandteil der mobilen Phase können geeignete pH-Verhältnisse für die Fluoreszenz-Detektion von Bumetanid geschaffen werden. Die mobile Phase besitzt nach der Neuzusammensetzung einen unveränderten pH-Wert von 3,5.

#### **3.5.3.2 Säule**

Eine Reversed-Phase-Säule des Typs Gromsil 120 ODS-3CP, 250 x 4,6 mm und einer Teilchengröße von 5 µm im Durchmesser erbrachte geeignete Voraussetzungen zur Bestimmung von Bumetanid in Plasma. Auch hier wurde erneut eine Vorsäule mit identischem Säulenpackungsmaterial dem System vorgeschaltet. Bei der Methodenbeschreibung von Smith wird eine entsprechende Säule von der Firma Whatman verwendet mit dem Unterschied eines doppelt so großen Teilchendurchmessers. Es handelte sich hierbei um eine Partisil-Säule 10 ODS-3, 250 x 4,6 mm, 10 µm.

### 3.5.3.3 Flußrate

Für die Flußrate wurde ein Durchgang von 1,0 ml/min gewählt. Diese Geschwindigkeit war die optimale Rate, um ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Trennleistung sowie Peakqualität und Belastbarkeit der Pumpe herzustellen.

### 3.5.3.4 Übersicht

Tab. 3-3: Modifizierung der chromatographischen Parameter bei der HPLC-Methode von Bumetanid/Plasma

Chromatographische Parameter		
	Vorschrift nach Smith	Modifikation
Mobile Phase	Methanol: Wasser: Eisessig  70 : 30 : 1 (V/V)	Methanol: Wasser: Eisessig  67 : 33 : 1 (V/V)
Säule	Partisil 10 ODS-3; 250 x 4,6 mm; 10 µm  40°C Temp.	Gromsil 120 ODS-3CP, 250 x 4,6 mm; 5 µm  + Vorsäule
Flußrate	1,5 ml/min	1,0 ml/min
Injektionsvolumen	Keine Angabe	100 µl

### 3.5.3.5 HPLC-Chromatogramm

Nachstehende Abbildung (Abb. 3-11) stellt die Bestimmung von Bumetanid in Plasma anhand des erarbeiteten analytischen HPLC-Trennverfahrens dar. Die Detektion erfolgte mittels der Fluoreszenzspektroskopie. Die eingesetzte Konzentration von Bumetanid betrug 65 ng pro Milliliter Plasma. Wie bei der HPLC-Methode FURO/Urin wurde hierbei ebenfalls Piretanid (PIR) als interner Standard eingesetzt.

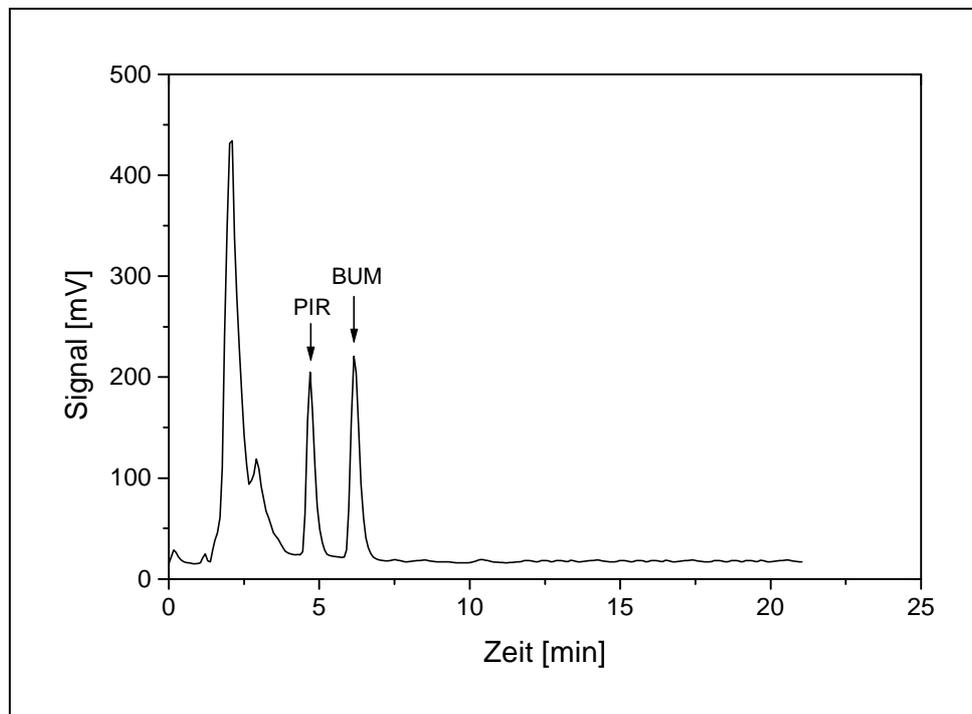


Abb. 3-11: HPLC-Chromatogramm von Bumetanid in Plasma, FL-Detektion, Konzentration BUM: 65 ng/ml

## **3.5.4 Bumetanid/Urin**

### **3.5.4.1 Mobile Phase**

In der Arbeit von Smith [60] wird je eine eigenständige Bestimmungsmethode von Bumetanid in Plasma und Urin beschrieben.

Auch bei der Quantifizierung von Bumetanid aus Urin konnte, wie schon bei Plasma, die Zusammenstellung der mobilen Phase, hier aus Acetonitril und *o*-Phosphorsäure (0,015M; pH1,5), aus der Vorschrift übernommen werden. Eine Veränderung der Lösungsmittelanteile zu Gunsten der wäßrigen Phosphorsäure-Phase erbrachte Vorteile bezüglich der Qualität des Chromatogramms.

### **3.5.4.2 Säule**

In der zugrundeliegenden Arbeitsvorschrift nach Smith wird für die quantitative Ermittlung von Bumetanid aus Urin die gleiche Säule wie bei der Bestimmungsmethode Bumetanid/Plasma gewählt. Dieser Vorgabe wurde auch bei der modifizierten HPLC-Methode entsprochen. Die Wahl der Gromsil-Säule 120 ODS-3CP, 250 x 4,6 mm, 5 µm erbrachte gute Ergebnisse in der Trennung der Substanzen auf der stationären Phase und entsprach den Anforderungen einer klaren Separierung der Peaks von der Basislinie sowie der Probenmatrix.

### **3.5.4.3 Flußrate**

Die Flußrate konnte von einer Vorgabe von 2,0 ml/min (Smith) auf einen Fluß von 1,5 ml/min entscheidend gesenkt werden, ohne Einbußen bei

der Güte des Chromatogramms in Kauf nehmen zu müssen. Durch eine niedrigere Flußrate entsteht ein geringerer Pumpendruck. Dies bedeutet einen deutlichen Vorteil zu Gunsten einer Senkung der Beanspruchung und einer Erhöhung der Lebensdauer der Pumpe.

### 3.5.4.4 Übersicht

Tab. 3-4: Modifizierung der chromatographischen Parameter bei der HPLC-Methode von Bumetanid/Urin

Chromatographische Parameter		
	Vorschrift nach Smith	Modifikation
Mobile Phase	Acetonitril: Phosphorsäure (0,015M)  50:50 (V/V)	Acetonitril: Phosphorsäure (0,015M)  45:55 (V/V)
Säule	Partisil 10 ODS-3; 250 x 4,6 mm; 10 µm	Gromsil 120 ODS-3CP, 250 x 4,6 mm; 5 µm  + Vorsäule
Flußrate	2,0 ml/min	1,5 ml/min
Injektionsvolumen	Keine Angabe	100 µl

### 3.5.4.5 HPLC-Chromatogramm

Untenstehende Abbildung (Abb. 3-12) zeigt das Chromatogramm einer gespikten Urinprobe bei Anwendung des erstellten HPLC-Verfahrens mit gekoppelter FL-UV-Detektion. Ein Milliliter der Urinprobe enthielt eine

Konzentration von 140 ng Bumetanid. Die gekoppelte UV-Detektion diente hier zur Bestimmung des internen Standards Acetophenon (ACP).

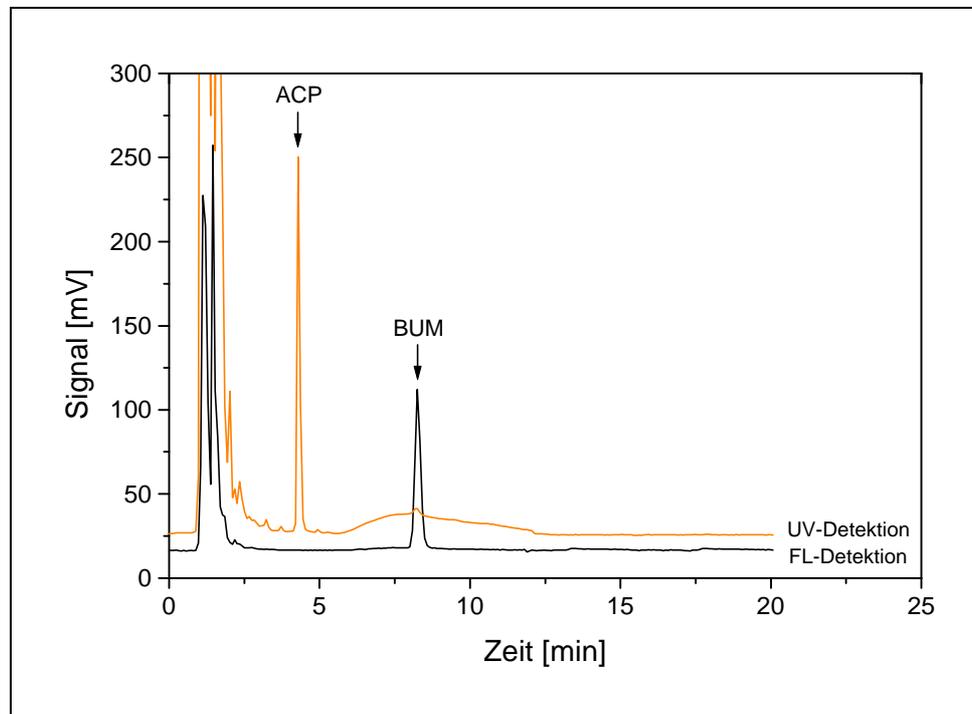


Abb. 3-12: HPLC-Chromatogramm von Bumetanid in Urin, FL-Detektion, Konzentration BUM: 140 ng/ml. Gekoppelte UV-Detektion für internen Standard (ACP = Acetophenon).

## 3.5.5 Indapamid/Vollblut

### 3.5.5.1 Mobile Phase

Die mobile Phase (Ammoniumacetat (0,08M; pH3,5)/Acetonitril/2-Propanol; 65/30/5 (V/V)) für die HPLC-Methode wurde zunächst nach der Vorlage von Miller et al. [68] zusammengestellt. Es stellte sich jedoch bei der Probenaufarbeitung das Problem einer ungenügenden Solubilisierung des Rückstandes (Rekonstitution – Flüssig-Flüssig-Extraktion) und einer

zu geringen Trennung des zu untersuchenden Indapamid-Peak von endogenen Störpeaks.

Das Solubilisierungs-Problem trat im Rahmen der Flüssig-Flüssig-Etherextraktion beim Rekonstitutionsschritt mit dem Lösungsmittelgemisch der mobilen Phase auf. Die eingeeengte Probe konnte nicht vollständig in Lösung gebracht werden und es war eine Trübung der Lösung zu verzeichnen. Eine Modifikation der Zusammensetzung der Rekonstitutionslösung (Ammoniumacetat (0,08M; pH3,5)/Acetonitril (55/45, V/V)) verschaffte Abhilfe.

Im Zuge der Probenaufarbeitung wird durch die Vollblut-Extraktion – im Unterschied zu Plasma – eine Reihe unerwünschter Bestandteile mitextrahiert, welche sich in hohem Basisrauschen, unruhiger Basislinie und als vielzähligen Störpeaks im Chromatogramm bemerkbar machen. Eine klare und deutliche Trennung des Analyten von den endogenen Peaks und der Basislinie gewinnt daher verstärkt an Bedeutung.

Erst eine Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung der mobilen Phase zu Gunsten einer Anteilserhöhung von Acetonitril führte zu schmälere Peaks und verbessertem Leistungspotential bei der Trennung der einzelnen Substanzpeaks (vgl. Abb. 3-13). Der Propanol-Anteil der von Miller beschriebenen mobilen Phase (Ammoniumacetat (0,08M; pH3,5)/Acetonitril/2-Propanol; 65/30/5, V/V) wurde hierbei zunehmend reduziert und schließlich verworfen. Die neue Zusammensetzung der mobilen Phase bestehend aus einem Verhältnis Ammoniumacetat (0,08M; pH3,5) zu Acetonitril, 66/34 (V/V) zeigte sich auch geeignet zur vollständigen Rekonstitution der eingeeengten Probe (vgl. Kap. 3.6.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion).

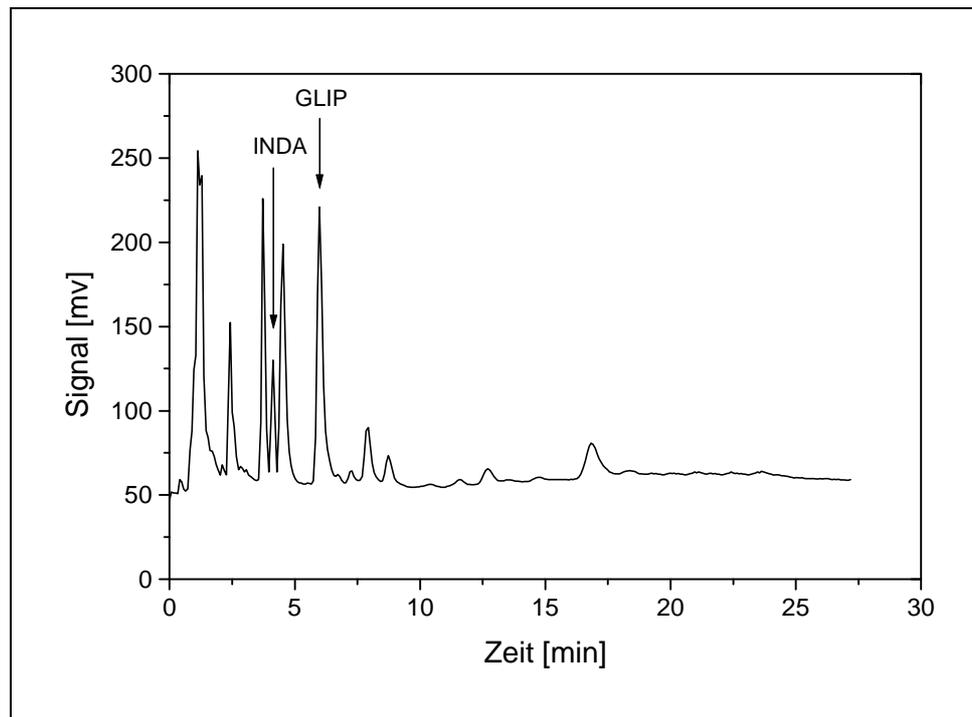


Abb. 3-13: HPLC-FL-Chromatogramm, Vollblut mit Indapamid gespikt, Nucleosil-Säule (125 x 4 mm). Mobile Phase: Ammoniumacetat (0,08M; pH3,5) zu Acetonitril 66/34 (V/V).

### 3.5.5.2 Säule

Indapamid konnte durch den Schritt der Änderung der mobilen Phase nun in ausreichendem Maße von der Blutmatrix getrennt werden. Eine weitere Auftrennung und Separierung des Indapamid-Peaks ist jedoch in Hinblick auf die Bestimmung niedriger Indapamidkonzentrationen (Natrlix<sup>®</sup> S.R.; 1,5 mg) und die individuelle Zusammensetzung des Blutes anzustreben. Als entscheidende Maßnahme erwies sich die Wahl einer neuen, doppelt so langen Säule. Diese führte zu verlängerten Retentionszeiten und somit zu einer Entzerrung der Peaks. Anstelle einer Nucleosil-Säule (100 C18, 5 µm, 125 x 4 mm) (Abb. 3-13) wurde eine Gromsil-Säule (120 ODS-3CP,

5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm) (Abb. 3-14) verwandt. Dies brachte schlußendlich eine klare, optimierte Trennung von Indapamid-Peak und endogenem Störpeak.

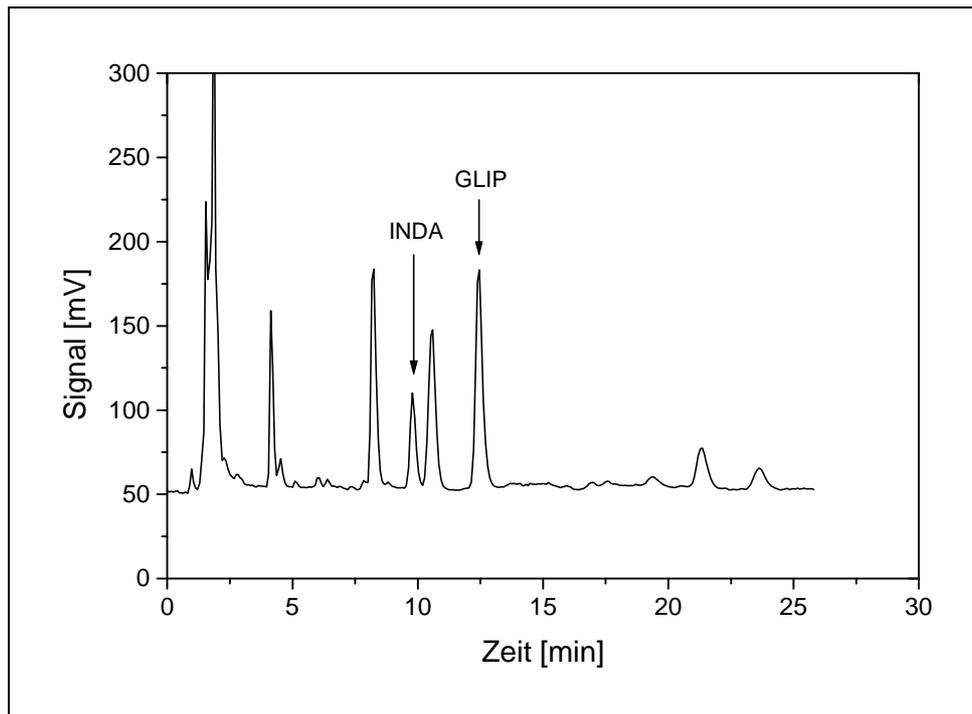


Abb. 3-14: HPLC-FL-Chromatogramm, Vollblut mit Indapamid gespikt, Gromsil-Säule (250 x 4,6 mm). Mobile Phase: Ammoniumacetat (0,08M; pH3,5) zu Acetonitril 66/34 (V/V)

### 3.5.5.3 Flußrate

Durch die Verwendung der längeren Gromsil-Säule wurde die Elution der Substanzen verzögert. Dieser Effekt machte sich im Chromatogramm durch größere Peakbreiten bemerkbar. Die Fließgeschwindigkeit des Laufmittels wurde daher von 1,0 ml/min auf 1,35 ml/min gesteigert.

### 3.5.5.4 Übersicht

Tab. 3-5: Modifizierung der chromatographischen Parameter bei der HPLC-Methode von Indapamid/Vollblut

Chromatographische Parameter		
	Vorschrift nach Miller	Modifikation
Mobile Phase	Ammoniumacetat (0,08M; pH3,5): Acetonitril: 2-Propanol  65 : 30 : 5 (V/V)	Ammoniumacetat (0,08M; pH3,5): Acetonitril  66 : 34 (V/V)
Säule	Nucleosil 100 C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm	Gromsil 120 ODS-3CP, 250 x 4,6 mm; 5 µm  + Vorsäule
Flußrate	1,0 ml/min	1,35 ml/min
Injektionsvolumen	40 µl	100 µl

### 3.5.5.5 HPLC-Chromatogramm

Das in Abb. 3-15 gezeigte HPLC-Chromatogramm gibt stellvertretend die Quantifizierung von Indapamid in Vollblut mittels des oben beschriebenen chromatographischen Trennverfahrens wieder. Es wurde hierbei eine eingesetzte Konzentration von 60 ng pro Milliliter Vollblut per UV-Detektion bestimmt. Glipizid (GLIP) diente als interner Standard.

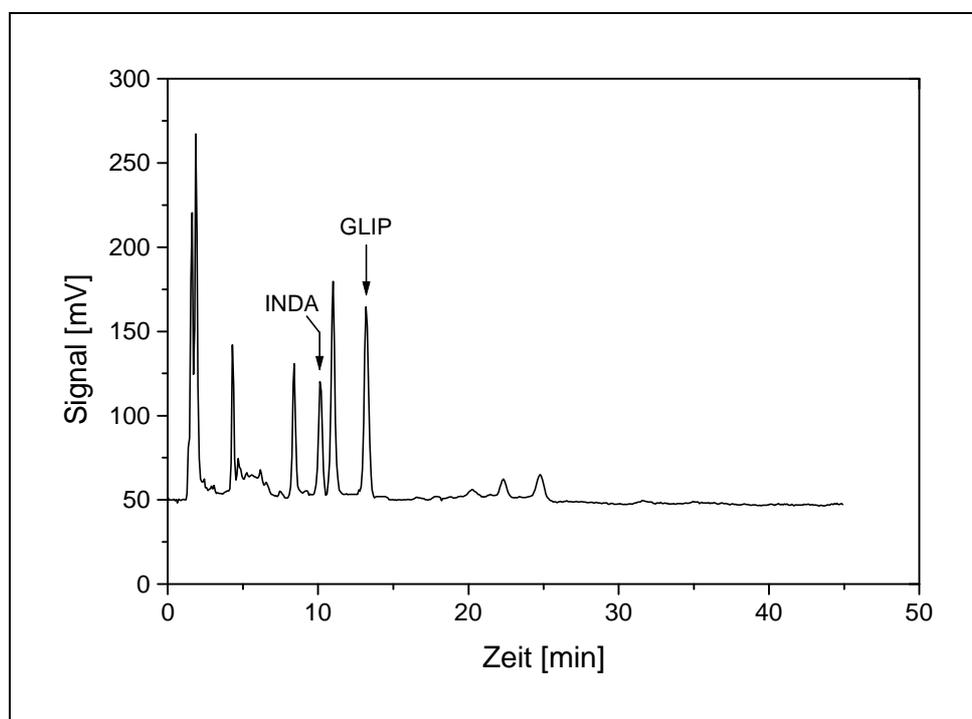


Abb. 3-15: HPLC-Chromatogramm von Indapamid in Vollblut, UV-Detektion, Konzentration INDA: 60 ng/ml

## 3.6 Optimierung bei der Probenaufarbeitung

Bei den für die Quantifizierung erhaltenen authentischen Proben aus den durchgeführten klinischen Studien handelte es sich ausschließlich um Vollblut-, Plasma- und Urinproben. Biologisches Material enthält jedoch in der Regel, für die chromatographische Analyse, eine Unmenge an störenden Begleitstoffen, welche die selektive Bestimmung der Zielsubstanz einschränken und erschweren.

Um eine Reduzierung dieser Stoffe im Probenmaterial zu erreichen, wurden für die Plasmaproben eine Proteinfällung durchgeführt. Über eine Flüssig-Flüssig-Extraktion erhält man ebenfalls eine weitere Minimierung der Stoffe, die bei der Quantifizierung zu einer Interferenz mit dem Arzneistoff führen können.

Eine Konjugatspaltung, wie sie oft bei der Bestimmung von Substanzen aus humanen Flüssigkeiten (Urin) erforderlich wird, ist hier nicht geboten. Die Anlage des Studiendesigns und die pharmakodynamische Besonderheit der Diuretika, die hauptsächlich nur als unveränderter Arzneistoff Wirksamkeit zeigen, grenzen die Untersuchung auf die Bestimmung des nichtmetabolisierten Arzneistoffes ein (s. Kap. 2.1.1).

### 3.6.1 Proteinfällung

Nach der Abtrennung der festen Blutbestandteile durch Zentrifugieren verbleiben im Plasma unter anderem noch lösliche Proteine. Proteine machen sich bei der chromatographischen Trennung jedoch als störende Größen bemerkbar. So können sie zum einen zu Interferenzen bei der Analytik führen, zum anderen bewirken sie das Festhalten von protein-gebundenem Analyten. Durch eine Proteinfällung sollen diese Einflüsse aus der biologischen Matrix im Vorfeld weitestgehend unterbunden

werden. Eine Abtrennung der Proteine verbessert die Probenbeschaffenheit hinsichtlich einer deutlichen Herabsetzung der Viskosität der Probenlösung. Darüber hinaus wird bei der chromatographischen Methode eine starke Beschädigung der Trennsäule durch diesen Schritt weitestgehend vermieden.

Eine Proteinfällung kann mit Hilfe verschiedener geeigneter Reagenzien erfolgen, welche die Proteine von einem hochgeordneten Zustand in einen ungeordneten Zustand überführen und somit irreversibel denaturieren. Der Zusatz organischer Lösungsmittel (Acetonitril, Isopropanol, Methanol u.a.), eine extreme pH-Änderung durch die Zugabe von Säuren und Basen, die Zugabe von Polymeren wie beispielsweise Polyethylenglykol (PEG) oder aber auch eine Temperaturerhöhung können eine Denaturierung bewirken.

Zu beachten ist die geeignete Wahl des Fällungsreagenz. Eine oxidative oder auch thermische Zersetzung des zu bestimmenden Stoffes muß bei diesem Arbeitsschritt vermieden werden. Die Fällung muß für die Zielsubstanz möglichst schonend erfolgen und eine extreme physikochemische Einwirkung auf das Material soll umgangen werden. Das ausgefällte Proteinpräzipitat kann durch Zentrifugation leicht abgetrennt und der Überstand abgehoben werden.

Für die Proteinfällung von Bumetanid aus Plasma wurden 60% (V/V) Lösungsmittelanteile Methanol verwandt und für Furosemid 66% (V/V) Acetonitrilanteile.

### **3.6.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion**

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion bietet beim Arbeiten mit biologischem Material eine weitere Möglichkeit zur Trennung von störendem Begleitmaterial aus der meist wäßrigen Untersuchungslösung. Der Schritt der Flüssigextraktion wird dem eigentlichen analytischen Trennverfahren als

Arbeitsschritt bei der Probenaufarbeitung vorgeschaltet. Beim Vorgang des Ausschüttelns geht der zu extrahierende Stoff – dem Nernst'schen Verteilungsgesetz folgend – in einem bestimmten Ausmaß in das organische Lösungsmittel über. Es kommt hierbei zu einer Verteilung des Stoffes gemäß seinem Verteilungskoeffizienten VK zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten. Dabei handelt es sich um eine wäßrige Phase und eine mit dieser nicht mischbaren Phase eines organischen Lösungsmittels. Es stellen sich ständig neue Verteilungsgleichgewichte zwischen den beiden Phasen ein. In Abhängigkeit vom Verteilungskoeffizienten, der ein Maß für die Affinität der zu trennenden Substanz zu den beiden Phasen darstellt, tritt eine Aufteilung der Substanz in die unterschiedlichen Lösungsmittelphasen ein.

$$VK = \frac{C_{Sub\ Phase\ I}}{C_{Sub\ Phase\ II}}$$

VK - Verteilungskoeffizient

$C_{Sub}$  - Konzentration der Substanz

Für Analyte, die eine Säure darstellen, ist es notwendig, die wäßrige Phase vor dem Ausschütteln mit organischem Lösungsmittel anzusäuern. So liegt Furosemid, als organische Säure, durch Ansäuern der wäßrigen Phase mit HCl undissoziiert (nicht ionisiert) vor. Dies führt zu einer erhöhten Affinität zur lipophilen, organischen Phase und zu einem weitestgehenden Übertritt des Arzneistoffes in diese Phase. Das Ausschütteln des Phasengemisches führt durch Bildung von Emul-

sionströpfchen zu einer Vergrößerung der Grenzflächen und zu einer Erhöhung der Übertrittsgeschwindigkeit.

Die organische Phase kann nach abschließender Zentrifugation von der wäßrigen getrennt und abgehoben werden und anschließend über weiterführende Schritte verarbeitet werden.

### **3.6.2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Furosemid aus Urin**

Die Bestimmung von Furosemid aus Urin erforderte eine Selektionierung des Analyten von den übrigen Begleitstoffen der biologischen Matrix. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion erwies sich hier als probates Mittel zur Extraktion des Arzneistoffes aus Urin.

Für die Probenaufarbeitung wurden 500 µl Urin mit 15 µl HCl (2M) auf pH1,5 angesäuert, da bei saurem pH-Wert Furosemid – als organische Säure – ungeladen vorliegt. Nach Ausschütteln und Übertritt des Analyten in die Diethylether-Phase (4 ml) konnte die organische, als obere der beiden Phasen, abgehoben werden. Die weiteren Arbeitsschritte beinhalteten ein Einengen des Überstandes unter Stickstoff bei 35°C und ein Rekonstituieren mit 500 µl bzw. 1000 µl des Lösungsmittelgemisches der mobilen Phase. In der Studie II wurde mit 1000 µl der mobilen Phase rekonstituiert, um eine Verdünnung der Proben zu erhalten. Dieser Schritt wurde erforderlich, um den geänderten Konzentrationsverhältnissen von Furosemid im Urin, bedingt durch die Studienkonzeption (einmaliger Furosemid-Bolus) gerecht zu werden.

### 3.6.2.2 Flüssig-Flüssig-Extraktion von Indapamid aus Vollblut

Bei der Probenvorbereitung von Indapamid wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Vollblut durchgeführt. Die Blutkonzentrationen sind hierbei höher als die Plasmakonzentrationen, da eine sehr hohe, aber dennoch reversible Bindung von Indapamid an die Carboanhydrase der roten Blutkörperchen vorliegt [46]. Indapamid liegt bei physiologischem pH-Wert neutral und ungeladen vor, daher wurde für die Extraktion aus Vollblut keine weitere Veränderung des pH-Wertes vorgenommen [69], [70].

Es wurden 1 ml Vollblut mit 6 ml Diethylether extrahiert und das Eluat unter Stickstoff bei 35°C zur Trockene eingedampft. Der eingeeengte Rückstand wurde in 500 µl Lösungsmittelgemisch der mobilen Phase (Ammoniumacetat/Acetonitril, 66/34 (V/V)) aufgenommen. Die mobile Phase erwies sich in Hinblick auf Löslichkeit des Blutextraktes und Peakgüte des Analyten bei dem ausgewählten chromatographischen Analyseverfahren als das am meisten geeignete Lösungsmittel für die Rekonstitution. Das eingeeengte Eluat ließ sich vollständig und ohne Trübung auflösen.

Mit Hilfe des Extraktionsverfahrens kommt es bei der Probenvorbereitung von Indapamid zu einer Aufkonzentrierung des Analyten. Dies stellt angesichts der niedrigen Blutkonzentrationsspiegel von Indapamid einen Vorteil bei der quantitativen Bestimmung dar.

## 3.7 Interner Standard

Hauptaufgabe des internen Standards ist es, Dosierfehler bei der Probeninjektion zu korrigieren. Der interne Standard wird allen Proben vor dem ersten Probenaufarbeitungsschritt in gleicher Konzentration zugesetzt. Die Peakflächen der zu bestimmenden Substanz werden dann

auf die Peakfläche des internen Standards bezogen. Eine geeignete Verbindung für den internen Standard muß folgende Eigenschaften mit sich bringen [51]:

- Retentionszeiten, bei der keine anderen Substanzen eluieren.
- Peak sollte möglichst nahe bei dem zu untersuchenden Substanzpeak liegen.
- Chemisch ähnliche Eigenschaften (gleiche Stoffklasse, gleiche funktionelle Gruppe, homologe oder isomere Substanz).
- Anwesenheit in der ursprünglichen Analyse muß ausgeschlossen sein.
- Reinheit der Verbindung.

Nachfolgend werden die eingesetzten internen Standards für die jeweiligen verwendeten Analyseverfahren aufgelistet:

<b>Methode</b>	<b>Interner Standard</b>
Bumetanid/Plasma	Piretanid (PIR)
Bumetanid/Urin	Acetophenon* (ACP)
Furosemid/Plasma	Naproxen** (NPX)
Furosemid/Urin	Piretanid (PIR)
Indapamid/Vollblut	Glipizid*** (GLIP)

\* nach Sidhu et al.

\*\* nach Smith

\*\*\* nach Miller et al.

## 3.8 HPLC-UV-Kopplung

### 3.8.1 Allgemeines

Die HPLC-UV-Kopplung stellt ein weit verbreitetes, empfindliches und leistungsfähiges Detektions-System dar, das bei der quantitativen Bestimmung von Substanzen sehr häufig eingesetzt wird. Mit Hilfe der UV-Kopplung können Substanzen registriert werden, die ultraviolettes Licht ausgewählter Wellenlänge absorbieren. Die Methode basiert auf der Ultraviolet-Spektroskopie, welche die spezifische Absorption von UV-Strahlung durch UV-aktive Chromophore in anorganischen und organischen Verbindungen beinhaltet.

Bei Einstrahlung von energiereichem UV-Licht kommt es bei Absorption zur Anregung von  $n$ - und  $\pi$ -Elektronen. Die Elektronen werden in angeregte Zustände überführt, das heißt sie gehen in leere antibindende Molekülorbitale mit höherer Energie über. Die notwendige Energie zur Überwindung der Energiedifferenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand wird dem eingestrahlten Licht entnommen. Dabei wird eine Intensitätsminderung des ursprünglich eingestrahlten monochromatischen Lichtstrahles herbeigeführt.

Die UV-Detektion zeigt eine Proportionalität zwischen der Intensität des entstehenden Signals und der Konzentration der Substanz in der Probenflüssigkeit. Sie weist über einen weiten Bereich Linearität auf, was eine Ermittlung der Konzentration über Kalibriergeraden ermöglicht [122].

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz stehen die Konzentration des gelösten Stoffes und die Absorption in folgendem Zusammenhang [51]:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d_1$$

- A - Absorption des Lichtes  
 $\epsilon$  - molarer Absorptionskoeffizient; eine für die Substanz spezifische Konstante  
c - Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in der Probenlösung  
 $d_1$  - Schichtdicke der Lösung im Strahlengang (= Durchmesser der Kuvette)

Wichtige Chromophore sind Molekülteile, die nur aus  $\pi$ -Elektronen und solche, die aus  $\pi$ - und n-Elektronen aufgebaut sind.

Die meisten aromatischen Moleküle weisen jedoch derartige Chromophore auf und besitzen bei einer UV-Anregung (254 nm) ein ausgeprägtes Absorptionsverhalten, was oftmals eine Selektionierung des gewünschten Analyten erschwert.

Eine Anpassung der Wellenlänge an das Absorptionsmaximum der gesuchten Substanz, eine Veränderung der chromatographischen Parameter (Wahl der Säule, Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase und somit Änderung der Retentionszeiten) sowie auf die Substanz abgestimmte Probenaufarbeitungsschritte ermöglichen gegebenenfalls eine klare Trennung von koeluuierenden Substanzen.

### 3.8.2 Indapamid

Die Detektion für Indapamid wurde mittels HPLC-UV-Kopplung durchgeführt. Um eine optimale Lichtabsorption von Indapamid zu gewährleisten wurde eine Anregungswellenlänge von 241 nm gewählt. Das HPLC-UV-Verfahren ermöglichte eine Bestimmung von Indapamid aus Vollblut sowie aus Urin.

Die Bestimmungsgrenze der chromatographischen Methode zur Ermittlung der Konzentration von nichtmetabolisiertem Indapamid aus Urin wird

dabei in authentischen Urinproben bei weitem unterschritten. Eine Bestimmung von Indapamid aus Urin ist jedoch für die Auswertung der Studie nicht erforderlich, da ausschließlich ein Monitoring der Indapamid trough-level vorgenommen werden sollte. Die geringe Konzentration von Indapamid im Urin erklärt sich aus der Pharmakokinetik des Arzneistoffes. Nach oraler Einnahme von Indapamid werden nur etwa 5 – 7% des Diuretikums als unveränderter Wirkstoff renal ausgeschieden [46], [70].

## **3.9 HPLC-FL-Kopplung**

### **3.9.1 Allgemeines/Grundlagen**

Die Kombination von chromatographischer HPLC-Trennung und Fluoreszenz-Detektion bietet eine weitere erfolgreiche Methode zur quantitativen Bestimmung von Substanzgemischen. Die HPLC-FL-Kopplung erweist sich als besonders günstig für die Quantifizierung von Mehrkomponentengemischen, da fluoreszierende Substanzen in Gegenwart von nichtfluoreszierenden Begleitstoffen einfach bestimmt werden können und somit eine höhere Selektivität des Meßverfahrens vorliegt. Neben der UV-Detektion ist die Fluoreszenz-Detektion ein routinemäßig eingesetztes Detektionsverfahren zur empfindlichen und spezifischen Erfassung von Analyten. Die Empfindlichkeit kann bis zu 1000mal höher sein als bei der UV-Detektion und ermöglicht daher die Quantifizierung im Nanogrammbereich.

Die Fluorimetrie basiert auf den Grundlagen der Emissions-Spektroskopie, wobei Moleküle nach Lichtabsorption zur Fluoreszenz angeregt

werden. Das emittierte Licht wird als Fluoreszenzspektrum registriert und analytisch ausgewertet.

Das Elektronensystem eines Moleküls kann durch Lichtabsorption in einen angeregten Molekülzustand versetzt werden. Durch die Absorption von elektromagnetischer Strahlung kommt es zu Elektronenübergängen in höhere Molekülorbitale. Typische Anregungszustände, die zur Fluoreszenz führen können, sind  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergänge.

Bei der Besetzung höherer Molekülorbitale durch die Elektronen werden diese, gemäß dem Jablonski-Termschema, aus dem Singulettzustand  $S_0$  in energiereichere Singulettzustände  $S_1$  oder  $S_2$  überführt. Bei Rückkehr der Elektronen aus dem Anregungszustand in den energieärmeren Grundzustand kann es neben der Umwandlung der Elektronenenergie in Wärmeenergie (strahlungslose Inaktivierung) auch zur Emission von Licht kommen (Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz) [51].

Im Unterschied zur Phosphoreszenz tritt Fluoreszenz nur während oder unmittelbar nach der Anregung des Elektronensystems auf und ist somit nach Beendigung der Lichteinstrahlung erloschen.

### 3.9.2 Fluoreszenz, Chromophore, Bestimmung

Fluoreszenz wird besonders bei Substanzen mit einer gewissen Starrheit des Molekülbaus und einer planaren Struktur beobachtet. Die Bestimmung dieser Substanzen wird mit einem Fluorimeter durchgeführt. Die Strahlungsintensität des Anregungslichtes (Lichtquelle) muß hierbei weitgehend konstant gehalten werden, da die Fluoreszenzintensität der zu prüfenden Substanz in hohem Maße von ihr abhängt.

Die Intensität ( $I_\lambda$ ) des Fluoreszenzlichtes einer Substanz bestimmter Konzentration bei einer definierten Wellenlänge unterliegt nachstehender Gesetzmäßigkeit:

$$I_\lambda \sim \epsilon \cdot I_0 \cdot Q \cdot K_G$$

$I_\lambda$  = Fluoreszenzintensität

$\epsilon$  = molarer Absorptionskoeffizient

$I_0$  = Intensität des Anregungslichtes

$Q$  = Fluoreszenzquantenausbeute

$K_G$  = Gerätekonstante

Bei konstanter Anregungsintensität  $I_0$  ist unter konstanten Meßbedingungen die Intensität des Fluoreszenzlichtes der Konzentration der Substanzen proportional [51].

Verschiedene Faktoren können einen Einfluß auf die Fluoreszenzintensität und die Quantenausbeute des zu untersuchenden Analyten aufweisen. Neben dem Einfluß von pH-Wert und Lösungsmittelzusammensetzung auf die Fluoreszenz kann es zudem zu Quenching-Effekten kommen. Wenn gemeinsam mit der fluoreszierenden Substanz eine andere eluiert, welche die Anregungsenergie übernimmt, wird die Emission geschwächt oder unterdrückt (Quenching). So ist zum Beispiel Sauerstoff aus nicht vollständig entgastem Eluens ein effektiver Quencher.

Ferner kann es zur "Selbstlöschung" kommen, wenn bei ungenügend hoher Verdünnung das emittierte Licht durch nichtangeregte Moleküle reabsorbiert wird.

Bei der Quantifizierung einer Substanz über Fluoreszenz-Spektroskopie sind folglich die Wahl eines geeigneten nicht fluoreszierenden Lösungsmittels, die Ermittlung eines günstigen pH-Wertes sowie die Überprüfung der Probenmatrix auf Eigenfluoreszenz als dem Meßverfahren vorausgehende Schritte unerlässlich.

### **3.9.3 Furosemid**

Furosemid kann mit der erarbeiteten HPLC-Methode sowohl über UV- als auch über Fluoreszenz-Kopplung detektiert werden. Furosemid eluiert jedoch rasch und die entstehenden Peaks befinden sich nahe den biogenen Matrixpeaks, so daß Interferenzen bei einer UV-Detektion wahrscheinlicher sind. Die Selektivität und Sensitivität bei der Bestimmung von Furosemid sind daher bei der Wahl der Fluoreszenz-Detektion erhöht, da die Zahl der Substanzen aus biologischer Matrix, die Fluoreszenz aufweisen, deutlich geringer ist.

### **3.9.4 Bumetanid**

Bumetanid wurde mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion aus Plasma und Urin bestimmt. Bei der Bestimmung von Bumetanid in Urin wurden UV- und Fluoreszenz-Detektor gekoppelt, um eine simultane Bestimmung von Bumetanid und dem internen Standard Acetophenon durchführen zu können (vgl. Abb. 3-12).

### 3.10 Arzneistoff-Interferenzen

Im Rahmen der INDIURE-Studie wurden Indapamid und Furosemid als Prüfmedikation bei Patienten mit einer bestehenden Herzinsuffizienz (NYHA II-III) eingesetzt. Alle Patienten benötigten Medikamente zur Behandlung der Herzinsuffizienz. Während der Studienzeit wurde die notwendige Begleitmedikation der Patienten (bis auf Diuretika am Untersuchungstag) unverändert beibehalten.

Im Vorfeld der klinischen Studie mußten daher die gewählten HPLC-Methoden einer Prüfung auf mögliche koeluiierende bzw. interferierende Arzneistoffpeaks im Chromatogramm unterzogen werden.

Für diese Vorbestimmung wurde Blut und Urin von Patienten mit Herzinsuffizienz und der üblichen Standardmedikation aufgearbeitet und jeweils unter den Bedingungen des HPLC-Analyseverfahrens für Indapamid/Vollblut, Furosemid/Plasma und Furosemid/Urin vermessen.

Dieses Screening ermöglichte das Herausfiltern von Medikamenten, die eine Peak-Interferenz mit dem zu untersuchenden Analyten oder dem zugehörigen internen Standard aufweisen.

Bei den von den Patienten eingenommenen Medikamenten handelte es sich um folgende Arzneistoffe:

Benazepril, Enalapril, Ramipril (ACE-Hemmer); Losartan, Valsartan (Sartane, AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten); Phenprocoumon (Antikoagulans); Bisoprolol, Carvedilol, Dilevalol, Nebivolol, Metoprolol (Betablocker); Atorvastatin (CSE-Hemmer); *b*-Acetyldigoxin, Digitoxin (Herzglykoside); Amilorid, Hydrochlorothiazid, Piretanid, Xipamid (Diuretika); Acetylsalicylsäure (Thrombozytenaggregationshemmer).

Die aufgelisteten Arzneistoffe stellen einen repräsentativen Querschnitt der Standardmedikation zur Behandlung der Herzinsuffizienz dar.

Acetylsalicylsäure (ASS) ergab als einziger der untersuchten Arzneistoffe eine schlechte Trennung von Furosemid bei der Bestimmung von Furosemid im Urin. Unter den gegebenen Bedingungen des Trennverfahrens wies ASS nahezu die gleiche Retentionszeit wie Furosemid auf (vgl. Abb. 3-16 und Abb. 3-17).

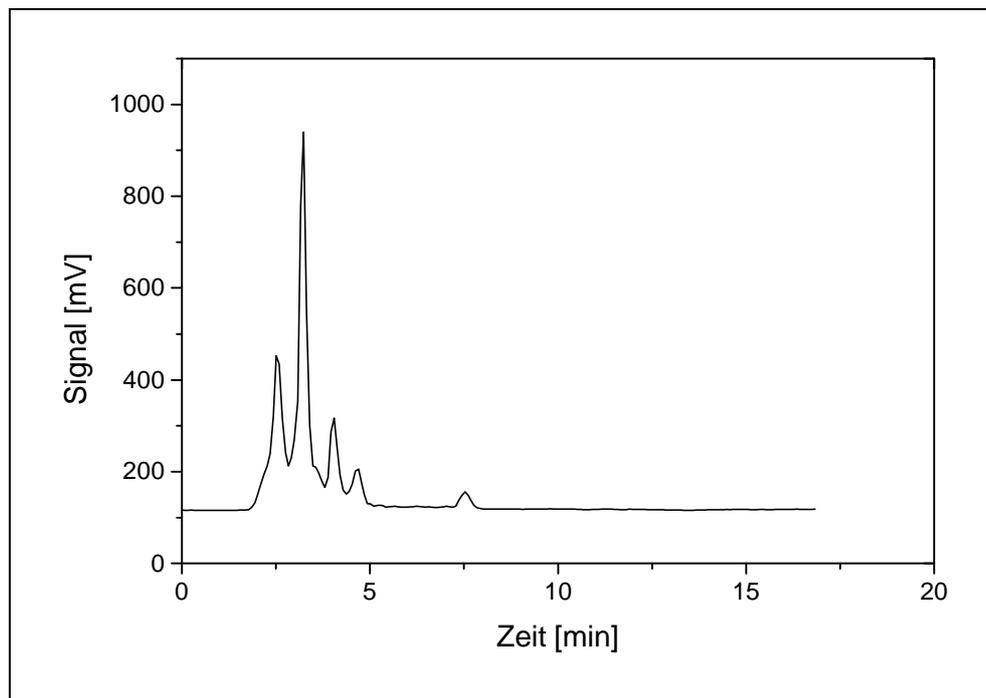


Abb. 3-16: HPLC-FL-Chromatogramm von Leerurin, vor Einnahme von ASS (100 mg). Methode Furosemid/Urin. ® Ausschluß von ko-eluierenden Substanzen.

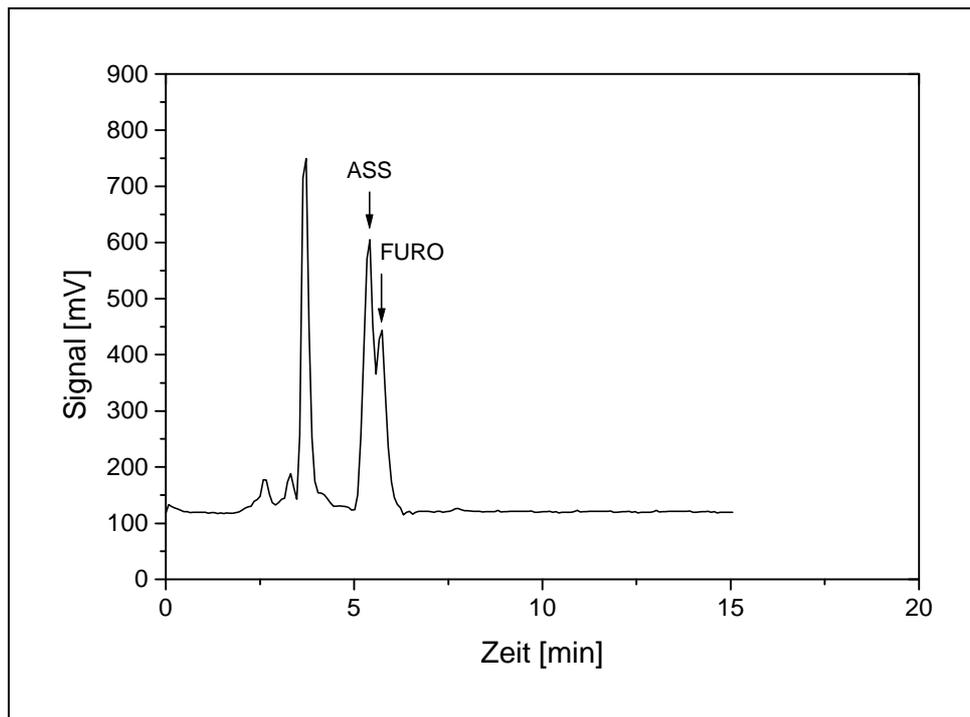


Abb. 3-17: HPLC-FL-Chromatogramm Urin 60 Minuten nach Einnahme von ASS (100 mg), Urin gespickt mit Furosemid. Methode Furosemid/Urin. Mobile Phase: Methanol/Phosphatpuffer (0,02M; pH3) im Verhältnis 54/46 (V/V).

Schon durch eine minimale Änderung der prozentualen Zusammensetzung der mobilen Phase konnte eine Trennung der Peaks herbeigeführt werden (Abb. 3-18). Der Anteil von Methanol wurde geringfügig reduziert, um eine Verschiebung der Retentionszeiten herbeizuführen. Das Lösungsmittelverhältnis der mobilen Phase Methanol/Phosphatpuffer (0,02M; pH3), 54/46 (V/V) ergibt sich nun zu 53/47 (INDIURE-Studie).

Um dennoch möglichen Interferenzen vorzubeugen, wurde nicht nur die mobile Phase verändert, sondern auch die Tagesdosis von ASS erst nach Durchführung der Untersuchung am Studientag verabreicht. Die zeitlich verzögerte Einnahme von ASS (100 mg) hat keinen Einfluß auf das Tages-Wirkprofil des Arzneistoffes und dessen therapeutische Wirkung.

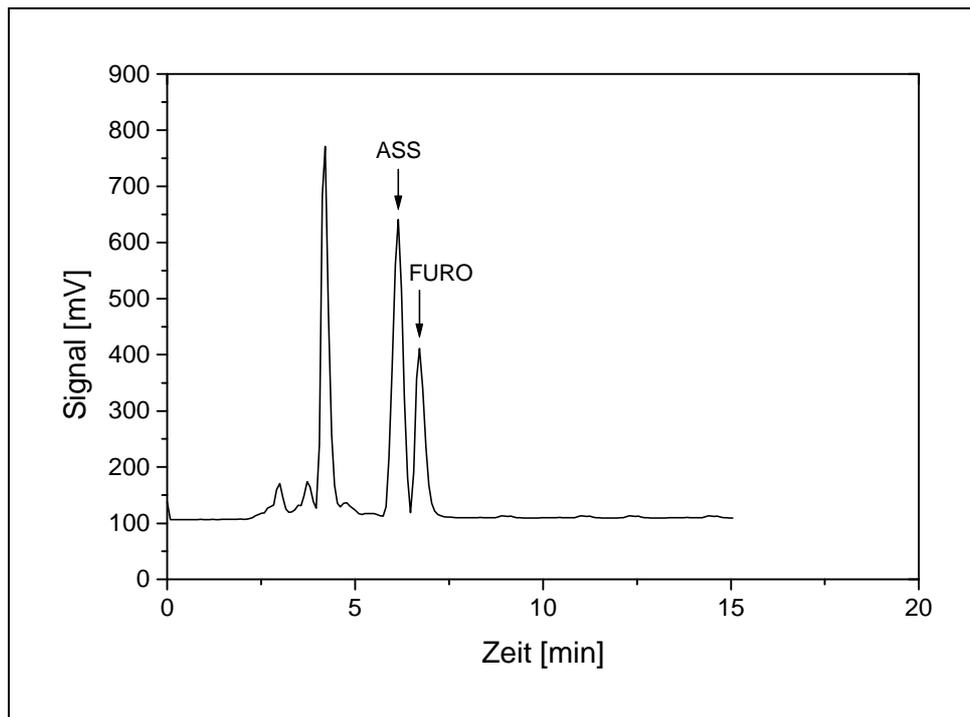


Abb. 3-18: HPLC-FL-Chromatogramm Urin 60 Minuten nach Einnahme von ASS (100 mg), Urin gespikt mit Furosemid. Methode Furosemid/Urin. Mobile Phase: Methanol/Phosphatpuffer (0,02M; pH3) im Verhältnis 53/47 (V/V).

## **3.11 Gemessene Größen**

### **3.11.1 Diuretikakonzentrationen in Plasma/Vollblut und Urin**

Nach Validierung des chromatographischen Trennverfahrens zur quantitativen Bestimmung der Diuretika aus biologischer Matrix, erfolgte die Ermittlung der Konzentrationen anhand der hierfür aufgestellten Kalibriergeraden (s. Kap. 6.3.1). Hierbei wird die integrierte Fläche des Substanzpeaks (AUC = **area under the curve**) mit der eingesetzten Konzentration der Substanz korreliert. Mit Hilfe der linearen Funktion der Kalibriergeraden und anhand der ermittelten AUC-Werte können die Konzentrationen berechnet werden.

### **3.11.2 Elektrolyte, Osmolarität, Inulin, PAH, Aldosteron, Plasmareninaktivität, ANP**

Alle im folgenden Kapitel (Kap. 3.11.2) aufgeführten Substanzen und Parameter wurden im Nephrologisch-Pharmakologischen Labor der Medizinischen Klinik Tübingen bestimmt.

#### **3.11.2.1 Elektrolyte**

Es wurden die Konzentration von Natrium und Kalium flammenphotometrisch bestimmt. Bei der Flammenphotometrie handelt es sich um eine Atomemissions-Spektroskopie. Die Methode basiert auf der Messung der Emission thermisch angeregter Atome. Die Urin- und

Plasmaproben mit den gelösten Elektrolyten Natrium und Kalium werden zu diesem Zweck in einer Flamme zerstäubt und das emittierte Licht mit einem entsprechendem Detektor-System gemessen. Anhand einer vorgefertigten Standardlösung wird zunächst eine Eichkurve erstellt, mit Hilfe derer dann der Gehalt an Elektrolyt ermittelt werden kann. Alle Werte wurden per Doppelbestimmung ermittelt.

### 3.11.2.2 Osmolarität

Die Osmolarität in Plasma und Urin wird mit Hilfe eines Osmometers über die Gefrierpunktserniedrigung gemessen. Die Meßmethode des Osmometers basiert auf dem Prinzip des erniedrigten Gefrierpunktes einer Lösung gegenüber dem des reinen Lösungsmittels. Dies wird bedingt durch die bestehende Dampfdruckerniedrigung über der Lösung.

Es besteht zudem eine Proportionalität zwischen der Gefrierpunktserniedrigung  $t$  und der Konzentration des gelösten Stoffes beziehungsweise der Anzahl Mole  $n$  pro kg Lösungsmittel. Die gemessene Osmolarität besitzt die Einheit mosm/l.

### 3.11.2.3 Inulin

Inulin ist ein hochmolekulares pflanzliches Reserveprotein und gehört zu der Gruppe der Fructane. Es ist aus etwa 20 bis 30 Fructofuranoseeinheiten mit einer endständigen Glucoseeinheit aufgebaut. Es findet seine Anwendung als Diabetikernahrung und in der klinischen Medizin als Diagnostikum zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate.

Inulin wird über die Nieren unverändert und vollständig ausgeschieden, es wird glomerulär frei filtriert und weder rückresorbiert noch sezerniert.

Aufgrund dieser günstigen Eigenschaften ist die renale Clearance des Fructosepolysaccharids ein Maß für die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Zur Berechnung werden die Inulinkonzentrationen in Plasma und Urin benötigt.

Die Gehaltsbestimmung von Inulin erfolgt anhand eines photokolorimetrischen Nachweises von Fructose, welche durch hydrolytische Spaltung aus Inulin hervorgeht. Die Fructose wird im Säuren zu 5-Hydroxymethylfurfural dehydratisiert. Dieses zerfällt weiter in Furfural und Formaldehyd, der mit Resorcin nach dem Prinzip Aldehyd + Phenol + wasserentziehende Säure zum Oxonol, einem phenolischen Farbstoff kondensiert.

Dieser rot-violette Farbstoff fällt in äquimolarer Menge zum Inulin an und kann photometrisch bestimmt werden. Es besteht eine Proportionalität zwischen der Absorption des Lichtes und der Inulinkonzentration. Quantitative Aussagen werden durch die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermöglicht (s. Kap. 3.8.1).

Über eine Standarddeichkurve aus Standardvergleichslösungen bekannter Konzentrationen kann die Konzentration von Inulin in Plasma und Urin ermittelt werden.

#### **3.11.2.4 PAH**

Paraaminohippursäure ist eine Substanz, die in der klinischen Diagnostik zur Bestimmung des renalen Plasmaflusses eingesetzt wird. Diese Substanz wird in den Tubulus der Niere glomerulär frei filtriert und zusätzlich sezerniert. Die Extraktionsrate von PAH liegt beim Menschen während einer Nierenpassage bei etwa 90% [71]. Durch diese Eigenschaft der nahezu vollständigen Extraktion des Stoffes bei einer Nierenpassage, kann der renale Plasmafluß über den Clearance-Wert bestimmt werden [71].

Die Gehaltsbestimmung von *p*-Aminohippursäure beruht auf der Diazotierung der Aminogruppe am Aromaten und einer anschließenden Kupplung zur farbigen Azo-Verbindung, deren Absorption innerhalb eines gewissen Bereiches der PAH-Konzentration der Proben proportional ist und photometrisch bestimmt werden kann.

Die Aminogruppe in *para*-Stellung wird zunächst mit Natriumnitrit diazotiert und der Nitritüberschuß mit Amidosulfonsäure gebunden. Durch Zusatz von bromwasserstoffarmem *a*-Naphtylamin entsteht dann mit dem diazotierten *p*-Aminohippurat ein roter Azofarbstoff. Anhand dieses Farbstoffes kann, wie schon bei Inulin, über Standardvergleichslösungen mit bekannten Konzentrationen eine Eichkurve erstellt werden, mit Hilfe derer der Gehalt an PAH in Urin und Plasmaproben ermittelt werden kann.

### 3.11.2.5 Aldosteron

Aldosteron ist das wichtigste Mineralcorticoid, das in der Nebenniere gebildet wird. Es ist an der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes beteiligt und verantwortlich für die renale Rückresorption von Natrium- und Chloridionen sowie die Ausscheidung von Kalium- und Wasserstoffionen. Hierdurch steigt die extrazelluläre Osmolarität und die Wasserretention. Die biologische Wirkung wird an der Niere durch Angriff am distalen Tubulus erreicht.

Produktion und Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, dazu gehören Volumenänderungen in den Gefäßen, Änderungen der Nierendurchblutung und der Natriumkonzentration im distalen Tubulus der Niere sowie Einflußnahme durch das Renin-Angiotensin-System.

Das Verfahren zur Bestimmung von Aldosteron beruht auf dem Grundprinzip des Radioimmunoassays, wobei radioaktive und nicht

radioaktive (Probe) Antigene um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen hochspezifischer Antikörper konkurrieren. In dieser Reaktion bilden markiertes und unmarkiertes Antigen mit dem Antiserum Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Komplexbildung strebt nach dem Massenwirkungsprinzip ein Gleichgewicht an. Die Menge von  $^{125}\text{J}$  markiertem Antigen, das an die Antikörper gebunden ist, ist umgekehrt proportional zur Analytkonzentration der Probe. Nach Trennung des freien Antigens von gebundenem Antigen wird das verbleibende Präzipitat im Gamma-counter gemessen [72].

### 3.11.2.6 Plasmareninaktivität (PRA)

Renin stellt ein proteolytisches Enzym dar, das von den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet wird. Das Gewebshormon Renin wandelt als Protease das Angiotensinogen I des Blutplasmas in Angiotensin I um, aus dem dann mittels des sogenannten Converting Enzyme Angiotensin II entsteht (Renin-Angiotensin-System). Die wichtigsten biologischen Aktivitäten von Angiotensin II sind die Vasokonstriktion und die Regulation der Synthese und Freisetzung von Aldosteron, das die Elektrolytbilanz moduliert. Daher ist das System über verschiedene Mechanismen bei der Regulation des Blutdrucks involviert.

Ein wirksamer Stimulus für die Reninabgabe in das Blut und damit für die Auslösung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Mechanismus (s. Kap. 3.11.2.5) ist neben der Hypovolämie und dem Blutdruckabfall die Hyponatriämie. Renin ist somit ein wichtiger Bestandteil im Regelkreis des Natriumhaushaltes.

Über die Messung der Plasmareninaktivität (PRA) ist es folglich möglich, die Aktivität des Systems zu bewerten.

Die Konzentration beziehungsweise Aktivität von Renin im Plasma wird nicht direkt, sondern indirekt über den Umsatz von Angiotensin I anhand

der radioimmunologischen Bestimmungen von Angiotensin I ermittelt. Vor der radioimmunologischen Bestimmung wird das Plasma inkubiert und unter standardisierten Bedingungen wird durch Renin Angiotensin I gebildet. Die abschließende Messung basiert wiederum auf dem Testprinzip des Radioimmunoassays (s. Kap. 3.11.2.5) [73].

### **3.11.2.7 ANP**

ANP ist die Abkürzung für atriales natriuretisches Peptid – ein Hormon das vorwiegend vom Herzen synthetisiert wird. Es wirkt als Vasodilatator und trägt zur kardiovaskulären und renovaskulären Homöostase bei.

Wichtigster Reiz für die Ausschüttung von ANP aus den Myokardzellen des Vorhofs in das Blut ist die Dehnung des Vorhofmyokards bei Zunahme des venösen Blutvolumens (Vorlast). Die physiologische Wirkung des Peptids besteht in der Suppression der Aldosteronbiosynthese, der Steigerung der renalen Natriumausscheidung und der Dilatation peripherer Ateriolen und Venolen, vor allem an der Niere.

ANP wirkt somit auf die Nieren, die Nebennieren und das Gefäßsystem ein. Die Wirkung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird daher durch ANP antagonisiert. Folge der biologischen Aktivität von ANP ist eine Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens, Erniedrigung des Blutdrucks sowie Anstieg der Herzfrequenz.

Das Bestimmungsverfahren von ANP aus Plasma erfolgt durch einen Radioimmunoassay (s. Kap. 3.11.2.5) nach vorausgehender Festphasenextraktion [74].

### 3.11.3 Linksventrikuläre Funktion (LVF)

Die Bestimmung der linksventrikulären Funktion (LVF) des Herzens erfolgt anhand echokardiographischer Messungen der Ejektionsfraktion nach Teichholz (EF) sowie der Verkürzungsfraktion (FS = fractional shortening).

Alle Echokardiographien wurden vom gleichen Untersucher durchgeführt.

## 3.12 Berechnete Größen

### 3.12.1 Clearance

Der Begriff Clearance ist allgemein definiert als virtuelles Plasmavolumen das pro Zeiteinheit von der betreffenden Substanz befreit wird.

Die renale Clearance ist ein Maß für die Elimination eines Stoffes aus dem Blutplasma bei der Nierenpassage. Die Clearance gibt den Teil des renalen Plasmaflusses an, der pro Minute von dem betreffenden Stoff vollständig befreit wird.

Die Clearance ergibt sich somit rechnerisch aus der pro Minute mit dem Urin ausgeschiedenen Menge einer Substanz dividiert durch deren Plasmakonzentration.

$$Cl = \frac{C_{Urin} \cdot \text{Urinvolumen}}{C_{Plasma} \cdot \text{Zeiteinheit}} \quad [\text{ml/min}]$$

Alle Clearances wurden nach der obengenannten Grundformel berechnet und auf die Standardkörperoberfläche von 1,73 m<sup>2</sup> normiert.

### 3.12.2 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Weiterhin kann mit Hilfe der Clearance die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmt werden. Diese bezeichnet das Filtratvolumen, das in sämtlichen Glomeruli der Niere pro Zeiteinheit abgepreßt wird. Es gilt, für eine Substanz, die im Glomerulus unbehindert (frei) filtriert und im Tubulus weder rückresorbiert noch sezerniert wird, ist die renale Clearance identisch mit der glomerulären Filtrationsrate. Das Fructosepolysaccharid Inulin ist eine Substanz mit den genannten Eigenschaften. Die berechnete Inulin-Clearance wird dabei auf die Standardkörperoberfläche von 1,73 m<sup>2</sup> normiert.

$$GFR \approx Cl_{Inulin} \quad [\text{ml/min}]$$

$$GFR = \frac{C_{Urin} Inulin \cdot Urinvolumen}{C_{Plasma} Inulin \cdot Zeiteinheit} \cdot \frac{1,73}{iKO} \quad [\text{ml/min}/1,73\text{m}^2]$$

*iKO* = Individuelle Körperoberfläche

### 3.12.3 Systemische Hämodynamik

#### 3.12.3.1 Arterieller Mitteldruck (MAP)

Als Parameter für die systemische Hämodynamik wurde der arterielle Mitteldruck herangezogen.

Der arterielle Mitteldruck (MAP – mean arterial pressure) wurde aus den Mittelwerten dreier unabhängiger Messungen am Untersuchungstag nach folgender Formel berechnet:

$$MAP = \frac{RR_{sys} + 2 RR_{dia}}{3} \quad [\text{mmHg}]$$

wobei  $RR_{sys}$  den systolischen Wert und  $RR_{dia}$  den diastolischen Wert der Blutdruckmessung nach Riva-Rocci darstellt.

### 3.12.4 Renale Hämodynamik

#### 3.12.4.1 Effektiver Renaler Plasmafluß (ERPF)

Der effektive renale Plasmafluß (ERPF) wurde aus der gemessenen PAH-Clearance ( $Cl_{PAH}$ ) und der für den Menschen bestimmten 90% PAH-Extraktion während einer Nierenpassage nach unten stehender Formel berechnet und auf die Standardkörperoberfläche von  $1,73 \text{ m}^2$  normiert [71].

$$ERPF = \frac{1}{0,9} \cdot Cl_{PAH} \cdot \frac{1,73}{iKO} \quad [\text{ml/min}/1,73\text{m}^2]$$

*iKO* = Individuelle Körperoberfläche

### 3.12.4.2 Renaler Blutfluß (RBF)

Der renale Blutfluß (RBF) wurde berechnet aus dem effektiven renalen Plasmafluß (ERPF) sowie dem Anteil der zellulären Bestandteile am gesamten Blutvolumen – dem Hämatokrit (Hk) als:

$$RBF = ERPF \cdot \frac{1}{(1 - Hk)} \quad [\text{ml/min}/1,73\text{m}^2]$$

### 3.12.4.3 Filtrationsfraktion (FF)

Die Filtrationsfraktion (FF) wurde anhand der ermittelten glomerulären Filtrationsrate (GFR) und den berechneten Werten des effektiven renalen Plasmaflusses (ERPF) wie folgt berechnet:

$$FF = \frac{GFR}{ERPF} \quad [\%]$$

### 3.12.4.4 Renovaskulärer Widerstand (RVR)

Der renovaskuläre Widerstand (RVR) gilt als Maß für den Gesamtwiderstand im Gefäßstrombett der Niere und wurde unter Einbeziehung des arteriellen Mitteldrucks (MAP) und des renalen Blutflusses (RBF) berechnet als:

$$RVR = \frac{MAP}{RBF} \cdot 80 \quad [\text{kdyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}]$$

### 3.12.5 Tubuläre Parameter

#### 3.12.5.1 Natriumausscheidung ( $E_{Na}$ )/ Diuretikumausscheidung ( $E_{Diu}$ )

Die Ausscheidungsrate ( $E_{Na}$ )/( $E_{Diu}$ ) gibt die Stoffmenge bzw. Konzentration einer Substanz ([...]) an, die pro Zeiteinheit mit dem Urin ausgeschieden wird. Sie wird berechnet als:

$$E_{Na} = [Na] \cdot \text{Harnfluß} \quad [\text{mmol}/\text{min}]$$

$$E_{Diu} = [Diu] \cdot \text{Harnfluß} \quad [\mu\text{g}/\text{min}]$$

### 3.12.5.2 Fraktionelle Natriumausscheidung ( $FE_{Na}$ )/ Fraktionelle Diuretikumausscheidung ( $FE_{Diu}$ )

Die fraktionelle Ausscheidung ( $FE_{Na}$ )/( $FE_{Diu}$ ) gibt die Ausscheidung der Substanz in Prozent der pro Zeiteinheit filtrierten Menge an und wurde folgendermaßen berechnet:

$$FE_{Na} = \frac{[Na]_{Urin} \cdot \text{Harnflu\ss}}{[Na]_{Plasma} \cdot GFR} \cdot 100 \quad [\%]$$

$$FE_{Diu} = \frac{[Diu]_{Urin} \cdot \text{Harnflu\ss}}{[Diu]_{Plasma} \cdot GFR} \cdot 100 \quad [\%]$$

### 3.12.5.3 Kumulative Natriumausscheidung ( $EC_{Na}$ )/ Kumulative Diuretikumausscheidung ( $EC_{Diu}$ )

Die kumulative Ausscheidung ( $EC_{Na}$ )/( $EC_{Diu}$ ) gibt die Summe der in jeder Sammelperiode (t) ausgeschiedenen Menge an Natrium bzw. Diuretikum über die gesamte Zeitdauer an. Sie berechnet sich nach folgender Formel:

$$EC_{Na} = \sum_{t=1}^n E_{Na} \quad [\text{mmol}]$$

$$EC_{Diu} = \sum_{t=1}^n E_{Diu} \quad [\text{mmol}]$$

$n$  = Anzahl der Sammelperioden  $t$

### 3.12.5.4 Natriuretische Effizienz ( $EC_{Na/Diu}$ )

Die Natriuretische Effizienz ( $EC_{Na/Diu}$ ) gilt als Maß für die natriuretische Wirkstärke. Sie berechnet sich als die kumulativ pro Zeiteinheit ausgeschiedene Menge an Natrium pro Einheit an sezerniertem Diuretikum.

$$EC_{Na/Diu} = \frac{EC_{Na}}{EC_{Diu}} \quad [\mu\text{mol}/\mu\text{g}]$$

## 3.13 Statistik

Die statistische Auswertung der vorliegenden Studien wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen durchgeführt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit 1. Art wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Hieraus ergab sich bei intraindividuellem Vergleich und den erwarteten Änderungen der Zielvariablen ein erforderlicher Stichprobenumfang von minimal  $N = 10$  Patienten (Studie I) bzw.  $N = 11$  Patienten (Studie II).

Für die demographischen und anamnestischen Merkmale der Studienkollektive wurden deskriptive Maßzahlen errechnet. Metrische Merkmale wurden durch Mittelwert und Standardabweichung sowie durch Angabe der Minima und Maxima beschrieben. Für nicht normalverteilte Größen wurde zusätzlich der Medianwert berechnet.

Alle Zielparameter wurden pro Zeiteinheit als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung protokolliert. Als Bezugsgröße zur Beurteilung der Arzneimittel effekte wurde jeweils der Mittelwert der Steady-State-Ausgangs-

werte herangezogen. Anschließend wurden pro Zielparameter und Zeiteinheit die absoluten und relativen Differenzen ( $d$ ) zum mittleren Ausgangswert berechnet. Für die bivariate Betrachtung von Exkretionsrate des Diuretikums und fraktioneller Natriumausscheidung wurden die Werte für die Diuretikumausscheidung klassiert und gegenüber der fraktionellen Natriumausscheidung als kontinuierlicher Variable aufgetragen (Studie I). Diese Betrachtungsweise war aufgrund des interindividuell sehr unterschiedlichen Zeitverlaufes aus statistischen Gründen angebracht.

Zur Beschreibung der pharmakokinetischen Kenngrößen wurden die Daten individuell nach dem entsprechenden pharmakokinetischen Modell gefittet (TopFit). Alle Variablen wurden mittels Shapiro-Wilks-Test auf Normalverteilung geprüft. Zur Prüfung der Mittelwertsdifferenzen auf Unterschiede kamen zusätzlich folgende Verfahren zur Anwendung: Student-Test (t-Test), U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, Friedman-Test.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der Plasma/Vollblut- und Urinproben aus den klinischen Studien

#### 4.1.1 Pharmakologische Grundlagen

Pharmakologische Aussagen über die Wirksamkeit eines Arzneistoffs werden allgemein über eine Korrelation der Arzneistoffkonzentrationen am Wirkort mit klinisch meßbaren Parametern der Wirkung ermittelt. Dies stellt eine Verknüpfung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines Wirkstoffs dar.

Die Pharmakokinetik befaßt sich mit der Konzentrationsveränderung eines Pharmakons im Organismus in Abhängigkeit von der Zeit. Hierzu gehören Teilprozesse wie Resorption, Verteilung, Biotransformation und Elimination des Wirkstoffs. Die meisten Pharmaka werden über die Blutbahn an ihren Wirkort transportiert. Eine Plasmaspiegelkurve (Konzentrations-Zeit-Kurve) spiegelt in diesem Fall die kinetischen Vorgänge im Organismus wieder.

Diuretika weisen die Besonderheit auf, daß sie zunächst renal eliminiert werden müssen, bevor sie ihren Wirkort erreichen. So stellt erst die tatsächlich in den Urin ausgeschiedene, nichtmetabolisierte Substanzmenge, die relevante Arzneistoffkonzentration am Wirkort dar. Diesem Sachverhalt muß bei der Auswertung der klinischen Studien Rechnung getragen werden.

Die Pharmakodynamik gibt Auskunft über die Wirkung des Pharmakons am Wirkort und über die Vorgänge bei der Wechselwirkung mit dem Rezeptor sowie dem daraus hervorgehenden pharmakologischen Effekt.

Um eine Aussage über die Wirksamkeit eines Diuretikums treffen zu können ist es wichtig, die diuretische Wirkung mit der ausgeschiedenen Menge an Diuretikum zu korrelieren. Die diuretische Antwort kann über verschiedene Größen der Natriumausscheidung dargestellt werden, hierbei tritt die fraktionelle Natriumausscheidung als übliches Maß für die natriuretische Wirkung auf.

### **4.1.2 Identifizierung**

Die aufbereiteten Analysenproben wurden mittels der HPLC-FL- bzw. der HPLC-UV-Kopplung untersucht.

Die Identifizierung des zu untersuchenden Analyten erfolgte anhand eines Vergleichs der Chromatogramme und der Retentionszeiten der jeweiligen Substanz (Bumetanid, Furosemid, Indapamid) aus den Standardlösungen mit denen aus biologischer Probenmatrix gewonnenen Verbindungen. Zusätzlich wurde von jedem Probanden bzw. Patienten vor jeder Analyse das Leerplasma/-urin bestimmt und in einem zweiten Schritt dieses mit einer festgelegten Konzentration gespikt und vermessen. Eine Vergleich dieser beiden Chromatogramme gibt Auskunft über die Retentionszeit des gesuchten Analyten und zeigt gleichzeitig mögliche koeluierende endogene Substanzpeaks auf. Es zeigte sich, daß bei keinem der Probanden/Patienten körpereigene Substanzen auftraten, die mit dem zu untersuchenden Analyten interferierten.

### 4.1.3 Quantifizierung

Über die Hochleistungs-Flüssigchromatographie wurden die Studienmedikamente (Bumetanid, Furosemid und Indapamid) mittels der in Kapitel 3.5 bzw. Kapitel 6 vorgestellten optimierten sowie validierten Methodenverfahren bestimmt. Die Ermittlung der vorliegenden Konzentrationen pro abgenommener Probe wurde anhand der, für das jeweilige Analyseverfahren errichteten, Kalibriergeraden erstellt. Die Kalibriergerade stellt einen Teil des Validierungsverfahrens zur Absicherung der chromatographischen Trennmethode dar und wurde statistisch geprüft (s. Kap. 6.3).

## 4.2 Ergebnisse Studie I

### 4.2.1 Ausgangsparameter

Zur Beurteilung der pharmakokinetischen/-dynamischen Unterschiede zwischen den beiden Diuretika ist es entscheidend, an beiden Untersuchungstagen gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Besonderer Wert wurde hierbei auf eine ausgeglichene Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz über die jeweils zwei vorausgegangenen Tage gelegt.

#### 4.2.1.1 MAP, Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase

Alle Probanden zeigten an beiden Untersuchungstagen einen vergleichbaren mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) sowie eine ausgeglichene Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz. Hinsichtlich Hämatokrit (Hk), Plasmareninaktivität (PRA) und der Hormonspiegel von Aldosteron und ANP, als Maß für den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des Körpers, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die einzelnen Werte sind in Tab. 4-1 als Mittelwerte aller Probanden am jeweiligen Untersuchungstag aufgeführt. Die mittlere Natriumzufuhr, berechnet aus dem Mittelwert der Natriumausscheidung in zwei aufeinanderfolgenden Sammelurinen betrug  $9,1 \pm 2,7$  (BUM) und  $9,3 \pm 3,6$  (FURO) g/24h.

Tab. 4-1: Basisparameter vor Beginn der Studie am Untersuchungstag

Vor Untersuchung		Bumetanid	Furosemid
MAP	MmHg	97 ± 8	96 ± 9
Hk	%	39,0 ± 5,2	39,3 ± 3,5
PRA	ng <sub>AngI</sub> /ml/h	2,37 ± 2,47	2,12 ± 1,85
Aldosteron	pg/ml	143,4 ± 87,4	143,8 ± 86,2
ANP	pg/ml	79,3 ± 33,6	82,7 ± 27,1
Na-Zufuhr	g/24h	9,1 ± 2,7	9,3 ± 3,6

#### 4.2.2 Ergebnisse Pharmakokinetik

Zur Ermittlung pharmakokinetischer Kenndaten wurde die Konzentration der untersuchten Diuretika in Plasma und Urin bestimmt. Durch die i.v.-Gabe der Arzneistoffe fallen Teilprozesse der Pharmakokinetik, wie Auflösung des Wirkstoffes und Absorption aus dem Gastrointestinal-Trakt, weg. Der Arzneistoff gelangt direkt in die Blutbahn, wodurch auch ein möglicher First-Pass-Effekt keine Rolle spielt. Für die Auswertung der Studie zeigen biotransformatorische Prozesse keinen Einfluß, da nur der nichtmetabolisierte Anteil des Diuretikums wirksam ist und quantitativ bestimmt wird.

Im folgenden wird zunächst die Pharmakokinetik beider Diuretika deskriptiv beschrieben und anschließend zusammenfassend gegenübergestellt.

### 4.2.2.1 Plasmaspiegelkurven von Bumetanid

Mit Hilfe des entwickelten Analyseverfahrens wurden die Konzentrationen von Bumetanid in Plasma bestimmt (Abb. 4-1). Alle ermittelten Werte befanden sich im Nanogramm-Bereich und konnten mit dem angewandten Analyseverfahren ohne Schwierigkeiten gemessen werden.

Die Plasmaspiegelkurven weisen in ihrem Verlauf interindividuelle Unterschiede auf. Insgesamt tritt aber bei allen Kurven die gleiche Charakteristik auf: In den ersten zwei Stunden wird ein „steady state“ mit konstanten Plasmaspiegeln aufrechterhalten, anschließend zeigen alle Kurven einen Anstieg der Plasmakonzentrationen. Dieser Konzentrationsanstieg nach 120 Minuten resultiert aus der Gabe von Probenecid (2 mg p.o.).

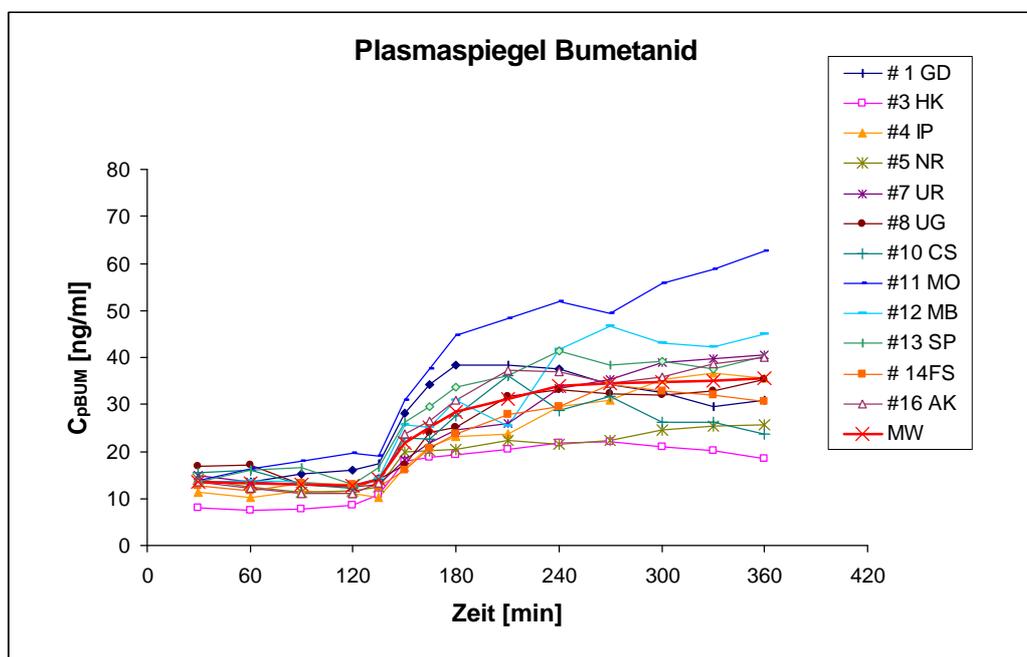


Abb. 4-1: Plasmaspiegelkurve für Bumetanid – Studie I

#### 4.2.2.2 Plasmaspiegelkurven von Furosemid

Mittels des beschriebenen Analyseverfahrens zur Bestimmung der Konzentrationen von Furosemid aus Plasmaproben wurden für alle 12 Probanden der klinischen Studie die Plasmaspiegelkurven erstellt (Abb. 4-2). Alle Konzentrationen befanden sich im Mikrogrammbereich und konnten über die gesamte Zeitdauer der Studie problemlos bestimmt werden.

Im Bereich der ersten 120 Minuten wird für alle Probanden ein „steady state“ der Plasmakonzentrationen festgestellt. Als Folge der oralen Gabe von Probenecid (bei  $t = 120$  min) ist bei allen Probanden, trotz interindividueller Schwankungen, ein vergleichbarer Anstieg der Plasmakonzentrationen zu verzeichnen.

Dieses Verhalten steht in Analogie zu dem zuvor beschriebenen Kurvenverlauf unter Infusion von Bumetanid.

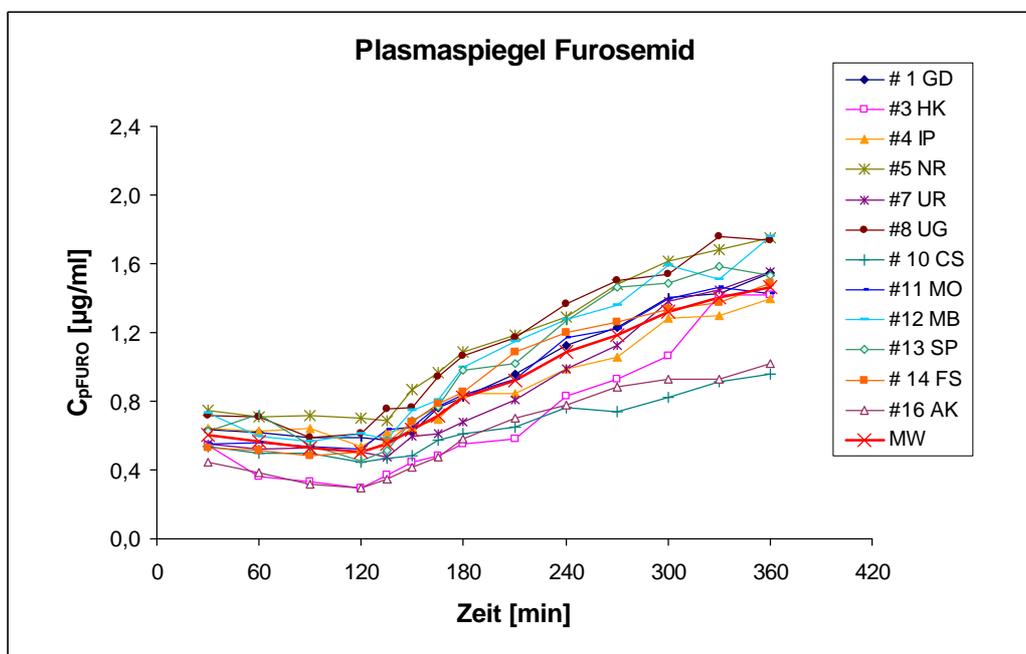


Abb. 4-2: Plasmaspiegelkurve für Furosemid – Studie I

### 4.2.2.3 Urinkonzentrationen von Bumetanid

Anhand der ermittelten Konzentrationen von Bumetanid im Urin pro gesammelter Zeitperiode wurden für alle 12 Probanden der klinischen Studie die Ausscheidungsrate errechnet (Abb. 4-3).

Nach 120 Minuten eines steady states ist bei allen Probanden eine Abnahme der Urinausscheidungsrate festzustellen. Der Abfall der Diuretikaexkretion in den Urin ist ab dem Zeitpunkt der Probenecidgabe, vier Sammlerperioden nach Beginn der Studie (120 min), zu vermerken.

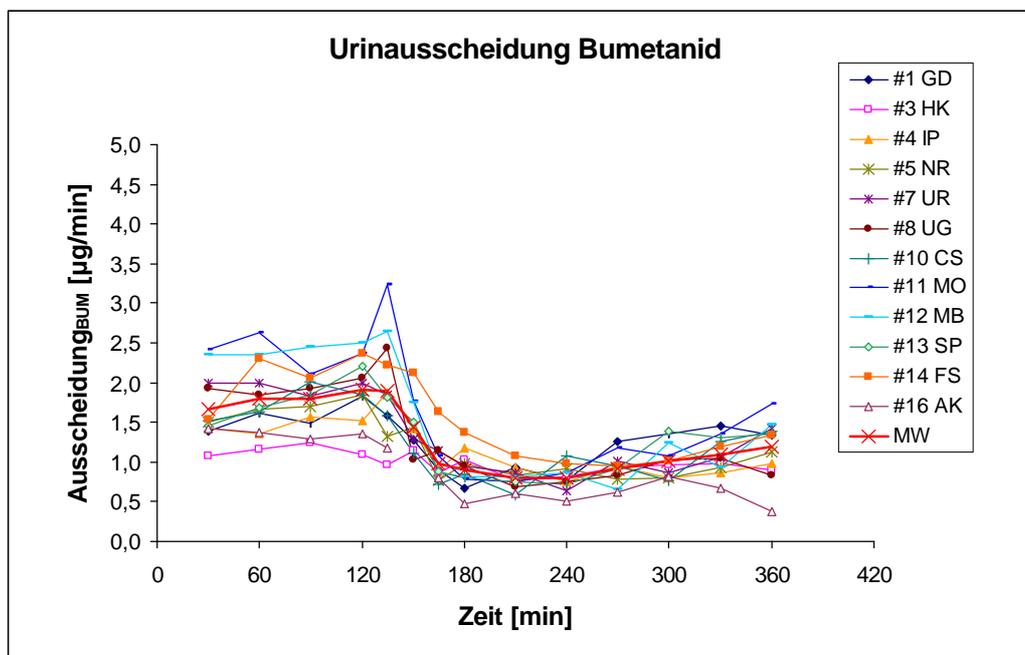


Abb. 4-3: Urinausscheidungsrate für Bumetanid – Studie I

Auch hier treten, wie bei den Plasmaspiegelkurven, interindividuelle Unterschiede in der Ausscheidungsrate auf. Ausgeprägte Schwankungen zwischen aufeinanderfolgenden Perioden (z.B. Proband 11-MO) sind am ehesten auf eine nicht vollständige Entleerung der Blase und damit auf ein in der nachfolgenden Periode falsch hohes Urinvolumen zurück-

zuführen. Dies spielt vor allem in den 15-Minuten-Perioden nach Gabe von Probenecid eine Rolle. Für die Ermittlung der Ausscheidungsraten gehen neben den Diuretikakonzentrationen auch die Zeitperiode und das Urinvolumen in die Berechnung mit ein. Falsch hohe Werte der Urinvolumina führen dann zu einer Fehlerpotenzierung und treten im Diagramm als auffällige Spitzen in Erscheinung.

Bei Proband 16-AK erfolgte keine Urinabgabe zum Zeitpunkt  $t = 150$  min. Für Parameter, bei denen die Zeitperioden zur Berechnung der Werte miteingehen, wurde für die darauffolgende Periode ein Zeitintervall von 30 min statt 15 min herangezogen (Intervall: 135 min – 165 min).

#### 4.2.2.4 Urinkonzentrationen von Furosemid

Mit Hilfe der chromatographischen Analyse (HPLC) wurden die Konzentrationen von Furosemid in den Urinproben der einzelnen Teilnehmer der klinischen Studie ermittelt. Unter Einbeziehung der Zeitperiode und des abgelesenen Urinvolumens können die Ausscheidungsraten in den Urin berechnet werden (Abb. 4-4).

Die einzelnen Kurvenverläufe weisen konstante Raten (steady state) für die ersten 120 Minuten auf. Nach der sodann erfolgten Gabe von Probenecid kommt es auch für Furosemid zu einer Abnahme der Ausscheidung in den Urin.

Auffällige Schwankungen in den Ausscheidungsraten aufeinanderfolgender Perioden (vgl. Proband 1-GD, Proband 8-UG) lassen auch hier eine unzureichende Entleerung der Blase vermuten (s. Kap. 4.2.2.3).

Bei Proband 4-IP konnte in zwei aufeinanderfolgenden Sammelperioden ( $t = 150, 165$  min) kein Urin erhalten werden. Für die Berechnung der nachfolgenden Periode wurde daher statt drei Zeitperioden zu 15 min ein Zeitintervall von 45 min eingesetzt.

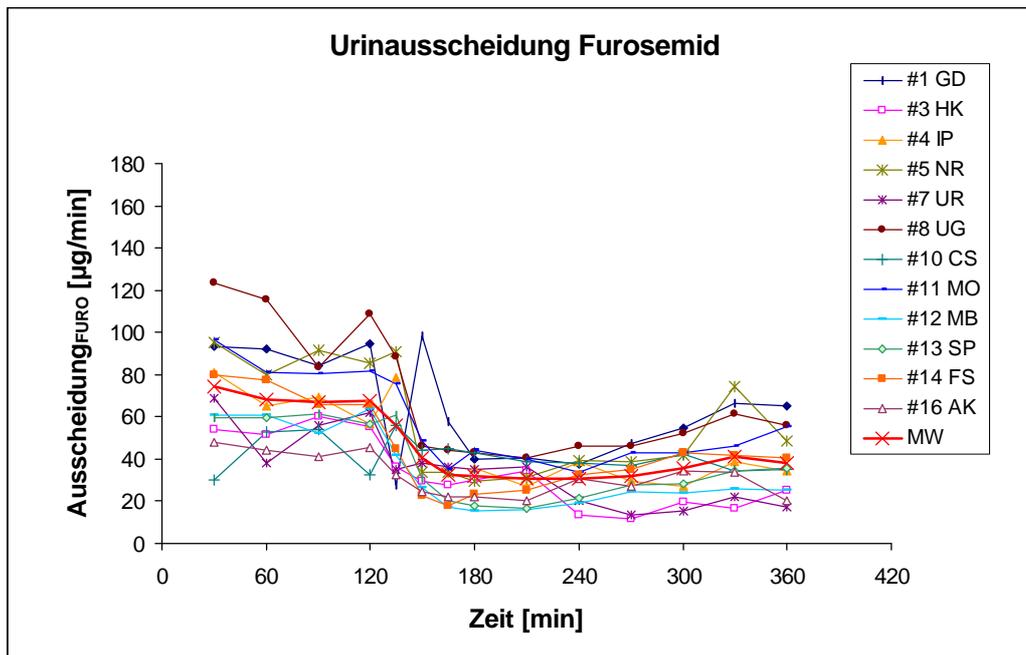


Abb. 4-4: Urinausscheidungsraten für Furosemid – Studie I

#### 4.2.2.5 Zusammenfassende pharmakokinetische Betrachtung

Nach einer einmaligen Bolusgabe zur Aufsättigung des Diuretikums führte die anschließende Dauerinfusion zu einem Gleichgewichtszustand der Konzentrationen in Plasma und Urin, dem „steady state“ (Tab. 4-2). Zur Berechnung der Basiswerte für die Steady-State-Konzentrationen in Plasma und Urin wurden die Werte aus den ersten vier Sammelperioden herangezogen und der Mittelwert gebildet.

Nach zwei Stunden Steady-State-Zustand wurde durch Gabe von Probenecid (2mg p.o.) eine fortschreitende Hemmung der tubulären Sekretion erreicht. Die Verabreichung von Probenecid zeigte Auswirkungen auf die Pharmakokinetik der Steady-State-Spiegel der Diuretika wie in Tab. 4-2 dargestellt.

Die Einnahme von Probenecid resultierte in einem zunehmenden Anstieg der Plasmakonzentrationen. Unter Bumetanid ist ein Anstieg um das  $1,9 \pm 0,48$ -fache und für Furosemid um das  $1,7 \pm 0,43$ -fache zu verzeichnen. Betrachtet man den Zeitverlauf bis zum Erreichen der maximalen Konzentration ( $C_{\max}$ ), so zeigen sich hier geringe Unterschiede für die beiden Diuretika. Unter Bumetanid-Infusion wurde nach  $165 \pm 61$  min das Konzentrationsmaximum erreicht, wohingegen bei Infusion von Furosemid dieses nach  $218 \pm 14$  min erreicht wurde.

Diese Differenz liegt unter anderem darin begründet, daß die Plasmaspiegel von Furosemid im Beobachtungszeitraum kontinuierlich ansteigen, wohingegen für Bumetanid, nach einem initial starkem Anstieg, nur noch eine geringe Zunahme der Plasmaspiegel beobachtet wurde. Dies ist vermutlich in der unterschiedlichen nichtrenalen bzw. biliären Elimination der beiden Arzneistoffe begründet (vgl. Kap. 3.1.2.1 und 3.1.2.2).

Als wichtiger erweist sich der nahezu übereinstimmende zeitliche Verlauf der beiden Substanzen bezüglich des Abfalls der Diuretikumausscheidung in den Urin. Zudem kommt es zu einer Abnahme der renalen Clearance. Die Abnahme findet sowohl für die Diuretikumausscheidung als auch für die renale Clearance in gleichem Ausmaß statt. Die Exkretion des Diuretikums wurde bei maximaler Hemmung um  $60 \pm 11\%$  (BUM) bzw.  $63 \pm 16\%$  (FURO) gesenkt, während die renale Clearance eine Abnahme um  $85 \pm 5,5\%$  für Bumetanid und  $82 \pm 6,8\%$  für Furosemid erfuhr. Trotz interindividueller Unterschiede, zeigte der intraindividuelle Vergleich der beiden Diuretika an den Untersuchungstagen eine durchgehende Übereinstimmung hinsichtlich des Abfalls der Exkretionsrate und der renalen Clearance. Die proximal-tubuläre Sekretion wurde bei beiden Substanzen im gleichen Ausmaß durch Probenecid inhibiert. Bei diesem intraindividuellen Vergleich traten keine statistischen Unterschiede auf. Die Werte sind in Tab. 4-2 protokolliert.

Tab. 4-2: Mittelwerte der pharmakokinetischen Parameter für Bumetanid und Furosemid im „steady state“ (oberes Feld) und nach Gabe von Probenecid (p.o.) (unteres Feld). \*  $p < 0,05$  vs. Furosemid

Ausgangswerte steady state		Bumetanid	Furosemid
$C_p$	ng( $\mu$ g)/ml	12,9 $\pm$ 2,23	0,54 $\pm$ 0,11
$E_{Diu}$	$\mu$ g/ml	1,80 $\pm$ 0,38	70,2 $\pm$ 20,4
$Cl_{Diu}$	ml/min	140 $\pm$ 19,8	130,1 $\pm$ 24,8
Nach Probenecid-Gabe		Bumetanid	Furosemid
delta $C_p$	%	180 $\pm$ 48	171 $\pm$ 43
Zeit	min	165 $\pm$ 61 *	218 $\pm$ 14
delta $E_{Diu}$	%	-60 $\pm$ 11,4	-63 $\pm$ 15,9
Zeit	min	100 $\pm$ 49	107 $\pm$ 57
delta $Cl_{Diu}$	%	-85 $\pm$ 5,5	-82 $\pm$ 6,8
Zeit	min	116 $\pm$ 50	143 $\pm$ 56

Die Konzentrations-Zeit-Kurven veranschaulichen die Änderungen der Konzentrationsverhältnisse auch optisch. Im Zeitraum 0-120 min ist für beide Diuretika in Plasma und Urin ein jeweils gleichmäßiger Kurvenverlauf – die Basislinie im „steady state“ – zu erkennen. Erst nach oraler Gabe von Probenecid werden die Änderungen in den Konzentrationsverläufen der Diuretika sowohl in Plasma wie auch in Urin deutlich. Die Pharmakokinetik von Bumetanid und Furosemid ist für Plasma und Urin jeweils in einem Diagramm (Abb. 4-5 bzw. Abb. 4-6) dargestellt und spiegelt den gegensätzlichen Verlauf der Kurven wider. Die Daten stellen Mittelwerte aller pro Zeitperiode erhaltenen Konzentrationswerte dar, die aus den Plasma und Urinproben der einzelnen Probanden ermittelt wurden.

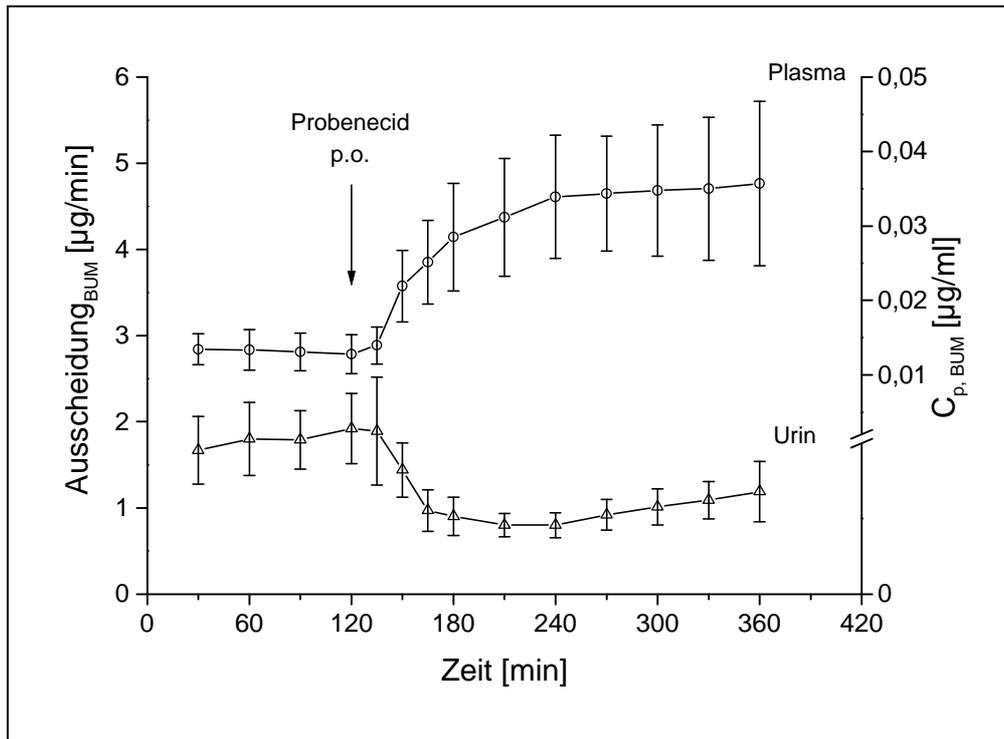


Abb. 4-5: Diagramm Pharmakokinetik Bumetanid – Studie I. Linke y-Achse: Bumetanidausscheidung im Urin. Rechte y-Achse: Plasmakonzentration von Bumetanid. Darstellung aus den Mittelwerten der zwölf Probanden. (o - Plasmakonzentration;  $\Delta$  - Urinausscheidung)

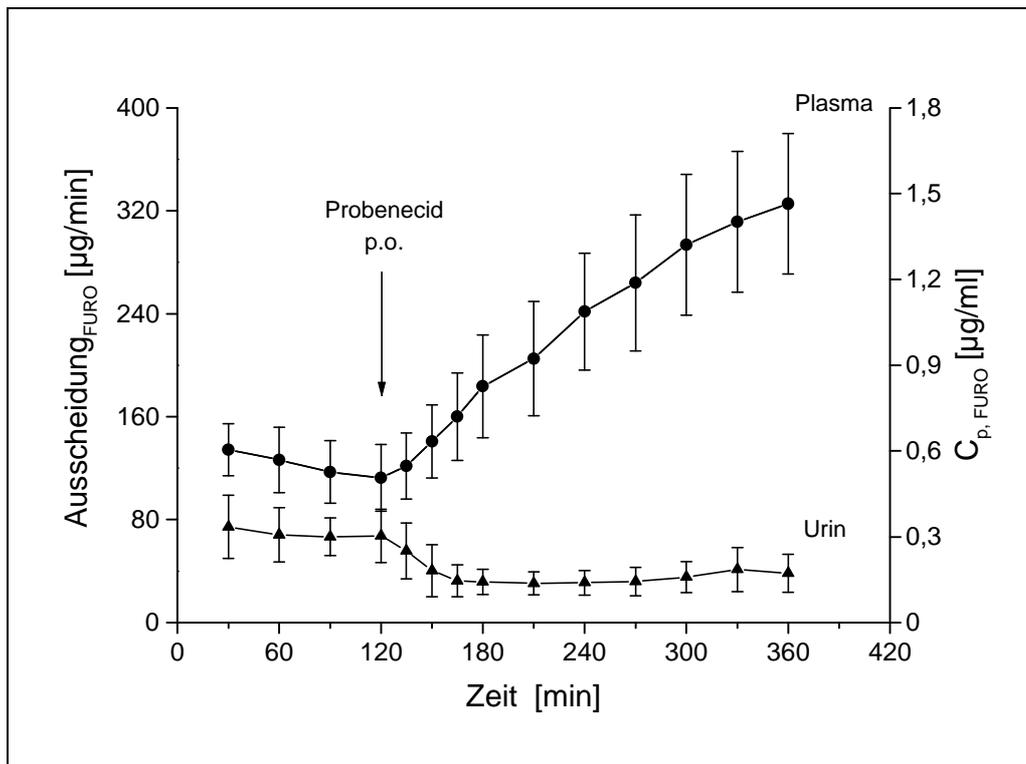


Abb. 4-6: Diagramm Pharmakokinetik Furosemid – Studie I. Linke y-Achse: Furosemidausscheidung im Urin. Rechte y-Achse: Plasmakonzentration von Furosemid. Darstellung aus den Mittelwerten der zwölf Probanden. (● = Plasmakonzentration; ▲ = Urinausscheidung)

## 4.2.3 Ergebnisse Pharmakodynamik

### 4.2.3.1 Renale Hämodynamik und Natriumausscheidung

Für die Steady-State-Ausgangswerte von GFR, Harnfluß, absoluter und fraktioneller Natriumausscheidung ergaben sich aufgrund der Dosistitration an den beiden Untersuchungstagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Diuretika. Die fraktionelle Natrium-

ausscheidung lag hierbei im Mittel bei  $10,0 \pm 1,7\%$  für Bumetanid und für Furosemid bei  $10,5 \pm 1,5\%$ . Die Ergebnisse der renalen Hämodynamik und der Natriuresis sind in Tab. 4-3 dargestellt.

Tab. 4-3: Wichtige Parameter der Steady-State-Ausgangswerte

Ausgangswerte steady state		Bumetanid	Furosemid
GFR	ml/min/1,73m <sup>2</sup>	$87 \pm 6,7$	$85 \pm 7,0$
HF	ml/min	$23,3 \pm 3,34$	$23,3 \pm 2,22$
E <sub>Na</sub>	mmol/min	$1,33 \pm 0,28$	$1,38 \pm 0,28$
FE <sub>Na</sub>	%	$10,0 \pm 1,7$	$10,5 \pm 1,5$

Nach Gabe von Probenecid wurde sowohl unter Bumetanid als auch unter Furosemid ein signifikanter Abfall der fraktionellen Natriumausscheidung deutlich. Bei einem vergleichbaren Grad der tubulären Sekretionshemmung des Diuretikums war jedoch der Abfall der fraktionellen Natriumausscheidung unter Furosemidgabe merklich stärker ausgeprägt als unter Bumetanid. Individuelle Daten für die Hemmung der Ausscheidungsrate der Diuretika wurden, aufgrund der interindividuell sehr unterschiedlichen Zeitverläufe, für den Vergleich der natriuretischen Antwort klassiert.

Der Zusammenhang zwischen Hemmung der Diuretikumausscheidung und dem Rückgang der fraktionellen Natriumausscheidung als Maß für den "Wirkungsverlust" ist in Abb. 4-7 gezeigt.

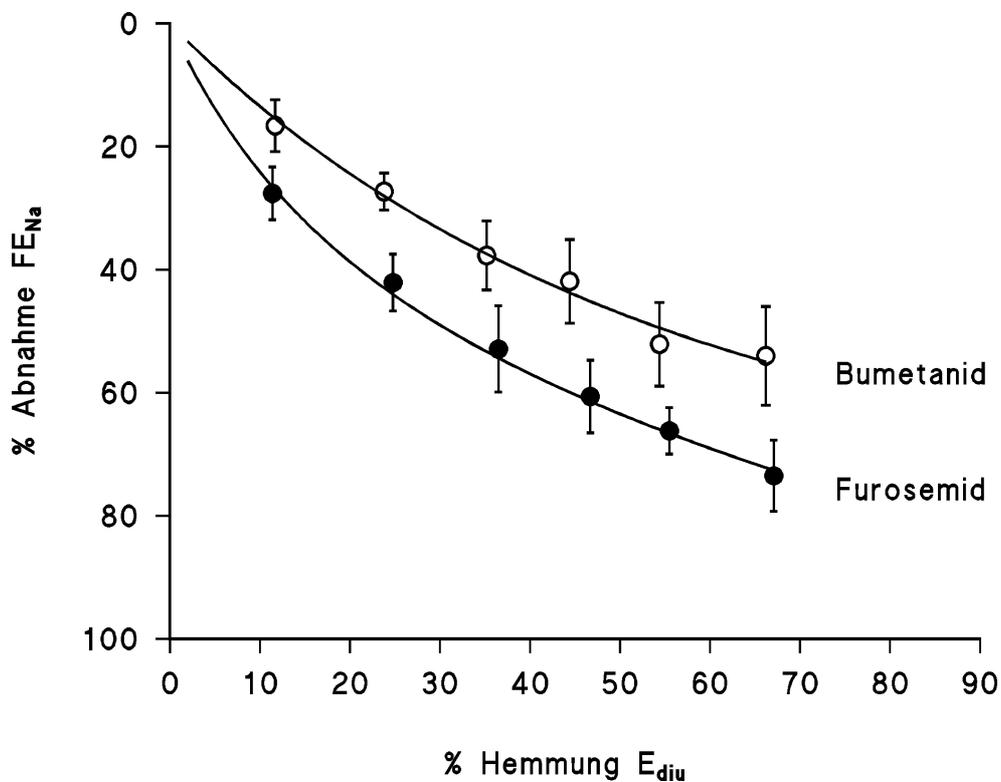


Abb. 4-7: Ergebnis der pharmakodynamischen Auswertung – Studie I: Darstellung der fraktionellen Natriumausscheidung (Abnahme in %) aufgetragen gegen die Sekretionshemmung des ausgeschiedenen Diuretikums.

Die gesamtnatriuretische Antwort erfährt eine Einschätzung über die kumulative Natriumausscheidung. Vergleicht man die kumulative Natriumausscheidung über die Zeitdauer von 4 Stunden nach Probenecid-einnahme, so werden auch hier Unterschiede zwischen den beiden Diuretika deutlich. Unter Infusion von Bumetanid war die kumulative Natriumausscheidung höher als unter Furosemid-Infusion ( $174 \pm 27$  vs.  $145 \pm 22$  mmol), wie in Abb. 4-8 dargestellt. Beim intraindividuellen Vergleich zeigte sich diese Differenz als signifikant unterschiedlich.

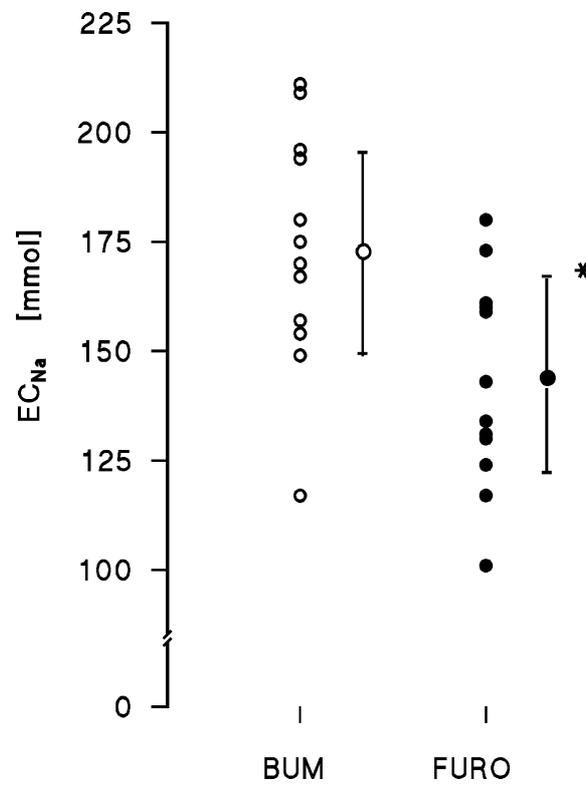


Abb. 4-8: Ergebnis der pharmakodynamischen Auswertung – Studie I: Kumulative Natriumausscheidung des jeweiligen Diuretikums als Darstellung der Einzelwerte und des Mittelwertes der Probanden. \*  $p < 0,05$  vs. BUM (gepaarter t-Test)

Über die „natriuretische Effizienz“ läßt sich die Wirksamkeit bzw. die natriuretische Wirkstärke der beiden Diuretika vergleichen und bewerten. Der Vergleich der natriuretischen Effizienz (berechnet als kumulative Natriumausscheidung pro Einheit [ $\mu\text{g}$ ] an ausgeschiedenem Diuretikum) zeigte nach Probenecidgabe für Bumetanid einen geringeren Wirkungsverlust als für Furosemid.

Unter Steady-State-Bedingungen betrug die natriuretische Effizienz für Bumetanid  $750 \pm 130 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$  und für Furosemid  $21 \pm 6,0 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ . Hieraus ergibt sich ein Effizienz-Verhältnis (Bumetanid zu Furosemid) von  $38,4 \pm 9,9$ . Bei maximaler Hemmung der Diuretikausscheidung ( $E_{\text{Diu}}$ ) zeigte sich ein Rückgang der natriuretischen Effizienz für Bumetanid auf  $660 \pm 120 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$  und für Furosemid auf  $14 \pm 4,0 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ . Die Berechnung des Effizienz-Verhältnisses (Bumetanid zu Furosemid) bei maximaler Sekretionshemmung ergibt nun  $49,0 \pm 9,6$ . Dies stellt eine Verschiebung zu Gunsten von Bumetanid dar.

## 4.3 Ergebnisse Studie II

### 4.3.1 Ausgangsparameter

Voraussetzung für die vergleichende Auswertung der pharmakologischen Daten der Studie sind äquivalente Rahmenbedingungen an beiden Tagen der Untersuchung. Hauptaugenmerk wurde hierbei auf eine ausgeglichene Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz der Patienten an den jeweils zwei vorausgegangenen Tagen gelegt.

#### 4.3.1.1 MAP, Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase

Vor jeder Untersuchung wurden der Blutdruck als Mittelwert aus drei aufeinanderfolgenden oszillometrischen Messungen im Abstand von zwei Minuten gemessen. Anhand der systolischen und diastolischen Werte wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) bestimmt. Der MAP-Wert der einzelnen Patienten unterschied sich an beiden Untersuchungstagen nicht signifikant.

Alle Patienten wiesen an beiden Studientagen eine ausgeglichene Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz auf. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Hämatokrits, der Plasmareninaktivität sowie der Aldosteronwerte. In Tab. 4-4 sind die Mittelwerte aller Patienten am Untersuchungstag unter der jeweiligen Vorbehandlung (Indapamid, Placebo) zusammengefaßt.

Die mittlere Natriumausscheidung in zwei aufeinanderfolgenden Sammelurinen betrug  $224,9 \pm 107,6$  (Placebo) und  $214,7 \pm 89,6$  mmol/24h (Indapamid).

Tab. 4-4: Ausgangsparameter vor Beginn der Studie am Untersuchungstag

Vor Untersuchung		Placebo	Indapamid
MAP	mmHg	98,2 ± 5,4	96,2 ± 6,7
Hk	%	41,2 ± 2,2	41,5 ± 1,8
PRA	ng <sub>Angl</sub> /ml/h	9,27 ± 8,30	9,65 ± 8,09
Aldosteron	pg/ml	78,5 ± 60,3	87,3 ± 48,9
E <sub>Na</sub>	mmol/24h	224,9 ± 107,6	214,7 ± 89,6

#### 4.3.1.2 Herzfunktion

Am Tag der Clearanceuntersuchung wurde die linksventrikuläre Herzfunktion (LVF) anhand einer Echokardiographie untersucht. Hierbei wurden die Ejektionsfraktion nach Teichholz (EF) sowie die Verkürzungsfraktion (FS) bestimmt. Die Komedikation mit Indapamid zeigte bei allen Patienten keinen Einfluß auf die linksventrikuläre Funktion. Die Daten sind in Tab. 4-5 zusammengestellt.

Tab. 4-5: Linksventrikuläre Funktion am Untersuchungstag

Vor Untersuchung		Placebo	Indapamid
EF	%	34,1 ± 4,0	34,7 ± 4,6
FS	%	17,4 ± 2,2	17,6 ± 2,5

## 4.3.2 Ergebnisse Pharmakokinetik

Es wurden die pharmakokinetischen Parameter von Furosemid nach 10-tägiger Vorbehandlung mit Indapamid (1,5 mg S.R.) oder Placebo untersucht. Voraussetzung für einen Vergleich der Furosemidkinetik an beiden Untersuchungstagen ist eine ausreichend hohe Blutspiegelkonzentration von Indapamid nach Vorbehandlung mit diesem Arzneistoff. Die Indapamid trough-level, vor Gabe der nächsten Indapamiddosis am Untersuchungstag selbst, sollten sich im therapeutischen Bereich befinden.

Analog zum Ergebnisteil der Studie I wird hier zunächst eine deskriptive Beschreibung der pharmakokinetischen Ergebnisse und sodann eine zusammenfassende Gegenüberstellung vorgenommen.

### 4.3.2.1 Indapamid

Bei allen Patienten wurden am Untersuchungstag die Blutspiegel über ein validiertes HPLC-Analyseverfahren zu Bestimmung von Indapamid aus Blut geprüft (s. Kap. 3.5.5). Es wurden zunächst die trough-level vor Gabe der nächsten Dosis zum Zeitpunkt  $t = 0$  min bestimmt. Es folgte die Bestimmung von Blutproben aus regelmäßigen Abnahmen bis 4 Stunden nach der ersten Gabe. Die Blutspiegelwerte für Indapamid liegen im Mittel als trough-level bei  $30,4 \pm 8,5$  ng/ml Blut und führen nach 4 Stunden zu einem Anstieg auf  $42,2 \pm 10,7$  ng/ml Blut.

Die trough-level aller Patienten befanden sich in einem Bereich, in dem in anderen Studien eine therapeutische Wirksamkeit gezeigt werden konnte ( $39,6 \pm 27,2$  ng/ml Blut [76] bzw.  $38 \pm 10$  ng/ml Blut [77]). Die nachfolgende Indapamidkinetik zeigt einen stetigen Anstieg der Blutspiegelkonzentrationen entsprechend einer Kinetik für verzögert freisetzende (sustained release) Tablettenformulierungen (Abb. 4-9).

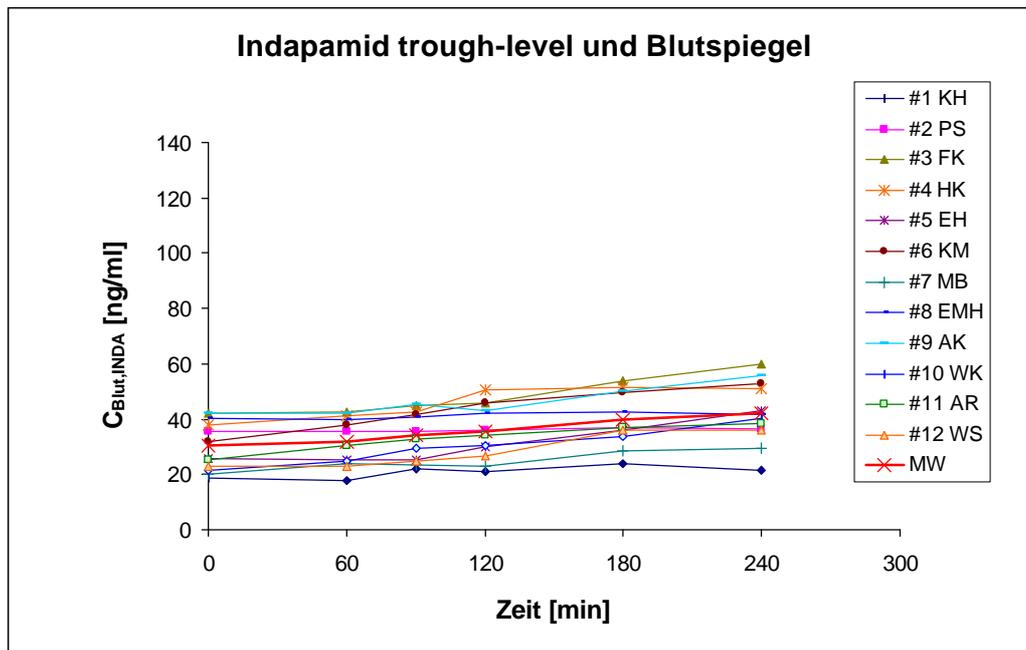


Abb. 4-9: Trough-level ( $t = 0$  min) und Blutspiegel von Indapamid – Studie II

#### 4.3.2.2 Furosemid Plasmakonzentrationen

Mit dem zuvor in Kap. 3.5.1 beschriebenen HPLC-Analyseverfahren wurden die Konzentrationen von Furosemid in den gewonnenen Plasmaproben ermittelt. Da für diese zweite Studie die Arbeitsbereiche geteilt wurden, erfolgte die Konzentrationsbestimmungen anhand zweier aufgestellter, validierter Kalibriergeraden.

Nach der Verabreichung eines Furosemid-Bolus (20 mg i.v.) erfährt Furosemid eine Elimination (Kinetik 1. Ordnung) aus dem Blutkompartiment. Die Konzentrationsverläufe in Plasma streben gegen Null.

Für alle Patienten konnte an beiden Untersuchungstagen nach Verabreichung der Furosemid-Infusion eine gleichartige Abnahme der Plasmakonzentrationen beobachtet werden (Abb. 4-10 und Abb. 4-11).

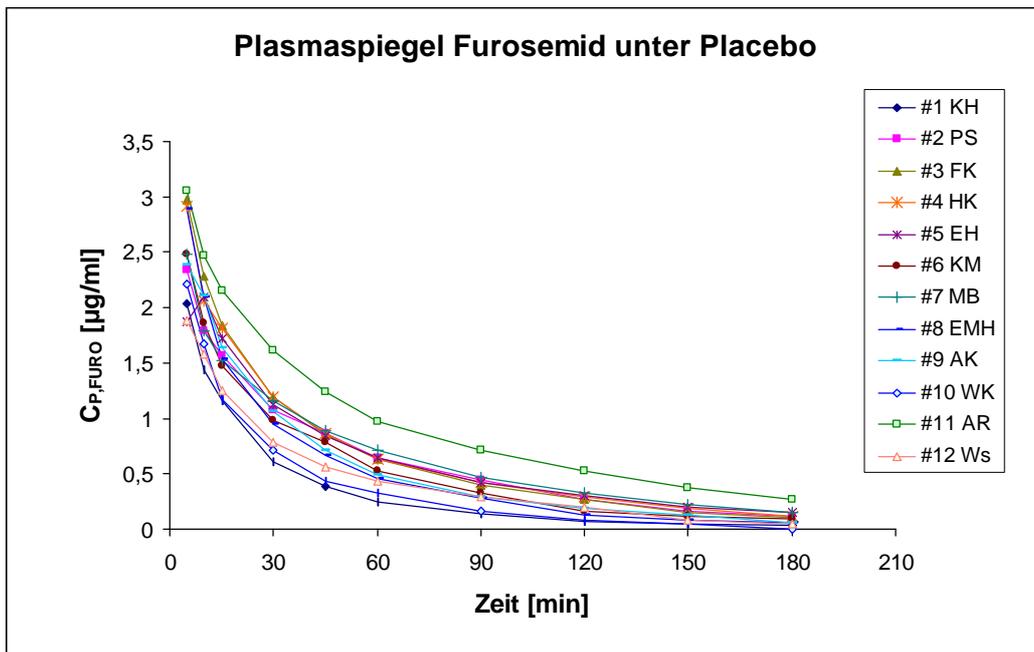


Abb. 4-10: Plasmaspiegelkurve für Furosemid unter Placebo-Vorbehandlung – Studie II

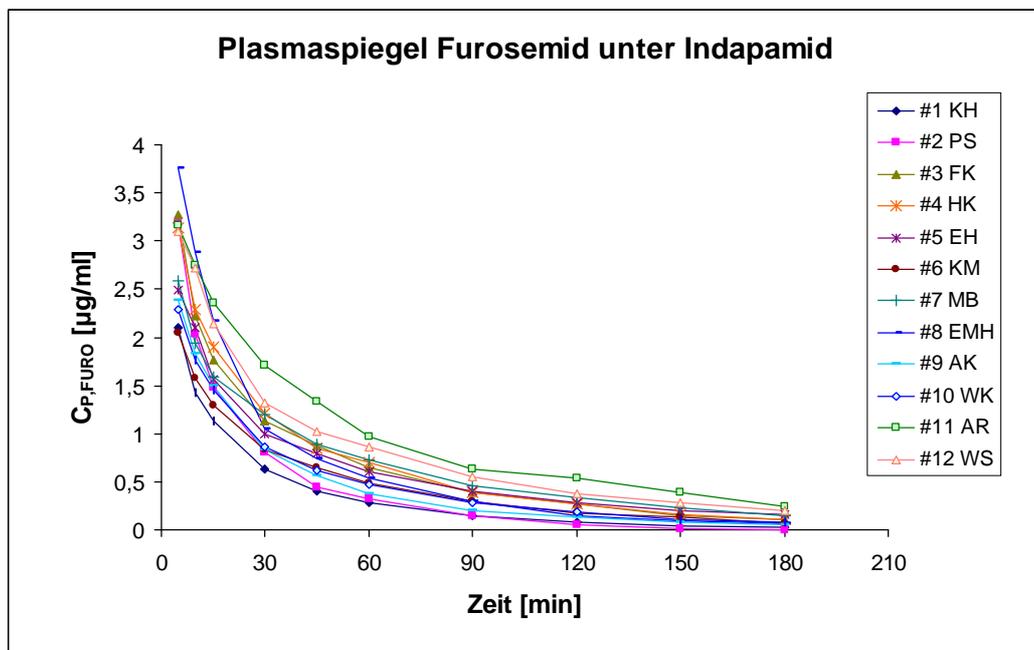


Abb. 4-11: Plasmaspiegelkurve für Furosemid unter Indapamid-Vorbehandlung – Studie II

### 4.3.2.3 Furosemid Urinkonzentrationen

Nach der quantitativen Bestimmung der Furosemidkonzentrationen im Urin wird die Ausscheidungsrate ( $E_{\text{Diu}}$ ) des Diuretikums ermittelt. Gemäß der einmaligen Bolusgabe von Furosemid, lassen die Urinausscheidungsrate über das Zeitintervall von 3 Stunden eine deutliche Abnahme erkennen. Für die Urinausscheidungsrate über die Zeit läßt sich für alle Patienten an beiden Untersuchungstagen ein gleicher Kurvenverlauf feststellen. Intraindividuelle Abweichungen sind am ehesten auf eine unvollständige Entleerung der Blase in der jeweiligen Sammelperiode zurückzuführen.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die zeitlichen Verläufe der Urinausscheidungsrate aller Patienten an beiden Untersuchungstagen unter der jeweiligen Vorbehandlung (Indapamid oder Placebo) dargestellt (Abb. 4-12 und Abb. 4-13).

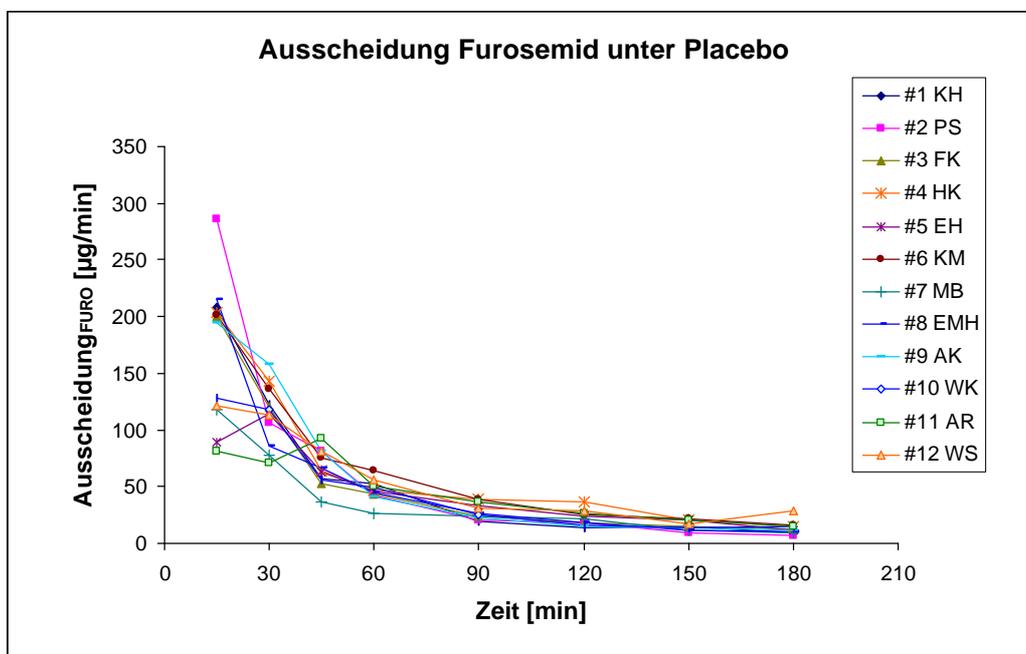


Abb. 4-12: Urinausscheidung für Furosemid unter Placebo-Vorbehandlung – Studie II

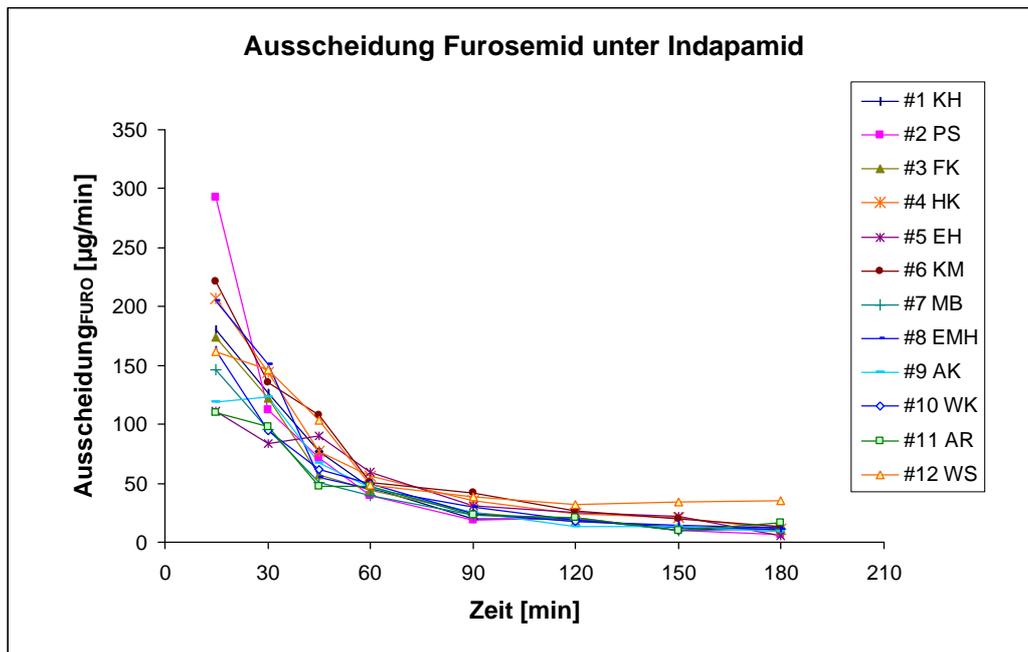


Abb. 4-13: Urinausscheidung für Furosemid unter Indapamid-Vorbehandlung – Studie II

#### 4.3.2.4 Zusammenfassende pharmakokinetische Betrachtung

Vergleicht man die Furosemidkinetik an beiden Untersuchungstagen, jeweils nach 10-tägiger Indapamid- bzw. Placebo-Vorbehandlung, so zeigen sich keine Unterschiede im Verlauf der Plasmaspiegel. Wie im Diagramm dargestellt, zeigen die beiden Plasmaspiegelkurven (gebildet aus den Mittelwerten der Einzelkurven am jeweiligen Behandlungstag) einen nahezu übereinstimmenden Fortgang (Abb. 4-14).

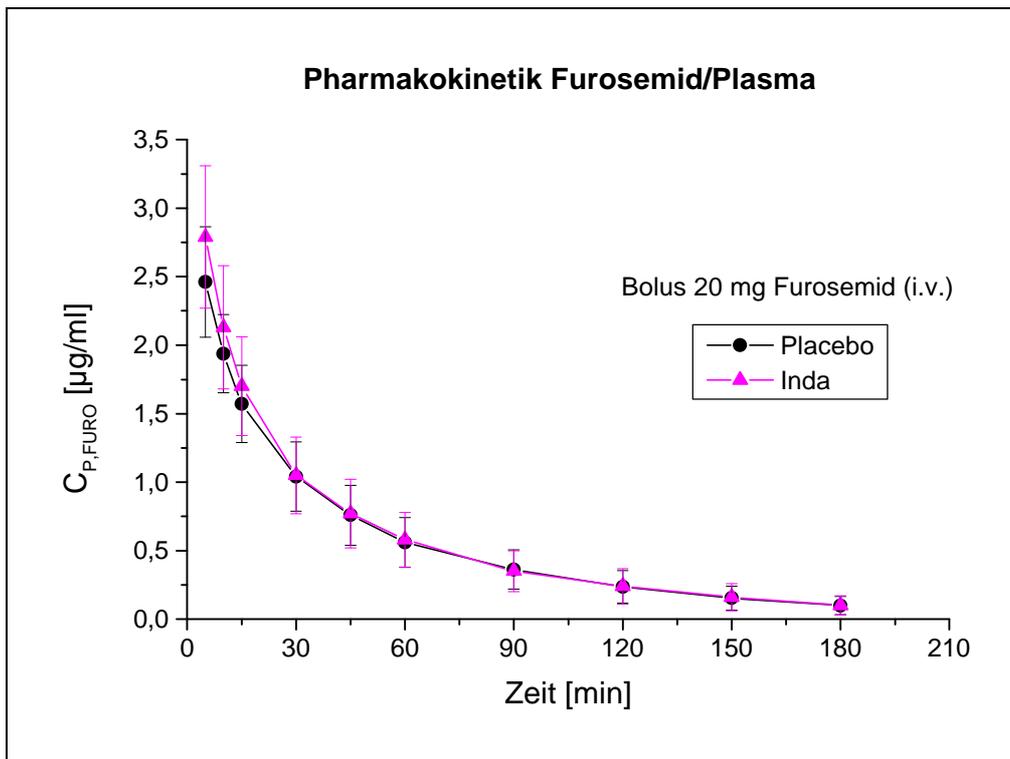


Abb. 4-14: Gesamtpharmakokinetische Auswertung – Studie II: Plasmaspiegelkurve von Furosemid unter Placebo- und Indapamid-Vorbehandlung. Darstellung der Mittelwerte aller Patienten an den beiden Untersuchungstagen. (● = Furosemidkinetik unter Placebo-Vorbehandlung; ▲ = Furosemidkinetik unter Indapamid-Vorbehandlung)

Anhand der Plasmaspiegelkurven wurden verschiedene pharmakokinetische Parameter bestimmt, die einen Vergleich der Furosemidkinetiken an beiden Untersuchungstagen zulassen. Tab. 4-6 stellt die ermittelten pharmakokinetischen Daten von Furosemid unter Indapamid- und Placebo-Vorbehandlung als Mittelwerte der Patientenbefunde dar. Die Zahlenpaare für  $c_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $AUC_{0-180}$ ,  $V_d$  und der renalen Clearance  $Cl_{\text{renal}}$  lagen jeweils im gleichen Größenordnungsbereich.

Tab. 4-6: Pharmakokinetische Parameter von Furosemid in Plasma

Pharmakokinetische Parameter		Furosemid in Plasma	
		Placebo	Indapamid
$C_{\max}$	$\mu\text{g/ml}$	$2,44 \pm 0,35$	$2,81 \pm 0,62$
$t_{\max}$	min	$2,9 \pm 0,63$	$2,76 \pm 0,54$
$t_{1/2}$	min	$25,8 \pm 7,5$	$23,0 \pm 7,0$
$AUC_{0-180}$	$\mu\text{g/ml/min}$	$101,3 \pm 28,5$	$106,1 \pm 31,3$
Vd	l	$8,34 \pm 1,14$	$7,43 \pm 1,57$
$Cl_{\text{renal}}$	ml/min	$243,0 \pm 82,5$	$241,42 \pm 79,3$

Ein Vergleich der pharmakokinetischen Kenngrößen von Furosemid in Plasma ergab an beiden Untersuchungstagen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der unterschiedlichen Komedikation.

Die gleichzeitige Verabreichung von Indapamid hatte somit keinen Einfluß auf die Pharmakokinetik von Furosemid im Plasma.

Des weiteren zeigte Indapamid verglichen mit Placebo keinen Einfluß auf die tubuläre Sekretion von Furosemid in den Urin. Eine Gegenüberstellung der mittleren Furosemid-Ausscheidungsraten an beiden Tagen der Behandlung ließ hier ebenfalls eine annähernde Übereinstimmung der Kurvenverläufe erkennen (Abb. 4-15).

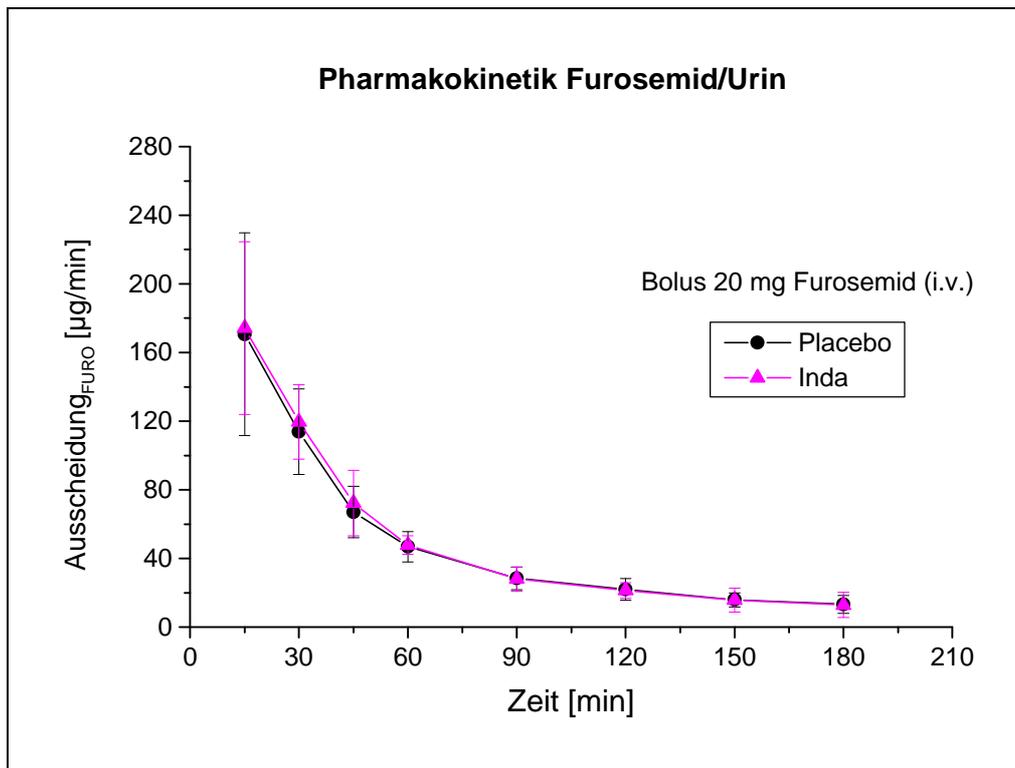


Abb. 4-15: Gesamtpharmakokinetische Auswertung – Studie II: Urinausscheidung von Furosemid unter Placebo- und Indapamid-Vorbehandlung. Darstellung der Mittelwerte aller Patienten an den beiden Untersuchungstagen. (● = Furosemidkinetik unter Placebo-Vorbehandlung; ▲ = Furosemidkinetik unter Indapamid-Vorbehandlung)

Unterstützt wird diese Aussage durch den Vergleich der kumulativen Diuretikausscheidung und der renalen Elimination von Furosemid unter Indapamid- bzw. unter Placebobehandlung: auch hier gibt es kaum Abweichungen zwischen den Zahlenpaaren an den beiden Untersuchungstagen. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-7 als Mittelwerte der von den einzelnen Patienten gewonnenen Daten dargestellt.

Tab. 4-7: Pharmakokinetische Parameter von Furosemid in Urin

Pharmakokinetische Parameter		Furosemid in Urin	
		Placebo	Indapamid
EC <sub>FURO</sub>	mg/3h	8,36 ± 1,27	8,55 ± 1,49
Renale Elimination	%	41,8 ± 6,35	42,8 ± 7,45

### 4.3.3 Ergebnisse Pharmakodynamik

#### 4.3.3.1 Renale Hämodynamik

Ein Vergleich der Meßgrößen der renalen Hämodynamik weist Veränderungen unter Indapamidbehandlung auf. Betrachtet man die Mittelwerte von glomerulärer Filtrationsrate (GFR), renalem Plasmafluß (RPF) und Filtrationsfraktion (FF) nach Indapamid-Vorbehandlung, so liegen die erhaltenen Werte höher als unter Placebogabe.

Für die Ausgangswerte dieser Parameter wurden bei allen Patienten intraindividuell die Differenzen zwischen den beiden Untersuchungstagen errechnet und verglichen. In Tab. 4-8 sind die hieraus erhaltenen Änderungen der jeweiligen Meßgröße absolut und in Prozent dargestellt.

Es ergab sich hierbei unter Indapamid im Vergleich zu Placebo eine signifikante Zunahme der GFR um  $9,0 \pm 3,0\%$  und des RPF um  $15,3 \pm 6,7\%$ , bei nur gering angestiegener Filtrationsfraktion ( $dFF = 1,2 \pm 1,1\%$ ). Zugleich kam es zu einem Rückgang des renovaskulären Widerstandes (RVR) von  $9,9 \pm 2,0$  auf  $8,3 \pm 1,4$   $\text{kdyn}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$ .

Tab. 4-8: Parameter der renalen Hämodynamik nach 10-tägiger Vorbehandlung von Indapamid bzw. Placebo. \*  $p < 0,05$  vs. Placebo

Parameter der renalen Hämodynamik		Placebo	Indapamid
GFR	ml/min/1,73m <sup>2</sup>	88,3 ± 8,8	96,1 ± 8,5
RPF	ml/min/1,73m <sup>2</sup>	430 ± 77	492 ± 70
FF	%	19,7 ± 1,5	20,9 ± 2,2
RVR	kdyn·s·cm <sup>-5</sup>	9,9 ± 2,0	8,3 ± 1,4
Intraindividueller Vergleich			
dGFR	ml/min/1,73m <sup>2</sup>	7,9 ± 2,4 *	
dGFR	%	9,0 ± 3,0 *	
dRPF	ml/min/1,73m <sup>2</sup>	62 ± 20 *	
dRPF	%	15,3 ± 6,7 *	
dFF	% (abs.)	-1,2 ± 1,1 *	
dRVR	kdyn·s·cm <sup>-5</sup>	-1,57 ± 1,0 *	
dRVR	%	-15,2 ± 8,1 *	

Die Änderungen, die sich beim intraindividuellen Vergleich der Parameter der renalen Hämodynamik unter Indapamid gegenüber Placebo-behandlung ergaben, sind in Form eines Säulendiagrammes in Abb. 4-16 dargestellt.

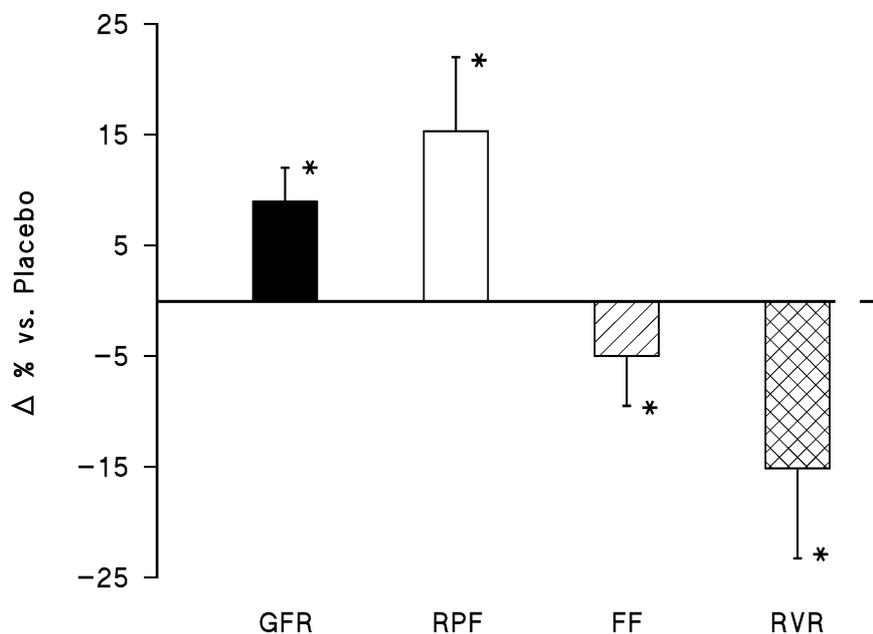


Abb. 4-16: Parameter der renalen Hämodynamik. Graphische Darstellung der prozentualen Veränderungen unter Indapamid im Vergleich zu Placebo nach 10-tägiger Vorbehandlung.  
\*  $p < 0,05$  vs. Placebo

### 4.3.3.2 Natriurese

Zur Beschreibung der natriuretischen Antwort wurden absolute, fraktionelle sowie kumulative Natriumausscheidung und die natriuretische Effizienz herangezogen.

Bei Betrachtung dieser, die Natriurese beschreibenden Kenngrößen können auch hier, im Vergleich zu Placebo, signifikante Unterschiede unter Indapamideinnahme beobachtet werden.

Erstellt man für jeden Patienten die Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Ausscheidungsrate des Diuretikums und der fraktionellen Natriumausscheidung, so lassen sich aus den individuellen Fits die Werte für halbmaximale Wirkung ( $EC_{Diu50}$ ) und maximale fraktionelle Natriumausscheidung ( $FENa_{max}$ ) errechnen (s. Tab. 4-9).

Tab. 4-9: Parameter der Natriurese unter 10-tägiger Vorbehandlung von Indapamid bzw. Placebo. \*  $p < 0,05$  vs. Placebo

Parameter der Natriurese		Placebo	Indapamid
$EC_{Diu50}$	$\mu\text{g}/\text{min}$	$80,1 \pm 17,8$	$61,7 \pm 10,2^*$
$FENa_{max}$	% (fit)	$13,5 \pm 1,9$	$16,4 \pm 2,7^*$
$EC_{Na}$	mmol	$110,3 \pm 26,9$	$131,4 \pm 24,9$
$EC_{Na/Diu}$	mmol/mg	$13,3 \pm 3,4$	$15,8 \pm 4,3$
Intraindividueller Vergleich			
$dFENa_{max}$	%	$2,9 \pm 2,5^*$	
$dEC_{Na}$	%	$18,43 \pm 16,37^*$	
$dEC_{Na/Diu}$	%	$18,4 \pm 6,4^*$	

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung unter Indapamid und Placebo ist zudem als Summenfit aller Patienten in halblogarithmischer Darstellung in Abb. 4-17 sowie in der klassischen doppellogarithmischen Form (Brater-Plot) in Abb. 4-18 wiedergegeben. Hier zeigt sich deutlich die Linksverschiebung der Kurve unter Indapamid, als Zeichen eines verbesserten Ansprechens und erhöhter Sensitivität, sowie eine signifikante Zunahme

der  $FENa_{max}$  (Plateau der Kurve) als Maß für die intrinsische Aktivität. Der relative Anstieg der  $FENa_{max}$  beträgt dabei 23%. Die zugehörigen Absolutwerte sind in Tab. 4-9 angegeben.

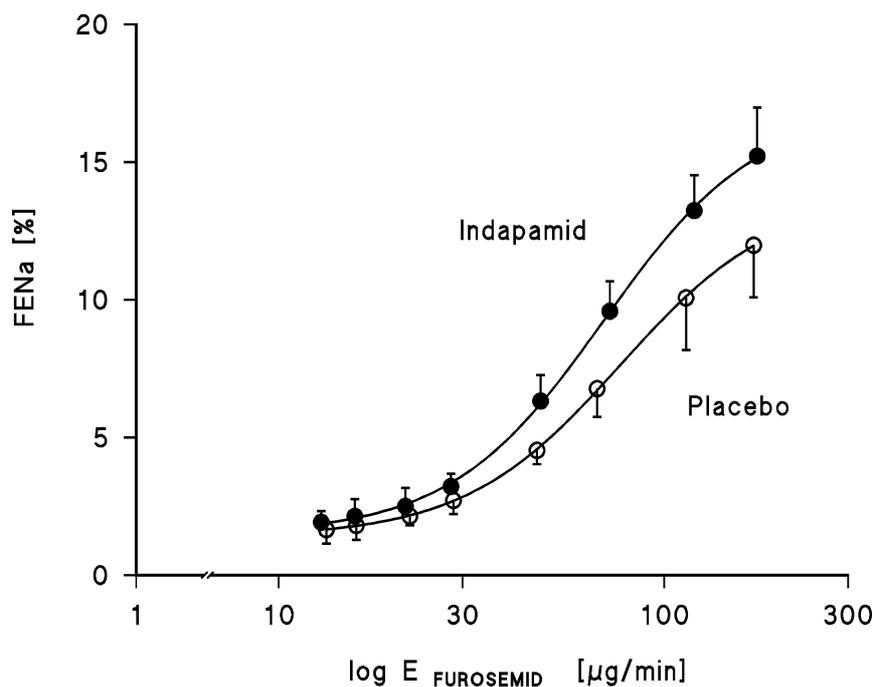


Abb. 4-17: Ergebnis der pharmakodynamischen Auswertung (halblogarithmische Darstellung) – Studie II: Darstellung der fraktionellen Natriumausscheidung (%) aufgetragen gegen die Ausscheidung von Furosemid in den Urin (µg/min). Summenfit aller Einzelwerte.

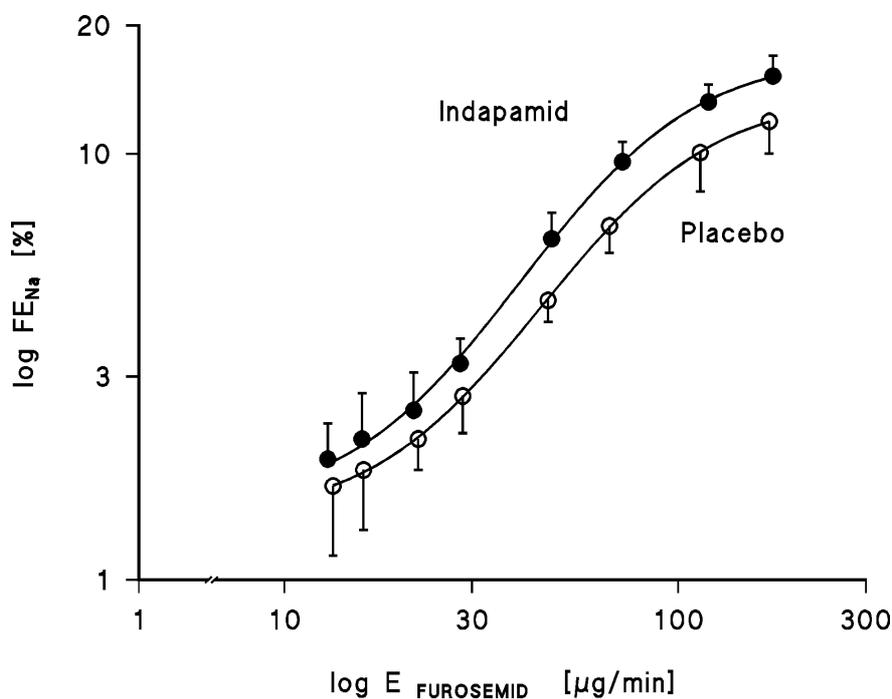


Abb. 4-18: Ergebnis der pharmakodynamischen Auswertung (doppellogarithmische Darstellung) – Studie II: Darstellung der fraktionellen Natriumausscheidung (%) aufgetragen gegen die Ausscheidung von Furosemid in den Urin ( $\mu\text{g}/\text{min}$ ). Summenfit aller Einzelwerte.

Hinsichtlich der kumulativen Natriumausscheidung ( $\text{EC}_{\text{Na}}$ ) und der natriuretischen Effizienz ( $\text{EC}_{\text{Na/Diu}}$ ) wurden unter Indapamid-Vorbehandlung ebenfalls höhere Werte verzeichnet (vgl. Abb. 4-19). An den beiden Untersuchungstagen wurde hierbei bei allen Patienten für  $\text{EC}_{\text{Na}}$  eine durchschnittliche Zunahme um  $20,6 \pm 11,7\%$  und für  $\text{EC}_{\text{Na/Diu}}$  um  $18,4 \pm 6,4\%$  festgestellt. Die genannten Größen sind in Tab. 4-9 aufgeführt.

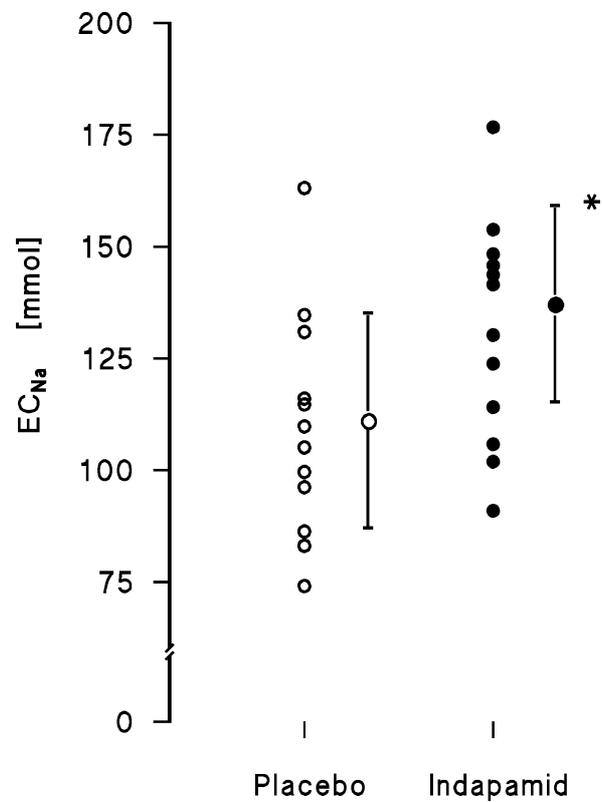


Abb. 4-19: Ergebnis der pharmakodynamischen Auswertung – Studie II: Kumulative Natriumausscheidung auf Bolus von Furosemid nach Vorbehandlung (10 Tage) mit Placebo bzw. Indapamid. Darstellung der Einzelwerte und des Mittelwertes der Patienten. \*  $p < 0,05$  vs. Placebo (gepaarter t-Test)



## 5 Diskussion und Schlußfolgerung

### A Klinisch

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue therapeutische Ansätze zur Verbesserung der Wirksamkeit von Schleifendiuretika bei Diuretikaresistenz zu entwickeln. In Abhängigkeit von dem der verminderten Diuretikawirkung zugrundeliegenden Pathomechanismus wurde hierbei entweder ein pharmakokinetischer oder -dynamischer Ansatz gewählt.

Bei chronischer Niereninsuffizienz ist die diuretische Wirkung durch eine verminderte Zahl funktionsfähiger Nephren und eine Reduktion der tubulären Sekretionskapazität verringert, wohingegen das Ansprechen der verbleibenden Nephren auf Diuretika unverändert erhalten ist. Mit zunehmender Niereninsuffizienz muß die Dosis des Diuretikums fortlaufend gesteigert werden, damit ausreichende Mengen an Wirkstoff in den Tubulus gelangen. Dies ist jedoch nur über einen gewissen Dosisbereich zweckmäßig (s. Kap. 2.1.1, Abb. 2-2) und mit der zunehmenden Gefahr von Nebenwirkungen vergesellschaftet.

Im Rahmen der ersten Studie sollte nun am Modell der pharmakokinetischen Diuretikaresistenz mit eingeschränkter tubulärer Sekretionskapazität untersucht werden, inwiefern substanzspezifische Eigenschaften einen Einfluß auf die gesamtnatriuretische Antwort von Schleifendiuretika haben. Zu diesem Zweck wurden intraindividuell das Wirkprofil und die natriuretische Effizienz einer kontinuierlichen Infusion von Bumetanid oder Furosemid, vor und während einer zunehmenden Hemmung der tubulären Sekretion durch Probenecid, verglichen.

Durch diesen Ansatz war es möglich, für die jeweilige Substanz den Anteil der pharmakokinetischen und -dynamischen Veränderungen an der natriuretischen Wirkung getrennt und über einen weiten Bereich der eingeschränkten tubulären Sekretionskapazität zu vergleichen.

Durch die kontinuierliche Infusion beider Diuretika, wie sie klinisch auch in der Behandlung einer akuten hydropischen Dekompensation eingesetzt wird, konnten Unterschiede in Bioverfügbarkeit und Resorption ausgeklammert werden. Die Infusionsraten wurden individuell so angepaßt, daß unter Ausgangsbedingungen eine halbmaximale Wirkung mit einer fraktionellen Natriumausscheidung von etwa 10% erreicht wurde. Flüssigkeits- und Elektrolytverluste wurden fortlaufend ersetzt, so daß über die gesamte Studie ein ausgeglichener Natrium- und Flüssigkeitshaushalt aufrechterhalten wurde.

Um die natriuretische Antwort der beiden Schleifendiuretika zu beurteilen, wurde die natriuretische Wirksamkeit (Effizienz – „efficiency“) als charakterisierende Größe herangezogen. Dieses Konzept beschreibt die Wirkung einer Substanz pro Einheit der am Wirkort vorliegenden Substanzmenge – so in diesem Fall die Natriumausscheidung pro Einheit des in den Urin sezernierten Diuretikums [78].

Das mathematische Modell basiert auf der sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Beziehung der Schleifendiuretika und ist von den gleichen Determinanten abhängig (s. Kap. 2.1.1, Abb. 2-2). Der sigmoidale Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve beinhaltet, daß ab einem bestimmten Konzentrationsbereich eine weitere Erhöhung der Diuretikakonzentration zu einer im Anstieg geringeren Zunahme der natriuretischen Wirkung führt (Plateauphase). Dies bedeutet, daß die maximale Effizienz in der Regel in einem Konzentrationsbereich erzielt wird, der unterhalb der Dosis liegt, die zu einer halbmaximalen Wirkung (Wendepunkt der Kurve) führt.

Bei Patienten mit Diuretikaresistenz ist die Berechnung der natriuretischen Effizienz eine effektive Methode, um die Dosis und das Dosierungsintervall des Diuretikums so anzupassen, daß für den Patien-

ten eine maximale kumulative Natriumausscheidung bei zugleich minimierten Nebenwirkungen erhalten wird.

Als Kernaussagen dieser ersten Studie lassen sich festhalten:

(i) Die Hemmung der tubulären Sekretionskapazität durch Probenecid führte zu einer in Ausmaß und Zeitverlauf vergleichbaren Reduktion der Ausscheidungsraten von Bumetanid und Furosemid. (ii) Unabhängig vom Grad der Sekretionshemmung wurde unter Bumetanid eine höhere fraktionelle Natriumausscheidung als unter Furosemid beobachtet. (iii) Die natriuretische Effizienz von Bumetanid und Furosemid wird durch eine Einschränkung der tubulären Sekretionskapazität in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst. (iv) Diese Unterschiede beruhen vermutlich auf substanzspezifischen Bindungseigenschaften am  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporter.

Schleifendiuretika müssen im proximalen Tubulus aktiv sezerniert werden, um ihren Wirkort an der luminalen Tubulusmembran zu erreichen [79]. Die Aufnahme aus den peritubulären Kapillaren über den organischen Anionentransporter (OAT) in die basolaterale Membran der Tubuluszelle ist ein aktiver Transportprozeß, der kompetitiv hemmbar ist [80], [81]. Einige dieser multispezifischen organischen Anionentransporter sind inzwischen kloniert [82], [83].

Unter experimentellen Bedingungen zeigen diese OAT Transportraten mit  $K_m$ -Werten (halbmaximale Transportraten) im unteren mikromolaren Bereich [84] und arbeiten damit unter physiologischen Bedingungen weit unterhalb der Sättigungsgrenze. Vergleichenden Daten bezüglich Affinität und Transportkinetik von Schleifendiuretika am OAT existieren bisher nicht. Bumetanid und Furosemid zeigen jedoch eine vergleichbare halbmaximale Hemmkonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) für den Transport der Modellsubstanz Paraaminohippursäure (PAH) [85], [86], so daß indirekt auf eine ähnliche Bindungs- und Transportcharakteristik von Bumetanid und Furosemid am OAT geschlossen werden kann.

Die in dieser Studie unter Ausgangsbedingungen beobachtete Clearance von Bumetanid und Furosemid sowie die Wiederfindungsraten des unveränderten Arzneistoffs im Urin stimmen mit Literaturangaben aus Studien am Gesunden überein [87] – [90]. Probenecid führt konzentrationsabhängig zu einer Reduktion der Ausscheidungsrate beider Diuretika; vergleichbar in Ausmaß und zeitlichem Verlauf. Trotz eines 40fachen Konzentrationsunterschiedes in den peritubulären Kapillaren, wurde die proximal-tubuläre Sekretion beider Substanzen in vergleichbarem Ausmaß inhibiert (vgl. Kap. 4.2.2.5).

Dies spricht zunächst gegen Vorteile von Schleifendiuretika mit größerer Wirkstärke (wie z.B. Bumetanid) bei eingeschränkter tubulärer Sekretionskapazität und steht im Gegensatz zu Schlußfolgerungen anderer Autoren, die eine unterschiedliche tubuläre Transportkapazität für Bumetanid und Furosemid vermutet haben [4].

Bei vergleichbarer Hemmung der Diuretikaausscheidung ( $E_{\text{Diu}}$ ) erzielt Bumetanid jedoch durchgehend eine höhere fraktionelle Natriumausscheidung ( $FE_{\text{Na}}$ ) als Furosemid. Dieser Unterschied war bei niedriger Diuretika-Ausscheidungsrate stärker ausgeprägt (vgl. Kap. 4.2.3.1, Abb. 4-7). Die kumulative Natriumausscheidung lag unter Bumetanid im Vergleich zu Furosemid zu jedem Zeitpunkt signifikant höher. Da sich pharmakokinetisch zwischen den beiden Diuretika keine Unterschiede ergeben, d.h. sich deren Konzentrationsverhältnis im Urin nicht ändert, ist dies nur durch einen Unterschied in der intratubulären Wirkung zu erklären.

In der Henle'schen Schleife blockieren Schleifendiuretika den Natriumtransport durch Bindung an der Chlorid-Bindungsstelle des  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporters [91], [92]. Die Wirkung von Bumetanid und Furosemid ist *in vitro* in verschiedenen experimentellen Ansätzen verglichen worden. Im Nierengewebe weist Bumetanid im Vergleich zu Furosemid eine auf Basis molarer Konzentrationen etwa 15 – 100fach höhere Affinität am  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporter auf [93] – [95]. Diese höhere

Affinität trägt auch zu der erhöhten Spezifität, wie sie für Bumetanid bei diesen Experimenten beobachtet wurde, bei.

Unter klinischen Bedingungen können jedoch nur indirekte Hinweise auf die Affinität am humanen  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -Kotransporters gewonnen werden.

In der vorliegenden Studie gelangten pro Zeiteinheit durchgehend vergleichbare Mengen beider Diuretika in den Urin. Mögliche Unterschiede in der natriuretischen Wirkung können somit nur durch intratubuläre Mechanismen, wie eine unterschiedliche Affinität am  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -Kotransporter bedingt sein. Während in einigen früheren Studien eine zusätzliche Wirkung von Bumetanid im proximalen Tubulus postuliert wurde [7], [96], ergaben sich hierfür in der vorliegenden Untersuchung keine Hinweise.

Es ist somit wahrscheinlich, daß die beobachteten Unterschiede in der natriuretischen Effizienz nicht durch eine erleichterte Sekretion von Bumetanid in den Urin bedingt sind, sondern durch eine höhere Affinität von Bumetanid am  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ -Kotransporter. Die klinische Relevanz dieser Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden.

Unterschiedliche Studien haben in der Vergangenheit die Wirksamkeit von Bumetanid und Furosemid bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz verglichen. Voelker et al. [97] haben bei diesen Patienten für eine vergleichbare Wirkung ein Dosis-Verhältnis von etwa 20:1 (Bumetanid/Furosemid) beschrieben. Dies war jedoch primär durch eine Zunahme der nichtrenalen Elimination von Bumetanid bedingt, so daß im Vergleich zu Furosemid nur etwa die Hälfte der verabreichten Substanzmenge von Bumetanid in den Urin sezerniert wurde. In der vorliegenden Studie ergab sich mit zunehmender Hemmung der Sekretionskapazität keine Änderung der nichtrenalen Elimination von Bumetanid oder Furosemid. Wird ein vergleichbarer Anteil des Diuretikums tubulär sezerniert, so ist bei zunehmender Sekretionsinsuffizienz die natriure-

tische Effizienz von Bumetanid höher als von Furosemid. Zwar haben einige vergleichende Studien eine im Vergleich zu Furosemid etwas höhere natriuretische Effizienz von Bumetanid beschrieben, sowohl nach einmaliger [98], [99] wie auch nach wiederholter Gabe [100], [101], jedoch wurden in keiner dieser Studie die tatsächliche Diuretikakonzentrationen im Urin bestimmt, so daß zwischen einer pharmakokinetischen und -dynamischen Ursache für diese Beobachtung nicht differenziert werden konnte.

Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse zeigen erstmals am Menschen, daß substanzspezifische Eigenschaften die natriuretische Effizienz von Schleifendiuretika beeinflussen. Eine eingeschränkte proximal-tubuläre Sekretionskapazität verringert die Ausscheidungsrate von Schleifendiuretika in gleichem Ausmaß. Gelangen jedoch bei entsprechender Wahl von Dosis und Applikationsform ausreichende Mengen an Diuretikum in den Urin, können Unterschiede in der Affinität am  $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ -Kotransporter die erzielbare Natriurese beeinflussen. Diese Unterschiede können für die natriuretische Effizienz des Diuretikums entscheidend sein und sollten bei der Wahl des Schleifendiuretikums bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Diuretikaresistenz berücksichtigt werden.

Im Gegensatz hierzu ist die verminderte Wirksamkeit von Schleifendiuretika bei chronischer Herzinsuffizienz vorwiegend pharmakodynamisch bedingt. Während die tubuläre Sekretionskapazität erhalten bleibt, führt das reduzierte Herzzeitvolumen mit glomerulärer Hypoperfusion zu einer verringerten Filtration von Flüssigkeit und Soluta. Die verlängerte Passagezeit und die neurohumorale Gegenregulation bewirken hingegen eine gesteigerte proximal-tubuläre Reabsorption, so daß in der Henle'schen Schleife nur eine geringe Natriumkonzentration herrscht. Insgesamt ist dadurch die Wirksamkeit von Schleifendiuretika herab-

gesetzt [28]. Bei chronischer Gabe wird überdies ein Teil der Wirkung durch eine kompensatorisch vermehrte Natriumreabsorption im distalen Tubulus zunichte gemacht [29], [102], [103].

Primäres therapeutisches Ziel ist eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion durch positiv inotrope Substanzen (ACE-Hemmer, Herzglykoside) sowie Frequenzkontrolle und gegebenenfalls Rhythmisierung (**b**-Blocker, Herzglykoside). Zur Vorlastsenkung spielen auch Diuretika eine entscheidende Rolle [104]. Bisherige Behandlungskonzepte der Diuretikatherapie bei chronischer Herzinsuffizienz beruhen auf der Kombination von Diuretika und somit auf einer „sequentiellen Nephronblockade“ [33], [105]. Dazu gehören zum einen proximal angreifende Diuretika (Acetazolamid), welche die Natriumkonzentration am Wirkort der Schleifendiuretika erhöhen; diese sind jedoch aufgrund der Nebenwirkungen (metabolische Azidose) für eine ambulante Dauertherapie nicht geeignet [106]. Zum anderen hemmen Thiazid-Diuretika die kompensatorische Hypertrophie des distalen Tubulus; sie führen jedoch über eine Aktivierung der tubulo-glomerulären Rückkopplung (mit nachfolgender Senkung der GFR) nicht selten zu einem weiteren, unerwünschten Rückgang des Glomerulumfiltrates [29], [102].

Im Rahmen der zweiten klinischen Studie sollte nun geprüft werden, ob das Thiazid-Analogon Indapamid zu einer verbesserten Wirksamkeit von Schleifendiuretika bzw. von Furosemid beiträgt. Hierzu wurden intra-individuell die Wirkung von Indapamid oder Placebo auf die linksventrikuläre Funktion, die renale Hämodynamik sowie die natriuretische Wirkung von Furosemid bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (NYHA II-III) untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Gabe von Indapamid über 10 Tage bei chronischer Herzinsuffizienz (i) gut verträglich ist, (ii) keinen signifikanten Einfluß auf Blutdruck und linksventrikuläre Funktion hat, (iii) zu einer Verbesserung der renalen Hämodynamik mit Zunahme von GFR und renalem Blutfluß führt und (iv) keinen Einfluß auf die Pharmakokinetik

von Furosemid hat, jedoch (v) die natriuretische Antwort auf Furosemid signifikant verbessert.

Die zusätzliche Gabe von Indapamid zur fortgeführten Standardtherapie der chronischen Herzinsuffizienz wurde von allen Patienten gut toleriert. Insbesondere wurde bei keinem Patienten ein symptomatischer Blutdruckabfall oder eine Hypokaliämie beobachtet. Alle Patienten erreichten die in der Literatur angegebenen Wirkspiegel (trough-level) der Sustained-Release-Formulierung [76], [77]. Hinsichtlich des mittleren arteriellen Druckes sowie der Parameter der linksventrikulären Funktion ergeben sich zwischen Indapamid und Placebo keine signifikanten Unterschiede (s. Kap. 4.3.1). Dies deckt sich mit Untersuchungen anderer Autoren, nach denen das Ausmaß der Blutdrucksenkung durch Indapamid abhängig ist von der Höhe des Ausgangsblutdruckes.

Im Vergleich zu Placebo konnte unter Indapamid bei vergleichbarem Mitteldruck eine signifikante Zunahme von renalem Blutfluß und GFR bei unveränderter Filtrationsfraktion beobachtet werden. Dies geht einher mit einer Abnahme des renovaskulären Widerstandes (vgl. Kap. 4.3.3.1). Diese Veränderungen der renalen Hämodynamik lassen sich am ehesten durch eine überwiegend afferente Vasodilatation und eine Zunahme des effektiven Filtrationsdruckes erklären. Die Höhe des effektiven Filtrationsdruckes entspricht dem glomerulären Kapillardruck, abzüglich des mittleren kolloidosmotischen Druckes in den Glomerulumschlingen und des Druckes in der Bowman'schen Kapsel. Der glomeruläre Kapillardruck wird vor allem durch die Widerstandsverhältnisse der afferenten und efferenten Gefäße bestimmt. Der Tonus des Vas afferens ist hierbei im wesentlichen druck- und flußabhängig (myogene Regulation) und unterliegt ferner dem Einfluß lokaler Hormone bzw. Autacoide (NO, Prostaglandine), des Sympathikustonus sowie Renin und Adenosin als Mediatoren der tubulo-glomerulären Rückkopplung [107]. Im Gegensatz hierzu wird der Tonus der efferenten Arteriole größtenteils flußabhängig (endothelabhängig) reguliert [108].

Thiazid-Diuretika führen in der Regel über eine Zunahme der Natriumkonzentration an der Macula densa zu einer für den Therapieerfolg unerwünschten Aktivierung des tubulo-glomerulären Feedbacks und zu einer afferenten Vasokonstriktion mit Abnahme von GFR und renalem Blutfluß. Dieses konnte in der vorliegenden Studie unter Indapamid nicht beobachtet werden. Als mögliche Ursachen lassen sich eine eigenständige direkte Vasodilatation des Vas afferens und/oder eine fehlende oder verminderte Aktivierung der tubulo-glomerulären Rückkopplung diskutieren.

Indapamid ist bereits in sehr geringen Dosen ein potenter Vasodilatator [21], [109]. Der exakte Mechanismus ist nicht abschließend geklärt; in unterschiedlichen experimentellen Untersuchungen konnte hierbei sowohl ein verminderter transmembraner Calciumflux [110], eine Potenzierung der lokalen Prostaglandin- und cGMP-Freisetzung [111] sowie ein verändertes Ansprechen auf vaskonstriktive Stimuli wie Noradrenalin oder Angiotensin II [21] nachgewiesen werden. Diese Mechanismen würden in der Niere zu einer vornehmlich afferenten Vasodilatation mit Zunahme des glomerulären Blutflusses führen. In vergleichenden Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, daß die GFR unter Indapamid wesentlich weniger stark abfällt als unter einer äquipotenten Dosis von Hydrochlorothiazid, bedingt durch eine geringere Aktivierung des tubulo-glomerulären Feedbacks [16], [17], [112], [113]. In welchem Ausmaß beide Faktoren zur Verbesserung der renalen Hämodynamik beitragen, läßt sich aus den vorliegenden Daten nicht abschätzen; hierzu sind weitere experimentelle Untersuchungen (wie z.B. die Mikropunktion am Einzelnephron) erforderlich.

In der vorliegenden Studie konnten unter Indapamid keine Veränderungen der Pharmakokinetik von Furosemid beobachtet werden. Im Vergleich zu Placebo ergaben sich für die relevanten pharmakokinetischen Parameter keine signifikanten Differenzen (vgl. Kap. 4.3.2.4).

Betrachtet man die Dosis-Wirkungs-Beziehung unter Placebo so zeigen alle Patienten im Vergleich zu Angaben beim Gesunden eine deutliche Rechtsverschiebung (Abnahme der Sensitivität – die halbmaximale Wirkung wird erst bei höheren Diuretikakonzentrationen erreicht) und eine Abnahme der maximalen fraktionellen Natriumausscheidung (intrinsische Aktivität) als Senkung des Wirkungsplateaus (vgl. Kap. 2.2 schematische Darstellung der Diuretikaresistenz; Abb. 2-3). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren bei einem vergleichbaren Kollektiv an Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz überein [114]. Nach Behandlung mit Indapamid über zehn Tage zeigt sich ein Rückgang der Rechtsverschiebung im Sinne einer erhöhten Empfindlichkeit bzw. Sensitivität sowie eine Zunahme der maximalen Wirkung (Wirkungsplateau) (vgl. Abb. 4-17, Abb. 4-18). Beide Veränderungen erreichen statistische Signifikanz. Des weiteren ist die kumulative Natriumausscheidung unter der Kombination von Indapamid und Furosemid signifikant höher als unter Furosemid und Placebo.

Als Ursache dieser gesteigerten natriuretischen Wirkung lassen sich neben einer eigenständigen diuretischen Wirkung von Indapamid vor allem eine verbesserte renale Hämodynamik mit höherem Angebot an Natrium im Bereich der Henle'schen Schleife diskutieren. Wirkung und Angriffspunkt von Indapamid am Nephron sind bisher nur in wenigen Studien untersucht. Experimentelle Untersuchungen lassen analog den Thiazid-Diuretika einen Angriffspunkt am distalen Tubulus vermuten [16], [115]. Ein gesicherter Anhalt für einen zusätzlichen Angriffspunkt im Bereich des proximalen Tubulus konnte jedoch – obwohl zeitweilig postuliert – nicht gewonnen werden [16]. In einem Dosisbereich von 0,5 bis 20 mg führt Indapamid experimentell zu einer Zunahme der Natriurese und Diurese [12], [115]. Klinisch wird jedoch erst in Dosen ab 2,5 mg eine relevante Diurese beobachtet, welche in Ausmaß und Ausscheidungsmuster von Elektrolyten einer Dosis von 12,5 mg Hydrochlorothiazid vergleichbar ist [17], [112], [113]. Somit erscheint bei der in der vorliegenden Studie gegebenen Dosis von 1,5 mg als Sustained-

Release-Formulierung eine eigenständige diuretische Wirkung von untergeordneter Bedeutung. Im Gegensatz hierzu wird beim Gesunden eine relevante Vasodilatation bereits in Dosen ab 0,5 mg beobachtet [12], [109]. Demnach scheint ein verbessertes Natriumangebot am Wirkort des Schleifendiuretikums die entscheidende Rolle für die gesteigerte natriuretische Wirksamkeit darzustellen. Diese Annahme wird unterstützt durch die signifikante Zunahme der maximalen fraktionellen Natriumausscheidung. Diese sogenannte intrinsische Aktivität beschreibt pro Zeiteinheit die maximale Antwort eines Nephrons auf eine bestimmte Substanzmenge an Diuretikum. Neben der absoluten Menge an Diuretikum und der Anflutungsrate, ist die intrinsische Aktivität direkt abhängig von der am Wirkort vorliegenden Menge an Natrium [116].

Da sich die pharmakokinetischen Parameter von Furosemid nicht verändert haben, erscheint ein verbessertes Natriumangebot als Ursache wahrscheinlich.

Zusammenfassend erweist sich Indapamid bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz als gut verträglich und wirksam in der Verbesserung der natriuretischen Antwort auf Schleifendiuretika/Furosemid. Im Gegensatz zu anderen distal angreifenden Diuretika führt Indapamid vielmehr zu einer, zwar geringen, aber erwünschten Zunahme von GFR und renalem Blutfluß. Das als Folge davon verbesserte Natriumangebot im Bereich der Henle'schen Schleife stellt sich für die gesteigerte natriuretische Antwort auf Gabe von Schleifendiuretika als entscheidender Punkt dar. Die Ergebnisse der vorliegenden Pilotstudie rechtfertigen daher die weitere klinische Prüfung von Indapamid bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und Diuretikaresistenz.

## B Analytisch

Um den Zusammenhang zwischen natriuretischer Wirksamkeit und veränderter Pharmakokinetik bzw. Pharmakodynamik zu beurteilen, war es erforderlich, die genauen Konzentrationen der in den klinischen Studien eingesetzten Diuretika in Plasma bzw. Vollblut und Urin zu bestimmen.

Dies erforderte ein geeignetes Analyseverfahren zur Bestimmung dieser Substanzen aus biologischer Flüssigkeit mit einem großen Maß an Präzision, Reproduzierbarkeit und hohen Wiederfindungsraten. Zur analytischen Trennung der Arzneistoffe aus biologischer Matrix wurde daher die HPLC herangezogen, welche eine einfache Handhabung und hohe Trennleistung, insbesondere von polaren Verbindungen verspricht. Mit einer gut ausgewählten Probenaufbereitung können bereits im Vorfeld störende Effekte bei der chromatographischen Trennung minimiert werden. Zudem muß die nachfolgende Detektion sehr empfindlich sein, um die zum Teil geringen Konzentrationen in den Körperflüssigkeiten nachweisen zu können. Eine geeignete Wahl des Detektions-Systems kann hierbei die Selektivität und Sensitivität der Methode entscheidend verbessern.

Die Validierung des erstellten Analyseverfahrens anhand anerkannter Überprüfungsmethoden [121] – [124] gewährleistet die Zuverlässigkeit und statistische Sicherheit der ermittelten Ergebnisse.

Bei den zu quantifizierenden Diuretika handelte es sich um Bumetanid und Furosemid aus der Klasse der Schleifendiuretika sowie um das Thiazid-Analogon Indapamid. Für Bumetanid und Furosemid wurde jeweils eine HPLC-Methoden zur Quantifizierung aus Plasma und Urin erstellt. Die HPLC-Methoden für Furosemid konnten hierbei bei beiden klinischen Studien zur Anwendung gebracht werden. Aufgrund seiner hohen Bindung an die Carboanhydrase der Erythrozyten, wurde für Indapamid die Bestimmung aus Vollblut gewählt und hierfür eine geeignete

analytische Methode etabliert. Da Indapamid als sehr lipophile Substanz während der Tubuluspassage mehrfach resorbiert und wieder sezerniert wird, lassen die Konzentrationen im Endharn keine gesicherten Rückschlüsse auf die sezernierte Menge bzw. die Konzentrationen am Wirkort zu. Aus diesem Grund wurde lediglich eine Bestimmung der Blutspiegel von Indapamid als Therapiemonitoring durchgeführt.

Bei allen diesen Substanzen handelt es sich um zum Teil schon seit langem auf dem Markt eingeführte Arzneistoffe. Es bestehen daher bereits eine Reihe analytischer Verfahren zur Quantifizierung dieser Verbindungen. Alle für diese Arbeit eingesetzten chromatographischen Trennverfahren basieren auf, für diesen Zweck geeigneten, bereits publizierten Methoden, wurden aber auf das verwendete HPLC-Detektor-System sowie auf das Studienkonzept abgestimmt und optimiert. Zudem wurden sie in entscheidenden Punkten modifiziert und verbessert.

Bei der Bestimmung von Bumetanid wurden insbesondere die fluoreszierenden Eigenschaften der Substanz genutzt, um den niedrigen Plasma- und Urinkonzentrationen im Körper – die aufgrund der hohen Wirkstärke im unteren Nanogrammbereich liegen – nach Bumetanid-Infusion gerecht zu werden. Zur Erhöhung der Sensitivität der Methode wurde daher dem chromatographischen System eine Fluoreszenz-Detektion nachgeschaltet. Die Bestimmungsgrenzen für Bumetanid in Plasma lagen hierdurch bei 5 ng pro Milliliter Plasma und in Urin bei 20 ng pro Milliliter. Im Rahmen der durchgeführten klinischen Untersuchung lagen alle authentischen Werte oberhalb dieser unteren Arbeitsbereichsgrenze, so daß die Konzentrationen zuverlässig bestimmt werden konnten.

Hinsichtlich der Bestimmungsgrenze sind die angewandten HPLC-Methoden den Arbeiten anderer Autoren gleichwertig, bei denen ebenfalls die FL-Detektion zum Einsatz kommt [57] – [60]. Verbesserungen wurden aber bei der Probenaufarbeitung erzielt, die schnell und zuverlässig durchführbar ist und ohne aufwendige Derivatisierungs- oder Extraktionsschritte auskommt [57] – [58].

Die erstellten chromatographischen Analyseverfahren zeigten sich als geeignete, einfache, sensitive, selektive, sowie reproduzierbare Methoden zur Bestimmung von Bumetanid in Plasma und Urin.

Für Furosemid besteht die größte Anzahl veröffentlichter Bestimmungsmethoden aus biologischer Matrix, die sich in bezug auf Handhabung, Probenaufarbeitung, Elution, Detektion, Detektionslimit etc. zum Teil erheblich unterscheiden.

So wird in einigen dieser Methoden die UV-Spektroskopie als Detektionssystem eingesetzt [117], [118]. Für das hier entwickelte HPLC-Analyseverfahren wurde jedoch die Eigenfluoreszenz von Furosemid genutzt und somit die Fluoreszenz- der UV-Detektion vorgezogen, um bei der quantitativen Analyse, neben ausgeprägter Sensitivität, eine hohe Selektivität des Verfahrens zu erreichen.

Eine weitere entscheidende Verbesserung der chromatographischen Analyse von Furosemid in Urin erbrachte die einfache Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether, basierend auf Verteilungsvorgängen der in wäßriger, angesäuerter Lösung befindlichen, nichtionisierten Substanz. Dies brachte Vorteile zu bestehenden Methoden mit mehreren Extraktionsschritten [54], [119], [120] und verhalf zu einer schonenden, schnellen und optimierten Probenvorbereitung.

Der hohen photoinduzierten Zersetzungsempfindlichkeit von Furosemid wurde dabei durch sorgfältige und lückenlose Lichtprotektion der Proben Rechnung getragen.

Die erstellten HPLC-Trennverfahren für Furosemid in Plasma und Urin wurden bei beiden Studien nahezu unverändert eingesetzt. Im Zuge der Vorarbeit zur zweiten Studie konnte jedoch eine sichere Trennung von Acetylsalicylsäure und Furosemid in Urin erst durch geringfügige Änderung der Laufmittelzusammensetzung der mobilen Phase erreicht werden, wie in Kapitel 3.10 ausführlich beschrieben.

Für die quantitative Analyse von Indapamid aus Vollblut im unteren Nanogrammbereich stehen bislang keine geeigneten Methoden zur Verfügung. Die wenigen publizierten Arbeiten beschreiben die Bestimmung von Indapamid aus Tablettenformulierungen [62], [63], Lösungsmitteln [64] und aus Urin [65], [66]; nur selten aus Plasma bzw. Vollblut [66] – [68]. Eine Bestimmungsmethode aus Plasma scheint hingegen zur Erlangung möglichst hoher Wiederfindungsraten wenig sinnvoll zu sein, da Indapamid eine 90%ige Bindung an Erythrozyten aufweist. Durch Flüssig-Flüssig-Extraktion von Vollblut mit Diethylether konnte eine geeignete Probenvorbereitung gefunden werden, die hohe Wiederfindungsraten und bestmögliche Reinheit der Probe garantierte. Die ermittelten Wiederfindungsraten wiesen, bei den verschiedenen Konzentrationen des Arbeitsbereiches einheitliche Werte auf und lagen im Mittel bei  $73,1 \pm 2,5\%$  mit nur geringen Abweichungen. Eine Wiederfindungsrate in diesem Bereich, mit einem Verlust von bis zu einem Viertel der Ausgangswerte und mehr, ist für Indapamid bekannt. In Arbeiten anderer Autoren werden, abhängig von der Konzentration, Werte im Bereich von 57,4% bis 91,6% angegeben [67], [68].

Die entwickelte HPLC-Methode orientierte sich in Grundzügen an der Arbeit von Miller et al. [68]. Während mit dieser Arbeit Blutproben von Probanden, die 2,5 mg Indapamid (I.R.) erhielten, bestimmt werden konnte, erwies sich diese Methode für die vorliegende Studie als nicht geeignet. Indapamid (1,5 mg S.R.) konnte in den Blutproben der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nicht zuverlässig und reproduzierbar bestimmt werden. Dies gelang erst durch eine in entscheidenden Punkten ansetzende Modifizierung des Analyseverfahrens, wodurch dieses verbessert wurde. Im wesentlichen führte die geänderte Zusammensetzung der mobilen Phase und die Wahl einer alternativen Säule mit unterschiedlicher Länge und Füllmaterial (Gromsil-Säule) zu einer optimierten HPLC-Methode Indapamid/Vollblut. Durch diese Maßnahme konnte schließlich eine abschließende klare und deutliche Trennung des

Analyten von endogenen, koeluiierenden bzw. interferierenden Verbindungen erhalten werden [vgl. Kap. 3.5.5 und Abb. 3-13, Abb. 3-14].

Aufgrund der Vielzahl von Begleitmedikamenten bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz mußte im Vorfeld eindeutig geklärt werden, inwiefern diese Arzneistoffe bzw. deren Metabolite einen störenden Einfluß auf das Leerblutprofil des einzelnen Patienten ausübt. Dies erschien umso wichtiger als die Methode aus den oben genannten Gründen eine Quantifizierung aus Vollblut und nicht, wie bei anderen Substanzen weitaus üblicher, aus Plasma verlangt. Hierbei ist eine ungleich größere Anzahl von Störgrößen zu erwarten, die beim Probenaufarbeitungsprozeß aus Vollblut extrahiert werden. Eine Überprüfung der Methode auf Interferenz von Indapamid mit den häufigsten Arzneistoffen bei der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz ergab jedoch, im Bereich von Indapamid und dem internen Standard, keine Einschränkung in der Methodenanwendung (vgl. Kap 3.10).

Wie auch in der Arbeit von Miller et al. [69] wurde bei der hier vorliegenden erarbeiteten Methode eine Nachweisgrenze von 10 ng pro Milliliter Blut ermittelt, wobei die hierbei erhaltenen Peaks im Vergleich zu Miller eine deutlichere Abgrenzung vom Basisrauschen erzielen.

Es wurde ein Analyseverfahren etabliert, das eine Verbesserung bestehender Methoden hinsichtlich Reproduzierbarkeit, Trennleistung, Detektionslimit und Qualität des Chromatogramms darstellt und validierte Ergebniswerte bis zu einer Konzentration von 20 ng pro Milliliter Blut als statistisch abgesicherte Bestimmungsgrenze (vgl. Kap. 6.3) garantiert.

Zudem ist eine weitere Absenkung dieser Bestimmungsgrenze möglich: Eine Volumenreduzierung beim Rekonstituierungsschritt in der Probenaufarbeitung erlaubt eine weitere Aufkonzentrierung der Probe um den Faktor zwei und gewährleistet dennoch ein, für die Analyse ausreichendes Probenvolumen.

Zusammenfassend gelang es für alle Arzneistoffe eine geeignete und optimierte analytische Methode zu erstellen und gesicherte Ergebnisse für die Konzentrationen in Plasma/Vollblut und Urin zu ermitteln. Alle chromatographischen Trennverfahren entsprachen den Anforderungen nach möglichst niedrigen Bestimmungsgrenzen, um die zuverlässige Quantifizierung geringer, endogener Diuretikakonzentrationen zu garantieren. Die gefundenen Konzentrationen sind durch die Validierung des Analyseverfahrens (gemäß ICH-Richtlinien, [121]) soweit statistisch abgesichert, daß sie als valide Ergebniswerte herangezogen werden konnten und eine Basis für die Auswertung der Studie sowie deren Interpretation darstellen.



## 6 Experimenteller Teil – Analytik

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel für analytische Zwecke wurden in p.a. Qualität von folgenden Firmen bezogen:

- Firma Merck (Darmstadt)  
o-Phosphorsäure (85%), Essigsäure (100%), Salzsäure, Natronlauge, Acetonitril, Methanol, Diethylether, Wasser, Acetophenon, Ammoniumacetat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat
- Firma Sigma-Aldrich, (Steinheim)  
Naproxen (freie Säure), Probenecid, Indapamid
- Firma Hoechst, (Frankfurt)  
Furosemid, Piretanid
- Firma Leo GmbH, Pharmazeutische Produkte, (Dreieich)  
Bumetanid
- Firma Sandoz, (Nürnberg); (heute: Novartis, München)  
Glipizid

## 6.1.2 Säulen

Für die chromatographische Trennung wurden verschiedene Säulen der Firma *GROM Analytic + HPLC GmbH* in Herrenberg verwendet:

- Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5 µm, 250 x 4 mm
- Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5 µm, 250 x 4,6 mm
  
- Nucleosil 100 C18, 5µm, 125 x 4 mm

Den Säulen wurden jeweils Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5 µm, 10 x 4 mm Vorsäulen vorgeschaltet.

## 6.1.3 Geräte

### 6.1.3.1 HPLC-UV und HPLC-Fluoreszenz

Die chromatographische Analyse wurde an einer HPLC-Station durchgeführt, die aus folgenden Komponenten bestand:

- Sykam Pumpe S 1100
- Jasco Intelligent Sampler 851-AS
- Linear Instruments UV/Vis-Detektor 205 (Indapamid-Bestimmung)
- Shimadzu RF-551 FL-Detektor (Bumetanid-Bestimmung)
- Gynkotek RF 1001 FL-Detektor (Furosemid-Bestimmung)
- Integrator Axxi-Chrom 747 Chromatographische Datensysteme

## 6.1.4 Humane Proben

Die humanen Plasmaproben (Pool-Plasma), die zur Erstellung beziehungsweise Optimierung der analytischen Trennmethode und zu Vergleichsmessungen dienten, wurden von der Blutbank und dem Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen bezogen. Leerurin wurde selbst gespendet.

Die authentischen Plasma- und Urinproben wurden aus zwei klinischen Studien erhalten, die an der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen durchgeführt wurden. Die Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Aufarbeitung und anschließender Analyse abgedunkelt gelagert.

## 6.2 Aufarbeitungsmethode zur Quantifizierung aus Plasma/Vollblut und Urin

### 6.2.1 Proteinfällung

Nach Entnahme eines definierten Aliquots aus der jeweiligen Probe (Plasma/Urin) wird durch Zusatz eines Lösungsmittels (Acetonitril/Methanol) und mindestens 30 sekündigem vortexen die Lösung deproteiniert. Es folgen 2 Minuten Desagglomeration im Ultraschallbad sowie eine nachfolgende 10 minütige Zentrifugation der Probe bei 3500 Upm und  $4^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wird vom Überstand ein definiertes Volumen abgehoben mit dem gemäß dem Probenaufarbeitungsplan weiterverfahren wird.

### 6.2.1.1 Furosemid

500 µl            Plasma  
1000 µl          Acetonitril  
Zentrifugation (3500 Upm, 4°C)

### 6.2.1.2 Bumetanid

500 µl            Plasma  
750 µl            Methanol  
Zentrifugation (3500 Upm, 4°C)

## 6.2.2 Extraktion

Zur Probenextraktion wird ein bestimmtes Volumen der Probe (Plasma, Vollblut) mit der Eppendorf-Pipette entnommen und nach dem jeweils erforderlichen Zupipettieren weiterer Reagenzien mindestens 30 Sekunden gevortext. Die Probe wird anschließend durch Zugabe von Diethylether extrahiert. Nach mindestens 5 minütigem Verschütteln wird das Zweiphasengemisch, bei 3000 Upm und 4°C, 10 Minuten lang zentrifugiert. Die obere organische Phase wird sodann vorsichtig abgehoben und unter Stickstoff bei 35°C eingeeengt. Nachfolgend wird der Rückstand mit einem Lösungsmittelgemisch rekonstituiert. Die erhaltene Probenlösung wird dann weiteren Arbeitsschritten unterzogen, sofern diese erforderlich sind.

### 6.2.2.1 Furosemid (Studie I)

500 µl      Urin  
15 µl       HCl (2M)  
250 µl      Wasser  
4 ml        Diethylether  
Einengen   (35°C, N<sub>2</sub>)  
500 µl      MeOH/Phosphatpuffer<sup>1</sup> (54/46, V/V) rekonstituieren

### 6.2.2.2 Furosemid (Studie II)

500 µl      Urin  
15 µl       HCl (2M)  
250 µl      Wasser  
4 ml        Diethylether  
Einengen   (35°C, N<sub>2</sub>)  
1000 µl     MeOH/Phosphatpuffer<sup>1</sup> (53/47, V/V) rekonstituieren

### 6.2.2.3 Indapamid

1000 µl     Vollblut  
6 ml        Diethylether  
Einengen   (35°C, N<sub>2</sub>)  
500 µl      0,08M Ammoniumacetat/Acetonitril (66/34, V/V)  
              rekonstituieren

---

<sup>1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02M; mit 2M HCl auf pH3,0 eingestellt

## 6.2.3 HPLC-FL-Bestimmung

### 6.2.3.1 Furosemid

#### Plasma

Säule: Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm  
Vorsäule: Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 10 x 4,6 mm  
Fließmittel: isokratische Elution  
37,5 Teile Acetonitril  
62,5 Teile Phosphorsäure 0,08M

pH-Wert: 2,0  
Flußrate: 1,35 ml/min  
Detektion: Anregung:  $\lambda = 270 \text{ nm}$   
Emission:  $\lambda = 410 \text{ nm}$   
Injektionsvolumen: 50  $\mu\text{l}$

#### Urin (Studie I)

Säule: Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,0 mm  
Vorsäule: Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 10 x 4,0 mm  
Fließmittel: isokratische Elution  
54 Teile Methanol  
46 Teile  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (0,02M; pH3,0)  
pH-Wert: 4,0  
Flußrate: 1,0 ml/min

Detektion:                   Anregung:            $\lambda = 275 \text{ nm}$   
                                  Emission:            $\lambda = 400 \text{ nm}$   
Injektionsvolumen:       50  $\mu\text{l}$

### Urin (Studie II)

Säule:                       Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,0 mm  
Vorsäule:                   Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 10 x 4,0 mm  
Fließmittel:               isokratische Elution  
                                  53 Teile    Methanol  
                                  47 Teile     $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (0,02M; pH3,0)

pH-Wert:                   4,0  
Flußrate:                  1,0 ml/min

Detektion:                   Anregung:            $\lambda = 275 \text{ nm}$   
                                  Emission:            $\lambda = 400 \text{ nm}$   
Injektionsvolumen:       50  $\mu\text{l}$

### 6.2.3.2 Bumetanid

#### Plasma

Säule:                       Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm  
Vorsäule:                   Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 10 x 4,6 mm

Fließmittel: isokratische Elution  
67 Teile Methanol  
33 Teile Wasser  
1 Teil Essigsäure (100%)

pH-Wert: 3,5  
Flußrate: 1,0 ml/min  
Detektion: Anregung:  $\lambda = 338 \text{ nm}$   
Emission:  $\lambda = 433 \text{ nm}$   
Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{l}$

## Urin

Säule: Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm  
Vorsäule: Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5  $\mu\text{m}$ , 10 x 4,6 mm  
Fließmittel: isokratische Elution  
45 Teile Acetonitril  
55 Teile Phosphorsäure 0,015M

pH-Wert: 2,0  
Flußrate: 1,5 ml/min

Detektion: Anregung:  $\lambda = 338 \text{ nm}$   
Emission:  $\lambda = 433 \text{ nm}$   
UV-Detektion für internen Standard  
(Acetophenon) bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$   
Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{l}$

## 6.2.4 HPLC-UV-Bestimmung

### 6.2.4.1 Indapamid

#### Vollblut

Säule:	Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5 µm, 250 x 4,6 mm
Vorsäule:	Gromsil 120 ODS – 3 CP, 5 µm, 10 x 4,6 mm
Fließmittel:	isokratische Elution 66 Teile $\text{NH}_4^+\text{CH}_3\text{COO}^-$ (0,08M; pH3,5) 34 Teile Acetonitril
pH-Wert:	4,20
Flußrate:	1,35 ml/min
Detektion:	$\lambda = 241 \text{ nm}$
Injektionsvolumen:	100 µl

## 6.3 Validierung

Die Durchführung eines Validierungsverfahrens dient zur statistischen Absicherung des analytischen Verfahrens und gewährleistet unter gleichen Bedingungen die Reproduzierbarkeit der verwendeten Methode. Die Validierung der für die Arbeit verwendeten HPLC-Analyseverfahren zur Gehaltsbestimmung wurde anhand der ICH-Richtlinien [121] sowie nach den Autoren Ebel [122], Funk [123] und Kromidas [124] durchgeführt.

### 6.3.1 Kalibrierung

Die Kalibrierung des Analyseverfahrens dient zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Meßwerten (Signal) und der Konzentration des Arzneistoffs in einem ausgewählten Arbeitsbereich. Sie wurde nach den oben angegebenen Quellen durchgeführt.

Der Zusammenhang zwischen gemessenem Signal und Arzneistoffkonzentration wird am besten über eine Kalibriergerade beschrieben, die anhand von Standardlösungen aufgestellt wird. Hierzu wurden Standardlösungen durch voneinander unabhängige Verdünnungen hergestellt. Mit Hilfe der Regressionsgeraden wird sodann die Kalibrierfunktion ermittelt.

Um eine Wertung der authentischen Proben mit der berechneten Kalibrierfunktion vornehmen zu können, wurden die Eichproben ebenfalls in biologischer Matrix (Plasma/Vollblut und Urin) angesetzt und durchliefen das gesamte Aufarbeitungs- und Analyseverfahren einschließlich aller vorbereitenden Schritte. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Peakflächen, zudem wurde eine Korrektur über den, zu Beginn der Probenaufarbeitung zugesetzten, internen Standard durchgeführt.

Für eine allgemeine Geradengleichung gilt:  $y = a_1x + a_0$ .

Nach statistischer Auswertung den experimentellen Daten und Bildung der Regressionsgeraden ergeben sich als weitere Kenngrößen:

$S_y$  - Reststandardabweichung

$s_{x0}$  - Verfahrensstandardabweichung

$V_{x0}\%$  - Relative Verfahrensstandardabweichung

In nachfolgender Tabelle sind die Parameter der linearen Kalibrierfunktion aller Methoden sowie die Rest- ( $s_y$ ) und Verfahrensstandardabweichung ( $s_{x0}$ ,  $V_{x0}\%$ ) aufgeführt (Tab. 6-1) [123].

Tab. 6-1: Parameter der Kalibrierfunktionen

Substanz	Studie	$a_1$	$a_0$	$S_y$	$s_{x0}$	$V_{x0}\%$
<b>Plasma/Vollblut*</b>						
Bumetanid	Studie I	1097,18	-1512,04	466,02	0,425	0,77
Furosemid	Studie I	52,54	987,69	962,40	18,32	1,53
Furosemid Plasma 1	Studie II	151,86	-564,32	159,28	1,05	0,84
Furosemid Plasma 2	Studie II	78,84	-1994,6	1197,25	15,18	1,05
Indapamid* (Vollblut)	Studie II	296,91	809,96	263,06	0,886	1,27
<b>Urin</b>						
Bumetanid	Studie I	140,39	-111,72	135,66	0,966	0,81
Furosemid	Studie I	41,45	4399,6	1879,06	45,33	1,51
Furosemid	Studie II	35,67	-586,08	1863,76	54,25	1,39

### 6.3.1.1 Festlegung der Arbeitsbereiche

Um eine Einschätzung des zu erwartenden Arbeitsbereiches vornehmen zu können, wurden im Vorfeld der eigentlichen Studie orientierende Vorversuche mit gesunden Probanden durchgeführt.

Anhand der ermittelten Konzentrationen aus den humanen Proben wurde dann der Arbeitsbereich definiert (vgl. Tab. 6-2). Die unterschiedlichen Dosierungsvorgaben (kontinuierliche Infusion und einmalige Bolus-Infusion) der zwei klinischen Studien erforderten für die Bestimmung von Furosemid aus Plasma- und Urinproben die Festlegung von jeweils zwei unterschiedlichen Arbeitsbereichen und deren erneute Validierung. Dazu war zwischen den Meßserien der beiden klinischen Studien der Austausch einer Xenon-Lampe im Fluoreszenz-Detektor notwendig; dies verlangt per se eine Neuaufnahme des Validierungsverfahrens.

Bei der INDIURE-Studie wird eine einmalige Dosis von Furosemid kontinuierlich eliminiert, so daß die abnehmenden Konzentrationsspiegel gegen Null laufen. Um der weiten Streuung der Konzentrationswerte Rechnung zu tragen, wurde bei der Quantifizierung von Furosemid in Plasma der Arbeitsbereich in zwei, einander ablösende Arbeitsbereiche (Plasma 1, Plasma 2) geteilt und jeder für sich dem Validierungsprozeß unterworfen.

Die Anzahl der äquidistanten Kalibrierpunkte für alle erarbeiteten Methoden betrug 6 (ICH-Guidelines [121]). Eine Ausnahme stellte der zweite untere Arbeitsbereich des Analyseverfahrens Furosemid/Plasma (Studie II) dar; hierbei wurden 7 Kalibrierpunkte gewählt, um für diesen niedrigen Konzentrationsbereich eine höhere statistische Absicherung zu erhalten.

Tab. 6-2: Validierte Arbeitsbereiche

Substanz	Studie	Arbeitsbereich Plasma/Vollblut*	Arbeitsbereich Urin
Bumetanid	Studie I	5 – 105 ng/ml	20 – 220 ng/ml
Furosemid	Studie I	0,2 – 2,2 µg/ml	0,5 – 5,5 µg/ml
Furosemid	Studie II	0,05 – 0,2 µg/ml (Plasma 1)	1,0 – 6,5 µg/ml
		0,2 – 2,7 µg/ml (Plasma 2)	
Indapamid	Studie II	20 – 120 ng/ml*	–

### 6.3.1.2 Linearität

Die Kalibriergerade soll einen linearen Zusammenhang über den gesamten Arbeitsbereich zwischen der Konzentration des Analyten und dem registrierten Detektorsignal aufweisen.

Die Überprüfung der Linearität, entsprechend der ICH-Richtlinien zur Validierung von Analysemethoden, erfolgte zunächst anhand einer visuellen Kontrolle und mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten  $r$  der ermittelten Kalibrierfunktion. Der Koeffizient muß hierbei größer als 0,999 sein [121].

Eine weitere rechnerische und objektivere Bewertung der Linearität erfolgte nach dem Anpassungstest nach MANDEL [123]. Für die Berechnung werden hierbei, wie unten angeführt, die Reststandardabweichungen der linearen und der quadratischen Funktion aus den Meßwerten der Kalibrierpunkte miteinbezogen. Weitere Rechenschritte führen schließlich zu einem Prüfwert (PW) der dem F-Test unterzogen wird (s.u. Varianzhomogenität).

$$DS^2 = (N - 2) \cdot s_{y1}^2 - (N - 3) \cdot s_{y2}^2$$

$DS^2$  - Varianzendifferenz

$N$  - Anzahl der Konzentrationsstufen

$s_{y1}$  - Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion

$s_{y2}$  - Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion

Die Berechnung des Prüfwertes  $PW$  und der Vergleich mit dem tabellierten  $F$ -Wert ergibt sich nach folgender Formel:

$$PW = \frac{DS^2}{s_{y2}^2}$$

$PW$  - Prüfwert

$DS^2$  - Varianzendifferenz

$s_{y2}$  - Reststandardabweichung der quadratischen Kalibrierfunktion

Der Vergleich des Prüfwertes mit dem tabellierten  $F$ -Wert ( $P = 95\%$ ;  $f_1 = 1$ ,  $f_2 = N-3$ ) ergibt:

- Falls  $PW \leq F_t$ , so wird durch die Kalibrierfunktion 2. Grades keine signifikant bessere Anpassung erreicht, und die tatsächliche Kalibrierfunktion ist als linear anzusehen.
- Falls  $PW > F_t$ , so stellt die Regressionsgleichung 2. Grades eine bessere Anpassung dar, und die Eichfunktion ist in diesem Arbeitsbereich signifikant unlinear.

In nachfolgender Tabelle (Tab. 6-3) sind die Werte für den Korrelationskoeffizienten  $r$  sowie der Prüfwert (PW) nach MANDEL angegeben. Alle erhaltenen Kalibrierfunktionen weisen Linearität auf.

Tab. 6-3: Linearität ( $F_t = 10,13$  für  $N = 6$  und  $F_t = 7,71$  für  $N = 7$ ; bei  $P = 95\%$ )

Substanz	Studie	$r_{\text{Korr.}}$	PW	$F_t$ ; $P=95\%$
<b>Plasma/Vollblut*</b>				
Bumetanid	Studie I	0,99994	1,57	10,13
Furosemid	Studie I	0,99998	4,68	10,13
Furosemid Plasma 1	Studie II	0,99984	0,001	7,71
Furosemid Plasma 2	Studie II	0,99989	7,21	10,13
Indapamid* (Vollblut)	Studie II	0,99978	0,46	10,13
<b>Urin</b>				
Bumetanid	Studie I	0,99993	0,36	10,13
Furosemid	Studie I	0,99977	0,39	10,13
Furosemid	Studie II	0,9995	1,70	10,13

### 6.3.1.3 Wiederfindung

Die Wiederfindung beschreibt das Verhältnis zwischen gespikten Proben, angesetzt in biologischer Matrix, und Standardproben gleicher Konzentration, gelöst in Wasser.

Für das jeweilige Analyseverfahren wurde über den gesamten Arbeitsbereich eine Standardkalibrierfunktion (Wasser) erstellt. Die ermittelten, aus Dreifachmessungen bezogenen Mittelwerte der einzelnen Meßpunkte stellen hierbei den *wahren Wert* der gemessenen Konzentrationen dar und werden gleich 100% gesetzt.

In Tab. 6-4 sind die prozentualen Wiederfindungsraten mit den dazugehörigen relativen Standardabweichungen  $s_{rel}$  dargestellt.

$$W = \frac{\bar{x}}{x_W} \cdot 100\%$$

W - Wiederfindungsrate

$\bar{x}$  - Mittelwert der gemessenen gespikten Proben

$x_W$  - Wahrer Wert

Tab. 6-4: Wiederfindungsraten

Substanz	Studie	Wiederfindungsraten [%]	S <sub>rel</sub> [%]
<b>Plasma/Vollblut*</b>			
Bumetanid	Studie I	96,60	2,63
Furosemid	Studie I	100,79	1,78
Furosemid Plasma 1	Studie II	100,79	2,02
Furosemid Plasma 2	Studie II	100,22	2,81
Indapamid* (Vollblut)	Studie II	73,09	2,50
<b>Urin</b>			
Bumetanid	Studie I	92,90	2,22
Furosemid	Studie I	97,06	2,61
Furosemid	Studie II	102,10	1,24

### 6.3.1.4 Varianzhomogenität

Die Prüfung auf Varianzhomogenität liefert eine Aussage über die Gleichmäßigkeit der Streuung aller Kalibrierpunkte über den gesamten Arbeitsbereich. Die Kalibrierfunktion kann nur dann für die Ermittlung der Konzentrationen herangezogen werden, wenn eine statistische Gleichheit der Varianzen gegeben ist. Es wird geprüft, ob die Standardabweichung aus zwei unterschiedlichen Meßreihen vergleichbar sind, ob also Varianzhomogenität vorliegt. Ist das der Fall, so stammen die Werte aus

einer Grundgesamtheit. Dabei müssen die zwei Meßreihen nicht gleich groß sein.

Es werden hierzu jeweils 10 Probenansätze der obersten und der untersten Konzentration des Arbeitsbereiches einzeln angesetzt und vermessen. Aus den ermittelten Varianzen der beiden Grenzkonzentrationen wird der Quotient (PG) gebildet und dem F-Test unterzogen, wobei  $s_a > s_b$  und  $PG > 1$  ist [123].

$$PG = \frac{s_a^2}{s_b^2}$$

PG - Prüfgröße

$s_a$  - Standardabweichung an der Arbeitsbereichsgrenze a

$s_b$  - Standardabweichung an der Arbeitsbereichsgrenze b

Nach Bestimmung der Freiheitsgrade ( $f$  = Zahl der Freiheitsgrade, es gilt:  $f_{a/b} = N - 1$  wobei  $N$  = Anzahl der Proben (10)) und Festlegung der statistischen Sicherheit ( $P = 95\%$ ,  $P = 99\%$ ,  $P = 99,9\%$ ), kann die berechnete Prüfgröße (PG) mit dem tabellarisch ermittelten  $F_t$ -Wert verglichen werden. Die Entscheidung, welche Art von Unterschied man bereit ist zu akzeptieren wird nach folgenden Regeln festgelegt [123]:

$PG \leq F_t$ -Wert ( $P = 95\%$ )	wahrscheinlicher Unterschied
$PG \leq F_t$ -Wert ( $P = 99\%$ )	signifikanter Unterschied
$PG \leq F_t$ -Wert ( $P = 99,9\%$ )	hochsignifikanter Unterschied

Liegt die berechnete Prüfgröße unter dem tabellarisch ermittelten  $F_t$ -Wert ( $P = 95\%$ ), das heißt ist  $PG \leq F_t$ , so ist die Differenz der Varianzen nicht wahrscheinlich und es liegt eine Homogenität der Streuung vor. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) gilt als erfüllt.

In der für den F-Test vorgesehenen Tabelle sind folgende Werte bei gegebenen Bedingungen ( $P$ ;  $f$ ) abzulesen:

$F_t$ -Wert	3,18	$P = 95\%$ ; $f = 9$
$F_t$ -Wert	5,35	$P = 99\%$ ; $f = 9$
$F_t$ -Wert	10,11	$P = 99,9\%$ ; $f = 9$

Die Varianzen der Arbeitsbereiche sind mit  $P = 95\%$ iger Sicherheit homogen (s. Tab. 6-5).

Tab. 6-5: Varianzhomogenität

Substanz	Studie	Varianzhomogenität - PG	Sicherheit P %
<b>Plasma/Vollblut*</b>			
Bumetanid	Studie I	2,02	95
Furosemid	Studie I	2,66	95
Furosemid Plasma 1	Studie II	1,26	95
Furosemid Plasma 2	Studie II	1,17	95
Indapamid* (Vollblut)	Studie II	3,08	95
<b>Urin</b>			
Bumetanid	Studie I	1,36	95
Furosemid	Studie I	2,96	95
Furosemid	Studie II	2,52	95

### 6.3.1.5 Präzision

Die Präzision gibt das Maß der Streuung von Analyseergebnissen eines festgelegten Analyseverfahrens an.

Zur Berechnung wurden die Meßdaten der Varianzhomogenität an der oberen und unteren Arbeitsbereichsgrenze des Kalibrierbereichs erhoben. Als Streuungsmaß und damit als Präzisionsmaß wird hierbei die relative Standardabweichung, die mit dem Variationskoeffizient identisch ist, herangezogen [124]. Für die Beurteilung der Präzision wurde zunächst eine Überprüfung der Normalverteilung der Meßergebnisse über den gesamten Arbeitsbereich vorangestellt und sodann der Variationskoeffizient (VK) als Streuungsmaß herangezogen.

Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Test nach DAVID durchgeführt. Die Werte sind mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit (P) (Entscheidungsregeln: s. Kap. 6.3.1.4) normalverteilt, wenn sich der Quotient (PG) aus Spannweite (R) und Standardabweichung (s) innerhalb der von DAVID vorgegebenen Grenzwerte befindet [124].

$$PG = \frac{\text{GrößterWert} - \text{KleinsterWert}}{\text{Standardabweichung}} = \frac{R}{s}$$

In dem für den David-Test vorgesehenen Tabellenwerk sind folgende Werte bei gegebenen Bedingungen (P; N) abzulesen:

Grenze David	unten: 2,67	oben: 4,24	P = 95%; N = 10
Grenze David	unten: 2,51	oben: 4,24	P = 99%; N = 10
Grenze David	unten: 1,90	oben: 3,88	P = 99,9%; N = 10

Für alle Analyseverfahren lagen die Werte innerhalb der von DAVID vorgegebenen Grenzen ( $P = 95\%$ ) und es liegt eine Normalverteilung vor (vgl. Tab. 6-6).

Der Variationskoeffizient an den Arbeitsbereichsgrenzen zur Einschätzung der Präzision des Analyseverfahrens ergibt sich zu:

$$VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

VK - Variationskoeffizient (entspricht relativer Standardabweichung)

s - Standardabweichung an der Arbeitsbereichsgrenze

$\bar{x}$  - Mittelwert der Einzelmessungen an der Arbeitsbereichsgrenze

Bei der Quantifizierung des Analyten aus biologischer Matrix sollte der Variationskoeffizient nicht größer als 15% und an der Bestimmungsgrenze nicht größer als 20% sein [125].

An den unteren Arbeitsbereichsgrenzen lag die Präzision bei 1,12 – 4,72% und an den oberen Arbeitsbereichsgrenzen bei 0,19 – 0,80% (Tab. 6-6).

Tab. 6-6: Präzision

Substanz	Studie	PG <sub>David</sub> UAG	PG <sub>David</sub> OAG	VK UAG [%]	VK OAG [%]
<b>Plasma/Vollblut*</b>					
Bumetanid	Studie I	3,26	2,87	3,06	0,19
Furosemid	Studie I	3,02	2,72	4,72	0,65
Furosemid Plasma 1	Studie II	3,41	3,17	1,12	0,31
Furosemid Plasma 2	Studie II	3,21	2,87	2,99	0,25
Indapamid* (Vollblut)	Studie II	3,05	3,43	2,74	0,80
<b>Urin</b>					
Bumetanid	Studie I	2,75	3,12	3,34	0,38
Furosemid	Studie I	3,36	2,86	3,39	0,45
Furosemid	Studie II	2,72	2,98	1,53	0,40

### 6.3.1.6 Richtigkeit

Die Richtigkeit gibt das Maß der Übereinstimmung zwischen einem gemessenem Wert und einem als richtig angesehenen *wahren Wert* an. Als quantitative Meßgröße wird somit die systematische Ergebnisabweichung aufgeführt.

Die Berechnung der Richtigkeit ergibt sich daher aus dem Vergleich der über die Kalibrierfunktion ermittelten Konzentrationswerte einer Meßprobe mit dem Wert der theoretischen Konzentration (Einwaage). Um die Richtigkeit zu überprüfen, wurden erneut die Meßergebnisse der

Varianzhomogenität an der oberen und unteren Arbeitsbereichsgrenze herangezogen (vgl. Tab. 6-7).

Die Abweichung vom tatsächlichen Wert sollte an der oberen bzw. unteren Grenze des Arbeitsbereiches 15% und an der Bestimmungsgrenze 20% nicht überschreiten [125].

Die Richtigkeit berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$d_{rel} = \frac{|x_{soll} - \bar{x}|}{x_{soll}} \cdot 100\%$$

$d_{rel}$  - Relative Abweichung; Richtigkeit

$x_{soll}$  - Wahrer Wert bzw. richtiger Wert

$\bar{x}$  - Mittelwert der Einzelmessungen an den Arbeitsbereichsgrenzen

An den unteren Arbeitsbereichsgrenzen lag die Richtigkeit bei 1,23 – 11,83% und an den oberen Arbeitsbereichsgrenzen 0,35 – 8,00%, wie in Tab. 6-7 aufgelistet.

Tab. 6-7: Richtigkeit

Substanz	Studie	Richtigkeit UAG [%]	Richtigkeit OAG [%]
<b>Plasma/Vollblut*</b>			
Bumetanid	Studie I	5,63	0,89
Furosemid	Studie I	6,26	1,55
Furosemid Plasma 1	Studie II	1,23	1,60
Furosemid Plasma 2	Studie II	1,60	1,02
Indapamid* (Vollblut)	Studie II	4,20	0,35
<b>Urin</b>			
Bumetanid	Studie I	11,03	8,00
Furosemid	Studie I	11,83	4,60
Furosemid	Studie II	5,10	2,55

### 6.3.1.7 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze eines Analyseverfahrens stellt die geringste Konzentration eines Analyten dar, die mit einer gegebenen statistischen Sicherheit (P) quantitativ von der Arbeitsmenge Null unterschieden werden kann [123]. Der unterste Punkt der Kalibriergeraden stellt demnach die praktische Bestimmungsgrenze dar. Die statistische Absicherung erfolgt hierbei über die Bestimmung der Präzision und der Richtigkeit an der unteren Arbeitsbereichsgrenze (UAG), wie in den vorangehenden Abschnitten beschrieben. Des weiteren wird die

theoretisch erreichbare Bestimmungsgrenze  $XB$  ermittelt [123], welche auch ein Maß für die Güte der Kalibriergerade darstellt.

In die Berechnung von  $XB$  gehen die Verfahrensstandardabweichung und der Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion mit ein. Der hierbei für die Bestimmungsgrenze berechnete theoretische Wert muß kleiner als der unterste Punkt der Kalibriergeraden sein [122], [123]. Die berechneten theoretischen Bestimmungsgrenzen der einzelnen Arbeitsbereiche lagen alle unterhalb des untersten Punktes der jeweiligen Kalibriergeraden (vgl. Tab. 6-8).

$$XB = \frac{y_h - a_0}{a_1} + \frac{s_y \cdot t}{a_1} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{\left(y_h - \bar{y}\right)^2}{a_1^2 \sum \left(x_i - \bar{x}\right)^2}}$$

$XB$  - Theoretische Bestimmungsgrenze

$a_0$  - Achsenabschnitt

$a_1$  - Steigung der Kalibriergeraden

$s_y$  - Reststandardabweichung

$t$  - t-Wert ( $P = 95\%$ )

$N$  - Anzahl der Meßwerte

$y_h$  - Hilfsgröße, stellt die obere vertikale Vertrauensbereichsgrenze für  $x = x_c$  dar [Funk]

$\bar{y}$  - Mittelwert der Peakflächen der vermessenen gespikten Proben

$x_i$  - Einzelwerte der Konzentrationen der vermessenen gespikten Proben

$\bar{x}$  - Mittelwert der Konzentrationen der vermessenen gespikten Proben

### 6.3.1.8 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze eines Analyseverfahrens stellt die geringste qualitativ nachweisbare Konzentration eines Analyten dar [123], die sich mit einer Wahrscheinlichkeit P von der Arbeitsmenge Null unterscheidet. Zur weiteren Beschreibung des validierten Analyseverfahrens wird die theoretisch erreichbare Nachweisgrenze  $X_N$  herangezogen, die mit Hilfe der Kalibrierfunktion bestimmt wird.

Die theoretische Nachweisgrenze stellt neben der theoretischen Bestimmungsgrenze ein weiteres Maß für die Güte einer Kalibrierfunktion dar. Auch hier gehen die Verfahrensstandardabweichung und der Vertrauensbereich der Funktion in die Berechnung mit ein.

Die theoretische Nachweisgrenze muß größer als Null und kleiner als die theoretische Bestimmungsgrenze sein [123]. Alle berechneten theoretischen Nachweisgrenzen der einzelnen Arbeitsbereiche entsprachen dieser Vorgabe (vgl. Tab. 6-8).

$$X_N = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

- $X_N$  - Theoretische Nachweisgrenze
- $a_1$  - Steigung der Kalibriergeraden
- $s_y$  - Reststandardabweichung
- $t$  - t-Wert (P = 95%)
- $N$  - Anzahl der Meßwerte

- $y_c$  - Schnittpunkt der oberen Vertrauensbereichsgrenze mit der y-Achse [Funk]
- $\bar{y}$  - Mittelwert der Peakflächen der vermessenen gespikten Proben
- $x_i$  - Einzelwerte der Konzentrationen der vermessenen gespikten Proben
- $\bar{x}$  - Mittelwert der Konzentrationen der vermessenen gespikten Proben

Tab. 6-8: Theoretische Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Substanz	Studie	Arbeitsbereiche	Theor. NG XN [ng/ml]	Theor. BG XB [ng/ml]
<b>Plasma/Vollblut*</b>				
Bumetanid	Studie I	5 – 105 ng/ml	2,96	4,43
Furosemid	Studie I	200 – 2200 ng/ml	129,71	193,55
Furosemid Plasma 1	Studie II	50 – 200 ng/ml	7,14	10,66
Furosemid Plasma 2	Studie II	200 – 2700 ng/ml	107,04	160
Indapamid* (Vollblut)	Studie II	20 – 120 ng/ml	6,60	9,85
<b>Urin</b>				
Bumetanid	Studie I	20 – 220 ng/ml	6,89	10,31
Furosemid	Studie I	500 – 5500 ng/ml	321,03	479,07
Furosemid	Studie II	1000 – 6500 ng/ml	385,18	574,38

## **6.4 Einzelwerte der Probanden und Patienten**

### **6.4.1 Studie I**

In den nachfolgenden Tabellen 6-9 – 6-12 sind die Probanden-Einzelwerte der Plasma und Urinproben unter Bumetanid-Infusion dargestellt. Die Tabellen 6-13 – 6-16 zeigen die Einzelwerte der gleichen Probanden unter Gabe von Furosemid.

### 6.4.1.1 Bumetanid/Plasma – Studie I

Tab. 6-9; Tab. 6-10: Bumetanid/Plasma [ng/ml]; Teil 1, Teil 2

Zeit [min]	#1 GD	#3 HK	#4 IP	#5 NR	#7 UR	#8 UG	#10 CS
30	13,39	8,11	11,41	14,00	14,88	16,88	15,45
60	13,61	7,42	10,22	12,47	13,58	17,23	16,13
90	15,09	7,73	11,67	11,23	13,00	12,84	12,87
120	15,92	8,62	11,01	11,46	12,51	12,56	12,23
135	17,36	10,70	10,33	12,29	13,00	14,07	14,15
150	28,06	17,96	16,43	19,83	18,19	17,11	22,88
165	34,10	18,74	20,91	20,21	21,74	23,97	22,61
180	38,26	19,27	23,25	20,40	24,46	25,09	27,55
210	38,40	20,50	23,77	22,23	26,02	31,78	36,07
240	37,52	21,72	29,65	21,47	33,38	33,10	28,79
270	34,27	22,13	30,87	22,42	35,35	32,36	31,73
300	32,51	21,02	35,33	24,55	38,77	32,03	26,15
330	29,39	20,22	36,82	25,48	39,76	32,76	26,09
360	30,84	18,50	35,63	25,52	40,56	35,44	23,76

Zeit [min]	#11 MO	#12 MB	#13 SP	#14 FS	#16 AK	MW	sdv
30	13,91	13,50	13,40	12,65	13,63	13,43	2,17
60	16,24	13,68	16,03	11,59	12,09	13,36	2,84
90	17,82	13,61	16,62	13,29	11,10	13,07	2,65
120	19,52	12,67	12,86	12,88	11,08	12,78	2,71
135	18,91	14,37	16,61	12,45	13,27	13,96	2,59
150	30,91	25,55	26,34	16,12	23,76	21,93	5,01
165	37,64	25,20	29,40	20,77	26,37	25,14	5,86
180	44,58	30,93	33,73	23,60	31,02	28,51	7,54
210	48,28	25,32	36,06	27,99	37,35	31,15	8,26
240	51,79	41,70	41,36	29,63	36,89	33,92	8,66
270	49,49	46,71	38,38	34,14	34,48	34,36	8,06
300	55,73	43,06	39,26	32,83	35,83	34,76	9,19
330	58,87	42,34	37,65	32,09	38,51	35,00	10,01
360	62,55	44,85	40,18	30,67	39,97	35,70	11,51

### 6.4.1.2 Bumetanid/Urin – Studie I

Tab. 6-11; Tab. 6-12: Ausscheidung Bumetanid/Urin [ $\mu\text{g}/\text{min}$ ]; Teil 1, Teil2

Zeit [min]	#1 GD	#3 HK	#4 IP	#5 NR	#7 UR	#8 UG	#10 CS
30	1,39	1,08	1,42	1,50	1,99	1,93	1,52
60	1,62	1,16	1,36	1,67	2,00	1,85	1,64
90	1,49	1,23	1,57	1,69	1,83	1,92	2,00
120	1,83	1,10	1,52	1,85	1,99	2,06	1,84
135	1,59	0,97	1,88	1,32	1,84	2,44	1,58
150	1,27	1,14	1,43	1,44	1,29	1,03	1,12
165	0,89	0,87	0,90	0,77	1,15	1,14	0,72
180	0,67	1,02	1,17	0,98	0,95	0,95	0,84
210	0,93	0,76	0,92	0,83	0,87	0,69	0,58
240	0,77	0,81	0,75	0,92	0,63	0,75	1,07
270	1,26	0,93	0,95	0,79	1,01	0,84	0,94
300	1,36	0,97	0,81	0,80	0,87	1,03	0,76
330	1,45	0,98	0,87	0,94	1,06	1,05	1,26
360	1,34	0,90	0,97	1,13	1,43	0,83	1,39

Zeit [min]	#11 MO	#12 MB	#13 SP	#14 FS	#16 AK	MW	sdv
30	2,42	2,35	1,46	1,54	1,43	1,67	0,41
60	2,64	2,35	1,69	2,30	1,38	1,80	0,44
90	2,11	2,45	1,84	2,05	1,29	1,79	0,35
120	2,37	2,49	2,20	2,37	1,36	1,92	0,43
135	3,24	2,65	1,81	2,21	1,17	1,89	0,65
150	1,77	1,75	1,50	2,12	-	1,44	0,33
165	1,08	0,86	0,89	1,64	0,80	0,97	0,25
180	0,78	0,81	0,80	1,38	0,48	0,90	0,23
210	0,75	0,81	0,76	1,08	0,60	0,80	0,14
240	0,87	0,86	0,72	0,97	0,51	0,80	0,15
270	1,17	0,66	0,92	0,95	0,61	0,92	0,19
300	1,08	1,24	1,39	1,01	0,82	1,01	0,22
330	1,35	0,92	1,30	1,19	0,67	1,09	0,23
360	1,74	1,48	1,36	1,34	0,38	1,19	0,37

### 6.4.1.3 Furosemid/Plasma – Studie I

Tab. 6-13; Tab. 6-14: Furosemid/Plasma [ $\mu\text{g/ml}$ ]; Teil 1, Teil 2

Zeit [min]	#1 GD	#3 HK	#4 IP	#5 NR	#7 UR	#8 UG	#10 CS
30	0,63	0,54	0,64	0,75	0,55	0,72	0,54
60	0,62	0,37	0,63	0,71	0,52	0,71	0,50
90	0,59	0,33	0,64	0,72	0,53	0,59	0,50
120	0,59	0,30	0,54	0,70	0,51	0,61	0,45
135	0,58	0,37	0,62	0,69	0,47	0,75	0,47
150	0,62	0,45	0,65	0,87	0,59	0,76	0,48
165	0,76	0,48	0,69	0,97	0,61	0,94	0,57
180	0,82	0,55	0,85	1,09	0,68	1,07	0,61
210	0,96	0,58	0,85	1,18	0,81	1,17	0,65
240	1,13	0,83	0,99	1,29	0,99	1,37	0,76
270	1,23	0,93	1,06	1,48	1,13	1,50	0,74
300	1,41	1,06	1,28	1,62	1,38	1,54	0,82
330	1,43	1,42	1,30	1,68	1,45	1,76	0,91
360	1,55	1,42	1,40	1,75	1,55	1,74	0,96

Zeit [min]	#11 MO	#12 MB	#13 SP	#14 FS	#16 AK	MW	sdv
30	0,55	0,73	0,63	0,53	0,44	0,60	0,09
60	0,56	0,60	0,73	0,51	0,39	0,57	0,12
90	0,53	0,57	0,54	0,48	0,31	0,53	0,11
120	0,52	0,61	0,45	0,50	0,30	0,51	0,12
135	0,63	0,58	0,51	0,56	0,35	0,55	0,12
150	0,65	0,75	0,68	0,68	0,42	0,63	0,13
165	0,77	0,81	0,77	0,79	0,48	0,72	0,16
180	0,84	1,00	0,98	0,85	0,58	0,83	0,19
210	0,93	1,14	1,02	1,09	0,70	0,92	0,21
240	1,17	1,28	1,27	1,20	0,78	1,09	0,21
270	1,22	1,36	1,46	1,26	0,88	1,19	0,25
300	1,39	1,59	1,49	1,34	0,93	1,32	0,26
330	1,47	1,51	1,58	1,38	0,93	1,40	0,26
360	1,43	1,76	1,53	1,49	1,02	1,46	0,26

### 6.4.1.4 Furosemid/Urin – Studie I

Tab. 6-15; Tab. 6-16: Ausscheidung Furosemid/Urin [ $\mu\text{g}/\text{min}$ ]

Zeit [min]	#1 GD	#3 HK	#4 IP	#5 NR	#7 UR	#8 UG	#10 CS
30	93,39	54,25	81,37	95,44	69,03	123,77	30,36
60	91,94	51,48	64,89	80,07	38,25	115,80	53,04
90	84,10	60,30	69,19	91,59	56,09	83,68	54,32
120	94,42	55,11	56,71	85,23	62,04	108,79	32,29
135	27,40	36,28	78,51	90,93	35,10	88,27	55,82
150	98,56	29,60	-	33,91	37,94	45,91	44,02
165	57,88	27,74	-	33,90	36,03	44,32	44,93
180	39,79	30,16	35,59	29,79	35,28	42,93	43,19
210	40,28	34,27	26,92	31,05	36,17	40,36	38,80
240	37,28	13,25	38,94	39,32	20,40	45,78	38,20
270	47,34	11,93	29,52	38,46	13,64	46,08	36,95
300	54,57	19,67	27,08	41,61	15,18	52,11	42,31
330	66,27	16,65	38,97	74,19	21,83	61,21	34,29
360	65,26	25,29	34,30	48,50	17,30	56,02	35,01

Zeit [min]	#11 MO	#12 MB	#13 SP	#14 FS	#16 AK	MW	sdv
30	96,16	60,79	59,74	79,67	47,95	74,33	25,70
60	80,92	60,93	59,30	77,62	44,45	68,22	22,02
90	80,18	52,33	61,33	65,70	41,42	66,69	15,32
120	81,72	63,85	56,58	65,44	45,73	67,33	21,52
135	75,76	41,88	61,04	45,12	32,65	55,73	22,74
150	48,31	26,68	30,89	22,63	24,56	40,27	21,21
165	35,21	17,37	20,52	17,59	21,97	32,50	12,99
180	44,32	15,65	17,92	23,58	22,03	31,69	10,10
210	39,82	15,93	16,74	24,96	20,40	30,47	9,26
240	33,83	19,29	21,50	32,68	30,87	30,95	10,03
270	43,13	24,52	27,37	35,23	27,31	31,79	11,60
300	42,84	23,91	28,14	43,04	34,30	35,40	12,64
330	46,04	25,51	34,24	41,96	33,52	41,22	17,90
360	55,56	25,46	35,52	40,71	20,04	38,25	15,35

## 6.4.2 Studie II

In den Tabellen 6-17 – 6-20 sind jeweils für alle 12 Patienten die Konzentrationen und Ausscheidungsraten von Furosemid (Plasma, Urin) unter Placebogabe aufgeführt.

Die Tabellen 6-21 – 6-24 zeigen die entsprechenden Werte unter Indapamid-Vorbehandlung.

Die trough-level und Blutkonzentrationen von Indapamid sind in Tabelle 6-25 und Tabelle 6-26 dargestellt.

### 6.4.2.1 Furosemid/Plasma (Placebo) – Studie II

Tab. 6-17; Tab. 6-18: Furosemid/Plasma [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] unter Placebogabe; Teil1, Teil2

Zeit [min]	#1 KH	#2 PS	#3 FK	#4 HK	#5 EH	#6 KM	#7 MB
0-60							
65	2,03	2,35	2,98	2,91	1,88	2,48	2,48
70	1,44	1,79	2,28	2,06	2,10	1,87	1,80
75	1,16	1,57	1,84	1,82	1,72	1,48	1,52
90	0,61	1,08	1,20	1,19	1,13	0,98	1,16
105	0,39	0,86	0,85	0,87	0,84	0,78	0,89
120	0,25	0,64	0,63	0,63	0,65	0,53	0,71
150	0,14	0,44	0,39	0,42	0,42	0,33	0,46
180	0,07	0,27	0,27	0,29	0,30	0,17	0,33
210	0,05	0,17	0,16	0,19	0,20	0,12	0,23
240	0,04	0,11	0,10	0,11	0,15	0,09	0,15

Zeit [min]	#8 EMH	#9 AK	#10 WK	#11 AR	#12 WS	MW	sdv
0-60							
65	2,89	2,39	2,21	3,06	1,88	2,46	0,42
70	2,09	2,11	1,67	2,47	1,59	1,94	0,30
75	1,53	1,64	1,17	2,16	1,25	1,57	0,29
90	0,95	1,07	0,71	1,62	0,78	1,04	0,27
105	0,67	0,72	0,44	1,24	0,56	0,76	0,23
120	0,46	0,49	0,32	0,97	0,43	0,56	0,19
150	0,29	0,29	0,17	0,71	0,29	0,36	0,15
180	0,13	0,18	0,08	0,53	0,19	0,23	0,13
210	0,08	0,13	0,05	0,37	0,09	0,15	0,09
240	0,05	0,06	0,00	0,27	0,05	0,10	0,07

### 6.4.2.2 Furosemid/Urin (Placebo) – Studie II

Tab. 6-19; Tab. 6-20: Ausscheidung Furosemid/Urin [ $\mu\text{g}/\text{min}$ ] unter Placebogabe; Teil1, Teil 2

Zeit [min]	#1 KH	#2 PS	#3 FK	#4 HK	#5 EH	#6 KM	#7 MB
0-60							
75	207,94	286,49	199,83	203,94	89,49	201,45	118,00
90	122,42	105,97	119,75	143,38	114,82	136,46	77,40
105	56,89	80,82	52,47	63,69	62,62	74,93	36,09
120	52,53	41,90	43,62	46,96	45,41	63,55	25,76
150	19,16	21,01	24,29	38,48	33,66	39,21	23,55
180	14,20	17,96	18,11	36,22	24,28	25,52	22,24
210	15,42	8,76	15,29	20,91	20,57	21,42	12,01
240	9,36	7,21	12,22	15,33	10,93	15,93	9,21

Zeit [min]	#8 EMH	#9 AK	#10 WK	#11 AR	#12 WS	MW	sdv
0							
75	214,71	194,83	127,69	81,17	121,52	170,59	61,69
90	85,55	157,73	117,95	71,12	113,74	113,86	26,03
105	65,79	80,87	56,26	92,28	81,36	67,01	15,69
120	44,95	41,40	49,32	49,87	56,51	46,82	9,22
150	26,28	23,43	24,73	36,21	31,22	28,43	6,99
180	18,13	15,35	15,96	25,88	28,92	21,90	6,54
210	11,13	13,80	13,73	20,70	17,09	15,90	4,27
240	9,89	11,30	14,85	15,21	28,09	13,29	5,46

### 6.4.2.3 Furosemid/Plasma (Indapamid) – Studie II

Tab. 6-21; Tab. 6-22: Furosemid/Plasma [ $\mu\text{g/ml}$ ] unter Indapamidgabe; Teil 1, Teil 2

Zeit [min]	#1 KH	#2 PS	#3 FK	#4 HK	#5 EH	#6 KM	#7 MB
0-60							
65	2,10	3,18	3,28	3,13	2,49	2,05	2,59
70	1,43	2,03	2,22	2,29	2,11	1,58	1,94
75	1,14	1,49	1,76	1,90	1,57	1,30	1,59
90	0,63	0,80	1,13	1,21	1,00	0,83	1,19
105	0,40	0,45	0,88	0,85	0,79	0,64	0,89
120	0,28	0,32	0,64	0,70	0,60	0,48	0,73
150	0,15	0,15	0,39	0,39	0,40	0,29	0,46
180	0,08	0,06	0,27	0,27	0,29	0,18	0,33
210	0,04	0,02	0,14	0,16	0,21	0,14	0,22
240	0,02	0,00	0,11	0,10	0,16	0,07	0,14

Zeit [min]	#8 EMH	#9 AK	#10 WK	#11 AR	#12 WS	MW	sdv
0-60							
65	3,76	2,39	2,29	3,16	3,10	2,79	0,54
70	2,89	1,83	1,76	2,75	2,72	2,13	0,47
75	2,17	1,50	1,46	2,36	2,14	1,70	0,38
90	1,05	0,84	0,87	1,71	1,33	1,05	0,29
105	0,75	0,56	0,63	1,33	1,03	0,77	0,26
120	0,53	0,38	0,47	0,97	0,86	0,58	0,21
150	0,30	0,20	0,29	0,63	0,56	0,35	0,15
180	0,15	0,14	0,19	0,54	0,38	0,24	0,14
210	0,09	0,08	0,11	0,39	0,28	0,16	0,11
240	0,06	0,06	0,07	0,25	0,20	0,10	0,07

### 6.4.2.4 Furosemid/Urin (Indapamid) – Studie II

Tab. 6-23; Tab. 6-24: Ausscheidung Furosemid/Urin [ $\mu\text{g}/\text{min}$ ] unter Indapamidgabe; Teil 1, Teil 2

Zeit [min]	#1 KH	#2 PS	#3 FK	#4 HK	#5 EH	#6 KM	#7 MB
0-60							
75	180,68	292,92	174,10	206,64	111,37	220,99	145,90
90	126,79	112,42	122,47	144,14	83,29	135,53	96,19
105	77,03	71,78	57,62	77,03	90,65	107,44	50,45
120	46,57	39,97	44,12	56,15	59,49	50,24	40,06
150	20,01	18,63	25,07	34,83	30,56	41,61	23,03
180	19,85	20,99	17,27	23,76	25,50	26,88	20,11
210	10,15	9,56	13,43	20,42	22,06	19,95	9,44
240	13,55	6,07	9,97	11,37	5,98	12,89	10,53

Zeit [min]	#8 EMH	#9 AK	#10 WK	#11 AR	#12 WS	MW	sdv
0-60							
75	204,77	118,63	163,19	110,45	161,84	174,29	52,65
90	151,21	123,80	94,50	98,07	146,48	119,57	22,70
105	55,05	67,56	61,51	47,83	103,68	72,30	19,84
120	45,35	46,52	49,07	47,38	48,76	47,81	5,71
150	30,11	25,18	24,59	23,16	39,01	27,98	7,34
180	18,36	13,61	17,51	20,63	31,49	21,33	4,87
210	12,42	13,37	14,46	10,04	33,76	15,76	7,19
240	11,05	8,84	12,39	16,65	35,48	12,90	7,72

### 6.4.2.5 Indapamid/Vollblut – Studie II

Tab. 6-25; Tab. 6-26: Indapamid/Vollblut [ng/ml], trough-level (0 min) und Kinetik (0 - 240 min); Teil 1, Teil 2

Zeit [min]	#1 KH	#2 PS	#3 FK	#4 HK	#5 EH	#6 KM	#7 MB
0	20,32	35,53	42,33	37,71	25,70	31,74	20,25
60	21,24	35,45	42,66	41,12	25,48	37,88	24,08
90	21,98	35,46	45,13	42,75	25,35	41,85	23,28
120	21,10	35,92	45,87	50,67	29,85	45,74	22,88
180	23,65	37,08	53,96	51,33	36,11	49,74	28,49
240	21,44	36,72	59,94	51,05	43,06	52,87	29,47

Zeit [min]	#8 EMH	#9 AK	#10 WK	#11 AR	#12 WS	MW	SD
0	40,30	42,20	21,56	25,28	22,90	30,36	8,57
60	39,70	42,17	24,99	30,22	22,95	32,03	8,42
90	40,61	45,43	29,61	32,78	24,62	34,07	8,57
120	42,07	43,19	30,21	34,31	26,71	35,71	9,35
180	42,45	50,10	33,92	37,14	36,02	40,00	9,18
240	41,85	55,73	40,08	38,49	35,84	42,21	10,69

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Brater DC: Clinical pharmacology of loop diuretics in health and disease. *Eur Heart J.* 1992; 13: 10–14.
- [2] Swan SK, Brater DC: Clinical pharmacology of loop diuretics and their use in chronic renal insufficiency. *J Nephrol.* 1993; 6: 118–123.
- [3] Kaojarern S, Day B, Brater DC: The time course of delivery of furosemide into urine is an independent determinant of overall response. *Kidney Int.* 1982; 22: 69–74.
- [4] Brater DC, Chennavasin P, Day B, Burdette A, Anderson S: Bumetanide and furosemide. *Clin Pharmacol Ther.* 1983b; 34: 207–213.
- [5] Brater DC, Leinfelder J, Anderson S: Clinical pharmacology of torasemide, a new loop diuretic. *Clin Pharmacol Ther.* 1987; 42: 187–192.
- [6] Greger R: Renale Wirkmechanismen der Diuretika. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten.* 1996; Jahrgang 25 Nr. 4: 136–146.
- [7] Braitsch R, Lohrmann E, Greger R: Effect of probenecid on loop diuretic induced saluresis and diuresis. In: Diuretics III: Chemistry, Pharmacology, and Clinical Applications. Puschett J and Greenberg A (editors). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990: 137–139.
- [8] Lant A: Diuretics: clinical pharmacology and therapeutic use (part I). *Drugs.* 1985; 29: 57–87.
- [9] White MG, Van Gelder J, Eastes G; The effect of loop diuretics on the excretion of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup>. *J Clin Pharmacol.* 1981; 21: 610–614.
- [10] Olsen UB: Prostaglandin/kinin activity related to changed renal compliance after bumetanide in dogs. *Acta Pharmacol Toxicol.* 1977; 40: 430–438.
- [11] Olsen UB, Ahnfeldt-Ronne I: Bumetanide induced increase of renal blood flow in conscious dogs and its relation to local hormones (PGE, kallikrein and renin). *Acta Pharmacol Toxicol.* 1976; 37: 65–78.
- [12] Caruso FS, Szabadi RR, Vukovich RA: Pharmacokinetics and clinical pharmacology of indapamide. *Am Heart J.* 1983; 106 (Suppl.): 212–220.
- [13] Goldberg B, Furman KI: Observations on the effect of a new diuretic. *South Afr Med J.* 1974; 48: 113–118.

- [14] Schlesinger P, Benchimol AB: The treatment of hypertension with indapamide: A controlled trial. *Arterial Hypertension; Excerpta Medica*. Amsterdam, 1980: 196–199.
- [15] Schlesinger P, Oignam W, Tabet FF, Benchimol AB: The treatment of hypertension with indapamide: A controlled trial. *Curr Med Res Opin*. 1977; 5 (Suppl. 1): 159–164.
- [16] Pitone J, Kim KE, Valvo E, Bronstein BJ, Lowenthal DT, Martinez EW, Fernandes M, Swartz C, Onesti G: Site of action of indapamide in the human nephron. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 1978; 23: 125 ff.
- [17] Waal-Manning HJ, Doesburg RMN: Randomised cross-over trial of indapamide and conventional diuretics in hypertension: Metabolic and renal effects. *New Zealand Med J*. 1982; 95: 19–20.
- [18] Chaffman M, Heel RC, Brogden RN, Speight TM, Avery GS: Indapamide: A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs*. 1984; 28: 189–235.
- [19] Andries EW, Brems HM, Clement DL: Long-term effects of indapamide in patients with essential hypertension. *Arterial Hypertension; Excerpta Medica*. Amsterdam, 1980: 182–190.
- [20] Ames RP: A comparison of blood lipid and blood pressure response during the treatment of systemic hypertension with indapamide and with thiazides. *Am J Cardiol*. 1996; 77: 12B–16B.
- [21] Finch L, Hicks PE, Moore RA: Changes in vascular reactivity in experimental hypertensive animals following treatment with indapamide. *J Pharm Pharmacol*. 1977; 29: 739–743.
- [22] Mironneau J: Indapamide-induced inhibition of calcium movement in smooth muscle. *Am J Med*. 1988; 84 (Suppl. 1B): 10–14.
- [23] Mironneau J, Savineau JP, Mironneau C: Compared effects of indapamide, hydrochlorothiazide and chlorthalidone on electrical and mechanical activities in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 1981; 75: 109–113.
- [24] LeBel M, Grose JH, Belleau LJ, Langlois S: Anihypertensive effect of indapamide with special emphasis of renal prostaglandin production. *Curr Med Res Opin*. 1983; 8 (Suppl. 3): 81–86.
- [25] Brater DC: Diuretic resistance: Mechanism and therapeutic strategies. *Cardiology*. 1994; 84 (Suppl. 2): 57–67.
- [26] Knauf H, Mutschler E: Functional state of the nephron and diuretic dose-response-rationale for a low-dose combination therapy. *Cardiology*. 1994; 84 (Suppl. 2): 18–26.

- [27] Voelker JR, Brater DC: Diuretics: Applied pharmacokinetics and drug resistance. In: The regulation of sodium and fluid balance. Seldin DW and Giebisch G (editors). Raven Press, New York, 1990: 503–524.
- [28] Andreoli TE: Pathogenesis of renal sodium retention in chronic heart failure. *Miner Electrolyte Metab.* 1999; 25: 11–30.
- [29] Kaissling B, Bachmann S, Kriz W: Structural adaptation of the distal convoluted tubule to prolonged furosemide treatment. *Am J Physiol.* 1985; 248: F374–381.
- [30] Ellison DH, Velasquez H, Wright FS: Adaption of the distal convoluted tubule of the rat. Structural and functional effects of dietary salt intake and chronic diuretic infusion. *J Clin Invest.* 1989; 83: 113–126.
- [31] Shelp WD, Rieselbach RE: The effect of furosemide on residual nephrons of the chronically diseased kidney in man. *Nephron.* 1971; 8: 427–439.
- [32] Brater DC, Anderson SA, Brown-Cartwright D: Response to furosemide in chronic renal insufficiency: Rationale for limited doses. *Clin Pharmacol Ther.* 1986; 40: 134–139.
- [33] Knauf H, Mutschler E: Sequential nephron blockade breaks resistance to diuretics in edematous states. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997; 29: 367–372.
- [34] Schrier RW: Pathogenesis of sodium and water retention in high and low output cardiac failure, cirrhosis nephrotic syndrome and pregnancy. *N Engl J Med.* 1988; 319: 1065–1072.
- [35] Beermann B, Groschinsky-Grind M: Clinical pharmacokinetics of diuretics. *Clin Pharmacokinet.* 1980; 5: 221–245.
- [36] Knauf H, Mutschler E: Pharmakokinetik von Diuretika. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten.* 1996; 4: 171–183.
- [37] Ward A, Heel RC: Bumetanide: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs.* 1994; 28: 426–464.
- [38] Pentikäinen PJ, Penttilä A, Neuvonen PJ, Gothoni G: Fate of <sup>14</sup>C-Bumetanide in man. *Br J Clin Pharmacol.* 1977; 4: 39–44.
- [39] Pentikäinen PJ, Neuvonen PJ, Kekki M, Penttilä A: Pharmacokinetics of intravenously administered bumetanide in man. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1980; 6: 219–228.
- [40] Aranda JV, Turmen T, Sasyniuk BI: Pharmacokinetics of diuretics and methylxanthines in the neonate. *Eur J Clin Pharmacol.* 1980; 18: 55–63.
- [41] Rudy DW, Brater DC: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of bumetanide. Johnson S, Johnson FN: The diuretic agents 1. Bumetanide. Marius Press, Carnforth, 1990: 31–57.

- [42] Halladay SC, Sipes IG, Carter DE: Diuretic effect and metabolism of bumetanide in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1977; 22: 179–187.
- [43] Martindale: The Complete Drug Reference. Reynolds EF (editor). 31. Auflage; Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 1982.
- [44] Melethil S, Conway WD: Urinary excretion of probenecid and its metabolites in humans as a function of dose. *J Pharm Sci.* 1976; 65: 861–865.
- [45] Cunningham RF, Israili ZH, Dayton PG: Clinical pharmacokinetics of probenecid. *Clin Pharmacokinet.* 1981; 6 (2): 135–151.
- [46] Campbell DB, Taylor AR, Hopkins YW, Doyle EA: Pharmacokinetics and metabolism of indapamide: A review. *Curr Med Res Opin.* 1977; 5 (Suppl. 1): 13–24.
- [47] Massry SG: Indapamide in perspective: A concise review of its action and efficacy in hypertension. In: *Drugs in Focus*. ADIS Press, Manchester, U.K., 1989.
- [48] Szabadi R, Costello R, Caruso F.S, Vukovich RA: Single and multiple oral dose pharmacokinetics of indapamide, a new diuretic-antihypertensive. *Clin Res.* 1982; 30: 635A ff.
- [49] Schiavi P, Jochemsen R, Guez D: Pharmacokinetics of sustained and immediate release formulations of indapamide after single and repeated oral administration in healthy volunteers. *Fundam Clin Pharmacol.* 2000; 14 (2): 139–146.
- [50] Schiavi P, Jochemsen R, Guez D: Pharmacokinetics sustained release indapamide in man. Institut de Recherches Internationales Servier.
- [51] Rücker G, Neugebauer M, Willems GG: Instrumentelle pharmazeutische Analytik. 2. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1992.
- [52] Rapaka RS, Roth J, Viswanathan CT, Goehl TJ, Prasad VK, Cabana BE: Improved method for the analysis of furosemide in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1982; 227 (2): 463–469.
- [53] Sidhu JS, Charles BG: Simple microscale high-performance liquid chromatographic method for determination of furosemide in neonatal plasma. *J Chromatogr.* 1993; 612 (1): 161–165.
- [54] Russel FG, Tan Y, Van Meijel JJM, Gribnau FWJ, Ginneken CAM: Solid-phase extraction of furosemide from plasma and urine and subsequent analysis by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1989; 496 (1): 234–241.

- [55] Carr K, Rane A, Frölich JC: A simplified assay of furosemide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1978; 145 (3): 421–427.
- [56] Kerremans AL, Tan Y, Van Ginneken C A, Gribnau FW: Specimen handling and high-performance liquid chromatographic determination of furosemide. *J Chromatogr.* 1982; 229 (1): 129–139.
- [57] Wells TG, Hendry IR, Kearns GL: Measurement of bumetanide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and application to bumetanide disposition. *J Chromatogr.* 1991; 570 (1): 235–242.
- [58] Gradeen CY, Billay DM, Chan SC: Analysis of bumetanide in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 1990; 14 (2): 123–126.
- [59] Marcantonio LA, Auld WH, Skellern GG: Determination of the diuretic bumetanide in biological fluids by high-performance liquid chromatography *J Chromatogr.* 1980; 183 (1): 118–123.
- [60] Smith DE: High-performance liquid chromatographic assay for bumetanide in plasma and urine. *J Pharm Sci.* 1982; 71 (5): 520–523.
- [61] Félix G, Cachau C, Thienpont A, Soulard M-H: Synthesis and chromatographic properties of HPLC chiral stationary phases based upon *b*-Cyclodextrins. *Chromatographia.* 1996; 42 (9/10): 583–590.
- [62] Ozden T, Turker H, Tosun U: Quantitative High-performance liquid chromatographic analysis of indapamide in pharmaceutical dosage forms. *Pharm. Pharmacol. Commun.* 1998; 4: 397–399.
- [63] Sane RT, Leela Joshi, Tendolkar RV, Gangal DP, Ladage KD, Kothurkar RM: Simultaneous high performance liquid chromatographic determination of atenolol and indapamide from pharmaceutical preparations. *Indian J Pharm Sci.* 1990; 204–206.
- [64] Padval MV, Bhargava HN: Liquid chromatographic determination of indapamide in the presence of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 1993; 11 (10): 1033–1036.
- [65] Grebow PE, Treitman JA, Yeung AK: Fluorometric assay for urinary indapamide. *J Pharm Sci.* 1978; 67 (8): 1117–1120.
- [66] Choi RL, Rosenberg M, Grebow PE, Huntley TE: High-performance liquid chromatographic analysis of indapamide in urine, plasma and blood. *J Chromatogr.* 1982; 230 (1): 181–187.
- [67] Vallee F, Bisson C, LeBel M: HPLC method for the determination of indapamide in human blood. *Pharm Res.* 1997; 14 (Suppl. 11): 2510.

- [68] Miller RB, Dadgar D, Lalande M: High-performance liquid chromatographic method for the determination of indapamide in human whole blood. *J Chromatogr.* 1993; 614: 293–298.
- [69] Urien S, Riant P, Renouard A, Coulomb B, Rocher I, Tillement JP: Binding of indapamide to serum proteins and erythrocytes. *Biochem Pharmacol.* 1988; 37 (15): 2963–2966.
- [70] Campbell DB, Moore RA: The Pharmacology and clinical pharmacology of indapamide. *Postgrad Med J.* 1981; 57 (Suppl.): 7–17.
- [71] Reubi FC, Weidmann P, Haller J, Cottier PT: Changes in renal function in essential hypertension. *Am J Med.* 1978; 64: 556–563.
- [72] Diagnostic Systems Laboratories Deutschland GbmH: Coated-Tube-Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Aldosteron in Serum, Plasma oder Urin. Sinsheim, 1999.
- [73] Biochem Immunosystems Deutschland: Radioimmunoassay mit Magnettrenntechnik zur quantitativen Bestimmung der Plasmapreninaktivität in humanem Plasma. Freiburg, 1999.
- [74] Nichols Institute Deutschland: Radioimmunoassay für die quantitative Bestimmung von atrialem natriuretischem Peptid (ANP) in Humanplasma nach C18-Extraktion. Bad Nauheim, 1992.
- [75] Mutschler E: Arzneimittelwirkungen. 7. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1996.
- [76] Asmar R: Résultats d'efficacité et de sécurité d'indapamide 1,5 mg comprimé enrobé à libération prolongée dans le traitement de l'hypertension artérielle. *Ann Cardiol Angéiol.* 1998; 47 (2): 94–104.
- [77] Schiavi P, Gordon B, Jochemsen R, Genissel P, Hiley M, Guez D: Pharmacokinetics of sustained and immediate release formulations of indapamide single oral administration under fasting and feeding conditions and after repeated administration in healthy volunteers. Institut de Recherches Internationales Servier. 1998.
- [78] Alvan G, Paintaud G, Wakelkamp M: The efficiency concept in pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 36: 375–389.
- [79] Odland B: Relation between renal tubular secretion and effects of five loop diuretics. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979; 211: 238–244.
- [80] Feig PU: Cellular mechanism of action of loop diuretics: Implications for drug effectiveness and adverse effects. *Am J Cardiol.* 1986; 57: 14–19.
- [81] Rose HJ, O'Malley K, Pruitt AW: Depression of renal clearance of furosemide in man by azotemia. *Clin Pharmacol Ther.* 1976; 21: 141–146.

- [82] Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H: Molecular cloning and functional expression of multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol.* 1999; 276: F122–F128.
- [83] Race JE, Grassl SM, Williams WJ, Holtzman EJ: Molecular cloning and characterisation of two novel human renal organic anion transporters (hOAT1 and hOAT3). *Biochem. Biophys Res Commun.* 1999; 255: 508–514.
- [84] Kusuvara H, Sekine T, Utsunomiya-Tate N, Tsuda M, Kojima R, Cha SH, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H: Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain. *J Biol Chem.* 1999; 274 (19): 13675–13680.
- [85] Uwai Y, Saito H, Hashimoto Y, Inui KI: Interaction and transport of thiazide diuretics, loop diuretics and acetazolamide via rat renal organic anion transporter rOAT1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295 (1): 261–265.
- [86] Lu R, Chan BS, Schuster VL: Cloning of the human kidney PAH transporter. Narrow substrate specificity and regulation by protein kinase C. *Am J Physiol.* 1999; 45: F245–F303.
- [87] Odling B, Beermann B, Lindstrom B: Coupling between renal tubular secretion and the effect of bumetanide. *Clin Pharmacol Ther.* 1983; 34: 805–809.
- [88] Odling B, Beermann B: Renal tubular secretion and the effects of furosemide. *Clin Pharmacol Ther.* 1980; 27: 784–790.
- [89] Brater DC: Clinical pharmacology of loop diuretics. *Drugs.* 1991; 41: 14–22.
- [90] Brater DC: Disposition and response to bumetanide and furosemide. *Am J Cardiol.* 1986; 57: 20A–25A.
- [91] Jacobsen HR, Kokko JP: Diuretics: Sites and mechanism of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1976; 16: 201–214.
- [92] Greger R: Chloride reabsorption in thick ascending limb, distal convolution and collecting duct. *Annu Rev Physiol.* 1988; 50: 111–122.
- [93] Imai M: Effect of bumetanide and furosemide on the thick ascending limb of Henle's loop of rabbits and rats perfused in vitro. *Eur J Pharmacol.* 1977; 41: 401–416.
- [94] Schletter E, Greger R, Weidtko C: Effect of high ceiling diuretics on active salt transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. *Pflügers Archiv.* 1983; 396: 210–217.
- [95] Rindler MJ, McRoberts JA, Saier MH: Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-cotransport in the Madin-Darby canine kidney cell line. *J Biol Chem.* 1982; 257: 2254–2259.

- [96] Jayakumar S, Puschett JB.: Study of the sites and mechanisms of action of bumetanide in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1977; 201: 251–258.
- [97] Voelker JR, Cartwright-Brown D, Anderson S, Leinfelder J, Sica DA, Kokko JP, Brater DC: Comparison of loop diuretics in patients with chronic renal insufficiency. *Kidney Int.* 1987; 32: 572–578.
- [98] Berg KJ, Tromsdahl A, Wideroe TE: Diuretic action of bumetanide in advanced chronic renal insufficiency. *Eur J Clin Pharmacol.* 1976; 9: 265–275.
- [99] Kampf VD, Baethke R: The diuretic activity of bumetanide in a controlled comparison with furosemide in patients with various degrees of impaired renal function. *Arzneimittelforschung.* 1980; 30: 1015–1018.
- [100] Whelton A: Longterm bumetanide treatment of renal edema. Comparison with furosemide. *J Clin Pharmacol.* 1981; 21: 591–598.
- [101] Runeberg L, Pasternack A, Borgmastars H, von Bonsdorff M: Clinical trial of a new diuretic, bumetanide, in seriously ill patients. *Ann Clin Res.* 1974; 6: 272–278.
- [102] Ellison DH: Epithelial cell hypertrophy: A physiological cause of diuretic resistance. In: Diuretics IV: Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications. Puschett J and Greenberg A (editors). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1993: 427–434.
- [103] Hasenfuss G, Holubarsch C, Herzog C, Knauf H, Spahn H, Mutschler E, Lust H: Influence of cardiac function on the diuretic and hemodynamic effects of the loop diuretic piretanide. *Clin Cardiol.* 1987; 10: 1–6.
- [104] Oster JR, Epstein M, Smoller S: Combined therapy with thiazide type and loop diuretic agents for resistant sodium retention. *Ann Int Med.* 1983; 99: 405–406.
- [105] Knauf H, Mutschler E: Low-dose segmental blockade of the nephron rather than high-dose diuretic monotherapy. *Eur J Clin Pharmacol.* 1993; 44 (Suppl. 1): S63–S68.
- [106] Brater DC, Kaojarern S, Chennavasin P: Pharmacodynamics of the diuretic effects of aminophylline and acetazolamide alone and combined with furosemide in normal subjects. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983; 227: 92–97.
- [107] Ito S, Abe K: Contractile properties of afferent and efferent arterioles. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997; 24 (7): 532–535.
- [108] Harrison-Bernard LM, Navar LG: Renal cortical and medullary microvascular blood flow autoregulation in rat. *Kidney Int.* 1996; 57 (Suppl.): S23–29.
- [109] Kreeft JH, Langlois S, Ogilvie RI: Comparative trial of indapamide and hydrochlorothiazide in essential hypertension with forearm plethysmography. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984; 6: 622–626.

- [110] Zempel G, Ditlevsen J, Hoch M, Emerich U, Heinle H, Schiavi P, Dubois F, Lang F: Effects of indapamide on  $\text{Ca}^{2+}$ -entry into vascular smooth muscle cells. *Nephron*. 1997; 76: 460–465.
- [111] Junquero DC, Schini VB, Vanhoutte PM: Indapamide potentiates the endothelium-dependent production of cyclic guanosine monophosphate by bradykinin in the canine femoral artery. *Am Heart J*. 1991; 122: 1204–1209.
- [112] Wolgast M, Bayati A, Hellberg O, Kallskog O, Nygren K: Osmotic diuretics and hemodilution in postischemic renal failure. *Renal Failure*. 1992; 14: 297–302.
- [113] Madkour H, Gadallah M, Riveline B, Plante GE, Massry SG: Comparison between the effects of indapamide and hydrochlorothiazide on creatinine clearance in patients with impaired renal function and hypertension. *American J Nephrol*. 1995; 15: 251–255.
- [114] Brater DC, Chennavasin P, Seiwel R, Beck J: Furosemide in patients with heart failure: shift in dose-response curves. *Clin Pharmacol Ther*. 1980. 28 (2): 182–186.
- [115] Burke TJ, Nobles EM, Wolf PE, Erickson AL: Effect of indapamide on volume-dependent hypertension, renal hemodynamics, solute excretion and proximal nephron fractional reabsorption in the dog. *Curr Med Res Opin*. 1983; 8 (Suppl. 3): 25–37.
- [116] Knauf H, Mutschler E: The  $\text{Na}^+$  load in the nephron segment determines the ceiling quality of the diuretic. In: Diuretics III, Chemistry, Pharmacology and Clinical Applications. Puschett J and Greenberg A (editors). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1989: 329–362.
- [117] Lindström B: Determination of furosemide concentrations in plasma and urine using high-speed liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1974; 100: 189–191.
- [118] Cooper SF, Massé R, Dugal R: Comprehensive screening procedure for diuretics in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1989; 489: 65–88.
- [119] Swezey SE, Meffin PJ, Blaschke TF: Measurement of furosemide by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1979; 174: 469–473.
- [120] Uchino K, Isozaki S, Saitho Y, Nakagawa F, Tamura Z: Quantitative determination of furosemide in plasma, plasma water, urine and ascites fluid by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1984; 308: 241–249.
- [121] ICH-Guidelines: International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Step 4: Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996.

- [122] Ebel S: Würzburger Skripten zur Analytik. 4. Auflage; Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie; Würzburg, 1992.
- [123] Funk W, Dammann V, Vonderheid C, Oehlmann G: Statistische Methoden in der Wasseranalytik. 1. Auflage; VCH Verlag, Weinheim, 1985.
- [124] Kromidas S: Validierung in der Analytik. 1. Auflage; Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1999.
- [125] Shah VP, Midha KK, Dighe S: Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. *J AOAC Int.* 1992: 19A–26A.





Meine akademischen Lehrer neben Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar und Prof. Dr. T. Risler waren die Professoren und Dozenten:

Ammon, H.P.T.	Pharmakologie und Toxikologie
Drews, G.	Pharmakologie und Toxikologie
Eger, K.	Pharmazeutische Chemie
Heide, L.	Pharmazeutische Biologie
Müller, C.	Pharmazeutische Chemie
Reinhard, E.	Pharmazeutische Biologie
Roth, H.J.	Pharmazeutische Chemie
Schmidt, P.C.	Pharmazeutische Technologie
Schubert, R.	Pharmazeutische Technologie
Schulz, J.	Pharmazeutische Biochemie
Steinhilber, D.	Pharmazeutische Chemie
Wahl, M.A.	Pharmakologie und Toxikologie
Zimmermann, W.	Pharmazeutische Chemie



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Christina Isabel Veiel
Geburtstag	14.06.1972
Geburtsort	Konstanz

### Ausbildung

1978 – 1982	Tegginger-Schule in Radolfzell a.B.
1982 – 1991	Gymnasium Radolfzell in Radolfzell a.B.
Juni 1991	Allgemeine Hochschulreife
10/1991 – 02/92	Lehramtsstudium der Fächer Englisch, Italienisch und Politikwissenschaft an der Universität Konstanz
April 1992	Immatrikulation zum Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 1994	1. Staatsexamen Pharmazie
April 1996	2. Staatsexamen Pharmazie
05/96 – 10/96	Pharmaziepraktikantin (Neckartor-Apotheke, Tübingen)
11/96 – 04/97	Pharmaziepraktikantin (Apotheke in der Kaiserpassage, Reutlingen)
Juli 1997	3. Staatsexamen Pharmazie
Juli 1997	Erhalt der Approbation als Apothekerin

11/97 – 06/01           Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit dem Titel „Neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der Diuretikaresistenz unter differenzierter Betrachtung von Bumetanid, Furosemid und Indapamid“ an der Medizinischen Klinik, Abteilung III für Innere Medizin und am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. T. Risler und wissenschaftlicher Mitbetreuung von Prof. Dr. K.-A. Kovar

### **Berufliche Tätigkeit**

10/97 – 08/98           Teilzeitbeschäftigung als Apothekerin in der Neuen Apotheke, Echterdingen

09/98 – 06/01           Teilzeitbeschäftigung als Apothekerin in der Apotheke in der Kaiserpassage, Reutlingen

