

# Studie formoline L112

Cnubben et al. BMC obesity (2016)

# Eine orale Einzeldosis eines Polyglucosamins beeinflusst die Bioverfügbarkeit von [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure bei adulten weiblichen Göttinger Minischweinen

Nicole H. P. Cnubben<sup>1\*</sup>, Shanti L. Tel<sup>1</sup>, Marleen A. Hemmes<sup>1</sup>, Astrid Langenkamp-Brand<sup>1</sup>, Dimitri Grossouw<sup>2</sup>, Harm T. Jansen<sup>2</sup> und Bert T. H. J. de Bie<sup>1</sup>

## Abstract

### Hintergrund:

Adipositas hat sich seit 1980 weltweit fast verdoppelt und ist ein führendes Risiko für Todesfälle auf globaler Ebene. Sie hat tiefgreifende Auswirkungen auf Morbidität, Mortalität, Kosten des Gesundheitswesens und berufliche und persönliche Lebensqualität. Die Behandlung von Adipositas und deren Konsequenzen beinhaltet Lebensstil-Interventionen, Pharmakotherapie und Adipositaschirurgie. Polyglucosamin wurde als alternative Strategie zur Behandlung der Adipositas vorgeschlagen, indem es die Menge des absorbierten Fetts durch Interaktion mit Nahrungsfetten auf Basis verschiedener Mechanismen reduziert. Das Ziel dieser Studie ist, den Einfluss von Polyglucosamin auf die Bioverfügbarkeit der Modellschweine [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure bei weiblichen Göttinger Minischweinen zu untersuchen.

### Methode:

Die Studie bestand aus zwei Behandlungsgruppen, und beide bestanden aus sechs adulten weiblichen Göttinger Minischweinen mit einer punktierten Halsvene, um die wiederholte Entnahme von Blutproben zu ermöglichen. Eine Gruppe diente als die unbehandelte Gruppe (Kontrolle), die andere Gruppe war vorbehandelt mit 2 Tabletten 500 mg formoline L112. Nach 30 min. wurde allen Tieren [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure oral verabreicht. Exkrete und Blutproben wurden für die Analyse von Radioaktivität in einem Zeitraum von 48 h vor der Dosierung bis zu 144 h nach der Dosierung gesammelt. Bei Tötung wurden die Leber und die Inhalte des Magen-Darm-Trakts für die Radioanalyse gesammelt

### Ergebnisse:

Bei Behandlung mit Polyglucosamin (formoline L112) wurde der  $T_{max}$  von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure im Plasma von 4 auf 16 h verschoben, und der  $C_{max}$  sank signifikant von 14,1 µg/g auf 3,3 µg/g. Darüber hinaus ist die interne Exposition auf [<sup>14</sup>C]-Ölsäure, wie wiedergegeben durch die Fläche unter der Kurve während dem 0-12 h-Zeitintervall nach Verabreichung ( $AUC_{0-12h}$ ), bei Behandlung mit Polyglucosamin signifikant verringert auf 32,9 % des Plasmawertes von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure bei unbehandelten Tieren. Sogar bis zu 24 h nach Dosierung ist  $AUC_{0-24h}$  signifikant auf 50,7 % des Plasmawertes von unbehandelten Tieren verringert, und dieser signifikante Effekt dauert bis zu 60 h nach Dosierung an.

### Schlussfolgerungen:

Diese Studie zeigt, dass die Behandlung mit Polyglucosamin (formoline L112) die Fettabsorption aus dem Magen-Darm-Trakt in die systemische Zirkulation verringert (wie bewertet durch  $C_{max}$  &  $AUC$ ) und verzögert (wie bewertet durch  $T_{max}$ ) und die Spitzenexposition auf freie Fettsäuren begrenzt, was zu günstigeren Bedingungen bei übergewichtigen Menschen beitragen könnte.

### Schlüsselworte:

Polyglucosamin, Chitosan, formoline L112, Gewichtsmanagement, Adipositas, Fettbindung

#### \*Korrespondenzautor.

nicole.cnubben@tno.triskelion.nl  
<sup>1</sup>TNO Triskelion BV, P.O. Box 844, Utrechtseweg 48, 3704 HE, Zeist, Die Niederlande. Die vollständige Liste der Autoreninformationen ist am Ende des Artikels aufgeführt

## Hintergrund

Seit 1980 hat sich Adipositas weltweit fast verdoppelt. 2008 waren mehr als 1,4 Milliarden Erwachsene, 20 und älter, übergewichtig. Von diesen waren mehr als 200 Millionen Männer und fast 300 Millionen Frauen adipös. Etwa 65 % der Weltbevölkerung lebt in Ländern, in denen Übergewicht und Adipositas mehr Menschen tötet als Untergewicht. Übergewicht und Adipositas sind die führenden Risikofaktoren für globale Todesfälle. Ca. 3,4 Millionen Erwachsene sterben jedes Jahr, da sie übergewichtig oder adipös sind. Darüber hinaus gehen 44 % der Diabeteserkrankungen, 23 % der ischämischen Herzerkrankungen und zwischen 7 und 41 % bestimmter Krebsleiden zu Lasten von Übergewicht und Adipositas [1]. Adipositas hat tiefgreifende Auswirkungen auf Morbidität, Mortalität, die Kosten des Gesundheitswesens und die berufliche und individuelle Lebensqualität [2].

Die aktuellen Strategien, um die Belastung durch diese Krankheit und ihrer Konsequenzen zu verringern, beinhalten Lebensstil-Interventionen (Diät/körperliche Aktivität), Pharmakotherapie und Adipositaschirurgie. Die strengen Anforderungen bezüglich Wirksamkeit und Sicherheit haben zu sehr begrenzten pharmakotherapeutischen Möglichkeiten geführt. Mit Stand September 2013 waren nur drei Medikamente von der FDA als Zusatztherapie für chronisches Gewichtsmanagement zugelassen: 1) der im Darm wirkende Lipasehemmer Orlistat, 2) das über das serotonerge System wirkende Lorcaserin und 3) ein Phentermin/Topiramat-Präparat mit verzögerter Wirkstofffreisetzung, welches über die Modulation von Katecholaminen in den Sättigungszentren des Hypothalamus wirkt. Es zügelt den Appetit (Phentermin) und blockiert spannungsabhängige Natriumkanäle, Glutamatrezeptoren, Carbonanhydrase und verstärkt die GABA-Aktivität (Topiramat) [2-4]. Aber es gibt dennoch potenziell gefährliche Wirkungen sowie gewisse unangenehme Nebenwirkungen. Die aus der Wirkungsweise von Orlistat resultierenden Nebenwirkungen beinhalten öligen Stuhl, flüssigen Stuhl, fäkale Dringlichkeit oder Inkontinenz, Flatulenz und Bauchkrämpfe [5]. Wichtige Bedenken bezüglich Lorcaserin sind u. A. kardiovaskuläre Ereignisse, kognitive Beeinträchtigung und psychiatrische Störungen [2, 4]. Die

Zulassung für den Phentermin/Topiramat-Cocktail wurde von den europäischen Regulierungsbehörden verwehrt, die auf potenzielle Risiken für Herz und Blutgefäße, psychiatrische Nebenwirkungen und kognitive Nebenwirkungen verweisen, um ihre Entscheidung zu erklären [6].

Gegenwärtig wird aufgrund von Unzufriedenheit mit den hohen Kosten und den potenziell gefährlichen und/oder unangenehmen Nebenwirkungen das Potenzial von natürlichen Produkten zur Behandlung von Adipositas untersucht, und dies ist möglicherweise eine hervorragende alternative Strategie für die Behandlung von Adipositas [3]. Es gibt eine Vielzahl nutrazeutischer Produkte, die für die Integration in ein Programm zum Gewichtsmanagement in Betracht kommen. Unter den löslichen Ballaststoffen ist ein solches Polysaccharid Polyglucosamin [7]. Polyglucosamin hat das Potenzial, eine sichere Substanz für orale Verwendung zu sein [8, 9]. Die FDA hat Polyglucosamin als GRAS (Generally Recognized As Safe, gesundheitlich unbedenklich) bewertet. Polyglucosamin-Polymere werden durch den Gastrointestinaltrakt nicht absorbiert, und Biodistribution ist unwahrscheinlich [9]. Polyglucosamin wurde als eine Art von Nahrungsfaser beworben die, aufgrund ihrer Fähigkeit, Fett und Gallensalze im menschlichen Magen-Darm-Trakt zu „binden“ und diese angelagerte Fett-Polyglucosamin-Mischung aus dem Körper auszuscheiden, dabei helfen kann, die Fettabsorption zu reduzieren. Diese Wirkweise verringert das absorbierte Fett und hat dazu geführt, dass diese Substanzen zur Unterstützung von Gewichtsverlust angewendet werden [7].

Die hypocholesterolemischen und lipidsenkenden Wirkungen von Polyglucosamin sind allgemein anerkannt, aber die spezifischen Mechanismen werden noch nicht vollständig verstanden. Die Aktivität von Polyglucosamin wurde mit dessen positiv geladenen Aminogruppen in Verbindung gebracht, die zu einer Bindung der freien Fettsäuren (freigesetzt aus Nahrungsfetten) und Gallensalzkomponenten führt. Dies wiederum führt zu einer gestörten Lipidabsorption im Darm. Es wurde beschrieben, dass sich Polyglucosamin im Magen auflöst, Fett emulgiert und im Darm ein Gel formt, welches Fett einfängt und die intestinale Absorption verhindert. In

jüngerer Zeit wurde berichtet, dass Polyglucosamin einen Flocculus im Duodenum bildet, der Nahrungsfette einschließt [8, 10, 11]. Darüber hinaus wurde durch in vitro-Experimente nahegelegt, dass Chitosan als konkurrierender Inhibitor von Pankreas-Lipase wirken könnte [12]. Insgesamt bewirken die Mechanismen, die bei der Interaktion von Polyglucosamin mit Nahrungsfetten aktiv werden, eine Kombination der oben genannten Mechanismen, aber es wurde noch keiner speziell bestätigt [7, 13, 14].

Ob Polyglucosamin tatsächlich für Cholesterinkontrolle oder Gewichtsverlust klinisch wirksam ist, wird weiterhin kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Polyglucosamin als Nahrungszusatz keinen Effekt auf Fettabsorption oder Plasmacholesterinniveaus hatte und nur einen minimalen, klinisch nicht signifikanten Effekt auf das Körpergewicht [15–19]. Allerdings berichten andere Studien bei Supplementierung von Polyglucosamin von reduzierten Blutcholesterinwerten, verringertem Gewicht und einem reduzierten Prozentsatz von Fett und Fettmasse in der Klinik [20–24]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine dreimonatige Gabe von Polyglucosamin die Insulinsensitivität bei adipösen Patienten signifikant erhöhte und eine deutlich bemerkbare Verringerung von Körpergewicht und Triglycerid-Niveaus aufwies [25].

formoline L112 ist ein lineares Polysaccharid bestehend aus willkürlich verteilten  $\beta$ -(1–4)-verknüpftem D-Glucosamin (deacetylierte Einheit) und N-Acetyl-D-Glucosamin (acetylierte Einheit) aus Krebstierpanzern. Daher ist formoline L112 eine dezidierte Spezifikation von Polyglucosamin mit geringem Molekulargewicht, und aufgrund seines hohen Grades an Deacetylierung ist es Teil der Untergruppe der Polyglucosamine [13, 14]. formoline L112 ist in Deutschland als Medizinprodukt der Klasse III registriert und wird zur Reduzierung der Fettabsorption eingesetzt. Die extrem hohe Fettbindekapazität von Polyglucosamin wurde in vitro durch die Nachahmung der Umgebung des Magen-Darm-Trakts nachgewiesen. Es wurde belegt, dass ein Gramm formoline L112 ca. 700 g Nahrungsfett bindet [7]. formoline L112 wird eingesetzt bei Gewichtsma-

nagement, Gewichtsreduzierung und zur Senkung der Cholesterinwerte im Blut. **Die Wirksamkeit des Polyglucosamins formoline L112 bei der Gewichtsreduzierung wurde in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten klinischen Studie bestätigt [24].**

Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass formoline L112 große Mengen von Nahrungsfetten in vitro bindet, muss die Wirkung von Polyglucosamin auf die Verfügbarkeit und die Aufnahme von Lipiden in der in vivo-Situation noch bewiesen werden.

Das Ziel dieser Studie ist die Bereitstellung von Daten zum Einfluss von formoline L112 auf die Bioverfügbarkeit von  $[9-^{14}\text{C}]$ -Ölsäure ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ ) als Modellsubstanz. Aus chemischer Sicht ist Ölsäure als eine einfach ungesättigte Omega-9-Fettsäure klassifiziert. Die Modellsubstanz Ölsäure ist eine Fettsäure, die natürlich in verschiedenen tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen vorkommt. Olivenöl besteht zum Großteil aus Ölsäure-Triglyceriden. Ölsäure ist die im menschlichen Fettgewebe am reichlichsten vorhandene Fettsäure [26]. Ölsäure ist eine ungesättigte Fettsäure, die leicht an einer spezifischen Position im Molekül markiert werden konnte. Dies gestattet eine gute Verfolgung der aktiven Substanz.

Das Minischwein wurde für die Untersuchung der Auswirkungen des fettbindenden Polyglucosamins auf die Bioverfügbarkeit der Modellsubstanz Ölsäure ausgesucht. Dies basiert auf dem Wissen, dass verschiedene anatomische und physiologische Aspekte von (Mini-)Schweinen den menschlichen Gegebenheiten mehr ähneln als die von anderen Tierarten. Das Minischwein etabliert sich rasch als biomedizinisches Modell für Energiemetabolismus und Adipositas beim Menschen, da es postnatal kein braunes Fettgewebe aufweist, und aufgrund seiner vergleichbaren metabolischen Eigenschaften, kardiovaskulären Systeme und proportionalen Organgrößen [27, 28]. Sowohl Menschen als auch (Mini-)Schweine sind echte Omnivore. Dies spiegelt sich in Anatomie, Physiologie und Funktion des gastrointestinalen Systems wider, und trotz einiger anatomischer Unterschiede des (Mini-) Schweins

bleibt die Verdauungsphysiologie der des Menschen doch vergleichbar [29-31]. Der Dünndarm ist lang, und Transitzeit und pH-Profil sind dem des Menschen sehr ähnlich. In einer Studie neueren Datums wurde die mittlere Retentionszeit im Dünndarm für 30 kg-Schweine auf 4 h [32] geschätzt. Enzymaktivität im Darm und Absorption weisen viele Ähnlichkeiten auf [33]. Es kann erwartet werden, dass die Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Medikamenten, die durch pH oder Transitzeit beeinflusst werden, bei Menschen und (Mini-) Schweinen vergleichbar sind. Zudem wird aus öffentlich zugänglichen Informationen sowie aus Publikationen der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) und der FDA deutlich, dass das Minischwein von Regulierungsbehörden weltweit vollständig anerkannt und akzeptiert ist [33]. Das Minischwein hat gegenüber dem Schwein aufgrund seiner verringerten Größe einen signifikanten Vorteil, da dies die für die Experimente benötigte Menge an radioaktiv markierter Substanz reduziert und eine leichtere Handhabung gestattet. Dies gilt insbesondere, da erwachsene Tiere benötigt werden [33]. Für die vorliegende Studie werden adulte Minischweine bevorzugt, da jüngere Tiere im ersten Jahr keine Fetteinlagerungen aufweisen. Sie verstoffwechseln alle verfügbaren Energien für das Wachstum und werden nicht fettleibig.

## Methoden

### Materialien

Ölsäure (Reinheit 99 %) wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deutschland) erworben. [9-<sup>14</sup>C] Ölsäure wurde bei Moravek Biochemicals Inc. (USA) speziell synthetisiert. Die spezifische Aktivität war 19,5 mCi/mmol, und die Reinheit war 99,7 %. Polyglucosamin (formoline L112 (C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>)<sub>n</sub> (C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>)<sub>n</sub>, 500 mg Tabletten) wurden von Certmedica International GmbH (Deutschland) bezogen.

### Versuchstiere

Die Studie wurde mit 12 weiblichen Göttinger Minischweinen im Alter von ungefähr 13-14 Monaten durchgeführt. Das Wohl der Tiere wurde im Einklang mit den allgemeinen Prinzipien zur Verwendung von Versuchstieren der Europäischen Gemeinschaft (Richtlinie 86/609/EWG) und der niederländischen

Gesetzgebung (Versuchstiergesetz, 1997) sichergestellt. Dies beinhaltet die Genehmigung der Studie durch die unabhängige Ethikkommission von TNO (DEC nr. 3329). Die Minischweine wurden von Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, Dalmoose (Dänemark) bezogen. Bei Ankunft wurden die Minischweine auf offensichtliche Zeichen schlechter Gesundheit und Anomalien untersucht. Die Tiere wurden gemäß der europäischen Richtlinien zur Unterbringung von Laborminischweinen in Innengehegen gehalten. Das Alter der Minischweine lag zu Beginn der Studie bei ungefähr 14 Monaten. Zum Start der Studie überschritt die Gewichtsabweichung nicht ± 20 % des Durchschnittsgewichts.

Eine Kanüle wurde den Tieren unter Narkose in die Halsvene gelegt. Als Prämedikation erhielten die Tiere 13 mg/kg Ketamin, 0,7 mg/kg Midazolam, 0,02 mg/kg Atropin und 4 mg/kg Thiopental sowie Amoxicillin/Clavulansäure als antibiotische Behandlung mit Depomycin um den Katheterbereich.

Nach der Punktion wurden die Tiere für mindestens 14 Tage an die Laborbedingungen gewöhnt. Die Minischweine wurden nach dem Zufallsprinzip einer Studienbehandlung zugewiesen, wobei die Randomisierung auf das Körpergewicht begrenzt war.

Jede Studiengruppe war in einem Gehege untergebracht. Während der Eingewöhnungsphase wurden die Minischweine sozialisiert und vor der Studie trainiert, um Stress zu minimieren und kooperative Tiere zu erhalten. Die Tiere wurden unter konventionellen Bedingungen in Innengehegen auf Stroheinstreu mit einem Spielball während der Eingewöhnung gehalten. Die Tiere wurden 48 h vor Beginn des Versuchs (Dosierung) unter Testbedingungen an die Edelstahl-Stoffwechselkäfige gewöhnt. Der Raum wurde mit circa 10 Luftwechseln pro Stunde ventiliert und hatte eine Zieltemperatur von 20-24 °C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45-70 %. Die Beleuchtung war künstlich mit einer Sequenz von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit. Die Tiere wurden zweimal täglich auf Zeichen schlechter Gesundheit untersucht.

Die Tiere wurden mit einer kommerziellen Kost (SMP (E) SQC) (SDS Special Diets Services, Whittham, England) gefüttert und erhielten eine abgemessene Futtermenge (225 g pro Mahlzeit) zweimal täglich (morgens und am Nachmittag/frühen Abend



(am Tag der Medikamentengabe; etwa 8 h nach der Dosierung). Vierzehn Tage vor dem Versuchsstartdatum (Dosierung) wurde die Standardkost mit circa 10 g Olivenöl pro Mahlzeit ergänzt. Trinkwasser wurde von N.V. Vitens Midden-Nederland geliefert und *ad libitum* jederzeit angeboten.

### Studiendesign

Die Studie bestand aus zwei Behandlungsgruppen. Beide bestanden aus sechs weiblichen Göttinger Minischweinen. Gruppe A diente als die unbehandelte Gruppe (Kontrolle), und Gruppe B wurde mit Polyglucosamin wie folgt vorbehandelt: die Tiere von Gruppe B wurden mit 2 Tabletten 500 mg formoline L112 (1 g formoline L112 gesamt) dosiert, gefolgt von ungefähr 10 ml Wasser über eine Spritze. Die 2 Tabletten Polyglucosamin wurden in 2 Gelatine-kapseln eingeführt. Die Minischweine waren darauf trainiert, diese Kapseln zu verzehren. Danach durften die Tiere beider Gruppen Wasser *ad libitum* trinken. Nach 30 Min. wurden alle Tiere durch orale Aufnahme von Gelatine-kapseln dosiert, die die korrekte Menge der Testsubstanz [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure (10,8 µCi (0,4 MBq) [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure pro kg Körpergewicht und 10 mg Ölsäure pro kg Körpergewicht) enthielten. Dazu wurde ein spezielles Dosiergerät und ein Holzblock verwendet, damit die Tiere nicht auf die Kapseln bissen. Ein Tier der Kontrollgruppe A wurde unzureichend dosiert und wurde aus dem Experiment ausgeschlossen. Die Dosierkapseln wurden am Tag vor der Verabreichung vorbereitet, basierend auf dem Körpergewicht, welches kurz vor der Dosierung bestimmt wurde, und unter Stickstoff und lichtgeschützt bei 2-10°C gelagert. Unmittelbar nach der Medikamentengabe erhielten alle Tiere circa 10 ml Wasser durch eine Spritze. Nach 15 min. durften alle Tiere Wasser trinken und ihre Morgenmahlzeit zu sich nehmen. Diese Mahlzeit wurde innerhalb weniger Minuten verzehrt. Die Tiere waren 48 h vor Versuchsstartdatum (Dosierung) in Stoffwechselläufigen aus Edelstahl unter Testbedingungen untergebracht.

### Probennahmeplan

Urin und Fäkalien wurden bei Raumtemperatur in 24 h-Intervallen gesammelt. Dies begann 2 Tage vor der Dosierung und endete 144 h nach der Dosierung. Bei jeder Sammelperiode wurde der Käfig mit 100 ml entmineralisiertem Wasser gespült. Zu verschiedenen definierten Zeitpunkten wurden über die Kanüle in der Halsvene Blutproben von circa 5 ml in Röhrchen mit Heparin als Antikoagulans entnommen. Dies geschah vor der Dosierung und 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 und 144 h nach der Verabreichung von [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure. Die Kanüle wurde nach jeder Blutprobenentnahme mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Nach der letzten Blutprobennahme des Tages wurde die Kanüle mit 3 % Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Heparin gefüllt und mit einem Deckel verschlossen. Vollblut-Teilproben wurden für die Analyse gesammelt, und das übrige Blut wurde für die Vorbereitung von Plasma durch Zentrifugierung für 10 min. bei 2000 g verwendet. Zum Ende des Experiments wurden die Käfige gründlich mit Wasser/Ethanol/Triton X-100 (100/100/1; v/v/v) gespült. Die Minischweine wurden intravenös durch den Katheter mit 60 mg Natrium-Pentobarbital pro kg Körpergewicht betäubt. Dann wurden die Tiere durch Ausbluten über die Halsschlagader getötet. Bei Tötung wurden die vollständige Leber und der Inhalt des Magen-Darm-Trakts gesammelt. Vor der Analyse auf Radioaktivität wurden die Fäkalien, die Leber und der Inhalt des Magen-Darm-Trakts per Ultra Turrax homogenisiert.

### Analyse der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde in allen Proben durch Flüssigszintillationszählung auf einem Tri-Carb 3100TR Flüssigszintillationszähler unter Verwendung von QuantaSmart-Software™ bestimmt. Alle Zählungen wurden mittels tSIE/AEC (transformierter Spektralindex des externen Standards mit automatischer Kontrolle der Zählhausbeute) in DPM konvertiert. Die Radioaktivität in Fäkalien, Blut- und Lebergewebe wurde durch Verbrennungsanalyse mit einem Packard Sample Oxidizer System 307 bestimmt. Das gebildete CO<sub>2</sub> wurde mit Carbosorb und Permafluor gemischt und mit LSC gemessen.

## HPLC-Analyse für metabolisches Profiling

Das HPLC-System bestand aus einer binären Gradientenpumpe Spectra Series P200 von Thermo Separations und einem Lablogic  $\beta$ -RAM-Detektor Model 4 in Kombination mit Laura Software und UV-Detektion bei 210 nm. Die HPLC-Analyse wurde erzielt mittels einer Umkehrphasen- BDS Hypersil C18-Säule (5  $\mu$ , 250  $\times$  4,6 mm) eluiert bei einem Fluss von 1 ml/min mit 0,1 % Ameisensäure in Wasser als Eluent A und 0,1 % Ameisensäure in Azetonitril als Eluent B. Der Fluss der Szintillationsflüssigkeit (Ultima-Flo M) war 3ml/min. Die Radioaktivität in Fäkalien wurde mit Azetonitril vor der HPLC-Analyse extrahiert. Die Rückstände wurden in DMSO aufgelöst: Tetrahydrofuran (1:1; v:v) und wurde direkt auf die HPLC-Säule injiziert.

## Pharmakokinetische und statistische Analyse

Die kinetische Analyse der Radioaktivität (Blut/Plasma) wurde unter Verwendung von WinNonlin® 6.3 mittels kompartimentfreier Modellanalyse durchgeführt. Die folgenden kinetischen Parameter wurden berechnet, wo es die Daten gestatteten:  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ), das Distributionsvolumen,  $Sp_{max}$ , die Fläche unter der Konzentration-Zeit-Kurve (AUC) (oder AUC<sub>0-n</sub>, AUC<sub>0-∞</sub>) und die Mittlere Verweildauer (Mean Residence Time, MRT). Die statistische Analyse wurde mittels Mann-Whitney-U-Test (parameterfreier Test) mit Brightstat [34] bewertet.

## Ergebnisse

### Verabreichung und Tierbeobachtung

Um den Einfluss des Polyglucosamins formoline L112 auf die Bioverfügbarkeit von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure zu untersuchen, wurden weibliche Göttinger Minischweine ohne (Gruppe A) oder mit Polyglucosamin formoline L112 (Gruppe B) oral dosiert gefolgt von einer einfachen Dosis [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure.

Die verabreichten Dosen Ölsäure lagen zwischen 9,78 und 10,0 mg/kg, was nahe bei der beabsichtigten Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht lag. Die dosierte Menge an Radioaktivität lag zwischen 0,42 und 0,43 MBq/kg, was nahe bei der beabsichtigten

Dosis von 0,4 MBq/kg Körpergewicht lag. Die Körpergewichte wurden während der Eingewöhnung bestimmt, am Anfangstag der Gewöhnung an die Stoffwechselfäuge und bei Tötung (Tabelle 1). Gewichtsverlust war nicht Ziel der vorliegenden Studie, da die [<sup>14</sup>C]-Ölsäure und formoline L112 nur in Einzeldosis gegeben wurde, um die Auswirkungen von L112 auf die Bioverfügbarkeit von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure zu beobachten.

Während der Eingewöhnung, während der Behandlung und bei jeder Probennahme wurden die Tiere hinsichtlich Erscheinung und Verhalten überprüft. Es wurden keine studien- oder substanzbezogenen Zeichen von Toxizität oder ungewöhnliches Verhalten beobachtet. formoline L112 hatte keine Auswirkungen auf die Fäkalausscheidung; öliges Stuhl, flüssiger Stuhl, fäkale Dringlichkeit oder Inkontinenz, Flatulenz und Bauchkrämpfe, wie sie bei Behandlung gegen Adipositas mit einem intestinalen Lipaseinhibitor häufig beobachtet werden [5], wurde in beiden Behandlungsgruppen nicht beobachtet. Bei der Autopsie wurden keine Auffälligkeiten festgestellt.

### Der Einfluss von Vorbehandlung mit dem Polyglucosamin formoline L112 auf das pharmakokinetische Verhalten von oral verabreichter [<sup>14</sup>C]-Ölsäure beim Göttinger Minischwein

Nach der Vorbehandlung mit oder ohne formoline L112 wurde den Minischweinen 10 mg [<sup>14</sup>C]-Ölsäure/kg Körpergewicht oral verabreicht. Blutproben wurden während einer Blutprobenentnahmepériode von 144 h entnommen, und Radioaktivität (die [<sup>14</sup>C]-Ölsäure und/oder deren Metabolite repräsentierend) wurde aus Blut und Plasma bestimmt.

Abbildung 1 zeigt die mittleren Plasmakonzentrationen von Radioaktivität ( $\mu$ g Ölsäure-Äquivalente und/oder deren Metabolite/g Plasma) versus Zeitkurve für die weiblichen Minischweine nach einer oralen Einzeldosis von 10 mg/kg [<sup>14</sup>C]-Ölsäure, die unbehandelten Kontrolltieren (Gruppe A) verabreicht wurde, und Tieren, die mit formoline L112 (Gruppe B) vorbehandelt waren. Die unbehandelten Tiere der Gruppe A zeigten eine klare Radioak-

tivitätsspitze (Ölsäure-Äquivalente und/oder deren Metabolite) zwischen 0 und 24 h, welche in der B-Gruppe nach Vorbehandlung mit formoline L112 auf niedrigem Niveau blieb.

Abbildung 2 zeigt die individuelle Zeit versus Radioaktivitätskonzentration, ausgedrückt als  $\mu\text{g}$  Muttersubstanzäquivalente/g Plasma von weiblichen Göttinger Minischweinen nach einer oralen Einzeldosis [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure, verabreicht an mit formoline L112 vorbehandelten Tieren. In diesen Plasmaprofilen wurde ein deutlicher Effekt von partieller Magenentleerung beobachtet, etwa zu den Zeitpunkten der Fütterung zu Beginn und Ende des Tages, circa 8 und 24 h nach Dosierung. Dieser Effekt wurde bei den unbehandelten Tieren der Gruppe A nicht beobachtet. Zur zweiten Leerungsperiode des Magens ist die Fettbindungskapazität von formoline L112 für [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure noch klar präsent.

Die kinetischen Plasma- und Blutdaten für [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure ( $\mu\text{g}$  Ölsäureäquivalente und/oder deren Metabolite/g) wurden analysiert und erwiesen sich am besten geeignet für ein kompartmentfreies Modell mit Verwendung der pharmakokinetischen WinNonlin-Software. Die Daten konnten weder für die unbehandelten Tiere der Gruppe A noch die mit

formoline L112 behandelten Tiere der Gruppe B auf andere kinetische Modelle angepasst werden. Die kalkulierten pharmakokinetischen Parameter für [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure von Gruppe A und Gruppe B sind in Tabelle 2 dargestellt und werden klar von der Behandlung mit formoline L112 beeinflusst.

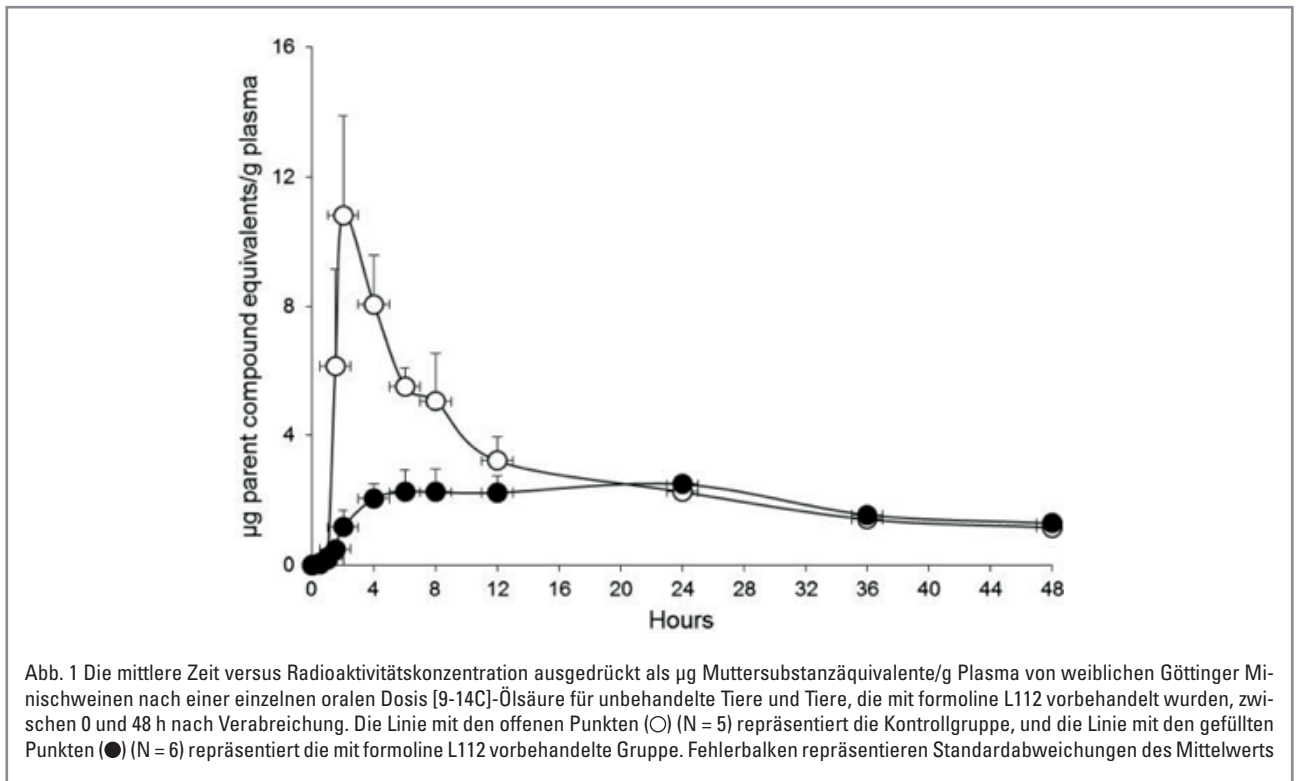
Bei Behandlung mit formoline L112 erreicht die [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure-Konzentration in Plasma ihren Maximalwert zu einem signifikant späteren Zeitpunkt, nämlich 16 h nach Dosierung im Vergleich zu unbehandelten Tieren, bei denen  $T_{\text{max}}$  4 h nach Dosierung eintrat. Die Maximalkonzentration von [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure in Plasma sinkt signifikant von 14,1  $\mu\text{g/g}$  auf 3,3  $\mu\text{g/g}$  bei Behandlung mit formoline L112. Darüber hinaus ist bei Behandlung mit formoline L112 die interne Exposition gegenüber [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure signifikant auf 32,9 % des Plasmawertes von [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure bei unbehandelten Tieren gesenkt, wie die Fläche unter der Kurve während des 0-12 h Zeitintervalls ( $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ ) nach Dosierung zeigt. Sogar bis zu 24h nach Verabreichung ist der  $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$  signifikant auf 50,7 % des Plasmawertes bei unbehandelten Tieren gesenkt, und dieser signifikante Effekt hält bis zu 60 h nach Dosierung an. Hinsichtlich der Konzentrationen von Radioaktivität im Blut wurde ein ähnliches Muster wie für Plasma beobachtet.

Tabelle 1 Körpergewicht und Dosierungsmengen von [ $^{14}\text{C}$ ]-Ölsäure, verabreicht an unbehandelte weibliche Göttinger Minischweine (Gruppe A - Kontrolle) und weibliche Göttinger Minischweine, die mit 2 Tabletten 500 mg formoline L112 vorbehandelt wurden (Gruppe B - formoline L112)

	Gruppe A - Kontrolle						Gruppe B - formoline L112						
Tiernummer	A1	A2	A3	A4	A5	Mittel $\pm$ SD	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Mittel $\pm$ SD
Körpergewicht (kg):													
Bei Akklimatisierung	25,6	30,1	34,5	31,7	28,3	30,0 $\pm$ 3,4	32,2	30,0	31,4	30,5	33,9	31,4	31,6 $\pm$ 1,4
Bei Dosierung	26,0	27,7	31,9	31,3	27,6	28,9 $\pm$ 2,6	32,2	31,4	28,8	30,5	31,6	31,2	31,0 $\pm$ 1,2
Bei Tötung	25,8	27,2	31,8	30,0	27,4	28,4 $\pm$ 2,4	32,9	29,6	28,2	28,2	30,4	30,0	29,9 $\pm$ 1,7
Dosis (mg/kg)	9,78	9,89	9,92	9,92	9,89	9,88 $\pm$ 0,06	10,0	9,88	9,91	9,91	9,92	9,93	9,93 $\pm$ 0,04
Radioaktivität (MBq/kg)	0,42	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43 $\pm$ 0,00	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43 $\pm$ 0,00

Werte dargestellt als individuelle und mittlere  $\pm$  Standardabweichung





## Ausscheidung der Radioaktivität

Die Hypothese wurde aufgestellt, dass die Bindung von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure an formoline L112 im Magen-Darm-Trakt zu einer erhöhten Ausscheidung von Radioaktivität aus dem Körper durch die Fäkalien und eine geringere Akkumulation von Radioaktivität in der Leber von Minischweinen, die mit formoline L112 behandelt wurden (Gruppe B), führen würde. Um die Auswirkung der Behandlung mit formoline L112 auf die Ausscheidung von Radioaktivität zu untersuchen, wurden alle Tiere, die eine einzelne

orale Dosis [<sup>14</sup>C]-Ölsäure erhielten, in Stoffwechselläufigen untergebracht, die für die getrennte Sammlung von Urin und Fäkalien in Zeitintervallen von 24 h bis zu 144 h nach der Dosierung geeignet waren. Tabelle 3 zeigt die Auffindungswerte von Radioaktivität in Exkrementen (Urin & Fäkalien), Leber und Inhalte des Magen-Darm-Trakts bei Tötung der unbehandelten (Kontrolle) und der mit formoline L112 vorbehandelten weiblichen Göttinger Minischweine nach Einmalgabe von 10 mg/kg [<sup>14</sup>C]-Ölsäure.

Tabelle 2 Pharmakokinetische Parameter (kompartimentfreie Analyse) von [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure und/oder deren Metabolite in Plasma und Blut von Göttinger Minischweinen nach einer einzelnen oralen Dosis [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure verabreicht an unbehandelte Minischweine (Gruppe A) und Minischweine, die mit 2 Tabletten 500 mg formoline L112 (Gruppe B) vorbehandelt wurden

Gruppe	A Plasma	B	% <sup>a</sup>	A Blut	B	% <sup>a</sup>
Pharmakokinetische Parameter						
T <sub>max</sub> (h)	4 ± 3	16 ± 9*	-	4 ± 3	14 ± 11	-
C <sub>max</sub> (µg/g)	14,1 ± 3,6	3,3 ± 1,2**	23,4	8,5 ± 2,2	2,1 ± 0,8**	24,7
AUC <sub>(0-12h)</sub> (h* µg/g)	65,6 ± 6,0	21,6 ± 14,0**	32,9	40,0 ± 4,8	13,3 ± 9,1**	33,3
AUC <sub>(0-24h)</sub> (h* µg/g)	98,4 ± 17,2	49,9 ± 20,8**	50,7	61,7 ± 13,1	29,8 ± 12,9**	48,3
AUC <sub>(0-48h)</sub> (h* µg/g)	136 ± 28	91,0 ± 23,2*	66,9	88,3 ± 19,0	56,9 ± 13,1*	64,4
AUC <sub>(0-60h)</sub> (h* µg/g)	148 ± 31	105 ± 25*	70,9	97,2 ± 20,6	67,3 ± 13,8*	69,2
AUC <sub>(0-72h)</sub> (h* µg/g)	157 ± 32	116 ± 26	73,9	105 ± 22	76,4 ± 14,2*	72,8
AUC <sub>all(0-144h)</sub> (h* µg/g)	190 ± 38	158 ± 32	83,2	139 ± 25	118 ± 16	84,9
Vz (g/kg)	7008 ± 2962	5629 ± 1946	-	8860 ± 1848	9515 ± 1647	-
Cl (g/h/kg)	40,7 ± 5,5	49,8 ± 8,3	-	48,4 ± 7,9	47,6 ± 7,3	-
MRTlast (h)	35,9 ± 1,8	50,2 ± 5,1**	-	43,6 ± 3,1	58,4 ± 5,7**	-

<sup>a</sup>Prozentsatz der in Plasma oder Blut nach Vorbehandlung mit formoline L112 verbleibenden Radioaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe \* P ≤ 0,05, \*\* P ≤ 0,01

144 h nach der Medikamentenvergabe ist nur ein Teil der dosierten Radioaktivität mit Urin 1,33 % und 1,46 % und Fäkalien 6,51 und 7,51 % für die unbehandelten Kontrolltiere der Gruppe A beziehungsweise die mit formoline L112 behandelten Tiere der Gruppe B ausgeschieden. Bei Tötung enthielt der Inhalt des Magen-Darm-Trakts 0,08 und 0,13% der verabreichten Menge von Radioaktivität in Gruppe A beziehungsweise B. Die Leber enthielt bei Tötung eine ähnliche Menge an Radioaktivität in beiden Gruppen, nämlich 0,37 % der verabreichten Menge an Radioaktivität. Höchstwahrscheinlich wird der Großteil der verabreichten Radioaktivität im Körper verteilt und/oder weiter zu CO<sub>2</sub> verstoffwechselt.

Obwohl die Standardabweichungen relativ hoch sind, schien das Ausscheidungsprofil der Radioaktivität in Urin und Fäkalien bei den mit formoline L112 vorbehandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren wie dargestellt in Abb. 3 etwas verzögert zu sein. Die Beobachtung, dass die Behandlung mit formoline L112 die Gesamtausscheidung der Radioaktivität mit Fäkalien nicht beeinflusste sondern die Ausscheidung nur leicht zu verzögern scheint, steht im Einklang mit den pharmakokinetischen Daten. Die Gesamtfläche unter der Kurve von Start bis Ende der Studie (AUC<sub>0-144h</sub>) war 190 ± 38 h.µg/g und sank nicht signifikant auf 158 ± 32 h. /g über die Gesamtdauer der

Studie. Da die Tiere nur eine orale Dosis formoline L112 erhielten, sind die Auswirkungen in der ersten Periode nach der Gabe (0-24 h) am deutlichsten, klingen aber ab, nachdem weitere Mahlzeiten mit Ölsäure aber ohne formoline L112-Behandlung aufgenommen wurden. Insgesamt deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass formoline L112 die Bioverfügbarkeit von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure zwischen den Zeitintervallen 0-12 h, 0-24 h, 0-48 h und 0-60 h aufgrund einer verzögerten Absorption verringert und höchst interessanterweise Spitzenexpositionen von Fettsäuren im Körper verhindert.

### Metabolitprofilierung von Radioaktivität in Fäkalien

Für die Untersuchung des Radioaktivitätsprofils in Fäkalien und um [<sup>14</sup>C]-Ölsäure von deren möglichen Abbauprodukten zu trennen und zu unterscheiden, wurde für einige ausgewählte Proben von unbehandelten und mit formoline L112 behandelten Tieren eine radiometrische Umkehrphasen-HPLC-Analyse angewendet. Die Radioaktivität wurde von den Fäkalien extrahiert, und die mittlere Rückgewinnung der Ausscheidung lag bei 84,2 %. Abbildung 4 zeigt ein repräsentatives Radioaktivitäts-HPLC-Profil der Fäkalien. Die ausgeschiedene Radioaktivität wurde als 3 Spitzen eluiert - die erste Spitze eluierte bei 12,1 - 14,7 min., die zweite Spitze eluierte etwa bei

17,7 - 20,4 min. ( $[^{14}\text{C}]$ -Ölsäure), und die dritte Spitze eluierte bei 23,4 - 24,7 min. Es gab hinsichtlich der Stoffwechselprofile keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen den unbehandelten und den mit formoline L112 behandelten Tieren.

## Bilanzierung und Wiedergewinnung der Radioaktivität

Eine vollständige Bilanz der verabreichten Radioaktivität fand nicht statt, da die flüchtige Materie während des Tests nicht abgefangen wurde und da alle Organe, Gewebe und Restkadaver der Minischweine nicht gesammelt und bezüglich Radioak-

tivität analysiert wurden. Eine Wiedergewinnung und eine Bilanz der nichtflüchtigen Materie der gesammelten Proben ist in Abb. 5 dargestellt. Hier ist ein relevanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe A und der mit formoline L112 behandelten Gruppe B klar ersichtlich. Da diese Studie aufgrund der oben genannten Gründe keine Massenbilanzstudie war, war die Gesamtwiedergewinnung 34,7 und 17,9 % (basierend auf  $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ ) und 13,9 und 10,6 % (basierend auf  $\text{C}_{\text{max}}$ ) der verabreichten Menge an Radioaktivität in den unbehandelten beziehungsweise den mit formoline L112 behandelten Minischweinen.

Tabelle 3 Zusammenfassende Tabelle der mittleren Wiederfindung von Radioaktivität ( $[9-^{14}\text{C}]$ -Ölsäure und/oder deren Metaboliten) in Exkrementen (Urin, Fäkalien und Käfigreinigung), Leber und Inhalte des Magen-Darm-Trakts von Göttinger Minischweinen nach einer oralen Einzeldosis  $[9-^{14}\text{C}]$ -Ölsäure an unbehandelte Minischweine (Gruppe A) und Minischweine, die mit 2 Tabletten 500 mg formoline L112 vorbehandelt wurden (Gruppe B). Daten dargestellt als Mittel  $\pm$  Standardabweichung

Probe	Auffindung ausgedrückt als % der angewandten Dosis	
	Gruppe A Kontrolle (unbehandelt)	Gruppe B formoline L112
Urin		
-48–24 h	0,00 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00
-24–0 h	0,01 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
0–24 h	0,79 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,28
24–48 h	0,28 $\pm$ 0,10	0,54 $\pm$ 0,14
48–72 h	0,09 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,17
72–96 h	0,08 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,04
96–120 h	0,05 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,04
120–144 h	0,03 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,02
Gesamt	1,33 $\pm$ 0,20	1,46 $\pm$ 0,17
Fäkalien		
-48–24 h	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
-24–0 h	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
0–24 h	0,02 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,06
24–48 h	2,22 $\pm$ 2,05	1,45 $\pm$ 1,94
48–72 h	3,21 $\pm$ 2,93	3,02 $\pm$ 1,43
72–96 h	0,85 $\pm$ 0,83	2,17 $\pm$ 2,21
96–120 h	0,15 $\pm$ 0,13	0,32 $\pm$ 0,16
120–144 h	0,06 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,09
Gesamt	6,51 $\pm$ 2,88	7,15 $\pm$ 2,87
Käfigreinigung	0,07 $\pm$ 0,07	0,10 $\pm$ 0,07
Gesamtausscheidung (Summe Urin, Fäkalien, Käfigreinigung)	7,90 $\pm$ 3,13	8,72 $\pm$ 2,75
Leber bei Tötung (144 h nach Gabe)	0,37 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,03
M-D-Trakt Inhalte bei Tötung (144 h nach Dosierung)	0,08 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,06

## Diskussion

Die aktuellen Strategien, um die Belastung durch diese Krankheit und ihrer Konsequenzen zu verringern, beinhalten Lebensstil-Interventionen (Diät/körperliche Aktivität), Pharmakotherapie und Adipositaschirurgie.

Gegenwärtig wird aufgrund von Unzufriedenheit mit den hohen Kosten und den potenziell gefährlichen und/oder unangenehmen Nebenwirkungen der aktuell verfügbaren Therapien das Potenzial von natürlichen Produkten wie Polyglucosamin zur Behandlung von Adipositas diskutiert, und dies ist möglicherweise eine hervorragende alternative Strategie für die Behandlung von Adipositas [3, 7]. Polyglucosamin wurde als eine Faser natürlichen Ursprungs beworben, die dabei helfen könnte, die Fettabsorption zu reduzieren, Fett und Gallensalze im menschlichen Magen-Darm-Trakt zu „binden“ und diese angelagerte Fett-Polyglucosamin-Mischung aus dem Körper auszuschleiden. Diese Aktion reduziert die Absorbierung von Nahrungsfetten und hat dazu geführt, dass diese Substanzen zur Unterstützung von Gewichtsverlust verwendet werden [7]. Das Ziel dieser Studie war die Bereitstellung von Daten zum Einfluss von formoline L112

auf die Bioverfügbarkeit von [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure als eine Modellschubstanz im adulten, weiblichen Göttinger Minischwein. Bei Behandlung mit formoline L112 wurde der  $T_{max}$  von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure in Plasma von 4 auf 16 h verschoben. Der  $C_{max}$  sank signifikant von 14,1 µg/g auf 3,3 µg/g bei Behandlung mit formoline L112. Darüber hinaus ist bei Behandlung mit formoline L112 die interne Exposition gegenüber [<sup>14</sup>C]-Ölsäure signifikant auf 32,9 % des Plasmawertes von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure bei unbehandelten Tieren gesenkt, wie die Fläche unter der Kurve während des 0-12 h Zeitintervalls ( $AUC_{0-12h}$ ) nach Dosierung zeigt. Sogar bis zu 24 h nach Verabreichung ist der  $AUC_{0-24h}$  signifikant auf 50,7 % des Plasmawertes bei unbehandelten Tieren gesenkt, und dieser signifikante Effekt hält bis zu 60 h nach Dosierung an. Bei den mit formoline L112 vorbehandelten Minischweinen wurde ein deutlicher Effekt der partiellen Magenentleerung beobachtet, etwa zu den Zeitpunkten der Fütterung zu Beginn und Ende des Tages, circa 8 und 24 h nach Dosierung. Dieser Effekt wurde bei den unbehandelten Tieren der Gruppe A nicht beobachtet. Zur zweiten Leerungsperiode des Magens ist die Bindekraft von formoline L112 für [<sup>14</sup>C]-Ölsäure noch klar präsent.

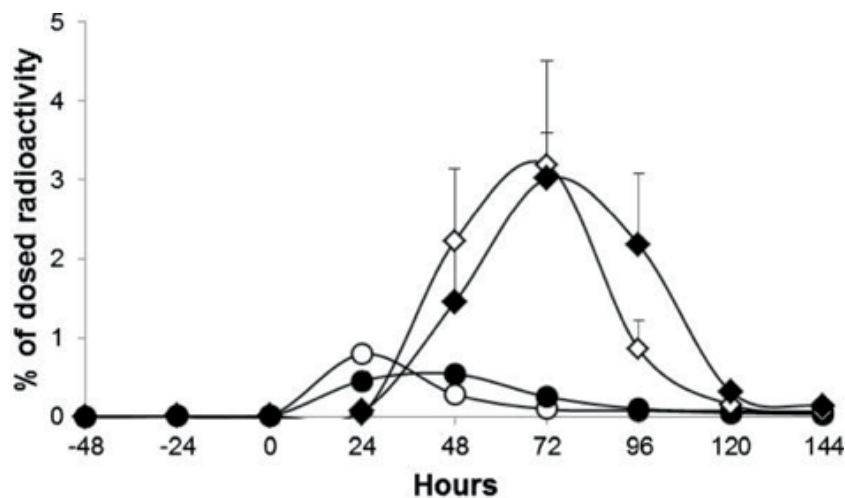


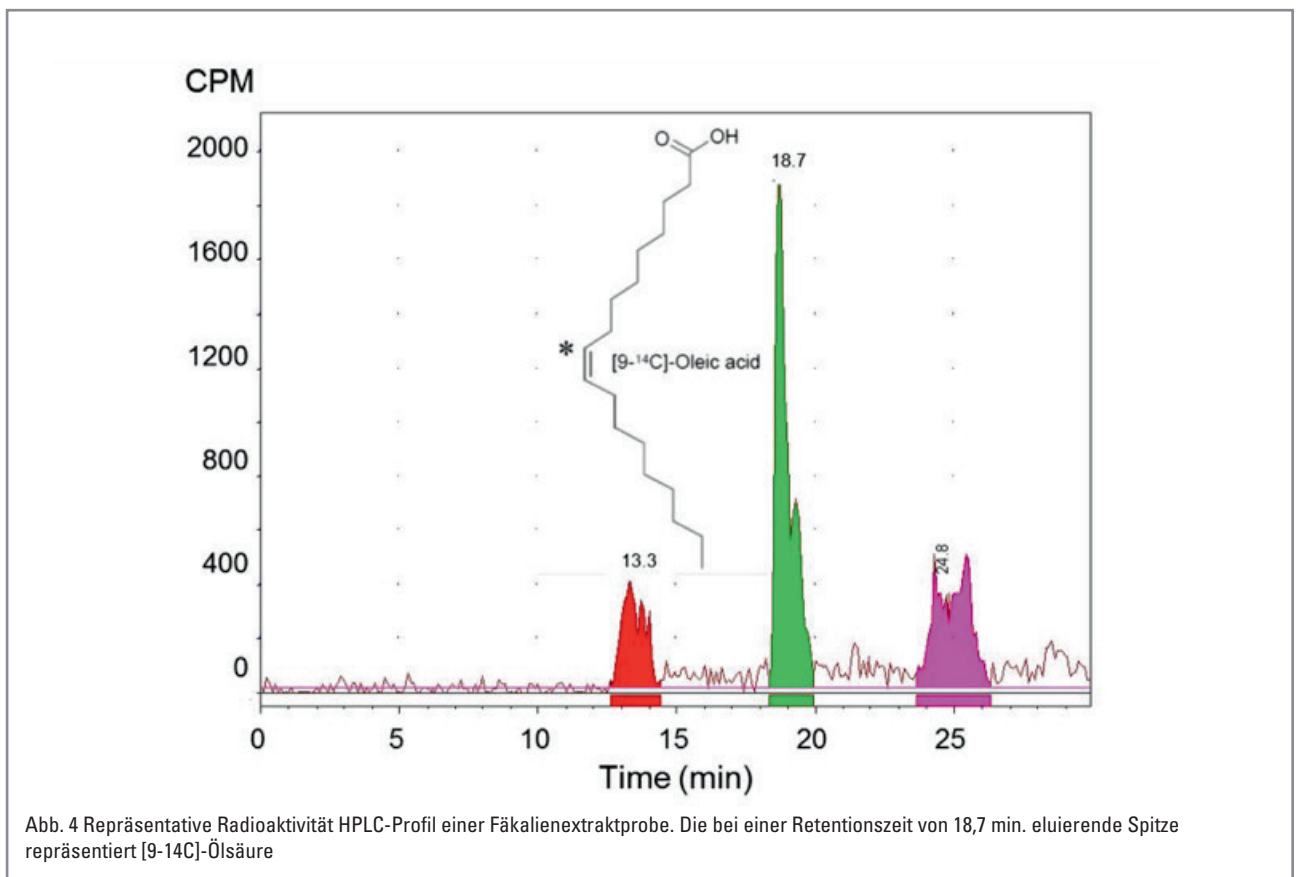
Abb. 3 Ausscheidungsprofil der Radioaktivität in Urin und Fäkalien von weiblichen Göttinger Minischweinen nach einer oralen Einzeldosis [9-<sup>14</sup>C]-Ölsäure an Gruppe A (Kontrolle) und Gruppe B (Minischweine, die mit einer einzelnen oralen Dosis von 2 Tabletten 500 mg formoline L112 pro Tier vorbehandelt wurden). Offene Marker unbehandelt, geschlossene Marker behandelt. Offene Punkte ○, gefüllte Punkte ● repräsentieren die Ausscheidung von Radioaktivität mit Urin, offene Rauten ◇ und gefüllte Rauten ◆ repräsentieren die Ausscheidung von Radioaktivität mit Fäkalien in Gruppe A bzw. Gruppe B. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen des Mittelwerts

Bei unbehandelten Probanden wird Ölsäure praktisch vollständig absorbiert und nach oraler Gabe in den Organismus verteilt [35, 36]. Die Aufschlüsselung über die Wege des Lipidstoffwechsels erfolgt durch sukzessive  $\beta$ -Oxidation und Ausscheidung als  $\text{CO}_2$ . Wie andere freie Fettsäuren wird Ölsäure von den Darmwänden absorbiert, wo es in Triglyceride umgewandelt wird. Die Triglyceride werden in Lipoproteinen im Serum oder in Chylomikronen in den Lymphgefäßen transportiert und in adipösem Gewebe eingelagert oder verstoffwechselt. 31 Testpersonen mit normaler Fettassimilation wurden orale Dosen radioaktiv markierten Trioleins und Ölsäure verabreicht. Nach 6 Tagen hatten sie weniger als 10 % der Substanzen mit den Fäkalien ausgeschieden [37]. Dieses Muster ähnelt den Beobachtungen dieser Studie.

Beachtliche Evidenz lässt darauf schließen, dass gesteigerte Aufnahme von freien Fettsäurekonzentrationen eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von Insulinresistenz spielt. Freie Fettsäuren verursachen sowohl Insulinresistenz als auch

Entzündung in den Hauptzielgeweben des Insulins (Skelett-Muskulatur, Leber und Endothelzellen) und sind somit eine wichtige Verbindung zwischen Adipositas, Insulinresistenz, Entzündung und der Entwicklung von Typ-2-Diabetes, Bluthochdruck, Dyslipidämie, Gerinnungsstörungen und atherosklerotischer Gefäßerkrankung [38]. Die Reduktion von Plasma-FFS-Konzentrationen bei fettleibigen Probanden und solchen mit Typ-2-Diabetes (T2DM) verbessert die Insulinsensitivität [39].

Endotoxin, der Hauptbestandteil der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien, durchbricht die Darmschleimhaut und gelangt in den Kreislauf, wo es entzündliche Leitungspfade direkt stimuliert. Mahlzeiten mit hohem Fettgehalt führen zu einer Steigerung des Endotoxin-Niveaus in Studien am Tier und am Menschen, mit einer größeren Steigerung bezüglich metabolischer Erkrankungsstadien [40-42]. Eine Ernährung mit hohem Fettgehalt stellt eines der hauptsächlichen Risiken für die Entwicklung von Adipositas, Diabetes, Arteriosklerose und andere ernährungsbezogene Störungen





dar. Der Konsum stark fetthaltiger Nahrung bewirkt Entzündungen im Fettgewebe, der Leber und der Skelettmuskulatur durch die Erhöhung der Endotoxin-/Lipopolysaccharidniveaus im Darmlumen sowie durch die Steigerung der LPS-Aktivität durch den Toll-ähnlichen Rezeptor 4. Diese Entzündung spielt eine kritische Rolle bei der Entwicklung von Adipositas und Insulinresistenz [41, 43].

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass formoline L112, für das Gewichtsmanagement, Gewichtsverlust und die Senkung des Cholesterinspiegels im Blut eingesetzt wird, die Spitzenwerte von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure im Plasma senkt und ebenso die allgemeine interne Exposition gegenüber [<sup>14</sup>C]-Ölsäure reduziert. Die Behandlung mit formoline L112 reduziert (wie bewertet durch  $C_{max}$  & AUC) und verzögert (wie bewertet durch  $T_{max}$ ) die Fettabsorption aus dem Magen-Darm-Trakt in die systemische Zirkulation und begrenzt die Spitzenexposition gegenüber freien Fettsäuren, was zu besseren Bedingungen bei übergewichtigen Menschen beitragen könnte.

Gemäß der Produktinformation von formoline L112 sollten zwei Tabletten mit 500 mg zweimal täglich zu zwei Hauptmahlzeiten mit dem höchsten Fettgehalt eingenommen werden, beispielsweise zum Frühstück und zum Abendessen. In der vorliegenden Studie wurden Minischweine nur einmalig mit formoline dosiert und erhielten formoline L112 nicht mit der zweiten Mahlzeit am Tag der Verabreichung. Daher wird erwartet, dass eine zweite Dosis die Aufnahme sogar noch weiter reduzieren würde.

In vitro-Tests, die vom Lieferanten des Polyglucosamins mit einer synthetischen Mischung von Nahrungsölen und -lipiden als Modellöl durchgeführt wurden, zeigten für die Interaktion beliebiger Fettsäuren mit formoline L112 keine Präferenz oder Unterscheidung (nicht veröffentlicht).

Daher wird angenommen, dass die Auswirkungen von Polyglucosamin auf die Bioverfügbarkeit von [<sup>14</sup>C]-Ölsäure auf andere Fette übertragbar sind.

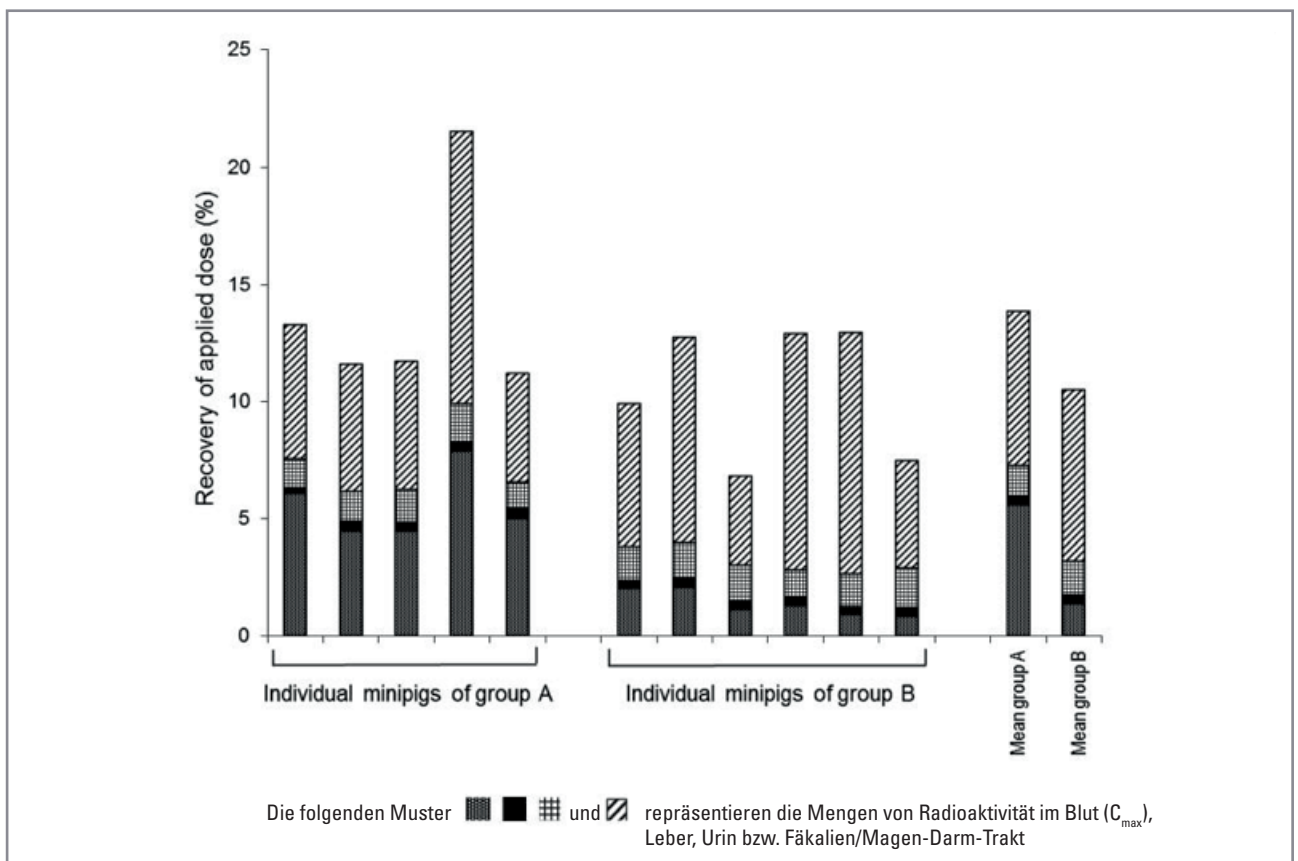


Abb. 5 Individuelle und mittlere Verteilung und Wiederfindung von Radioaktivität bei weiblichen Göttinger Minischweinen nach einer einzelnen oralen Dosis von nominal 10 mg [<sup>14</sup>C]-Ölsäure/kg in Gruppe A (Kontrolle) und Gruppe B (vorbehandelt mit einer einzelnen oralen Dosis von 2 Tabletten 500 mg formoline L112 pro Tier). Radioaktivität ist ausgedrückt als % Muttersubstanz.

## Schlussfolgerung

In der Schlussfolgerung reduziert (wie bewertet durch  $C_{max}$  & AUC) und verzögert (wie bewertet durch  $T_{max}$ ) die Behandlung mit dem Polyglucosamin formoline L112 die Fettabsorption aus dem Magen-Darm-Trakt in die systemische Zirkulation und begrenzt die Spitzenexposition gegenüber freien Fettsäuren, was zu besseren Bedingungen bei übergewichtigen Menschen beitragen könnte.

## Abkürzungen

AUC: area under the curve, Fläche unter der Kurve; Cl: clearance, Spiel;  $C_{max}$ : maximum concentration in plasma or blood, Maximalkonzentration in Plasma oder Blut; DPM: Desintegrationen pro Minute; EMA: European Medicines Agency, Europäische Arzneimittelagentur; FDA: Food and Drug Administration; FFS: freie Fettsäuren; GABA: gamma amino butyric acid, Gammaaminobuttersäure; GIT: Gastrointestinaltrakt; GRAS: Generally Recognized As Safe, gesundheitlich unbedenklich; HPLC: high pressure liquid chromatography, Hochleistungsflüssigchromatografie; LPS: Lipopolysaccharide; LSC: liquid scintillation counting, Flüssigszintillationszählung; MBq: Megabecquerel; MRT: Mean Residence Time, mittlere Verweilzeit; SD: standard deviation, Standardabweichung; T2DM: Typ 2 Diabetes mellitus;  $T_{max}$ : time after dosing associated with the maximum observed concentration in plasma or blood, Zeit nach der Dosierung assoziiert mit der beobachteten Maximalkonzentration in Plasma oder Blut; UV: ultraviolett; Vz: volume of distribution, Distributionsvolumen.

## Interessenkonflikte

Die Autoren erklären, dass es keine Interessenkonflikte gibt. Diese Forschungsarbeit wurde durch Certmedica International GmbH, Aschaffenburg, Deutschland finanziert. Die Studienbehandlung formoline L112 wurde durch den Sponsor bereitgestellt. formoline L112 wird zur Unterstützung der Behandlung von Übergewicht und zur Gewichtskontrolle vertrieben.

## Beiträge der Autoren

Alle Autoren haben die Studie entworfen und gestaltet. NC hat die Studie ausgeführt. NC, BB, ST, MH, AL, DG, HJ und MM analysierten und interpretierten die Daten. NC hat die Arbeit geschrieben. Alle Autoren haben das finale Manuskript gelesen und freigegeben.

## Anerkennung

Diese Forschungsarbeit wurde von Certmedica International GmbH finanziell unterstützt. Wir danken Jürgen Ebert und Berthold Trautmann von Certmedica International GmbH für die kritische Durch-

sicht des Manuskripts. Wir danken dem Sicherheitsbeauftragten für Radiochemie D. Grossouw für seine Unterstützung bei der Dosierung der radioaktiv markierten Ölsäure. Die Autoren danken der Universität Utrecht für die Punktierung der Minischweine. Wir wissen die hervorragende Hilfe von Gerard van Beek und seine Mitarbeitern bei der in vivo-Durchführung dieser Studie sehr zu würdigen. Wir danken Gemma BrufauDonés für ihren Beitrag zur statistischen Analyse.

## Autorendetails

<sup>1</sup>TNO Triskelion BV, P.O. Box 844, Utrechtseweg 48, 3704 HE, Zeist, Die Niederlande. <sup>2</sup>TNO, P.O. Box 360, Utrechtseweg 48, 3704 HE, Zeist, Die Niederlande.

Eingegangen: 15. Juli 2015 Akzeptiert: 29. Februar 2016

Online veröffentlicht 15. März 2016

Literaturverzeichnis

1. World Health Organization, Obesity and overweight, Fact sheet N° 311, updated August 2014.
2. Kim GW, Lin JE, Blomain ES, Waldman SA. Antiobesity Pharmacotherapy: New Drugs and Emerging Targets. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;95(1):53–66.
3. Yun JW. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. *Phytochemistry.* 2010;71:1625–41.
4. Cheung BM, Cheun Saf. 2013;4(4):171–81.
5. Chaput JP, St-Pierre S, Tremblay A. Currently available drugs for the treatment of obesity: sibutramine and orlistat. *Mini Rev Med Chem.* 2007;7:3–10.
6. EMA, Refusal of the marketing authorisation for Qsiva (phentermine/topiramate) EMA/109958/2013, EMEA/H/C/002350, 21 February 2013. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion\\_-\\_Initial\\_authorisation/human/002350/WC500139215.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/002350/WC500139215.pdf).
7. Froese WM, Ludlow ME. Efficacy of Over-the-Counter (OTC) Medical Device Products as a Tool in Clinical Weight Management. *Food Nutr Sci.* 2014;5: 1637–43.
8. Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;56:290–9.
9. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62:3–11.
10. Rodriguez MS, Albertengo LE. Interaction between chitosan and oil under stomach and duodenal digestive chemical conditions. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69:2057–62.
11. Helgason T, Weiss J, McClements DJ, Gislason J, Einarsson JM, Thordarson FR, Kristbergsson K. Examination of the interaction of chitosan and oil-in-water emulsions under conditions simulating the digestive system using confocal microscopy. *J Aquat Food Prod Technol.* 2008;17(3):216–33.
12. Han LK, Kimura Y, Okuda H. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *Int J Obes.* 1999;23:174–9.
13. Dimzon IKD, Ebert J, Knepper TP. The interaction of chitosan and olive oil: effect of degree of deacetylation and degree of polymerization. *Carbohydr Polym.* 2013;92:564–70.
14. Dimzon IK, Knepper TP. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. *Int J Biol Macromol.* 2015;72:939–45.

15. Jull AB, Ni Mhurchu C, Bennett DA, Dunshea-Mooij CA, Rodgers A. Chitosan for overweight or obesity. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;16(3):CD003892. doi:10.1002/14651858.CD003892.pub3.
16. Gades MD, Stern JS. Chitosan Supplementation and Fecal Fat Excretion in Men. *Obes Res.* 2003;11(5):683–8.
17. Tapola NS, Lyyra ML, Kolehmainen RM, Sarkkinen ES, Schauss AG. Safety aspects and cholesterol-lowering efficacy of chitosan tablets. *J Am Coll Nutr.* 2008;27(1):22–30.
18. Pittler MH, Abbot NC, Harkness EF, Ernst E. Randomized, double-blind trial of chitosan for body weight reduction. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53(5):379–81.
19. Mhurchu CN, Poppitt SD, McGill AT, Leahy FE, Bennett DA, Lin RB, Ormrod D, Ward L, Strik C, Rodgers A. The effect of the dietary supplement, Chitosan, on body weight: a randomised controlled trial in 250 overweight and obese adults. *Int J Obes.* 2004;28:1149–56.
20. Kaats GR, Michalek JE, Preuss HG. Evaluating efficacy of a chitosan product using a double-blinded, placebo controlled protocol. *J Am Coll Nutr.* 2006; 25(5):389–94.
21. Cornelli U, Belcaro G, Cesarone MR, Cornelli M. Use of polyglucosamine and physical activity to reduce body weight and dyslipidemia in moderately over-weight subjects. *Minerva Cardioangiol.* 2008;56(5):71–8.
22. Egras AM, Hamilton WR, Lenz TL and Monaghan MS: An Evidence-Based Review of Fat Modifying Supplemental Weight Loss Products. *J Obesity.* 2011: 297–315, doi:10.1155/2011/297315.
23. Walsh AM, Sweeney T, Bahar B, O'Doherty JV. Multi-Functional Roles of Chitosan as a Potential Protective Agent against Obesity. *Plos One.* 2013; 8(1):e53828. doi:10.1371/journal.pone.0053828.
24. Pokhis K, Bitterlich N, Cornelli U, Cassano G. Efficacy of polyglucosamine for weight loss—confirmed in a randomized double-blind, placebo-controlled clinical investigation. *BMC Obesity.* 2015;2:25.
25. Karadeniz F, Kim SK. Antidiabetic Activities of Chitosan and Its Derivatives: A Mini Review. *Adv Food Nutr Res.* 2014;73:33–44.
26. Kokatnur MG, Oalman MC, Johnson WD, Malcom GT, Strong JP. Fatty acid composition of human adipose tissue from two anatomical sites in a biracial community. *Am J Clin Nutr.* 1979;32(11):2198–205.
27. Spurlock ME, Gabler NK. The Development of Porcine Models of Obesity and the Metabolic Syndrome. *J Nutr.* 2008;138:397–402.
28. Christoffersen B, Golozoubova V, Pacini G, Svendsen O, Raun K. The young göttingen minipig as a model of childhood and adolescent obesity: Influence of diet and gender. *Obesity.* 2013;21(1):149–58.
29. Bode G, Clausing P, Gervais F, Loegsted J, Luft J, Noguez V, Sims J. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *J Pharmacol Toxicol Meth.* 2010;62:196–220.
30. Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutr Res Rev.* 2010;23:4–22.
31. Patterson JK, Lei XG, Miller DD. The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. *Exp Biol Med.* 2008;233:651–64.
32. Wilfart A, Montagne L, Simmins H, Noblet J, Van Milgen J. Effect of fiber content in the diet on the mean retention time in different segments of the digestive tract in growing pigs. *Livest Sci.* 2007;109:27–9.
33. Van der Laan JW, Brightwell J, McAnulty P, Ratky J, Stark C. Under the auspices of the Steering Group of the RETHINK Project. *J Pharmacol Toxicol Meth.* 2010;62:184–95.
34. Stricker D. BrightStat.com: free statistics online. *Comput. Methods Programs Biomed.* 2008;92:135–43.
35. Pérez LY, Menéndez R, Más R, González RM. Plasma levels, tissue distribution and excretion of radioactivity after single-dose administration of (3H)-Oleic acid added to D-004, a lipid extract of the fruit of *Roystonea regia* in rats. *Curr Ther Res.* 2006;67(6):407–19.
36. Beierwaltes WH, Ice RD, Shaw MJ, Ryo UY. Myocardial uptake of labelled oleic and linoleic acids. *J Nucl Med.* 1975;16:842–5.
37. Pedersen NT. Estimation of assimilation of simultaneously ingested <sup>14</sup>C-triolein and <sup>3</sup>H-oleic acid as a test of pancreatic digestive function. *Scand J Gastro-enterol.* 1984;19:161–6.
38. Liang H, Tantiwong P, Sriwijitkamol A, Shanmugasundaram K, Mohan S, Espinoza S, DeFronzo RA, Dubé JJ, Musi N. Effect of a sustained reduction in plasma free fatty acid concentration on insulin signalling and inflammation in skeletal muscle from human subjects. *J Physiol.* 2013;591(11):2897–909.
39. Boden G. Obesity and Free Fatty Acids (FFA). *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(3):635–9.
40. Mani V, Harris AJ, Keating AF, Weber TE, Dekers JCM, Gabler NK. Intestinal integrity, endotoxin transport and detoxification in pigs divergently selected for residual feed intake. *J Anim Sci.* 2013;91(5):2141–50.
41. Piya MK, Harte AL, McTernan PG. Metabolic endotoxaemia; is it more than just a gut feeling? (review). *Curr Opin Lipidol.* 2013;24(1):78–85.
42. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxaemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes.* 2008;57:1470–81.
43. Zaved Waise TM, Toshinai K, Naznin F, NamKoong C, Abu Saleh Md Moin A, Sakoda H, Nakazato M. One-day high-fat diet induces inflammation in the no-dose ganglion and hypothalamus of mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464:1157–62.