

Einfluss des P-Glykoproteins auf die Blut-Hirn-Schrankenfunktion

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Fakultät Biologie

der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Manfred Uhr

München, Januar 2002

Die Arbeit wurde am
Max-Planck-Institut für Psychiatrie



in München angefertigt.

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | MULTI-DRUG-RESISTANCE | 1 |
| 1.2 | CHARAKTERISTIK DES P-GLYKOPROTEINS | 2 |
| 1.3 | P-GLYKOPROTEIN AN DER BLUT-HIRN-SCHRANKE | 11 |
| 1.4 | ZIELE DER ARBEIT | 16 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN | 19 |
| 2.1 | MATERIALIEN | 19 |
| 2.2 | GERÄTE | 20 |
| 2.3 | VERSUCHSTIERE | 20 |
| 2.4 | METHODIK DER PHARMAKOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN | 21 |
| 2.4.1 | <i>Experimentelles Vorgehen der Tierversuche</i> | 21 |
| 2.4.2 | <i>Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)</i> | 23 |
| 2.4.2.1 | Flüssig-Flüssig-Extraktion | 23 |
| 2.4.2.2 | HPLC-Bedingungen | 24 |
| 2.4.2.3 | HPLC-Methode für Dextromethorphan..... | 25 |
| 2.5 | ENDOKRINOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN (STEROIDPENETRATION UND FUNKTIONELLE TESTS) | 26 |
| 2.5.1 | <i>Experimentelles Procedere</i> | 26 |
| 2.5.1.1 | Verteilungsversuche von Tritium-markierten Steroiden..... | 26 |
| 2.5.1.2 | Funktionelle Tests zur Charakterisierung der HPA-Achsenfunktion.... | 27 |
| 2.5.2 | <i>Radioimmunoassays</i> | 28 |
| 2.6 | STATISTISCHE ANALYSE | 29 |
| 3. | ERGEBNISSE | 31 |
| 3.1 | METHODENENTWICKLUNG | 31 |
| 3.1.1 | <i>Extraktionsverfahren – Zusammensetzung der organischen Phase</i> | 32 |
| 3.1.2 | <i>HPLC-Chromato-gramme</i> | 35 |
| 3.1.3 | <i>HPLC-Medikamenten-Quantifizierung</i> | 36 |
| 3.2 | EINFLUSS DES P-GLYKOPROTEINS AUF DIE PHARMAKOLOGIE ZENTRAL WIRKSAMER MEDIKAMENTE | 37 |
| 3.2.1 | <i>Nach einmaliger subkutaner Medikamenteninjektion</i> | 37 |
| 3.2.1.1 | Amitriptylinkinetik | 38 |

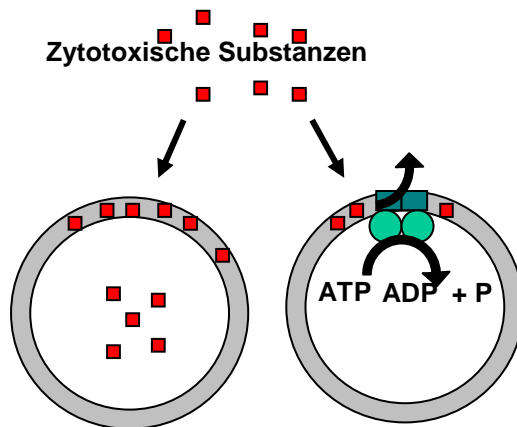
| | | |
|---------|---|-----|
| 3.2.1.2 | Trimipramin und Desmethyltrimipramin..... | 44 |
| 3.2.1.3 | Doxepin und Desmethyldoxepin | 47 |
| 3.2.1.4 | Citalopram | 51 |
| 3.2.1.5 | Paroxetin | 53 |
| 3.2.1.6 | Mirtazapin | 55 |
| 3.2.1.7 | Melperon | 57 |
| 3.2.1.8 | Dextromethorphan | 59 |
| 3.2.1.9 | Venlafaxin und Desmethylvenlafaxin | 61 |
| 3.2.2 | <u>Langzeitbehandlung mit repetitiver bzw. kontinuierlicher subkutaner Medikamentengabe</u> | 64 |
| 3.2.2.1 | Amitriptylin nach repetitiver Gabe | 64 |
| 3.2.2.2 | Citalopram (osmotische Pumpen)..... | 69 |
| 3.2.2.3 | Venlafaxin und Desmethylvenlafaxin (osmotische Pumpen) | 71 |
| 3.2.2.4 | Budipin (osmotische Pumpen)..... | 74 |
| 3.3 | ENDOKRINOLOGISCHE VERSUCHSERGEBNISSE | 76 |
| 3.3.1 | <u>Organverteilung nach subkutaner Injektion Tritium-markierter Steroide</u> . | 76 |
| 3.3.1.1 | Dexamethason (mdr1a(-/-) und FVB/N-Wildtypmäuse)..... | 77 |
| 3.3.1.2 | Dexamethason (mdr1ab(-/-) und FVB/N-Kontrollmäuse | 79 |
| 3.3.1.3 | Progesteron | 81 |
| 3.3.1.4 | Aldosteron | 83 |
| 3.3.1.5 | Corticosteron | 85 |
| 3.3.1.6 | Hydrocortison (Cortisol) | 87 |
| 3.3.1.7 | Östradiol | 89 |
| 3.3.2 | <u>Plasma ACTH, Corticosteron und AVP unter Basal- und Stressbedingungen im mdr1ab(-/-) und FVB/N-Kontrollmäusen</u> | 91 |
| 3.3.3 | <u>Dexamethason-Suppressionstest</u> | 95 |
| 3.3.4 | <u>Dexamethason-CRH-Test</u> | 98 |
| 3.3.5 | <u>CRH-Challenge-Test</u> | 100 |
| 4 | DISKUSSION | 103 |
| 4.1 | METHODENDISKUSSION | 103 |
| 4.2 | EINFLUSS DES P-GLYKOPROTEINS AUF DIE BLUT-HIRN-SCHRANKENFUNKTION VON ZENTRAL WIRKSAMEN MEDIKAMENTEN | 106 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 4.3 | EINFLUSS DES P-GLYKOPROTEINS AUF DIE BLUT-HIRN-SCHRANKENFUNKTION VON STEROIDEN UND AUF DIE HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSEN-NEBENNIEREN-ACHSE | 118 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 129 |
| 6 | LITERATUR | 131 |

1. EINLEITUNG

1.1 Multi-Drug-Resistance

Klinische Onkologen waren die Ersten, die die Erfahrung machten, dass Tumore, die mit verschiedensten Antitumor-Medikamenten behandelt wurden, eine Kreuzresistenz auch für andere ganz unterschiedliche Zytostatika entwickeln, mit denen sie zuvor nie in Berührung gekommen waren. In vielen Fällen waren diese Tumorzellen dann in der Zellkultur ebenfalls resistent gegen multiple Chemotherapeutika. Biedler und Riehm konnten 1970 demonstrieren, dass Zellen des chinesischen Hamsters die mit Actinomycin D selektiert wurden, ebenfalls eine Resistenz gegen Mithramycin, Vinblastin, Vincristin, Puromycin, Daunorubicin, Demecolcine und Mitomycin C entwickelten (Biedler u. Riehm 1970). Diese Selektion von Säugetiertumorzellen mit einem einzigen zytotoxischen Medikament unter Entwicklung einer simultanen Cross-Resistenz für eine Reihe anderer Medikamente wurde als Multi-Drug-Resistance (MDR) bezeichnet. Von Multi-Drug-Resistance sind viele in der Tumorthapie eingesetzte Medikamente betroffen, die sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs sein können. Eine der besten Studien, die den Mechanismus des Multi-Drug-Resistance erklärt, ist die von Juliano und Ling (1976), die zeigen konnte, dass ein 170 kDa Membranprotein am Multi-Drug-Resistance beteiligt ist. Dieses Protein wird als P-Glykoprotein bezeichnet. Das P steht hier für Permeabilität. Es ist ein großes Plasmamembranprotein, das aktiv seine Substrate unter Energieverbrauch aus der Zelle transportiert. Dies wiederum erniedrigt die Konzentration der zytotoxischen Medikamente intrazellulär und verhindert dadurch den gewünschten toxischen Antitumoreffekt (Kartner et al. 1983).



Zellen sterben (kein P-Gp) Zellen überleben (P-Gp exprimiert)

Abbildung 1: P-Glykoprotein und Multi-Drug-Resistance

Zytotoxische Medikamente wie Vinblastin oder Colchicin diffundieren schnell in die Lipidbilayer der Zellen und erreichen das Zytoplasma, wo sie an ihre Zielstrukturen, wie z.B. den Mikrotubuli im Falle von Colchicin und Vinblastin, binden. Die Folge ist der Eintritt des toxisch bedingten Zelltodes. Zellen, in denen das P-Glykoprotein exprimiert wird, sind teilweise gegen diesen Vorgang geschützt. Das P-Glykoprotein transportiert seine Substrate unter Energieaufwand (ATP-Verbrauch) wieder aus der Zelle. Die zytoplasmatischen Medikamentenkonzentrationen bleiben dadurch niedrig und die Zellen überleben (in Anlehnung an Loo u. Clarke 1999).

1.2 Charakteristik des P-Glykoproteins

Die cDNA dieses in Multi-Drug-Resistance-Zellen überexprimierten Membranoberflächen-Glykoproteins wurde in der Maus (Gros et al. 1986a, b), im Menschen (Chen et al. 1986) und im Hamster (Gerlach et al. 1986b) sequenziert. Einen guten Überblick über die genetische Analyse und funktionelle Daten des Multi-Drug-Transporters geben die Review-Artikel von Gottesman et al. (1995) und Schoenlein (1993, 1994). Das Säugetier P-Glykoprotein wird durch eine kleine Genfamilie kodiert. Dies zeigen die großen Homologien zwischen den Aminosäuresequenzen des P-Glykoproteins unterschiedlicher Arten. Aber auch zu Proteinen der Bakterienplasmamembran, die einen adenosintriphosphat-abhängigen Transport durchführen, gibt es deutliche Aminosäurehomologien (Gerlach et al. 1986a).

In Primaten sind zwei P-Glykoprotein-Gene bekannt. Das Multi-Drug-Resistance-Gen 1 (MDR1) (Chen et al. 1986) und das MDR3 Gen (van der Bliek u. Borst 1989), auch bezeichnet als MDR2 Gen (Roninson et al. 1986). In der Maus wurden drei unterschiedliche Gene charakterisiert, hierzu gehört das *mdr1a* (*mdr3*), *mdr1b* (*mdr1*) und *mdr2* (Gros et al. 1986a, b, Devault u. Gros 1990, Raymond et al. 1990).

Die Tabelle 1 zeigt die Bezeichnung der unterschiedlichen Gene des P-Glykoproteins in Säugern. Es wird zwischen medikamententransportierendem P-Glykoprotein und den Phosphatidylcholintanslokatoren unterschieden.

| Organismus | <i>Drug Transporter</i> | | Phosphatidylcholin Translokatoren |
|-------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Mensch | MDR 1 | | MDR3 |
| Maus | <i>mdr1a</i> | <i>mdr1b</i> | <i>mdr2</i> |
| Ratte | <i>mdr1a</i> | <i>mdr1b</i> | <i>mdr2</i> |
| Hamster | P-Gp1 | P-Gp2 | P-Gp 3 |

Tabelle 1: Vielfalt und Nomenklatur des Säugetier-P-Glykoprotein-Gens

Transfektionsexperimente mit genomischer DNA konnten demonstrieren, dass die Transfektion mit humanem MDR1 (Ueda et al. 1987; Lincke et al. 1990) und Maus *mdr1a* (Devault u. Gros 1990) und *mdr1b* (Gros et al. 1986b, Croop et al. 1987, Devault u. Gros 1990) Multi-Drug-Resistance der transfizierten Zellen erzeugen kann. Eine Transfektion mit dem humanen MDR3-Gen sowie dem *mdr2*-Gen der Maus führt nicht zum Phänotyp des Multi-Drug-Resistance (Gros et al. 1988). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch das MDR3 P-Glykoprotein, jedoch in wesentlich geringerem Umfang als das MDR1 Genprodukt, Substrate wie Digoxin und Paclitaxel transportieren kann (Smith et al. 2000).

Das P-Glykoprotein ist ein Mitglied der mehr als 200 Proteine zählenden Familie der ABC-Transporter (**ATP-Binding-Cassette**), die für den Transport ihrer Substrate durch biologische Membran verantwortlich sind. Das P-Glykoprotein ist ein 1280 Aminosäure langes, 170 kDa schweres membranassoziertes Protein mit 12 transmembranären Domänen und 2 ATP-Bindungsstellen. Das Protein ist in 2 homologe Hälften aufgeteilt, die über eine flexible „Linker-Region“ verbunden sind (Higgins et al. 1997).

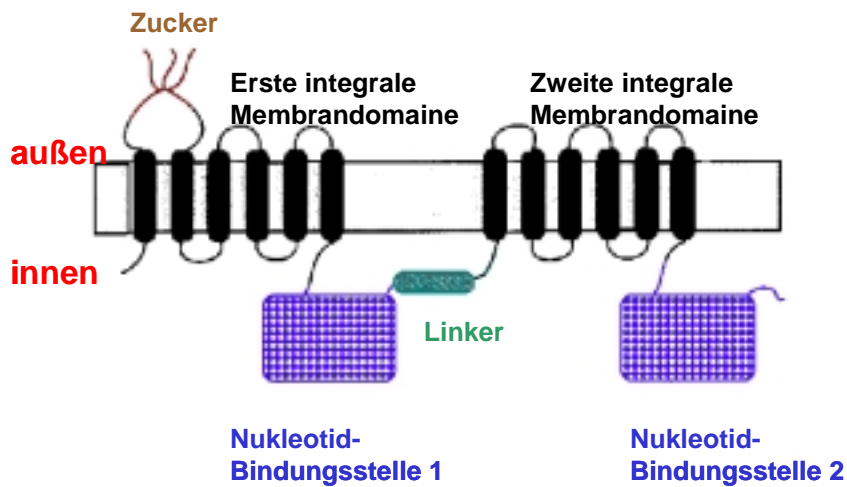


Abbildung 2: Topologische Karte u. Domänenorganisation des P-Glykoproteins. Das P-Glykoprotein besteht aus 2 identischen Hälften, jeweils mit 6 transmembranären Domänen und jeweils einer Nukleotid (ATP) -Bindungsstelle und einer flexiblen Bindungsstelle. Das Protein ist glykosiliert (Abbildung nach Higgins et al. 1997).

Die integralen Membrandomänen des P-Glykoproteins haben 2 zentrale Funktionen des Transportprozesses. Erstens formen sie den Weg, durch den die Translokation der Substrate durch die Membran erfolgt und zweitens formen sie die Substratbindungsstellen. Die Nukleotid-Bindungsdomänen binden und hydrolysieren ATP. Dies ist die Voraussetzung für die Translokation der Substrate durch die Membran. Obwohl der Mechanismus der Energietransduktion nicht sicher bekannt ist wird angenommen, dass die ATP-Hydrolyse eine Konformationsänderung bedingt. Die Bindung eines Substrats an das P-Glykoprotein stimuliert die ATP-Hydrolyse (Sarkadi et al. 1992, Ambudkar et al. 1992), was wiederum die Konformationsänderung bedingt (Sonveaux et al. 1996, Loo et al. 1996).

Aufgrund von elektronenmikroskopischen Daten wurde von Rosenberg et al. (1997) eine räumliche Rekonstruktion vorgeschlagen, die in Abbildung 3 dargestellt ist.

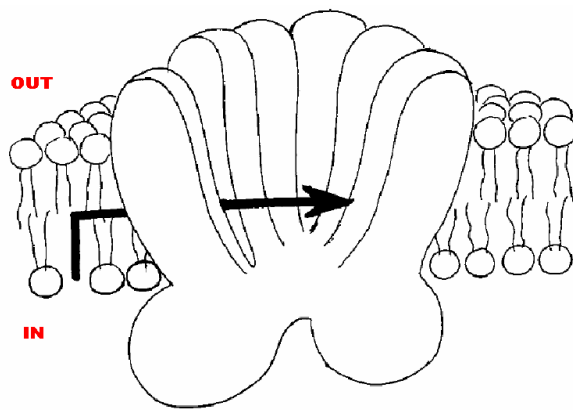


Abbildung 3: Cartoon einer dreidimensionalen Struktur des P-Glykoproteins aufgrund elektrodenmikroskopischer Daten (Rosenberg et al. 1997)

Die von Loo und Clarke (1999) vorgeschlagene Arbeitsweise des P-Glykoproteins wird in Abbildung 4 zusammengefasst. Ein Substrat des P-Glykoproteins wird aufgrund seiner Lipophilie in den Lipid-Bilayer der Plasmamembranen aufgenommen und durch Diffusion zum P-Glykoprotein transportiert. Hier bindet das Substrat an die Substratbindungsstelle, die einer lipophilen Tasche entspricht. Unter Bindung und Verbrauch von ATP an die Nukleotidbindungsstelle tritt eine Konformationsänderung des P-Glykoproteins ein, die zur Veränderung der Affinität des Substrates an die Substratbindungsstelle führt. Dies wiederum führt zum Transport des Substrates aus der Zelle.

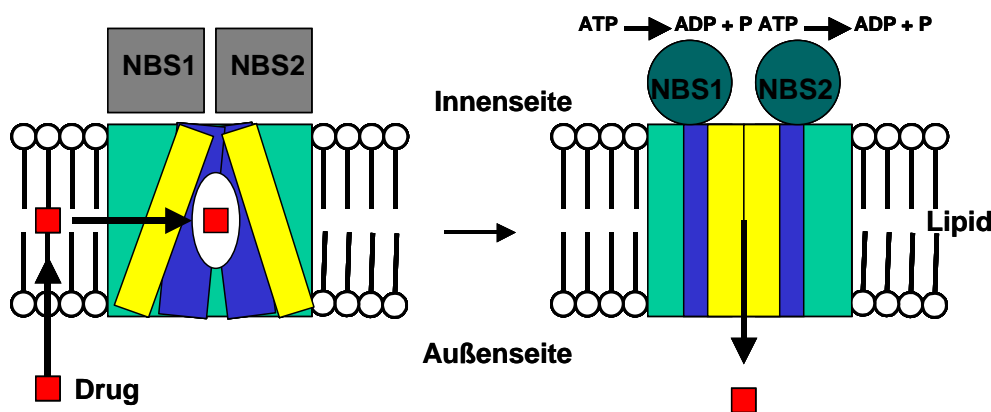


Abbildung 4: Vorgeschlagenes Arbeitsmodell für den P-Glykoprotein-vermittelten Medikamentenrücktransport (NBS = Nukleotid-Bindungsstelle)

Die Zahl und Vielfalt der Substanzen und Medikamente, die durch das P-Glykoprotein transportiert werden, ist verblüffend groß. Sie umfassen nicht nur Chemotherapeutika, wie die Antitumormedikamente, Antacycline, Vinca, Alkaloide, Taxane und weitere mehr, sondern auch immunsupprimierende Wirkstoffe wie Cyclosporin A (Saeki et al. 1993), das Herzglykosid Digoxin (Tanigawara et al. 1992), Glukokortikoide sowie Dexamethason (Ueda et al. 1992), Morphine (Callaghan u. Riordan 1993), antihelminthen'sche Medikamente wie Ivermektin und einige HIV-Protease-Inhibitoren, um nur einige zu nennen. Da die Substrate eine sehr hohe strukturelle Variabilität aufweisen ist bis heute unklar, wie das P-Glykoprotein seine Substrate erkennt und transportiert. So rangieren die Molekülgrößen zwischen 250 Da (Cimetidin) bis 1850 Da (Gramicidin D). Viele Substrate enthalten aromatische Gruppen, jedoch sind auch nichtaromatische, lineare oder zyklische Moleküle unter den durch das P-Glykoprotein transportierten Substanzen. Die meisten Substrate sind basisch oder ungeladen, jedoch auch Substanzen mit negativer Ladung kommen vor. Eine grobe Anforderung an Substrate ist ihre Hydrophobie sowie eine amphipathische Struktur mit hydrophilen und hydrophoben Anteilen. Möglicherweise ist diese Charakteristik erforderlich, damit die Substanzen in den Membranlipidbilayer diffundieren können. Wie auch immer der Mechanismus genau ist, das P-Glykoprotein ist in der Lage, sehr effektiv seine Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch aus der Zelle zu transportieren und eine niedrige intrazelluläre Substratkonzentration zu erhalten. Die Tabelle 2 zeigt einige ausgewählte, sehr unterschiedliche Substrate des P-Glykoproteins, die in der Medizin von Bedeutung sind.

Die Erkenntnis, dass ein Transportprotein an der Entwicklung des Multi-Drug-Resistance von Tumorzellen verantwortlich war führte zu der Hoffnung, dass die Hemmung dieses Proteins zu dessen Überwindung beitragen könnte. Vor ca. 20 Jahren war es Tsuruo et al. (1981) der herausfand, dass Verapamil in der Lage war, den Rücktransport von Vincristin aus der Zelle zu stoppen und damit die Sensitivität auf dieses Medikament zu erhöhen. Diese Erkenntnis führte weltweit zur Suche weiterer das P-Glykoprotein-inhibierender Substanzen. Im weiteren stellte sich dann heraus, dass einige dieser die Funktion aufhebenden Substanzen („reversial agents“) selber Substrate des P-Glykoproteins waren. Dies legte die Vermutung nahe, dass deren inhibitorischer Effekt durch kompetitive Hemmung zustande kommt.

| | | |
|--|--|---|
| Anticancer drugs | CA Blockers | HIV protease inhibitor |
| Actinomycin D Daunorubicin Doxorubicin Etoposide Mitomycin C Paclitaxel | Diltiazem Nicardipine Verapamil | Indinavir Ritonavir Saquinavir |
| Tamoxifen Topotecan Vinblastine Vincristine | Cardiacs Propafenon Amiodaron Quinidine Digoxin | Morphins Morphine 6-glucuronide Loperamide |
| Anti-allergics | CNS drugs | Peptides |
| Terfenadine | Domperidone Fluphenazine Odansetron | Granicidin D Valinomycin N-Acetyl-leucyl Leucyl-norleucine |
| Antibiotics Cefazolin Cefoperazon | Perphenazine Phenoxazine Phenytoin | Steroids Aldosterone Dexamethasone Hydrocortisone |
| Immunosuppressants Cyclosporin A Tacrolimus | | |

Tabelle 2: Substrate des humanen P-Glykoproteins (MDR1) (aus Seelig 1998, König et al. 1999, Ambudkar et al. 1999)

Aufgrund der großen Bedeutung einer Hemmung des in Tumorzellen exprimierten P-Glykoproteins in der Onkologie und der Hemmung des natürlich vorkommenden P-Glykoproteins im Darm und an der Blut-Hirn-Schranke wurden große Anstrengungen unternommen, spezifische, das P-Glykoprotein blockierende Substanzen zu entwickeln. Die das P-Glykoprotein hemmenden Substanzen sind ebenfalls von sehr unterschiedlichem Charakter und auch hier lassen sich keine eindeutigen strukturellen Voraussetzungen beschreiben, die einen guten P-Glykoprotein-Inhibitor ausmachen. Tabelle 3 zeigt einige ausgewählte Inhibitoren des humanen P-Glykoproteins MDR1.

| Tricyclic ring structure | Alkaloids | Antimalaria drugs |
|---------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Phenoxazine | Colchicine | Primaquine |
| Phenothiazine | Reserpine | Chloroquine |
| Phenoxazone | Staurosporine | |
| Resurfin acetat | Neuroleptics | Peptides |
| Xanthene | Phenothiazines | Prenylcysteines |
| Xanthene carboxyl acid | Thioxanthene | |
| Phenanthroline | Flupentixol | |
| Acridine | | |
| Acridine orane | | |
| Quinacrine | | |

Tabelle 3: Inhibitoren des humanen P-Glykoproteins (MDR1) (aus Seelig 1998)

Das P-Glykoprotein wird nicht nur in Tumorzellen gebildet, es wird auch im normalen Gewebe exprimiert. Die Expressionsverteilung in den unterschiedlichen Geweben lässt auf seine Funktion schließen. Diese besteht darin, den Organismus vor toxischen und schädlichen Substanzen zu schützen. Das humane MDR1 P-Glykoprotein wurde in der apikalen Oberfläche von Epithelmembranen exkretorischer Organe wie den Leberzellmembranen, der kleinen Gallengänge in der Leber, den proximalen Tubuli in der Niere und den Enterozyten des Darmes gefunden (Thiebaut et al. 1987, 1989). Diese Lokalisation lässt vermuten, dass das P-Glykoprotein seine Substrate in das intestinale Lumen, in die Galleflüssigkeit sowie den Urin transportiert, was letztendlich zur Ausscheidung dieser Substrate führt. Weiterhin wird das P-Glykoprotein in kapillären Endothelzellen des Gehirns und der Hoden gefunden. Hier wird eine protektive Rolle an der Blut-Hirn- und Blut-Testes-Schranke angenommen (Cordon-Cardo et al. 1989, 1990). Die Präsenz des P-Glykoproteins im Bereich der klassischen pharmakologischen Barrieren und in den exkretorischen Organen lässt eine entgiftende, detoxifizierende Funktion annehmen.

In steroidhomonproduzierenden Geweben findet sich das P-Glykoprotein (Thiebaut et al. 1987, Sugawara et al. 1988, Croop et al. 1989). Weil das P-Glykoprotein die Fähigkeit besitzt, Cortisol und andere Steroide zu transportieren, wird angenommen, dass das P-Glykoprotein für die Sekretion dieser Hormone erforderlich ist (Gottesman u. Pastan 1993). Im Endometrium des

schwangeren Uterus ist eine den Fötus schützende und detoxifizierende Funktion des P-Glykoproteins anzunehmen (Arceci et al. 1988).

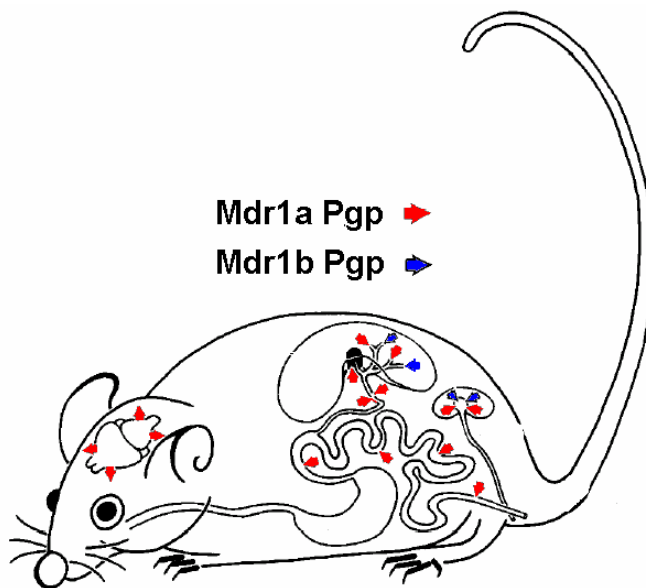


Abbildung 5: Verteilung des mdr1-Typ-P-Glykoproteins in der Maus. Die Pfeile zeigen die Richtung des Transportes, die Farbe, welches medikamententransportierende P-Glykoprotein in der Maus in dem jeweiligen Organ exprimiert wird, mdr1a bzw. mdr1b.

In den Nebennieren von Mensch und Maus ist das humane MDR1 und das Maus mdr1b hoch exprimiert (Thiebaut et al 1987, Fojo et al. 1987, Croop 1989). Das mdr1b ist in sekretorischen Epithelzellen des Endometriums des Uterus während der Schwangerschaft hoch exprimiert und das menschliche MDR1 P-Glykoprotein wurde in plazentalen Poroblasten und im Endometrium gefunden (Arceci et al. 1988, 1990, Sugawara et al. 1988, Sugawara 1990). Die hohe Expression des MDR1-Gentyps in typischen hormonproduzierenden und für die Reproduktion verantwortlichen Organen legt nahe, dass möglicherweise der Hormontransport eine physiologische Rolle des P-Glykoproteins darstellt. Diese Vorstellung wird dadurch gestützt, dass das humane MDR1 und das Maus mdr1b die kortikosteroidalen Hormone Cortisol, Corticosteron und Aldosteron als Substrat transportiert (Ueda et al. 1992, Wolf u. Horwitz 1992, Bourgeois et al. 1993). Das Hormon Progesteron ist zwar selbst kein Substrat des P-Glykoproteins und wird somit nicht transportiert, ist jedoch ein Inhibitor (Yang et al. 1989, Ueda et al. 1992). Zwei Funktionen werden dem P-Glykoprotein in diesem Kontext zugeschrieben, das ist zum einen die schnelle Sekretion von Steroiden,

zum anderen aber auch der Schutz vor hohen Steroidkonzentrationen in den produzierenden Zellen.

Intestinales P-Glykoprotein spielt nicht nur eine wichtige Rolle in der Exkretion von transportierten Substraten, es führt auch zu einer stark reduzierten Aufnahme, wenn diese oral verabreicht werden. Bedingt ist dies durch einen direkten aktiven Rücktransport durch die Darmwand sowie eine reduzierte Rückaufnahme nach hepatobiliärer Exkretion. Dies stellt einen Schutz gegen oral aufgenommene Toxine dar. Sparreboom et al. (1997) zeigten an Knock-out-Mäusen für das *mdr*-Gen im Vergleich zu Wildtypmäusen, dass die Aufnahme ins Plasma nach oraler Gabe von Paclitaxel um das sechsfache in den Knock-out-Mäusen erhöht war. Die fekale Exkretion des unveränderten Medikaments war in den Wildtypmäusen ca. 90%, wogegen sie in den Mutanten 2% war. Dies belegt, dass fast die gesamte Medikamentenmenge in den Knock-out-Mäusen aufgenommen wurde, wogegen die Funktion des P-Glykoproteins in den Wildtypmäusen die Medikamentenaufnahme verhinderte.

Knock-out-Mäuse, die ein oder mehrere bestimmte Proteine nicht produzieren, sind gute Modelle, um die Funktion der jeweiligen „ausgeknockten“ Struktur im komplexen Organismus zu untersuchen. Mit der Standard-knock-out-Technologie hat Schinkel und Mitarbeiter Knock-out-Mäuse für das *mdr1a* und das *mdr1b* sowie eine kombinierte Knock-out-Maus für *mdr1a* und *mdr1b* generiert (Schinkel et al. 1994, 1997). Der Phänotyp der Tiere war gegenüber Kontrollen unter Labortierstallzuchtbedingungen nicht zu unterscheiden, sie waren gesund und normal fertil. Intensive Analyse klinisch-chemischer Serumparameter sowie hämatologischer Parameter erbrachten ebenfalls keine Unterschiede gegenüber den Wildtyp-Mäusen. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen ebenfalls keine makroskopischen oder mikroskopischen Unterschiede aller untersuchten Organe, keine systematischen Gewichtsunterschiede zwischen den beiden Mausgruppen. Die normale Reproduktionsfähigkeit der *mdr1a/1b*(-/-) Mäuse sowie die normale Physiologie spricht in diesem Falle gegen eine prominente Rolle des P-Glykoproteins beim Austausch von Steroidhormonen in Bezug auf die Reproduktion oder die Sekretion der Kortikosteroidhormone von den Nebennieren unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen. Obwohl die physiologische Analyse nicht erschöpfend war, vermutet Schinkel (1997), dass keine wesentlichen Veränderungen der Funktion zwischen den Wildtypen und den Mutanten bezüglich

der Leber, Nieren, Darm, Gehirn, Nebennieren, Ovarien und Uterusfunktion besteht. Ähnliches gilt für das hämatopoetische Stammzellsystem und die hämatologischen Komponenten.

1.3 P-Glykoprotein an der Blut-Hirn-Schranke

Im Folgenden soll die Funktion des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke dargestellt werden. Erstmals wurde die Bedeutung des P-Glykoproteins an einer Blut-Organ-Schranke durch die Untersuchung von Cordon-Cardo et al. (1989) und Thiebaut et al. (1989), die das P-Glykoprotein in den Endothelzellen der kleinen Hirnkapillaren nachweisen konnten, vermutet. Die Blut-Hirn-Schranke wird durch die Endothelzellen der Hirnkapillaren geformt. Im Kontrast zu den Endothelzellen der Blutgefäße in anderen Organen sind diese durch tight junctions fest miteinander verknüpft. Sie zeichnen sich durch sehr geringe Fenestration und Pinozytose aus. Als Konsequenz hieraus können nur sehr kleine hydrophile Moleküle das Gehirn durch Diffusion durch die tight junctions erreichen. Alle anderen Moleküle müssen die Endothelzellen hierfür passieren (Goldstein u. Betz 1986, Pardrige 1988, Bradbury 1993). Aus diesem Grunde gibt es für spezielle Stoffe, die für den Metabolismus notwendig sind, wie z.B. die hydrophilen Komponenten Glucose und Aminosäuren, spezielle Translokationssysteme (Abb. 6). Charakteristisch für die Endothelzellen des Gehirns ist die enge Assoziation zu der Gehirnglia und astrozytären Zellen. Hydrophobe Substanzen wie Alkohol, Koffein, Nikotin können die Blut-Hirn-Schranke durch passive Diffusion durch die Membran der Endothelzellen passieren. Für viele hydrophobe Substanzen ist die Lipophilie zusammen mit dem Molekulargewicht ein guter Prädiktor für die Hirnpenetration. Als ein Maß hierfür wird häufig der Oktanol/Wasser-Löslichkeitskoeffizient angegeben (Levin 1980). Diese Regel gilt jedoch meist nur für Moleküle bis zu einer Größe von 400 Da. Für größere Moleküle gilt diese Funktion teilweise nicht mehr. Es stellte sich heraus, dass der wichtigste Faktor hierfür das P-Glykoprotein an der Blut-Hirn-Schranke darstellt. Dies führt zu einer niedrigen Penetration seiner Substrate ins Gehirn. Seine Substrate sind meist hydrophobe Substanzen mit einer Größe > 400 Da. Thiebaut et al. (1989) zeigte mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern, die an das P-Glykoprotein binden, in Kapillaren des Gehirns vom Menschen und Ratte und in geringerem Ausmaß in Endothelzellen des Testes, dass das P-Glykoprotein hier exprimiert wird. In den Endothelzellen anderer

Gewebe ließ sich kein P-Glykoprotein nachweisen. Aufgrund der bekannten Transporteigenschaften des P-Glykoproteins ist anzunehmen, dass es an der Blut-Hirn-Schranke den Eintritt von potenziell toxischen Substanzen aus dem Blut in das Gehirn limitiert, indem es diese Substanzen aktiv zurück in das Blut transportiert. Das P-Glykoprotein wird in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke nur in den apikalen Membranen, die Kontakt zum Blutlumen haben, exprimiert. Bedingt durch diese Lage besitzt es die Fähigkeit, Substrate, die in die Membran der Endothelzellen diffundiert sind, unmittelbar gegen einen Konzentrationsgradienten unter Energieverbrauch zurück in den Blutstrom rückzutransportieren (Abb. 6). Dadurch, dass es direkt in der Membran sitzt, die die physikalische lipophile Barriere bildet, ist der Rücktransport der entsprechenden Komponenten besonders effektiv.

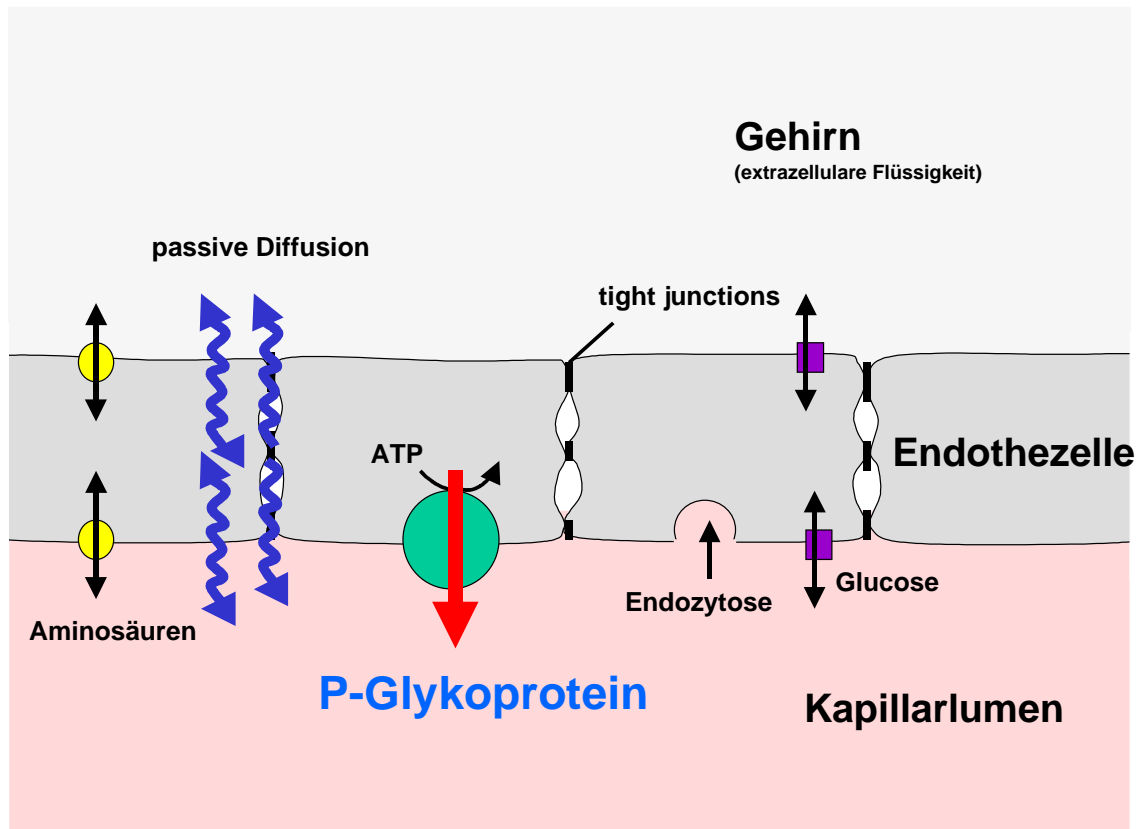


Abbildung 6: P-Glykoprotein in Endothelzellen an der Blut-Hirn-Schranke

Die ersten experimentellen Erkenntnisse, dass das P-Glykoprotein an der Blut-Hirn-Schranke am Medikamententransport beteiligt ist, stammen aus der Zellkultur mit kultivierten Endothelzellen (Tsuji et al. 1992, 1993, Tatsuta et al. 1992, Hegmann et

al. 1992, Biegel et al. 1995, Jetté et al. 1995). Das P-Glykoprotein konnte in immobilisierten Mausendothelzelllinien von Hirnkapillaren sowie in primären Kulturen von Rinder- und Schweinenendothelzellen des Gehirns nachgewiesen werden. Eine reduzierte zelluläre Akkumulation von P-Glykoprotein-Substraten konnte durch die Hemmung des P-Glykoproteins durch blockierende Substanzen demonstriert werden. An Zellen, die in polarisierter Zellschicht gezüchtet wurden, konnte eine klare Polarität gezeigt werden. Der Transport der P-Glykoprotein-Substrate hatte eine klare Richtung, von basal nach apikal. Es wurde eine apikale Lokalisation und Transport des P-Glykoproteins in den Zellschichten gezeigt. Diese apikale Lokalisation wurde ebenfalls durch monoklonale und polyklonale Antikörper demonstriert.

Es muss bemerkt werden, dass die Zellkulturbedingungen natürlich nicht denen entsprechen, wie sie für die Endothelzellen der Hirnkapillaren in situ vorkommen. Zum Beispiel exprimieren immobilisierte Maus- und Rattenhirnkapillarendothelzellen das P-Glykoprotein *mdr1b*, wogegen in vivo Mäuse und Ratten kein *mdr1b*, sondern nur das *mdr1a* P-Glykoprotein exprimieren (Tatsuta et al. 1992, Schinkel et al. 1994). Die Zellkulturexperimente sind deshalb nur mit Vorsicht auf die Situation der Blut-Hirn-Schranke in vivo zu übertragen.

Die richtige Bedeutung des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke wurde erst durch Versuche deutlich, die mit Knock-out-Mäusen durchgeführt wurden, in deren Endothelzellen kein P-Glykoprotein nachgewiesen werden konnte. Diese Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtypen drastische Veränderungen bezüglich der Penetration von Substraten des Multi-Drug-Resistance-Genprodukts (Schinkel et al. 1994). Es zeigte sich, dass die Knock-out-Mutanten ca. 100fach sensitiver auf das neurotoxische Pestizid Ivermectin im Vergleich zu den Wildtypen waren. Während einer routinemäßigen Antiparasitenbehandlung mit Ivermectin fiel auf, dass fast alle *mdr1a* (-/-) Knock-out-Mäuse starben, wogegen alle Kontrollmäuse diese Prozedur ohne klinische Anzeichen gut überlebten. In einem nachgeschalteten Versuch unter standardisierten Bedingungen zeigte sich dann, dass die Mutanten im Vergleich zu den Wildtypmäusen beinahe die 100fach Hirnkonzentration des verabreichten Tritiummarkierten Ivermectin aufwiesen. Die Plasmakonzentrationen waren in den Mutanten lediglich 3mal so hoch. Im weiteren wurde dann von Schinkel et al. (1995) nachgewiesen, dass Ivermectin ein gutes transportiertes Substrat des P-Glykoproteins für das *mdr1a* und das humane MDR1 Genprodukt ist. Diese Ergebnisse zeigten, dass

das P-Glykoprotein in der Blut-Hirn-Schranke einen wesentlichen Anteil daran hat, dass seine Substrate nicht frei durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirnkompartment diffundieren können. Das P-Glykoprotein transportiert seine Substrate an der Blut-Hirn-Schranke in den Endothelzellen zurück in das Blut und hält damit deren Hirnkonzentrationen gering (Abb. 6). Dies hat wesentliche Konsequenzen auf die Pharmakokinetik und pharmakologische Aktivität von Substanzen, die auch Substrate des P-Glykoproteins sind.

Studien wurden dann auf eine Vielzahl weiterer Medikamente ausgeweitet, von denen man vermutete, dass sie Substrate des P-Glykoproteins sind. So ergaben sich für eine Reihe von Tritium-markierten Medikamenten wie Digoxin, Cyclosporin A, Morphin und Dexamethason Unterschiede in der Hirnpenetration zwischen den *mdr1a* Knock-out- und Kontrollmäusen. Wie die Ergebnisse von Schinkel et al. (1996) zeigten, kann das Blut-Hirn-Schranken-P-Glykoprotein somit einen entscheidenden Effekt auf die zentrale klinische Wirkung von Medikamenten haben. Er und seine Mitarbeiter zeigten, dass Domperidon, ein Dopaminantagonist, der normalerweise als Antiemetikum eingesetzt wird weil er die Blut-Hirn-Schranke kaum überwindet und daher keine zentrale antipsychotische neuroleptische Wirkung hat, in den Knock-out-Mäusen einen zentralen Effekt mit herabgesetzter Spontanbewegung zeigt, wogegen dieses Medikament in den Wildtyp-Kontrollen diese zentrale Wirkung nicht aufweist. Ein weiteres Beispiel ist das Loperamid (Imodium®), ein dem Morphin ähnliches Opiat, das normalerweise eingesetzt wird, um den obstipatorischen Opiat-effekt im Gastrointestinaltrakt zu nutzen, aber keine zentrale Wirkung hat, da es die Blut-Hirn-Schranke kaum überwinden kann. Wird den *mdr1a* Knock-out-Mäusen Loperamid verabreicht, so zeigen diese im Gegensatz zu den Wildtypen die typischen zentralen Opiateffekte. Die Hirnkonzentration von Tritium-markiertem Loperamid war in den *mdr1a* (-/-) Mäusen 13mal höher als in den Wildtypen (Schinkel et al. 1996). Diese Beispiele belegen deutlich die Wirkung des P-Glykoproteins auf die Hirnpenetration seiner Substrate mit Auswirkung auf dessen zentrale ZNS-Effekte. Auf der anderen Seite gibt es hydrophile und hydrophobe Medikamente, die keine Substrate des P-Glykoproteins sind und keine Unterschiede in der Penetration zwischen den beiden Mausgruppen finden ließen. Dazu gehören Tritium-markiertes Methotrexat, Oxitocin, Haloperidol und Clozapin sowie C14-markiertes Topotecan oder Phenytoin (Schinkel et al. 1996).

Bis heute wurden einige weitere Substrate des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke gefunden, die von größerer klinischer Bedeutung sind. Hierzu gehören u.a. die Proteaseinhibitoren Indinavir, Nelfinavir, Saquinavir, die zur Therapie des HIV-Virus eingesetzt werden (Kim al. 1998, Lee et al. 1998). Die schlechte Penetration der Proteaseinhibitoren in das ZNS mag ein Problem der Therapie der HIV-Infektion darstellen und das klinische Outcome der Patienten verschlechtern. In Tabelle 4 sind einige ausgewählte Medikamente dargestellt, die durch das P-Glykoprotein an der Blut-Hirn-Schranke beeinflusst werden.

| Medikament | Molekulargewicht | Therapeutische Kategorie |
|--------------|------------------|--------------------------|
| Ondansetron | 393 | Antiemetika |
| Dexamethason | 392 | Glukocorticoid |
| Domperidon | 426 | Antiemetika |
| Loperamid | 477 | Antiarrhythmika |
| Doxorubicin | 544 | Zytostatika |
| Nelfinavir | 568 | HIV Protease Inhibitor |
| Indinavir | 614 | HIV Protease Inhibitor |
| Saquinavir | 671 | HIV Protease Inhibitor |
| Erythromycin | 734 | Antibiotika |
| Digoxin | 781 | Herzglykosid |
| Vinblastin | 811 | Zytostatika |
| Paclitaxel | 854 | Zytostatika |
| Invermectin | 874 | Pestizid, |
| CyclosporinA | 1203 | Immunsuppressiva |

Tabelle 4: Medikamente, deren Penetration an der Blut-Hirn-Schranke durch das P-Glykoprotein herabgesetzt wird. Die Tabelle zeigt ausgewählte Medikamente, deren Aufnahme in das Gehirn negativ durch das P-Glykoprotein beeinflusst wird. Es ist die therapeutische Kategorie sowie die Molekülgröße dargestellt (nach Schinkel 1999).

Wie aus Tabelle 4 zu entnehmen ist, sind die Substrate des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke ebenfalls in ihrer Struktur und ihren Molekülgrößen sehr unterschiedlich und auch hier ist keine sichere Vorhersage möglich, welche Substanz ein Substrat des P-Glykoproteins ist und welche nicht. Für viele weitere Medikamente ist eine Interaktion des P-Glykoproteins auf die Pharmakokinetik und auf die pharmakotherapeutische Applikation zu erwarten. Für einige Medikamente, die eine zentral wirksame Wirkung haben sollten, wäre eine Blockade des P-Glykoproteins eine sinn-

volle therapeutische Maßnahme. Aus diesem Grund wurden, wie bereits zuvor erwähnt, große Anstrengungen unternommen, therapeutisch wirksame, nebenwirkungsarme Therapeutika zu entwickeln. Als Beispiel sei das Derivat des Cyclosporin A, das PSC833 als P-Glykoprotein-Blocker, genannt. Es ist bei intravenöser Applikation in der Lage, die Hirnpenetration von z.B. Colchicin und Vinblastin deutlich zu steigern (Drion et al. 1996).

1.4 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu zeigen, ob und in welchem Umfang zentral wirksame Medikamente wie Antidepressiva, Neuroleptika oder auch die Anti-Parkinson-Mittel Substrate des P-Glykoproteins sein können und die Penetration ins Gehirn beeinflussen. Ein weiteres Ziel ist zu untersuchen, ob auch endogen vorkommende Substanzen, insbesondere steroidale Hormone, Substrate des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke sind und in wie weit deren Penetration ins Gehirn durch das P-Glykoprotein beeinflusst wird. Sollten sich hier unterschiedliche Penetrationen der Steroide zeigen, ist eine weitere Frage die der biologischen Wirkung. In wie weit sind die regulatorischen Systeme, wie z.B. die HPA-Achse (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse) durch diese Veränderungen der Hirnpenetration betroffen.

Der erste Teil der Arbeit stellt Ergebnisse dar, die zur Penetration von zentral wirksamen Medikamenten gewonnen wurden. Ich habe mich dabei des Tiermodells mit Knock-out-Mäusen und Wildtypen bedient, bei denen in den Knock-out-Mutanten das P-Glykoprotein nicht mehr funktionsfähig ist. Die Doppel-Knock-out-Maus *mdr1ab* (-/-) wurde gewählt, weil die Funktion beider Gene zusammen der des humanen Gens entspricht und weil nicht sicher bewiesen ist, dass das *mdr1b* Gen die Funktion des *mdr1a* Gens übernimmt, wenn dieses nicht mehr funktionstüchtig ist. Die Doppel-Knock-out-Maus hat also kein funktionsfähiges P-Glykoprotein mehr in den entsprechenden Organen (siehe Abb. 5).

An zentral wirksamen Medikamenten wurden in der Mehrzahl Antidepressiva ausgewählt, die von sehr unterschiedlichem strukturellen Aufbau und unterschiedlicher biologischer Wirkungsweise sind. Ergänzend wurde ein Neuroleptikum und ein in der Parkinson-Therapie angewendeter Dopaminagonist auf seine P-Glykoprotein-

abhängige Penetration ins Gehirn untersucht. Da die Medikamente schnell und zu einem hohen Ausmaß metabolisiert werden, haben wir keine radioaktiv markierten Substanzen für unseren Versuchsaufbau verwendet, da später nicht mehr zu differenzieren ist, ob die Metabolite oder die Ausgangssubstanzen für die unterschiedliche Penetration, letztendlich der Radioaktivität, ins Gehirn verantwortlich sind. Wir haben somit für die eingesetzten Substanzen jeweils Methoden für die Extraktion und HPLC-Messungen aus Organen und Plasma entwickelt.

Neben den Experimenten, in denen den Versuchstieren eine Einmaldosis eines Medikamentes verabreicht wurde und dann die Organkonzentrationen gemessen wurden, haben wir beispielhaft für Amitriptylin und seine Metabolite eine pharmakokinetische Untersuchung durchgeführt, bei der zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einmaliger Injektion die Medikamentenspiegel gemessen wurden. Da natürlich in der therapeutischen Anwendung der meisten zentral wirksamen Medikamente keine Einmaldosis, sondern kontinuierliche Gabe der Medikamente indiziert ist, haben wir die Effekte nach Langzeitgabe überprüft, indem wir im Amitriptylin Langzeitversuch mehrfache Injektionen täglich über einen längeren Zeitraum durchführten und dann Medikamentenspiegel und Metabolitspiegel in den Organen der beiden Versuchstiergruppen, Mutanten und Wildtypen, verglichen. Als weiteres wurden Langzeitversuche für ausgewählte Medikamente durchgeführt, in denen Mäusen kleine osmotische Pumpen implantiert wurden, die über einen längeren Zeitraum, bis zu 14 Tagen, kontinuierlich einen gleichmäßigen Plasmaspiegel der jeweiligen Medikamente aufrecht erhalten. Diese Langzeituntersuchungen sind wichtig, da natürlich durch die Medikamente oder deren Metabolite eine Beeinflussung des P-Glykoproteins eintreten kann und zum weiteren die Medikamente bei Langzeittherapie in den Organen akkumulieren und sich die Effekte von der Kurzmedikation deutlich unterscheiden können.

Eine wesentliche Fragestellung, die hinter all diesen Versuchen steckt, ist die zu überprüfen, ob nicht Therapieresistenz auf zentral wirksame Medikamente ihre Ursache in einer nicht ausreichenden Penetration ins Gehirn haben könnte. Als Beispiel sei hier die Depression genannt. Lediglich 60 bis 70% depressiver Patienten sprechen auf eine fachkundig durchgeführte antidepressive Therapie an. Neben anderen pharmakobiologischen Faktoren könnte eine unterschiedliche P-Glykoprotein-Funktion eine Ursache hierfür sein, vorausgesetzt, das verwendete Psychopharma-

kon ist Substrat des P-Glykoproteins. Da bis heute keine strukturellen Gesetzmäßigkeiten auf Substrate des P-Glykoproteins hinweisen, muss jede einzelne Substanz oder jedes Medikament experimentell daraufhin überprüft werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wird dargestellt, ob und in welchem Umfang Steroide wie Cortisol, Corticosteron, Aldosteron und andere endogen vorkommende Substanzen Substrate des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke sind. Versuchsergebnisse funktioneller Tests, die die HPA-Achsenfunktion charakterisieren, werden dargestellt. Dazu gehören der Dexamethason-Suppressionstest, der CRH-Challenge-Test und weitere. Glukokortikoidhormone sowie deren Sekretion über die Nebennieren und deren Penetration ins Gehirn stellen wichtige Faktoren dar, da diese zu den Modulatoren neuronaler Aktivität und Funktion gehören. Sie beeinflussen die Exitabilität des neuronalen Netzwerkes, das wiederum Lernen, Gedächtnis, zirkadiane Effekte wie Schlafen und Wachrhythmus sowie Futteraufnahme reguliert (Joels u. de Kloet 1992, de Kloet et al. 1998). Glukokortikoide sind involviert in Verhaltens- und kognitive Prozesse und sie koordinieren die Ausschüttung unterschiedlicher Neuropeptide, die möglicherweise an stressabhängigen klinischen Bedingungen, z.B. der Major Depression, beteiligt sind (Lupien u. McEwen 1997, Holsboer 1999, 2000). Auf der anderen Seite helfen Glukokortikoide, die stressinduzierte HPA-Aktivierung über negatives Feedback durch Inhibition am hypothalamischen Nucleus paraventricularis und im Hippokampus zu terminieren. Darum ist die Glukokortikoidaufnahme ins Gehirn von zentraler Bedeutung. Die Kontrolle der Glukokortikoidaufnahme durch das MDR1 P-Glykoprotein nimmt wahrscheinlich einen erheblichen Einfluss auf die Aktivierung und Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierensystems. Beides, Glukokortikoidüberexposition und Glukokortikoidmangel, zeigt einen schädlichen Effekt auf die neuronale Integrität und Funktion (de Kloet u. Joels 1996, Lucassen et al. 2001).

Die mögliche Auswirkung einer unterschiedlichen Aktivität des P-Glykoproteins auf sehr unterschiedliche Systeme wie der Medikamentenaufnahme, aber auch der Funktion des neuroendokrinen Systems, werden diskutiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Die für die pharmakologischen Untersuchungen verwendeten Substanzen und Medikamente werden im Folgenden mit ihren Bezugsquellen aufgelistet:

- Amitriptylin und deren Metabolite Z- und E-Hydroxy-Amitriptylin und Nortriptylin, E- und Z-Hydroxy-Nortriptylin von Lundbeck (Kopenhagen, Dänemark)
- Budipin von Lundbeck (Kopenhagen, Dänemark)
- Citalopram von Lundbeck (Kopenhagen, Dänemark)
- Dextromethorphan und deren Metaboliten, Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)
- Doxepin und Desmethyldoxepin von Mack (Illertissen, Deutschland)
- Melperon, Knoll AG (Uetersen, Deutschland)
- Mirtazapin von Thiemann Arzneimittel GmbH (Waltrop, Deutschland)
- Paroxetin von SmithKline Beecham (Großbritannien)
- Protriptyline von RBI (Massachusetts, USA)
- Trimipramin und Desmethyltrimipramin von Rhone-Pulenc Rorer (Köln, Deutschland)
- Venlafaxin und o-Desmethylvenlafaxin von Wyeth Pharma GmbH (Münster, Deutschland)

- Beta-Glucuronidase/Arylsulfatase, Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)
- Die Tritium-markierten Steroide [³H]-Dexamethason, [³H]-Corticosteron [³H]-Cortisol (Hydrocortison), [³H]-Aldosteron, [³H]-Progesteron und [³H]-17 Beta-Östradiol wurden von NEN (Boston, USA) bezogen.
- Der Gewebslöser Biolud S sowie die Szintillationsflüssigkeit Quick Save A wurden von Zinsser Analytik (Frankfurt, Deutschland) bezogen.
- Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) (Ferring, Pharmaceuticals, Malmö, Schweden).

Alle weiteren Chemikalien, die in den Versuchen eingesetzt wurden, waren von höchstem Reinheitsgrad und wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

- Miniosmotische Pumpen, Alzet-Pumpen, Modell 1002, Alza Corporation (Palo Alto, USA)
- HPLC: Stationäre Phase: Luna 5 μ C18 (2) 250 x 4,6 mm Säule von Phenomenex (Torrance, USA). Die Chemikalien für die mobile Phase wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) im HPLC-Reinheitsgrad bezogen.

2.2 Geräte

- HPLC: Beckman 166 variabler UV-Wellen Detektor (München, Deutschland)
 - Merck L-7480 Fluoreszenzdetektor (Darmstadt, Deutschland)
 - Beckman Gradienten-Pumpe 126 (München, Deutschland)
 - Beckman Autoinjektor 508 (München, Deutschland)
 - Betacounter, Beckman LS 6000 IC (München, Deutschland)
 - Gammacounter Cobra II, Packard Cambera (Dreieich, Deutschland)
 - Polytron PT 1200 Kinematic AG (Luzern, Schweiz)
 - Eppendorf Zentrifuge 5417R (Hamburg, Deutschland)
 - Branson Sonifier Cell Disruptor B15, Heinemann (Schwäbisch Gmünd, Deutschland)
 - Radioaktiv-wascher für ACTH, Nichols Allegro Aspirwash (Bad Nauheim, Deutschland)
 - Pipettierroboter Probe 1000, Packard Camerba (Dreieich, Deutschland)
 - Kendro Zentrifuge Omnifuge 2 (Hanau, Deutschland)
- und weiteres Gerät, nicht näher bezeichnet

2.3 Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden entsprechend den Richtlinien über die Pflege und den Gebrauch von Laboratoriumstieren der Regierung von Bayern, Deutschland, durchgeführt. Entsprechend genehmigte Tierversuchsanträge liegen vor.

Es wurden entsprechend der unterschiedlichen Versuche weibliche und männliche Versuchstiere verwendet. *mdr1ab*(-/-) Mäuse und FVB-N Wildtypmäuse wurden im Tierstall des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, München, gezüchtet. Die Mäuse wurden entsprechend den geltenden Vorschriften in kleinen Tiergruppen bzw. einzeln gehalten. Vor den entsprechenden Versuchen wurden die Tiere 10 bis 14 Tage

isoliert und einzeln im Käfig gehalten. Die Mäuse unterlagen einem 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Zyklus. Sie wurden mit Standardmauslaborfutter unbegrenzter Menge und Wasser ernährt. Das Geschlecht, Alter und Körpergewicht der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Tierexperimente sind jeweils in den Versuchsbeschreibungen genauer bezeichnet. Wenn nicht näher beschrieben waren die Gewichte und das Alter zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich und die Gewichte unterschieden sich zwischen den Tieren nicht in mehr als 4 g und das Alter nicht in mehr als 4 Wochen.

Die *mdr1ab* Doppel-Knock-out-Mäuse wurden ursprünglich von Schinkel und seinen Mitarbeitern (1997) kreiert. Dabei wurde sequenzielles Gentergeting in 129/Ola E14 embryonalen Stammzellen und siebenmalige Rückkreuzungen mit FVB/N der C57BL/6 x 129 Chimären durchgeführt. FVB/N Wildtypmäuse sowie die Knock-out-Mäuse wurden von Taconic gekauft (Germantown, USA) (FVB/Tac-[KO]Pgy2 N7). Beide Mausgruppen, die Wildtypen und die Knock-out-Mäuse, wurden ab der Generation N7 mit dem genetischen Hintergrund FVB/N als homozygote Kolonien im Max-Planck-Institut für Psychiatrie im Tierhaus durch intercrossing der homozygoten Mäuse gezüchtet.

Die gezüchteten Tiere wurden mittels Westernblott mit einem polyklonalen Antikörper gegen das P-Glykoprotein und mittels PCR (Methoden hier nicht näher beschrieben) auf ihren Knock-out kontrolliert.

Die *mdr1a*(-/-) Einzel-Knock-out-Mäuse und FVB/N Kontrollmäuse für den [³H]-Dexamethason-Penetrationsversuch wurden von Taconic (Germantown, USA) gekauft.

2.4 Methodik der pharmakologischen Untersuchungen

2.4.1 Experimentelles Vorgehen der Tierversuche

In den Tierversuchen ging es darum herauszufinden, wie sich die verabreichten Medikamente entweder nach einmaliger, wiederholter oder kontinuierlicher Gabe in den unterschiedlichen Organen der beiden Versuchstiergruppen, der Mutanten und der Wildtypen verteilen.

Bei der einmaligen Gabe wurde den Versuchstieren zu einem bestimmten Zeitpunkt eine subkutane Injektion der zu verabreichenden Substanz (10 µl/g Körpergewicht) im Nackenbereich verabreicht. Wenn nicht bei den Versuchsergebnissen anders erwähnt, wurden die Tiere 1 Stunde nach der Injektion mit Halothan narkotisiert und dann dekapitiert. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt und die Organe innerhalb weniger Minuten entnommen. Die entnommenen Organe sowie das Blut wurden unmittelbar entsprechend der späteren Verwendung auf Trockeneis tiefgefroren bzw. auf Eis gekühlt. Das EDTA-Blut wurde 5 min bei 3000 g zentrifugiert und das Plasma bei -20° bzw. -80°C tiefgefroren. Die entnommenen Organe und hierzu zählten in der Regel Gehirn, Milz, Leber, Niere, Hoden, Ovar, Fett und Muskel, wurden gewogen und dann mit dem fünffachen Volumen des Homogenisierungspuffers (HBSS 0,02 M, HEPES buffer pH 7,2) mit einem polytron PT 1200 Kinematic AG homogenisiert. Für die Medikamentenspiegelbestimmung konnten diese Homogenate bis zur HPLC-Aufarbeitung bei -20° eingefroren werden.

Bei den Pharmakokinetik-Versuchen wurden die Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der subkutanen Injektion getötet. Die Tötung, Dissektion der Organe und Homogenisierung erfolgten in ähnlicher Weise wie in den Versuchen nach Einmalinjektion. Alle Versuchstiere wurden vor ihrer Verwendung gewogen und in gewichtsgleiche Gruppen eingeteilt.

Für die Versuche mit kontinuierlicher Medikamentengabe wurden den Versuchstieren kleine osmotische Pumpen implantiert. Diese osmotischen Alzet-Pumpen wurden zunächst mit den entsprechenden Medikamenten, gelöst in NaCl, mit einer Ethanolkonzentration nicht höher 15%, gefüllt. Die Versuchstiere wurden mit Rompun und Ketamin narkotisiert (200 µl einer 0,1%igen Rompun und 0,5%igen Ketamin-Lösung). Unter sterilen Bedingungen wurden ihnen dann die osmotischen Pumpen subkutan im Nackenbereich implantiert. Es wurde darauf geachtet, die Pumpen an Stellen zu implantieren, die von der Maus nicht mit der Schnauze oder den Beinen zugänglich waren, damit der Wundbereich nicht aufgekratzt und die Pumpen nicht wieder entfernt werden konnten. Die Tiere wurden 10-12 Tage einzeln in den Käfigen gehalten, täglich ihr Gewicht gemessen und ihr Gesundheitszustand beurteilt. Nach dieser Zeit wurden die Tiere entsprechend der Spritz- und Pharmakokinetik-Versuche mit Halothan narkotisiert, dekapitiert, die Organe und das Blut entnommen und im weiteren

wie bei den oben beschriebenen Versuchen verfahren. Bei den Versuchstieren mit osmotischen Pumpen wurde kontrolliert, ob der Pumpenbereich in einem guten Zustand war und ob sich Entzündungsreaktionen um die osmotischen Pumpen und den Wundbereich ergeben hatten. Diese hätten zu einer Unterbrechung der Pumpleistung durch Verstopfung der Pumpen führen können. Die Homogenate sowie das gewonnene Plasma wurde für die im Folgenden zu beschreibenden Medikamentenspiegelbestimmungen oder zu endokrinologischen Messungen verwendet.

In den Experimenten mit repetitiver Injektion wurde den Versuchstieren 10 Tage 2 x täglich subkutan Amitriptylin injiziert und die Tötung der Tiere 4 Stunden nach der letzter Injektion vorgenommen. Zur Probenaufarbeitung siehe oben.

2.4.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung von Verfahren die es ermöglichten, die strukturell sehr unterschiedlichen Pharmaka auch in sehr niedrigen Konzentrationen nicht nur im Plasma, sondern auch in fettreichen Organen, wie dem Gehirn, zu messen. Da die Fragestellung der Arbeit vorgab, strukturell und von der Lipophilie sehr unterschiedliche Pharmaka in den Knock-out-Mäusen und Kontrollen einzusetzen, musste das Messverfahren eine hohe Flexibilität und Sensitivität aufweisen. Ich habe mich für ein HPLC-Verfahren mit Gradientensystem und vorheriger Flüssig-Flüssig-Extraktion entschieden. Das genauere Extraktionsprinzip und deren Ergebnisse werden im Ergebnisteil dargestellt. Im Methodenteil wird im Folgenden das genaue Procedere dargestellt.

2.4.2.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Nachdem die Homogenate bzw. das Serum aufgetaut waren, wurden sie gekühlt ultraschallbehandelt (Branson Sonifier, gepulst 30%, Level 3, 10-20 Pulse). Zu 400 µl Plasma bzw. Homogenat wurden 50 µl des internen Standards (Protriptylin 10 µg/ml) und 400 µl einer 2 M Natrium Carbonat-Puffer-Lösung (mit NaOH auf einen pH-Wert von 10,5 eingestellt) zugegeben und kurz gevortext. Zu diesem Gemisch wurden 5 ml n-Hexan mit einem unterschiedlichen Anteil an Isoamyl Alkohol zugegeben. Die Isoamyl-Alkoholkonzentration, die für die jeweilige Extraktion erforderlich ist, variiert

von Medikament zu Medikament und wird im Ergebnisteil in Tabelle 6 dargestellt. In einem Überkopfschüttler wurden die Proben bei Raumtemperatur 30 min lang gemischt. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 3000 g wurde die organische Phase in ein mit 0,3 ml 0,18 M Phosphorsäure bestücktes Röhrchen transferiert und wieder für 30 min im Überkopfschüttler gemischt. Es folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 3000 g, nach der die organische Phase abgenommen wurde. Die wässrige Phase wurde für die HPLC-Messungen verwendet. Ein zusätzlicher wiederholter letzter Zentrifugationsschritt konnte die organische Phase sauberer abtrennen und Störpeaks im HPLC-Lauf vermeiden. Die Extraktionsrecovery war für die untersuchten Medikamente und deren Metabolite in der Regel über 90 %. Eine Ausnahme stellt das Desmethylvenlavaxin dar, hier betrug die Extraktionsrecovery etwas weniger als 40 %.

2.4.2.2 HPLC-Bedingungen

Für die HPLC wurde ein Beckman 166 variabler UV-Detektor, ein Merck L-7480 Fluoreszenz-Detektor, eine Beckman Gradientenpumpe 126 sowie ein Beckman Autoinjektor 508 verwendet. Als stationäre Phase wurde eine reversed phased-Säule der Firma Phenomenex (Luna 5 μ C18 (2) 250 x 4,6 mm) genutzt. Um schärfere Peaks zu erreichen und einen niedrigeren Gegendruck zu bekommen, wurde die Säule im Säulenofen bei 60° gehalten. Die mobile Phase wurde mit einem Fluss von 1 ml/min durch die Säule gepumpt. Die meisten Analysen wurden mit einem Gradientenverfahren der mobilen Phase durchgeführt und dauerten zwischen 20 und 55 min. Die genaueren Gradientenverläufe der unterschiedlichen HPLC-Methoden sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die mobile Phase A wird dabei im zeitlichen Verlauf mit zunehmendem Anteil der mobilen Phase B versetzt. Die mobile Phase A setzte sich aus Acetonitril und Wasser (15:85) mit 43,6 mM Phosphorsäure und 35,9 mM Triethylamin zusammen. Die mobile Phase B bestand aus Acetonitril. Beide Eluenten wurden vor ihrer Verwendung im Ultraschallbad unter Vakuum entgast. Die zu bestimmenden Substanzen und deren Metabolite wurden mittels UV-Absorption und Fluoreszenzmessung nachgewiesen. Welches Verfahren bei welcher Substanz mit welchen Wellenlängen verwendet wurde, ist der Tabelle 5 zu entnehmen. Die Quantifizierung der zu messenden Substanzen aus Plasma und Organhomogenaten erfolgte über Standardkurven, die mit gespikten Proben unter identischen Versuchs- und

Messbedingungen hergestellt wurden. Es wurden nur Proben ausgewertet, deren Werte im Messbereich der Standardkurve lagen. Die Quantifizierung erfolgte über Kalkulation des Analyten zu internen Standard Peak Area-Verhältnisses (Beispiel Standardkurven siehe Abb. 10). Die Abbildung 9 zeigt beispielhaft typische HPLC-Chromatogramme, wie sie zur Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen im Gehirn hergestellt wurden.

| Substanz | mobile Phase Gradient [% B] | UV Absorption [nm] | Fluoreszenz (Ex/Em) [nm/nm] |
|--------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Amitriptylin | 5-22 | 254 | - |
| Doxepin | 12,5-25 | 254 | - |
| Trimipramin | isokratisch 35 | 254 | - |
| Citalopram | 5-25 | 214 | 230/300 |
| Paroxetin | 15-30 | 214 | 295/365 |
| Venlafaxin | 0-30 | 214 | 225/305 |
| Mirtazapin | 0-25 | 214 | 295/370 |
| Melperon | 28-60 | 245 | 245/290 |
| Budipin | 25-70 | 214 | 220/290 |

Tabelle 5: HPLC-Methodik. Die Tabelle fasst die Detailsinstellungen des Gradientensystems und der Detektion für die einzelnen Medikamenten-Mess-Methoden zusammen.

2.4.2.3 HPLC-Methode für Dextromethorphan

Für die Bestimmung von Dextromethorphan und seinen Metaboliten im Plasma wurde eine Extraktionsmethodik in Anlehnung an Härter et al. (1996) entwickelt. Die Plasma und Homogenat-proben wurde mit gleichem Volumen Natriumacetat 0,2 M pH 5,0 versetzt und 10 µl Beta-Glucuronidase/Arylsulfatase zugegeben, gevortext und mindestens 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 2 ml Natriumhydrogencarbonatlösung 0,1 M pH 9,1 zugegeben, gevortext und zentrifugiert.

Diese Lösung wurde über Festphasenextraktion weiter aufgereinigt. Dabei wurden Merck Adsorbex RP-18 (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Nach Probenaufgabe und Waschen mit Wasser und Acetonitril erfolgte die Elution mit saurem Acetonitril

(5% Ameisensäure). Nachdem die Probe unter Stickstoff abgedampft wurde, wurde sie in 200 µl der mobilen Phase aufgenommen und in die HPLC-Analytik eingesetzt. HPLC: Die stationäre Phase war eine Merck LiChrospher 100 CN (5 µm) Säule. Der Eluent (mobile Phase) bestand aus 9% Acetonitril mit 0,025% Triethylamin, pH 2,5 mit Phosphorsäure eingestellt. Isokratische Laufbedingungen mit einem Flow von 1 ml/min. Fluoreszenzdetektion erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 220 nm und einer Detektionswellenlänge von 305 nm. Es erfolgte eine externe Kalibrierung mit gespickten Plasmaproben von 25 nM bis 10 µM. Mit diesem Verfahren konnten Hydroxymorphinan, Dextrophan, 3-Methoxymorphinan und Dextromethorphan gemessen werden.

2.5 Endokrinologische Untersuchungen (Steroidpenetration und funktionelle Tests)

Im Weiteren werden die Methoden beschrieben, die herangezogen wurden, um näher zu beschreiben, ob endogen vorkommende Steroide Substrate des P-Glykoproteins sind, und ob sich Unterschiede zwischen den Knock-out-Mäusen und den Wildtypen bezüglich der HPA-Achsenfunktion finden.

2.5.1 Experimentelles Procedere

2.5.1.1 Verteilungsversuche von Tritium-markierten Steroiden

Tritium-markierte Steroide wie Corticosteron, Cortisol, Progesteron Aldosteron, und Östradiol wurden den Mäusen subkutan in 0,9 % Natrium-Chlorid und 10% Ethanol-lösung im Bereich des Nackens verabreicht. Das Tritium-markierte Dexamethason für den Versuch mit den *mdr1a(-/-)* Mäusen wurde abweichend hiervon intraperitoneal in gleichen Volumina verabreicht. Das Volumen der Injektion war 10 µl/g Körpergewicht. 2 Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse mit Halothan narkotisiert und dann dekapitiert. Das Blut wurde in EDTA-beschichteten Röhrchen gesammelt und das Plasma durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 min gewonnen. Die Organe Hirn, Milz, Leber, Niere, Hypophyse, Nebenniere, Testes und ggf. weitere wurden entnommen und gewogen. Die Organe und das Plasma wurden im Gewebslöser Bio-

lud S von Zinsser in einem Verhältnis von 1 Gewichtsteil zu 20-200 Gewebslöserteilen aufgelöst. Dieses erfolgte durch Inkubation für 24 Stunden bei 40°C. Jeweils 300 µl dieser Proben wurden zusammen mit 3 ml Quick save A und 50 µl 99,7%iger Essigsäure vermischt. Die Radioaktivität wurde im Betacounter gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über Kalibration mit einer jeweils gleichzeitig durchgeführten Standardkurve.

2.5.1.2 Funktionelle Tests zur Charakterisierung der HPA-Achsenfunktion

Für alle funktionellen Tests wurden die Mäuse jeweils 10-14 Tage einzeln gesetzt und in einer stressfreien Umgebung gehalten, um unkontrollierte Stressreaktionen auszuschließen.

Basale Stresshormonspiegel:

Um die basalen morgendlichen Plasmaspiegel für ACTH, Corticosteron und AVP (Arginin-Vasopressin) zu bestimmen, wurden die Mäuse über Nacht ungestört belassen. Blut wurde morgens zwischen 7.00 und 8.00 Uhr retroorbital entnommen. Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt und nach Zentrifugation das Plasma gewonnen. ACTH, Corticosteron und AVP-Plasmakonzentrationen wurden mit Radioimmunoassays (RIA) bestimmt (siehe 2.5.2).

Forced-swim-stress-Test:

Die Tiere wurden morgens in der Zeit von 8.00 bis 12.00 Uhr einem Stress, dem sog. forced-swim-stress-Test ausgesetzt. 5 min nach diesem Test wurde retroorbital Blut entnommen und in oben beschriebener Weise weiterverarbeitet. ACTH, Corticosteron und AVP wurden im RIA bestimmt (siehe 2.5.2). Im forced-swim-Test kommen die Mäuse 5 min lang in ein Becherglas, das mit 21°C warmem Wasser gefüllt ist, der Durchmesser war 12,5 cm, Wassersäule 14 cm.

Dexamethason-Suppressionstest:

Unterschiedliche Dosierungen von Dexamethason wurden den Mäusen morgens um 8.00 Uhr subkutan im Bereich des Nackens injiziert (10 µl/g Körpergewicht). Die Tiere verblieben dann weiterhin in stressfreier Umgebung alleine in ihren Käfigen, um um 14.00 Uhr nach Halothannarkose dekapitiert zu werden. Das Blut wurde in EDTA-

Röhrchen gesammelt, Plasma hergestellt und im Anschluss die Plasma-Corticosteron- und ACTH-Konzentrationen mittels Radioimmunoassay gemessen.

CRH-Challenge-Test:

Nachdem die *mdr1ab(-/-)* Mutanten und die Wildtypmäuse eine Woche lang täglich betreut wurden, um sie an den Umgang zu gewöhnen, wurde ihnen zum Versuchsbeginn subkutan im Bereich des Nackens entweder Vehikel (0,9%ige NaCl) oder 5 ng CRH (Ferring, Pharmaceuticals, Malmö, Schweden)/g Körpergewicht injiziert. Die Versuche wurden um 14.00 Uhr mittags durchgeführt. 30 min nach der Injektion wurde retroorbital Blut genommen und aus dem Plasma ACTH und Corticosteron mittels Radioimmunoassay gemessen.

Dexamethason-CRH-Test:

Im Dexamethason-CRH-Test wurde den Tieren, nachdem sie 14 Tage einzeln gesetzt waren, 25 ng Dexamethason/g Körpergewicht um 8.00 Uhr morgens subkutan injiziert. Mittags um 14.00 Uhr wurde ihnen dann ebenfalls subkutan im Bereich des Nackens CRH in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert. 30 min danach wurde ihnen retroorbital Blut abgenommen und aus dem gewonnenen Plasma ACTH und Corticosteron mittels Radioimmunoassay gemessen.

2.5.2 Radioimmunoassays

ACTH-RIA (Adrenocorticotrophes Hormon):

Beim ACTH-RIA handelt es sich um einen kommerziell vertriebenen RIA-Kit der Firma Nichols (San Juan Capistrano, Californien, USA).

Das Testprinzip beruht darauf, dass ein monoklonaler und ein polyklonaler Antikörper an das ACTH bindet. Der monoklonale Antikörper bindet an die N-terminale Region des ACTHs und ist radioaktiv markiert. Der polyklonale Antikörper bindet an die C-terminale Region des ACTHs und ist Biotin markiert. Eine kompetitive sterische Behinderung der beiden Antikörper kommt nicht vor. Der Sandwich-Komplex wird an eine Avidin-beschichtete Kugel gebunden und mehrmalig gewaschen. Die Radioaktivität des Jod 125 wurde im Gammacounter gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über eine parallel mitgemessene Eichkurve. Die Testempfindlichkeit war 1 pg/ml bis 1400 pg/ml (oberster Wert der Standardkurve). Die Intra-Assay-Variation war im Be-

reich von 30 pg/ml bis 350 pg/ml 3%, der Inter-Assay-Variationskoeffizient lag für diese Messbereiche bei ca. 7%. Es bestand eine gute Verdünnungsechtheit mit Abweichungen geringer 10% bis zu einer Verdünnung von 1:8.

Corticosteron:

Das Testprinzip des Corticosteron-RIAs basiert auf der Konkurrenz zwischen [¹²⁵Jod]-markiertem Corticosteron und nicht radioaktiv markiertem Corticosteron. Es wurde eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers angeboten. Dieser spezifische Antikörper wurde dann mit einem zweiten Antikörper ausgefällt. Das nicht an den Antikörper gebundene [¹²⁵Jod]-markierte radioaktive Antigen wurde durch Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes abgetrennt. Die Radioaktivität wurde im Gammacounter gemessen, die Quantifizierung erfolgte über eine Standardkurve. Entsprechend dem Testprinzip ist die Corticosteronkonzentration umgekehrt proportional zur gemessenen Radioaktivität.

Im Test wurde das Plasma 1:200 verdünnt eingesetzt. Der Messbereich der Kalibratoren ging von 25 bis 1000 ng/ml. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde entsprechend weniger verdünnt. Die Intra-Assay-Präzision stellte sich mit einem Variationskoeffizienten, abhängig von der Konzentration von 45 ng/ml bis 370 ng/ml mit 4-10 % dar. Die Inter-Assay-Präzision zeigte ebenfalls für diesen Messbereich einen Variationskoeffizient um ca. 7%. Die Wiederfindung bei gespiktem Corticosteron lag im Bereich von 86-110%. Es bestand gute Verdünnungsechtheit des Testes bis zu einer zusätzlichen Verdünnung (neben der regulären Routineverdünnung von 1:200) von bis zu 1:8. (Radioimmunoassay von ICN)

AVP-Messung:

AVP wurde in lyophilisierten Plasmaproben nach Extraktion durch einen hoch selektiven Radioimmunoassay mit einem Detektionslimit von 0,1 pg/Probe gemessen. Die Kreuzreaktion zu anderen Peptiden inkl. Oxytocin war < 0,7% (Landgraf 1995).

2.6 Statistische Analyse

Differenzen in Plasma- und Organkonzentrationen zwischen den Mutanten und Wildtypen wurden im one-factorial multivariat analyses of variance test (MANOVAS) auf

ihre Signifikanz getestet. Die Plasma- und Organkonzentrationen waren die abhängigen Variablen und die Gruppe (Mutanten vs. Wildtypen) die unabhängige Variable. Wenn ein signifikanter Gruppeneffekt auftrat, wurde ein univariater F-Test durchgeführt um zu identifizieren, welche Variablen zum Gruppeneffekt beigetragen haben. Als Signifikanzlevel wurde eine Signifikanz von $\alpha = 0,05$ akzeptiert.

In den Versuchen, in denen Mäuse wiederholt untersucht wurden, wurde Varianzanalyse mit Messwiederholungen angewandt.

Durchgeführt wurde die statistische Analyse mit dem Softwarepaket SPSS, Version 10 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Die graphischen Darstellungen wurden mit SigmaPlot Version 4.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) angefertigt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Methodenentwicklung

Erfreulicher weise sind in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer wirksamer Psychopharmaka in der Klinik eingesetzt worden. Diese differieren sehr in ihrer Struktur und unterscheiden sich deshalb in ihrem chemischen Verhalten. Sie werden zum Teil in sehr niedrigen Dosierungen verabreicht. Dieses stellt eine besondere Herausforderung an die Laboratorien, die therapeutisches Drug-monitoring durchführen und oder die Verteilung dieser Medikamente im Tiermodell untersuchen. Es sind Meßmethoden gefragt, die sehr sensitiv und spezifisch messen. Auf der anderen Seite sollten die Methoden die Möglichkeit bieten, sehr unterschiedliche Substanzen zu bestimmen und neue Substanzen schnell in das Analysesystem zu integrieren. Aus diesem Grunde wurden neue Methoden zur Medikamenten-spiegelbestimmung aus Plasma sowie aus Zellmaterial und Gewebehomogenaten entwickelt.

Zur Isolation der Psychopharmaka aus biologischem Material haben wir uns für eine Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode entschieden, die für sehr viele (Psycho-) Pharmaka in gleicher Weise angewendet werden kann und nur bei speziellen Fragestellungen modifiziert werden muß. Diese Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode hat den Vorteil, dass auch Zellmaterial und Gewebehomogenate gut aufzuarbeiten sind. Das Prinzip besteht darin, durch Alkalisierung der Substanzen diese in einer organischen Phase aufzunehmen, um sie dann durch Ansäuerung wieder später in eine wässrige Phase zu überführen. Durch diese Schritte wird eine Aufreinigung und Anreicherung der zu untersuchenden Substanz vorgenommen. Die Probenextrakte wurden mit einem reversed-phase HPLC-System mit UV-Absorption und Fluoreszenz analysiert. Wir haben uns für ein Gradientensystem entschieden, da dadurch das zu messende Substanzspektrum wesentlich erweitert werden konnte und die Empfindlichkeit aufgrund der steileren Peakformen zunimmt. Weitere technische Details der HPLC Bestimmung werden im Methodenteil beschrieben.

Im weiteren werden wichtige Ergebnisse der Methodenentwicklung, meist an ausgewählten Beispielen dargestellt.

3.1.1 Extraktionsverfahren – Zusammensetzung der organischen Phase

Während des Extraktionsverfahrens (siehe Methodenteil 2.4.2.1) erwies sich die Zusammensetzung der organischen Phase als bedeutend für die Wiederfindung der zu extrahierenden Substanzen. Dies galt insbesondere für die Substanzextraktion aus Gewebehomogenaten. Eine n-Hexan Phase mit variablem Isoamylalkoholanteil erwies sich als geeignet. Durch Zugabe von Isoamylalkohol wurde die Lipophilie der organischen Phase nach Bedarf verändert.

Für alle zu untersuchenden Substanzen musste zunächst der Zusammenhang der Extraktionswiederfindung zum Isoamylalkoholgehalt der organischen Phase bestimmt werden. Abbildung 7 und Abbildung 8 zeigen repräsentative Beispiele für Gewebehomogenat- und Plasma-Extraktionen. Der eingesetzte Isoamylalkoholanteil in der organischen Phase des jeweiligen Extraktionsverfahren wird in Tabelle 6 dargestellt.

| Substanz | % Isoamylalkohol (Plasma) | % Isoamylalkohol (Homogenat) |
|---------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| Amitriptylin | 3,5 | 0,6 |
| Doxepin | 1,5 | 0 |
| Trimipramin | 1,5 | 0 |
| Citalopram | 0 | 0 |
| Paroxetin | 0,5 | 0,5 |
| Venlafaxin | 0,5 | 0,5 |
| Mirtazapin | 0 | 0 |
| Melperon | 0 | 0 |
| Budipin | 0 | 0 |

Tabelle 6: Isoamylalkoholanteil in organischen n-Hexanphase. Es ist der für die optimale Extraktionswiederfindung erforderliche Isoamylalkoholanteil in der n-Hexan organischen Phase angegeben. (Extraktionsverfahren siehe 2.4.2.1)

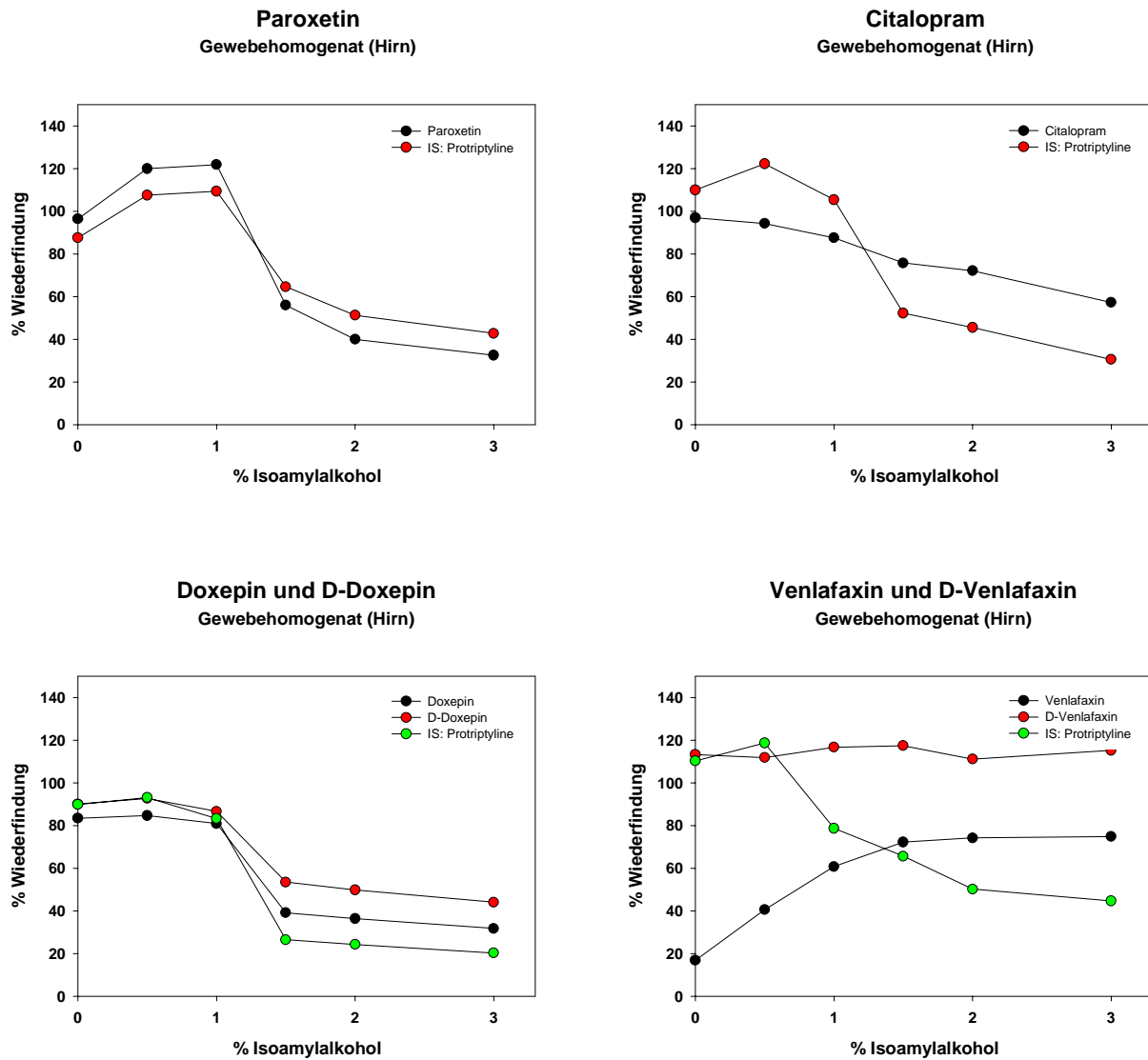


Abbildung 7: Gewebsextraktion – % Isoamylalkohol in der organischen n-Hexan Phase. Die Wiederfindung ist in Abhängigkeit vom Isoamylalkoholgehalt in der n-Hexanphase (siehe 2.4.2.1) dargestellt. Beispielhaft sind die Ergebnisse der Paroxetin-, Citalopram-, Doxepin- und Venlafaxin-Gewebeextraktion (Hirn) dargestellt. Gleichzeitig wurde der interne Standard (IS: Protriptylin) mitextrahiert und ebenfalls seine Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der organischen Phase dargestellt.

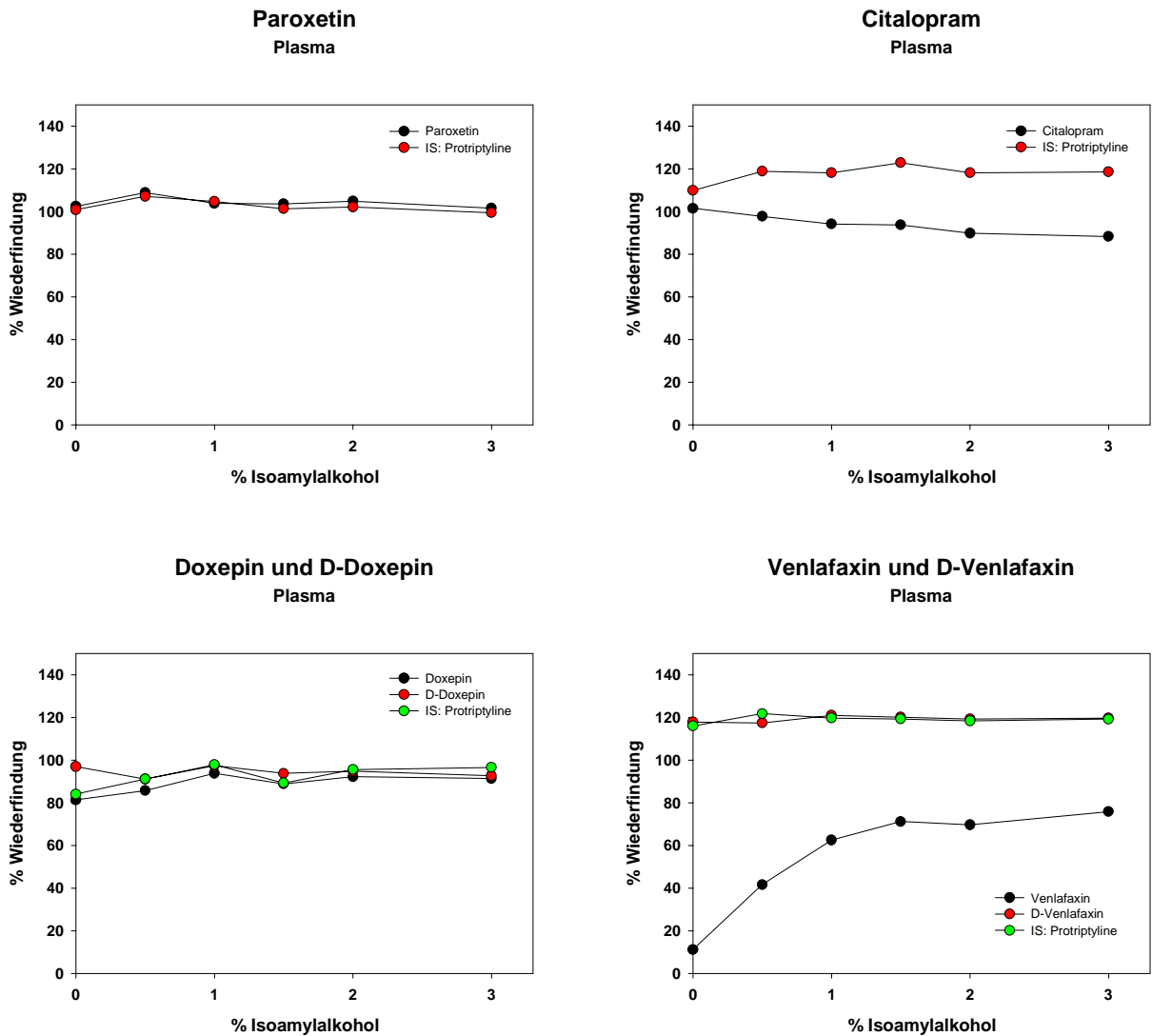
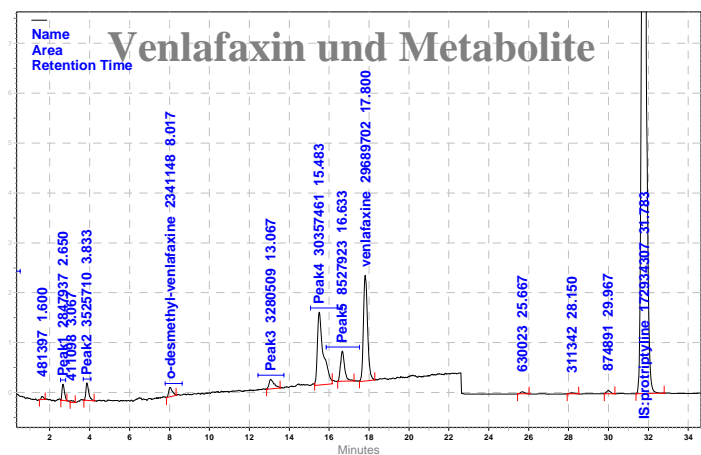
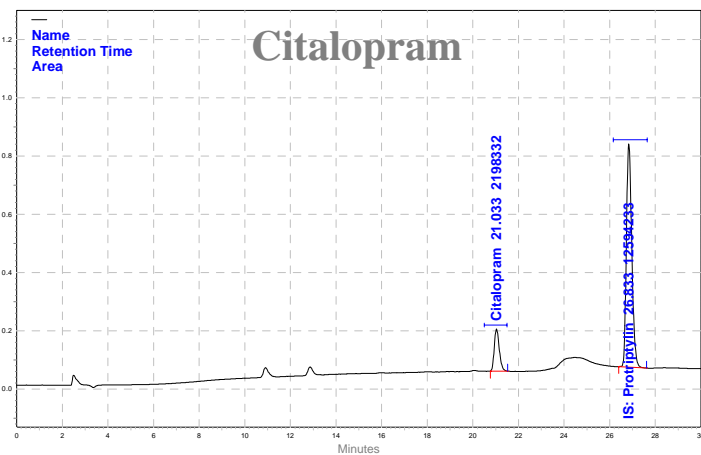
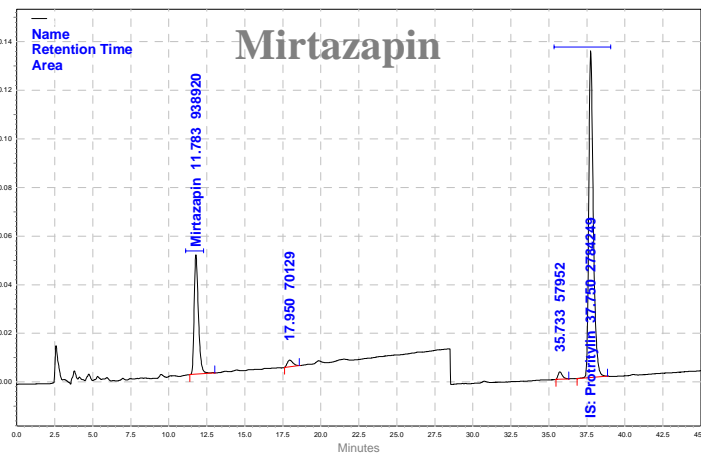
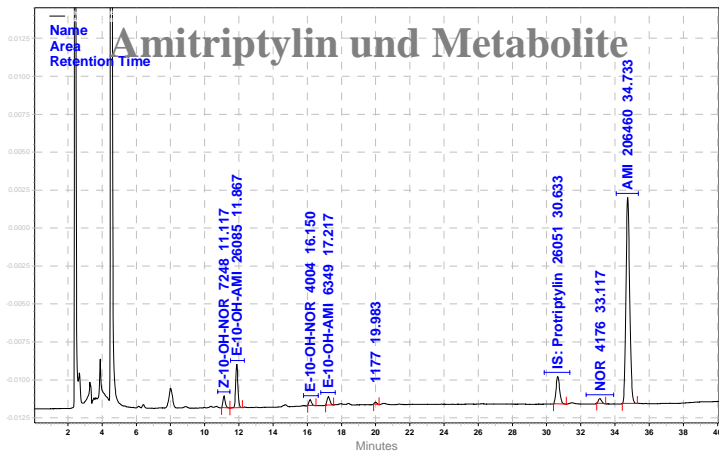


Abbildung 8: Plasmasextraktion – % Isoamylalkohol in der organischen n-Hexan Phase. Die Wiederfindung ist in Abhängigkeit vom Isoamylalkoholgehalt in der n-Hexanphase (siehe 2.4.2.1) dargestellt. Beispielhaft sind die Ergebnisse der Paroxetin-, Citalopram-, Doxepin- und Venlafaxin-Plasmaextraktion dargestellt. Gleichzeitig wurde der interne Standard (IS: Protriptylin) mitextrahiert und ebenfalls seine Wiederfindung in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der organischen Phase dargestellt.



3.1.2 HPLC-Chromatogramme

Beispielhaft sind die HPLC-Chromatogramme für Amitriptylin und seine Metabolite, Mirtazapin, Citalopram und Venlafaxin und sein Metabolit in Abbildung 9 dargestellt. Durch die in 2.4.2.2 beschriebene Methode war es für alle untersuchten Substanzen möglich auch deren Metabolite im selben HPLC-Lauf mitzubestimmen.

Abbildung 9: HPLC-Chromatogramme. Es sind typische Chromatogramme dargestellt, die aus (Hirn)-Gewebeextrakten hergestellt wurden. Als interner Standard wurde jeweils Protriptylin verwendet.

(HPLC-Bedingungen siehe 2.4.2.2)

3.1.3 HPLC-Medikamenten-Quantifizierung

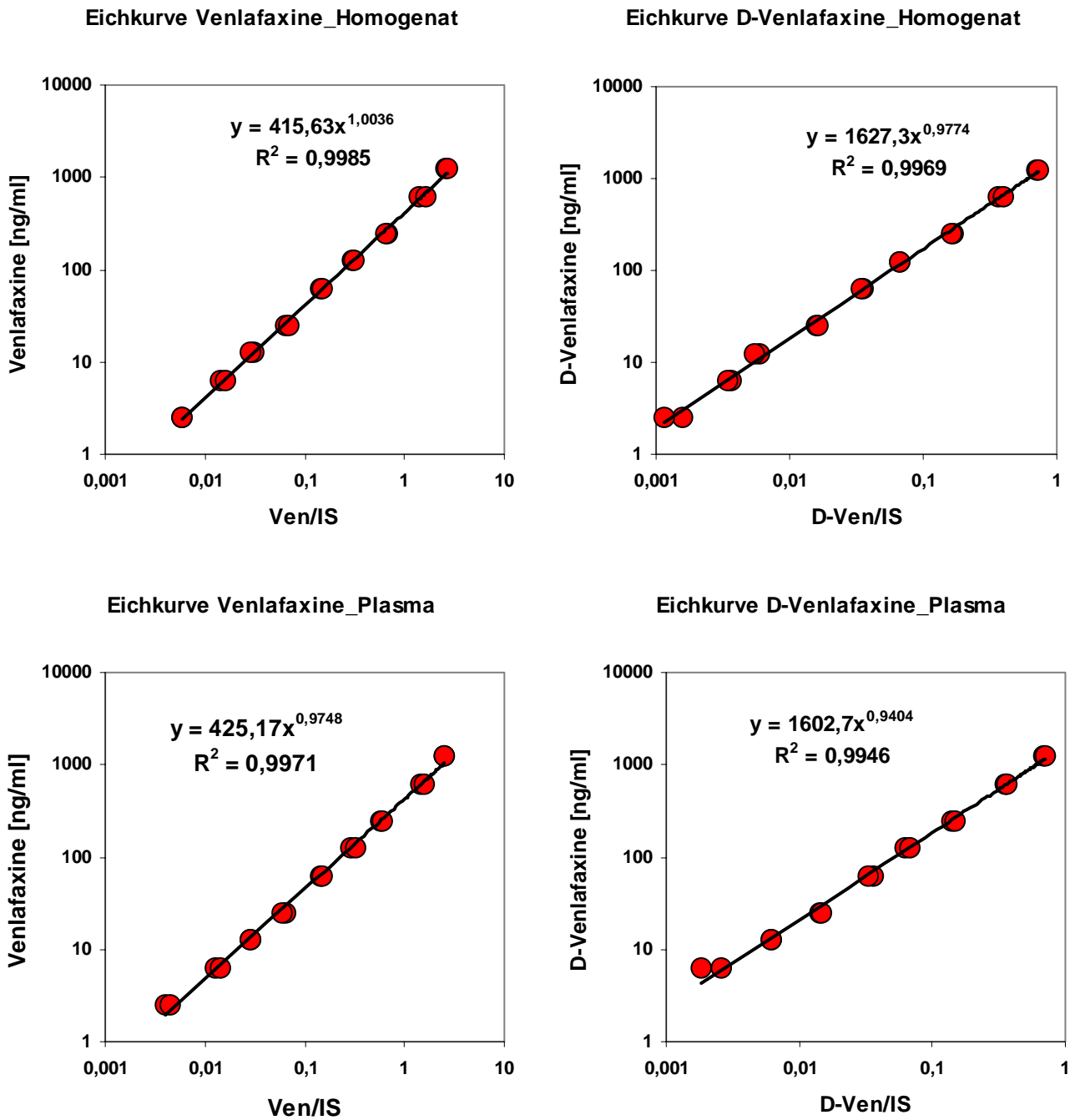


Abbildung 10: Eichkurven für Venlafaxin und D-Venlafaxin aus Plasma und Hirnhomogenat. Y-Achse: eingesetzte gespikete Substanzkonzentration; X-Achse: Area-Substanz/Area Interner Standart.

Die Quantifizierung erfolgte über Kalkulation des Analyten zu internen Standard Peak Area-Verhältnisses. Für alle zu messenden Medikamente und deren Metaboliten wurden Standardkurven hergestellt. Dazu wurden Plasma und Gewebshomogenatproben mit definierten Konzentrationen der entsprechenden Substanz gespikt und wie später das Probenmaterial extrahiert und HPLC-chromatographisch gemessen. Die Abbildung 10 zeigt beispielhaft die Eichkurven für Venlafaxin und deren Metaboliten Desmethyl-Venlafaxin nach Extraktion aus Plasma und Hirnhomogenat.

3.2 Einfluss des P-Glykoproteins auf die Pharmakologie zentral wirksamer Medikamente

Im Folgenden werden Versuchsergebnisse dargestellt die zeigen, wie die Organ- und Plasma-Medikamenten- und Metaboliten-Verteilung in FVB/N-Kontrollmäusen und *mdr1ab(-/-)* Mutanten nach Medikamentenverabreichung war. Es wurden jeweils beide Tierversuchsgruppen miteinander verglichen. Dabei wurden unterschiedliche Medikamente und Verabreichungsmodi untersucht.

Die ersten Versuche zeigen die Verteilungsmuster nach einmaliger subkutaner Injektion. Für das Amitriptylin wird der zeitliche Verlauf der Plasma- und Organkonzentrationen dargestellt. Alle weiteren dargestellten Versuche nach einmaliger Injektion zeigen die jeweilige Verteilung der Medikamente und Metaboliten zu einem festen Zeitpunkt. Der zweite Teil der pharmakologischen Untersuchungen stellt in den zwei Mausgruppen Unterschiede im Verteilungsmuster nach Langzeitmedikation dar. Amitriptylin wurde repetitiv zweimal täglich verabfolgt, Citalopram, Venlafaxin und Bupropion wurden kontinuierlich über subkutane osmotische Pumpen verabreicht..

3.2.1 Nach einmaliger subkutaner Medikamenteninjektion

3.2.1.1 Amitriptylinkinetik

mdr1ab(-/-) und mdr1ab(+/-) Kontrollmäusen wurde 10 µg Amitriptylin/g Körpergewicht injiziert, die Mäuse wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet und die Amitriptylin- und Metabolitenkonzentrationen im Plasma und Organen gemessen. In jeder Tiergruppe wurden jeweils 6 Mäuse pro Zeitpunkt untersucht. Die Zeitpunkte waren 30, 60, 120 und 240 min nach Injektion. Mittels HPLC wurde die injizierte Substanz des Amitriptylin sowie die Metabolite E-10-Hydroxy-Amitriptylin, Z-10-Hydroxy-Amitriptylin, Nortriptylin, E-10-Hydroxy-Nortriptylin und Z-10-Hydroxy-Nortriptylin bestimmt. Die verwendeten Versuchstiere waren in einem Alter von 19 - 24 Wochen und hatten in der mdr1ab(-/-) Gruppe ein durchschnittliches Gewicht von 25,7 g ± 0,5 g und in der Kontrollgruppe ein Gewicht von 23,6 g ± 0,5 g. Die Abbildung 11 zeigt die Kinetik der Hirnkonzentrationen für Amitriptylin und seine Metabolite für die beiden Mausgruppen im Vergleich. Die Gehirnkonzentrationen von Amitriptylin und seiner Metabolite waren zu jedem Zeitpunkt in den Gehirnen der mdr1ab(-/-) Mäuse, verglichen mit den Kontrollmäusen, erhöht. In Tabelle 7 ist dargestellt, ob es einen signifikanten Gruppeneffekt der Amitriptylin-Konzentration und jeweils seiner Metabolite in den unterschiedlichen Organen gab. Die maximalen Amitriptylin-Hirnkonzentrationen wurden in beiden Mausgruppen bereits nach 60 min erreicht, um dann über den weiteren zeitlichen Ablauf wieder deutlich abzunehmen. Interessanterweise gleichen sich die signifikanten Unterschiede nach 120 min nach 240 min wieder an. Die Amitriptylin-Metabolite E-10-OH-Amitriptylin und Z-10-OH-Amitriptylin erreichen ihre maximalen Hirnkonzentrationen erst nach 120 min bzw. 240 min. Die Metabolite Nortriptylin und E-10-OH-Nortriptylin und Z-10-OH-Nortriptylin zeigten vom pharmakokinetischen Verlauf in beiden Mausgruppen auch nach 240 min ihre höchsten Konzentrationen.

Die von der Konzentration dominierende Substanz ist nach Einmalgabe auch nach 240 min das Amitriptylin, gefolgt vom E-10-Hydroxy-Amitriptylin und Z-10-Hydroxy-Amitriptylin, das jedoch in den Kontrollmäusen lediglich 10% der Amitriptylin-Konzentration ausmacht. Die Konzentrationen der Metabolite unterscheiden sich zum Teil sehr deutlich zwischen den beiden Mausgruppen, so sind Konzentrationsunterschiede bis zu 10fach höheren Konzentrationen in Gehirnen der Mutanten aufgetreten (Tab. 7).

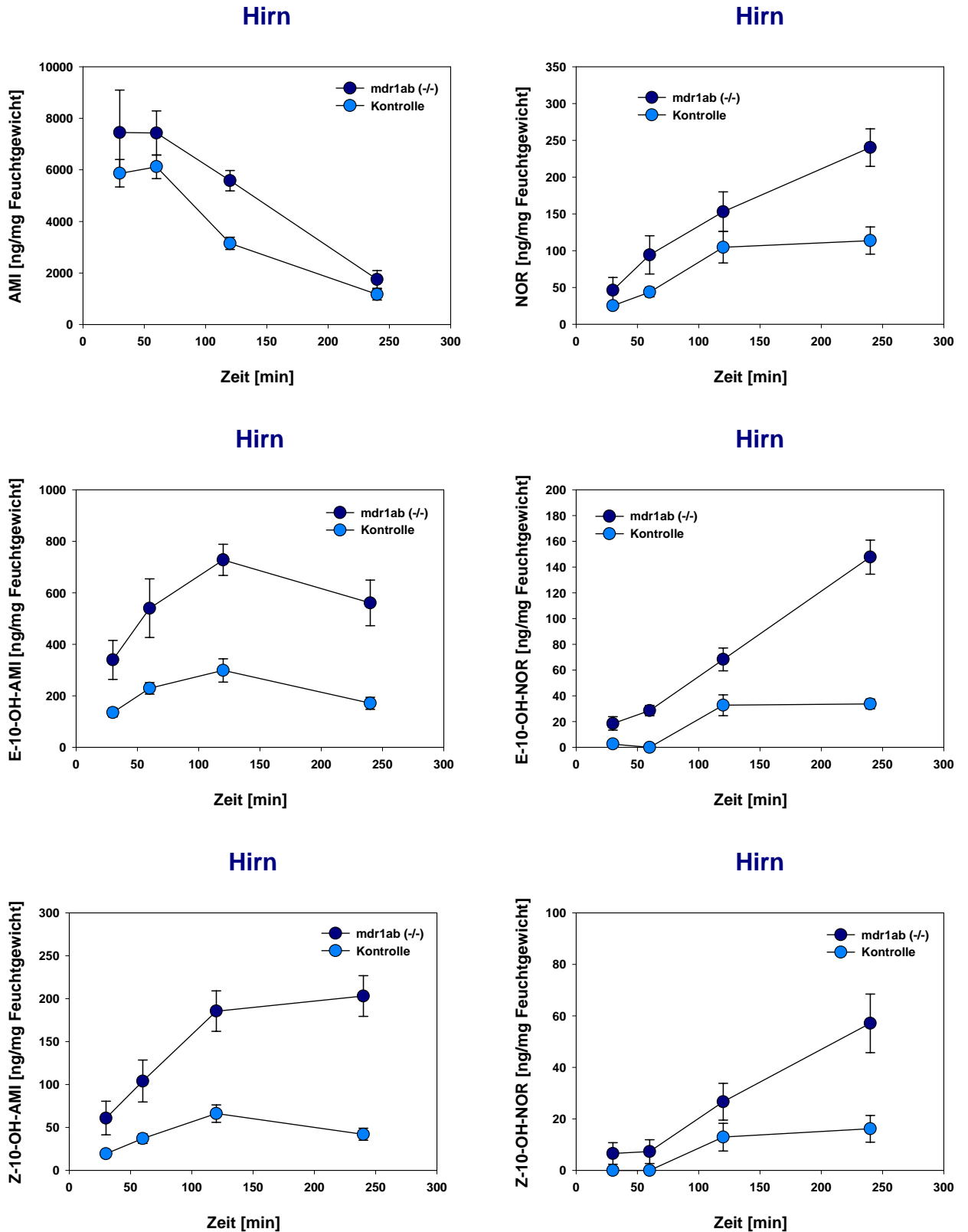


Abbildung 11: Amitriptylin und Metabolite Zeitkinetik im Hirn von mdr1ab (-/-) und FVB/N Kontrollmäusen nach subcutaner Injektion von 10 µg/g Körpergewicht Amitriptyline. Die Punkte stellen die Mittelwerte ± SEM dar, n=6.

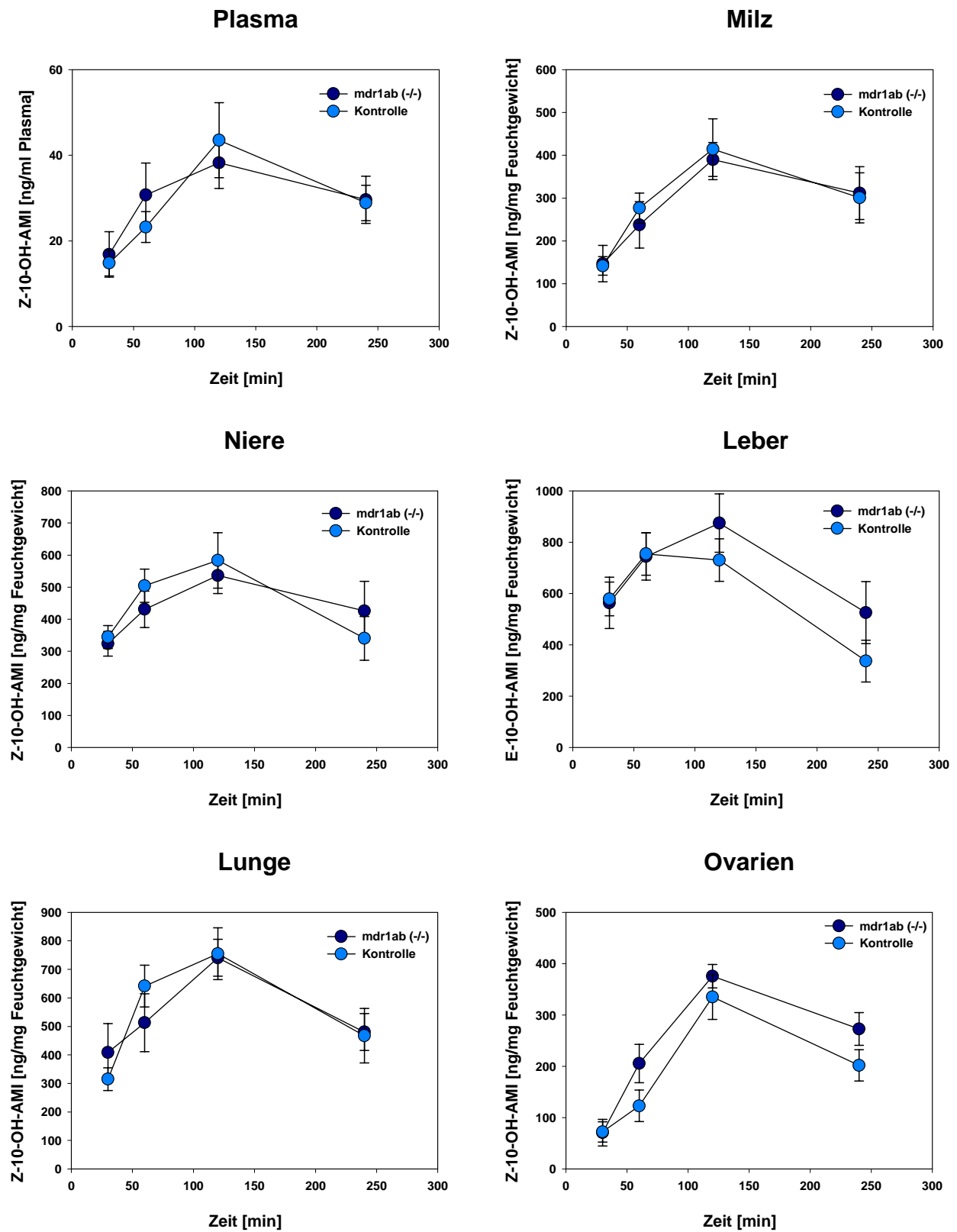


Abbildung 12: Z-10-Amitriptylin in Organen von mdr1ab (-/-) und FVB/N Kontrollmäusen nach subcutaner Injektion von 10 µg/g Körpergewicht Amitriptyline. Die Punkte stellen die Mittelwerte ± SEM dar, n=6.

Keine signifikanten Gruppeneffekte der Amitriptylin- und Metabolitenkonzentrationen traten für das untersuchte Plasma sowie Milz, Niere, Leber und Lunge auf. Auch die Pharmakokinetik beider Tiergruppen war nicht signifikant unterschiedlich. Geringgradige Gruppeneffekte der Ovarienkonzentrationen waren für die Amitriptylin-Metabolite E-10-Hydroxy-Amitriptylin, Nortriptylin, E-10-Hydroxy-Nortriptylin und Z-10-Hydroxy-Nortriptylin aufgetreten (Tab. 7). Die Abbildung 12 zeigt die Kinetikkurven beispielhaft für das Z-10-OH-Amitriptylin, bei dem die Hirnkonzentrationen der beiden Tiergruppen am deutlichsten voneinander differierten.

Tabelle 7: Organkonzentrationen von Amitriptylin und seiner Metaboliten nach subkutaner Injektion von 10 µg Amitriptylin/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

Tabelle: 7

| | | mdr1ab (-/-) | | | | | | | | mdr1ab (+/) (Kontrollen) | | | | | | | | Signifikanz Gruppeneffekt |
|---|---|------------------------------|------|--------|------|---------|------|---------|-----|------------------------------|------|--------|------|---------|-----|---------|------|------------------------------|
| | | [ng/g Feuchtgewicht bzw. ml] | | | | | | | | [ng/g Feuchtgewicht bzw. ml] | | | | | | | | |
| | | 30 min | | 60 min | | 120 min | | 240 min | | 30 min | | 60 min | | 120 min | | 240 min | | |
| | | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | |
| AMI | Hirn | 7447 | 1645 | 7433 | 858 | 5582 | 397 | 1746 | 342 | 5865 | 534 | 6121 | 459 | 3148 | 236 | 1168 | 213 | * |
| | Fett | 4648 | 1815 | 2765 | 772 | 1878 | 461 | 860 | 152 | 3980 | 1343 | 3241 | 449 | 2320 | 227 | 1317 | 557 | ns |
| | Niere | 12027 | 1382 | 10271 | 588 | 6682 | 825 | 2960 | 728 | 11574 | 1372 | 11214 | 1271 | 5582 | 652 | 2180 | 648 | ns |
| | Leber | 2553 | 660 | 2648 | 496 | 3188 | 587 | 1286 | 397 | 2104 | 341 | 2748 | 427 | 1967 | 355 | 620 | 189 | ns |
| | Lunge | 24883 | 2536 | 18141 | 1271 | 11563 | 1515 | 3281 | 753 | 21490 | 1818 | 19542 | 2063 | 8233 | 666 | 2781 | 711 | ns |
| | Muskel | 1481 | 260 | 1144 | 113 | 684 | 77 | 470 | 151 | 1260 | 193 | 1445 | 211 | 679 | 104 | 349 | 88 | ns |
| | Ovar | 7813 | 1254 | 8379 | 834 | 7228 | 873 | 3082 | 483 | 5242 | 410 | 5930 | 591 | 5080 | 426 | 2469 | 421 | * |
| | Plasma | 931 | 118 | 836 | 146 | 348 | 59 | 146 | 40 | 725 | 80 | 530 | 46 | 269 | 40 | 91 | 19 | * |
| | Milz | 8555 | 2468 | 10134 | 1694 | 7266 | 910 | 2585 | 609 | 9307 | 1000 | 9185 | 1037 | 4915 | 452 | 2253 | 441 | ns |
| | Gruppeneffekt (Wilks-Lambda): F(9,28) = 8,3; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,82) = 6,6; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gruppen * Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,82) = 1,5; Signifikanz von F = 0,9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NOR | Hirn | 46 | 18 | 94 | 26 | 153 | 27 | 240 | 26 | 25 | 4 | 44 | 7 | 105 | 22 | 114 | 18 | * |
| | Fett | 66 | 36 | 23 | 13 | 41 | 9 | 79 | 50 | 48 | 18 | 33 | 9 | 73 | 16 | 96 | 71 | ns |
| | Niere | 327 | 71 | 365 | 66 | 507 | 60 | 571 | 112 | 284 | 41 | 399 | 55 | 571 | 83 | 423 | 89 | ns |
| | Leber | 488 | 144 | 548 | 91 | 845 | 100 | 638 | 184 | 392 | 75 | 560 | 94 | 636 | 107 | 299 | 86 | ns |
| | Lunge | 734 | 200 | 784 | 149 | 1028 | 117 | 925 | 153 | 529 | 46 | 808 | 95 | 1029 | 129 | 756 | 156 | ns |
| | Muskel | 40 | 12 | 43 | 7 | 58 | 4 | 95 | 18 | 20 | 6 | 43 | 6 | 63 | 13 | 60 | 12 | ns |
| | Ovar | 102 | 19 | 200 | 29 | 375 | 34 | 394 | 49 | 85 | 14 | 160 | 15 | 261 | 34 | 252 | 50 | * |
| | Plasma | 18 | 5 | 19 | 3 | 21 | 1 | 21 | 5 | 9 | 1 | 14 | 2 | 22 | 6 | 14 | 3 | ns |
| | Milz | 173 | 51 | 256 | 60 | 395 | 36 | 466 | 82 | 165 | 24 | 258 | 41 | 409 | 71 | 373 | 70 | ns |
| | Gruppeneffekt (Wilks-Lambda): F(9,29) = 9,6; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,85) = 4,9; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gruppen * Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,85) = 1,6; Signifikanz von F = 0,05 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-H-AMI | Hirn | 340 | 76 | 540 | 114 | 728 | 61 | 561 | 88 | 135 | 17 | 229 | 23 | 299 | 45 | 171 | 23 | * |
| | Fett | 262 | 162 | 139 | 32 | 184 | 38 | 113 | 35 | 267 | 107 | 111 | 24 | 264 | 69 | 1699 | 1446 | ns |
| | Niere | 1182 | 137 | 1544 | 196 | 1814 | 169 | 1231 | 267 | 1272 | 142 | 1818 | 169 | 1976 | 236 | 926 | 176 | ns |
| | Leber | 1570 | 291 | 1805 | 224 | 2162 | 267 | 1165 | 292 | 1511 | 170 | 1998 | 186 | 1862 | 162 | 763 | 187 | ns |
| | Lunge | 1235 | 280 | 1433 | 253 | 1781 | 160 | 936 | 158 | 1040 | 104 | 1821 | 171 | 1781 | 170 | 865 | 179 | ns |
| | Muskel | 184 | 35 | 205 | 49 | 233 | 20 | 250 | 66 | 129 | 17 | 231 | 23 | 244 | 43 | 142 | 29 | ns |
| | Ovar | 476 | 81 | 855 | 158 | 1004 | 63 | 690 | 99 | 343 | 49 | 642 | 76 | 854 | 140 | 449 | 70 | * |
| | Plasma | 90 | 20 | 128 | 22 | 144 | 18 | 113 | 22 | 95 | 10 | 128 | 17 | 144 | 23 | 92 | 12 | ns |
| | Milz | 691 | 151 | 1119 | 224 | 1479 | 161 | 1011 | 204 | 738 | 100 | 1288 | 140 | 1534 | 215 | 906 | 176 | ns |
| | Gruppeneffekt (Wilks-Lambda): F(9,31) = 25,3; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,91) = 3,7; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gruppen * Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,91) = 1,5; Signifikanz von F = 0,14 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tabelle: 7 (Fortsetzung)

| | | mdr1ab (-/-) | | | | | | | | mdr1ab (+/) (Kontrollen) | | | | | | | | Signifikanz Gruppeneffekt |
|--|--------|------------------------------|-----|--------|-----|---------|-----|---------|-----|------------------------------|-----|--------|-----|---------|-----|---------|-----|------------------------------|
| | | [ng/g Feuchtgewicht bzw. ml] | | | | | | | | [ng/g Feuchtgewicht bzw. ml] | | | | | | | | |
| | | 30 min | | 60 min | | 120 min | | 240 min | | 30 min | | 60 min | | 120 min | | 240 min | | |
| | | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | MW | SEM | |
| Z-H-AMI | Hirn | 61 | 20 | 104 | 24 | 186 | 24 | 203 | 24 | 19 | 3 | 37 | 5 | 66 | 10 | 42 | 7 | * |
| | Fett | 23 | 9 | 37 | 9 | 55 | 7 | 40 | 4 | 74 | 34 | 29 | 3 | 82 | 16 | 28 | 2 | ns |
| | Niere | 323 | 38 | 431 | 57 | 536 | 56 | 426 | 92 | 344 | 36 | 504 | 52 | 583 | 86 | 340 | 68 | ns |
| | Leber | 564 | 100 | 744 | 92 | 874 | 114 | 526 | 121 | 579 | 66 | 754 | 83 | 730 | 83 | 337 | 81 | ns |
| | Lunge | 409 | 101 | 513 | 102 | 741 | 65 | 480 | 65 | 315 | 40 | 641 | 73 | 755 | 91 | 467 | 96 | ns |
| | Muskel | 58 | 17 | 59 | 13 | 81 | 9 | 88 | 21 | 29 | 5 | 63 | 4 | 81 | 17 | 62 | 17 | ns |
| | Ovar | 71 | 26 | 206 | 37 | 376 | 23 | 273 | 32 | 72 | 20 | 123 | 31 | 335 | 44 | 202 | 30 | ns |
| | Plasma | 17 | 5 | 31 | 7 | 38 | 6 | 30 | 5 | 15 | 3 | 23 | 4 | 44 | 9 | 29 | 4 | ns |
| | Milz | 147 | 43 | 238 | 54 | 390 | 40 | 312 | 62 | 142 | 22 | 277 | 35 | 414 | 71 | 301 | 58 | ns |
| Gruppeneffekt (Wilks-Lambda): F(9,27) = 15,6; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,79) = 5,7; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gruppen * Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,79) = 2,1; Signifikanz von F = 0,005 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-H-NOR | Hirn | 18 | 5 | 29 | 4 | 68 | 9 | 148 | 13 | 3 | 3 | 0 | 0 | 33 | 8 | 34 | 4 | * |
| | Fett | 100 | 51 | 33 | 8 | 67 | 27 | 85 | 29 | 92 | 33 | 22 | 7 | 111 | 32 | 119 | 81 | ns |
| | Niere | 389 | 43 | 514 | 50 | 583 | 70 | 724 | 116 | 379 | 38 | 466 | 47 | 802 | 96 | 664 | 105 | ns |
| | Leber | 525 | 83 | 640 | 60 | 763 | 55 | 661 | 117 | 446 | 45 | 606 | 49 | 786 | 55 | 474 | 88 | ns |
| | Lunge | 355 | 73 | 493 | 60 | 705 | 74 | 864 | 70 | 265 | 30 | 494 | 50 | 863 | 68 | 840 | 102 | ns |
| | Muskel | 63 | 6 | 81 | 17 | 122 | 10 | 208 | 52 | 48 | 7 | 87 | 14 | 123 | 21 | 116 | 15 | ns |
| | Ovar | 119 | 19 | 186 | 28 | 320 | 39 | 373 | 26 | 77 | 34 | 125 | 34 | 297 | 46 | 223 | 24 | * |
| | Plasma | 40 | 10 | 52 | 6 | 66 | 5 | 79 | 12 | 32 | 5 | 51 | 8 | 72 | 13 | 58 | 8 | ns |
| | Milz | 177 | 35 | 216 | 35 | 285 | 26 | 318 | 46 | 144 | 20 | 224 | 33 | 315 | 37 | 273 | 49 | ns |
| Gruppeneffekt (Wilks-Lambda): F(9,31) = 14,9; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,91) = 7,6; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gruppen * Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,91) = 2,5; Signifikanz von F = 0,047 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Z-H-NOR | Hirn | 7 | 4 | 7 | 5 | 27 | 7 | 57 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 5 | 16 | 5 | * |
| | Fett | 31 | 20 | 23 | 12 | 19 | 8 | 17 | 6 | 22 | 14 | 13 | 4 | 57 | 15 | 54 | 38 | ns |
| | Niere | 219 | 26 | 300 | 47 | 375 | 47 | 476 | 79 | 204 | 28 | 283 | 42 | 484 | 63 | 426 | 65 | ns |
| | Leber | 221 | 32 | 303 | 30 | 416 | 29 | 373 | 67 | 204 | 34 | 322 | 38 | 441 | 44 | 262 | 52 | ns |
| | Lunge | 126 | 21 | 184 | 27 | 329 | 42 | 496 | 35 | 93 | 12 | 214 | 25 | 398 | 40 | 500 | 44 | ns |
| | Muskel | 25 | 3 | 35 | 10 | 48 | 7 | 79 | 9 | 12 | 3 | 32 | 5 | 55 | 10 | 56 | 4 | ns |
| | Ovar | 40 | 19 | 56 | 23 | 153 | 23 | 159 | 21 | 0 | 0 | 54 | 15 | 109 | 19 | 97 | 24 | * |
| | Plasma | 42 | 11 | 38 | 6 | 57 | 3 | 62 | 9 | 24 | 5 | 37 | 8 | 69 | 20 | 49 | 4 | ns |
| | Milz | 67 | 11 | 82 | 16 | 122 | 8 | 134 | 12 | 55 | 10 | 86 | 14 | 148 | 20 | 121 | 24 | ns |
| Gruppeneffekt (Wilks-Lambda): F(30,9) = 4,9; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,88) = 6,5; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gruppen * Zeiteffekt (Wilks-Lambda): F(27,88) = 1,6; Signifikanz von F = 0,047 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

3.2.1.2 **Trimipramin** und Desmethyltrimipramin

Eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 µg Trimipramin/g Körpergewicht wurde ein unterschiedliches Verteilungsmuster des Trimipramins und seines Metaboliten Desmethyltrimipramin zwischen den untersuchten *mdr1ab(-/-)* Mutanten und den *mdr1b(+/+)* Wildtypkontrollen gefunden. In der *mdr1ab(-/-)* und der Kontrollmäusegruppe wurden jeweils 10 weibliche Mäuse im Alter von 13 bis 15 Wochen untersucht. Das durchschnittliche Gewicht betrug 26,1 g ± 0,3 g und 24,0 g ± 0,6 g. Die Varianzanalyse erbrachte einen signifikanten Gruppeneffekt der Trimipramin- und Desmethyltrimipramin-Konzentration [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: F (5,14) = 7,9; Signifikanz von F = 0,001] und [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: F (5,14) = 3,2; Signifikanz von F = 0,04] siehe Tabelle 8. Verantwortlich für die Signifikanzen waren für Trimipramin sowie für Desmethyltrimipramin die Hirnkonzentrationsunterschiede zwischen den beiden Versuchstiergruppen. Im Gehirn der Knock-out-Mutanten fand sich 20% mehr Trimipramin und 50% mehr Desmethyltrimipramin als in den Kontrolltieren (Abb. 13 und 14). Zwischen beiden Versuchstiergruppen bestand kein signifikanter Unterschied für die Plasma-, Milz-, Nieren- und Leber-Trimipramin- und Desmethyltrimipramin-Konzentrationen.

| Trimipramin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|--|---------------------|--------|-----------|--------|---------------------------|-------------|
| | <i>mdr1ab (-/-)</i> | SEM | Kontrolle | SEM | <i>mdr1ab (-/-)/(+/+)</i> | Signifikanz |
| Plasma | 170,86 | 9,43 | 198,36 | 9,04 | 0,9 | ns |
| Hirn | 1666,16 | 75,28 | 1388,84 | 89,84 | 1,2 | * |
| Milz | 1926,23 | 114,17 | 2291,27 | 245,77 | 0,8 | ns |
| Niere | 2142,92 | 165,17 | 2498,65 | 131,11 | 0,9 | ns |
| Leber | 358,16 | 29,85 | 410,06 | 30,45 | 0,9 | ns |
| Gruppeneffekt: F(5,14) = 7,9; Signifikanz von F = 0,001 | | | | | | |

Tabelle 8: Organkonzentrationen von Trimipramin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 µg Trimipramin/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben.

* = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

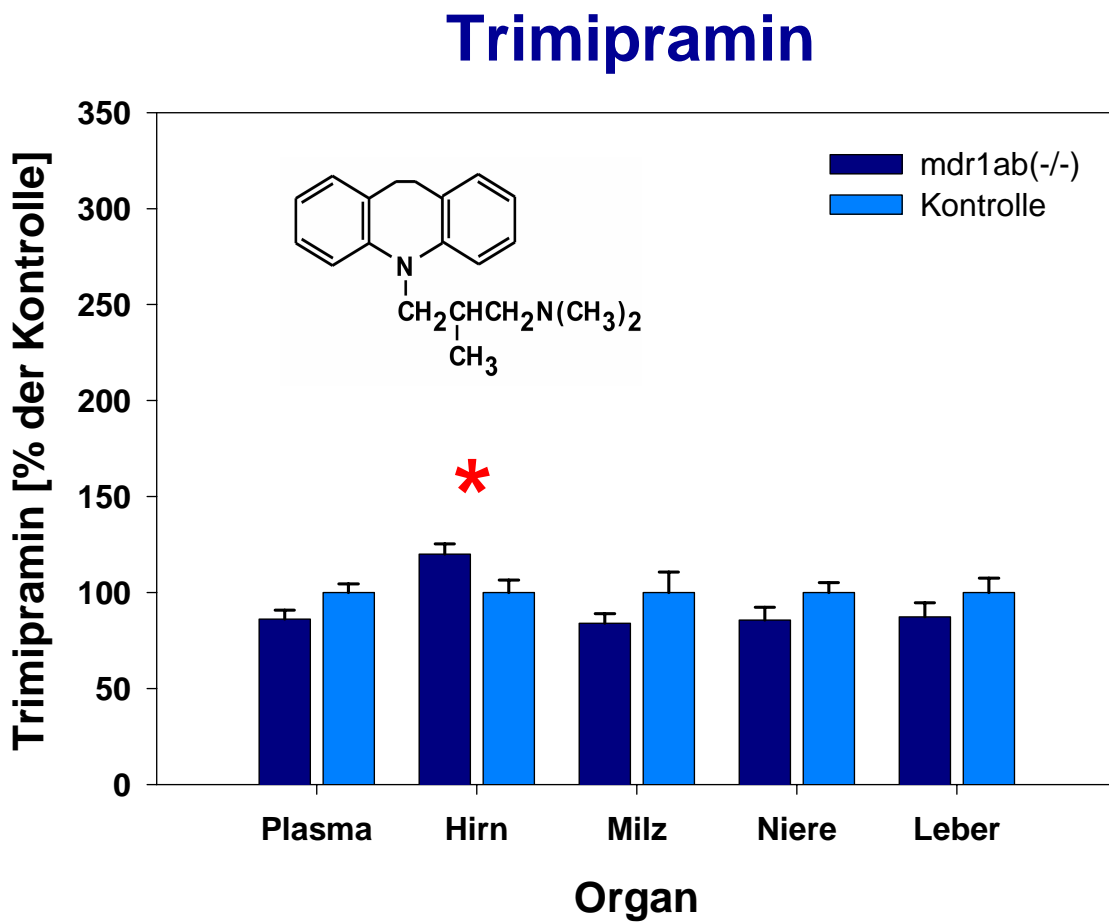


Abbildung 13: Organ- und Plasmakonzentrationen von Trimipramin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 μg Trimipramin/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dar.

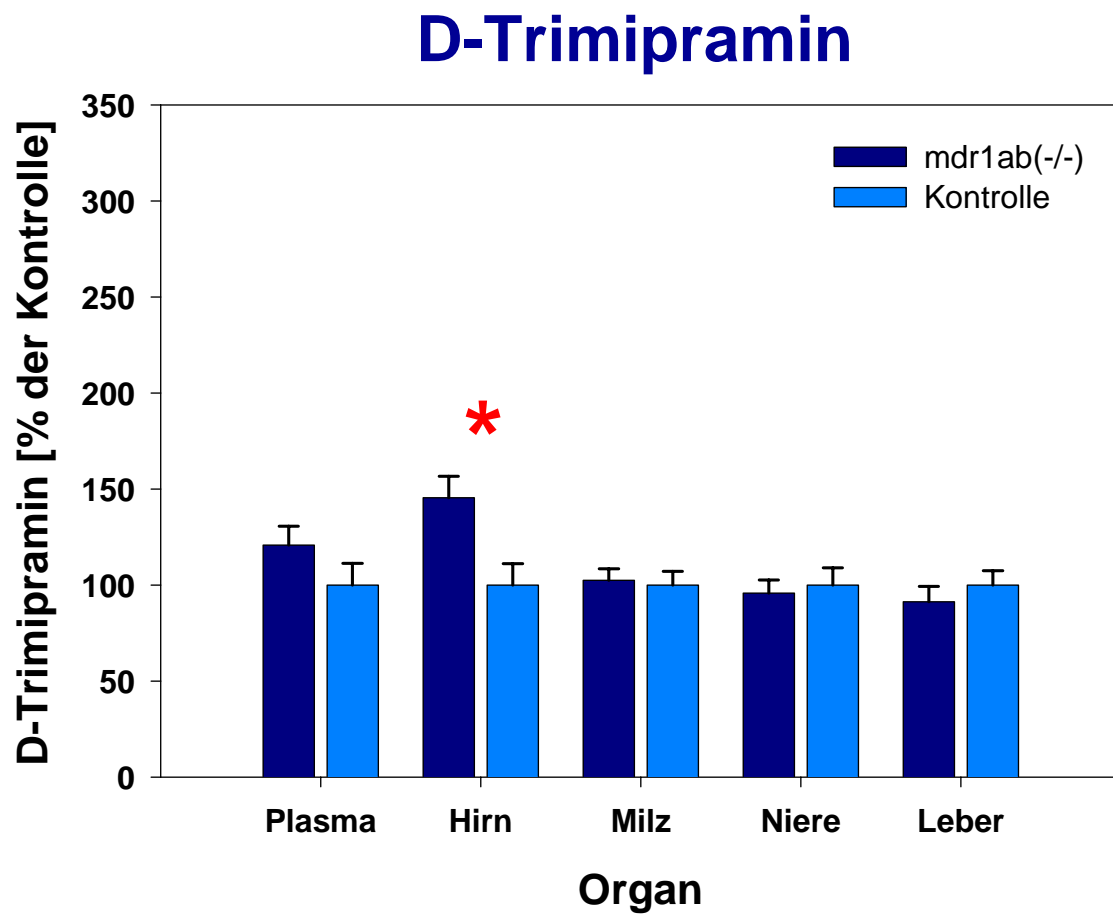


Abbildung 14: Organ- und Plasmakonzentrationen von Desmethyltrimipramin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 μg Trimipramin/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

| D-Trimipramin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|-------------|------------------|--------------|---------------------------|--------------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 14,55 | 1,19 | 12,04 | 1,37 | 1,2 | ns |
| Hirn | 48,39 | 3,68 | 33,25 | 3,74 | 1,5 | * |
| Milz | 91,40 | 5,34 | 89,10 | 6,34 | 1,0 | ns |
| Niere | 119,89 | 8,61 | 125,02 | 11,31 | 1,0 | ns |
| Leber | 76,59 | 6,71 | 83,80 | 6,24 | 0,9 | ns |
| Gruppeneffekt: F(5,14) = 3,2; Signifikanz von F = 0,04 | | | | | | |

Tabelle 9: Organkonzentrationen von Desmethyltrimipramin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 µg Trimipramin/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtwicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

3.2.1.3 Doxepin und Desmethyldoxepin

Eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 µg Doxepin/g Körpergewicht fanden sich geringe, aber signifikante Unterschiede der Doxepin- und Desmethyldoxepin-Konzentrationen im Gehirn und der Leber zwischen den mdr1ab(-/-) Mutanten und den Wildtypkontrollmäusen. Es wurden jeweils 10 männliche Mäuse im Alter von 12 bis 15 Wochen mit einem Gewicht von $20,0 \pm 0,3$ g und $27,4 \pm 0,3$ g für die mdr1ab(-/-) und mdr1ab(+/+) Mäuse verwendet. Die Varianzanalyse erbrachte einen signifikanten Gruppeneffekt der Doxepin-Konzentration [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(5,14) = 3,1$; Signifikanz von $F = 0,043$] und für Desmethyldoxepin [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(5,14) = 6,2$; Signifikanz von $F = 0,02$]. Für Doxepin und Desmethyldoxepin waren die Hirn- und Leberkonzentration für die Ausbildung der signifikanten Verteilungsunterschiede der zwei Tierversuchsgruppen verantwortlich. Die Konzentrationsunterschiede für Doxepin und Desmethyldoxepin stellen sich mit 1,2fach und 1,5fach höheren Hirnkonzentrationen in den Knock-out-Mäusen nicht deutlich dar. Keine signifikanten Konzentrationsunterschiede waren für das Medikament und seine Metaboliten in Plasma, Milz und Nieren nachzuweisen (Tab. 10 und 11, Abb. 15 und 16).

Eine Stunde nach Doxepin-Injektion war die im Plasma und den Organen vorherrschende Substanz die Verabreichte. Der Metabolit Desmethyldoxepin war nur in wesentlich niedrigeren Konzentrationen nachweisbar (Tab. 11).

| Doxepin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|--|--------------|--------|-----------|--------|--------------------|-------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 414,41 | 18,87 | 365,36 | 15,67 | 1,1 | ns |
| Hirn | 3139,58 | 97,36 | 2609,00 | 154,83 | 1,2 | * |
| Milz | 3203,48 | 204,69 | 3361,96 | 190,03 | 1,0 | ns |
| Niere | 5595,04 | 303,82 | 5069,82 | 277,86 | 1,1 | ns |
| Leber | 534,97 | 38,68 | 397,58 | 37,64 | 1,3 | * |
| Gruppeneffekt: F(5,14) = 3,1; Signifikanz von F = 0,043 | | | | | | |

Tabelle 10: Organkonzentrationen von Doxepin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 µg Doxepin/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant

| D-Doxepin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|--------------|-------|-----------|-------|--------------------|-------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 11,10 | 0,94 | 9,48 | 1,17 | 1,2 | ns |
| Hirn | 26,99 | 1,83 | 18,33 | 1,78 | 1,5 | * |
| Milz | 66,17 | 3,46 | 70,07 | 3,99 | 0,9 | ns |
| Niere | 228,75 | 10,88 | 200,15 | 11,72 | 1,1 | ns |
| Leber | 199,73 | 18,21 | 145,11 | 14,42 | 1,4 | * |
| Gruppeneffekt: F(5,14) = 6,2; Signifikanz von F = 0,02 | | | | | | |

Tabelle 11: Organkonzentrationen von Desmethyldoxepin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 µg Doxepin/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Doxepin

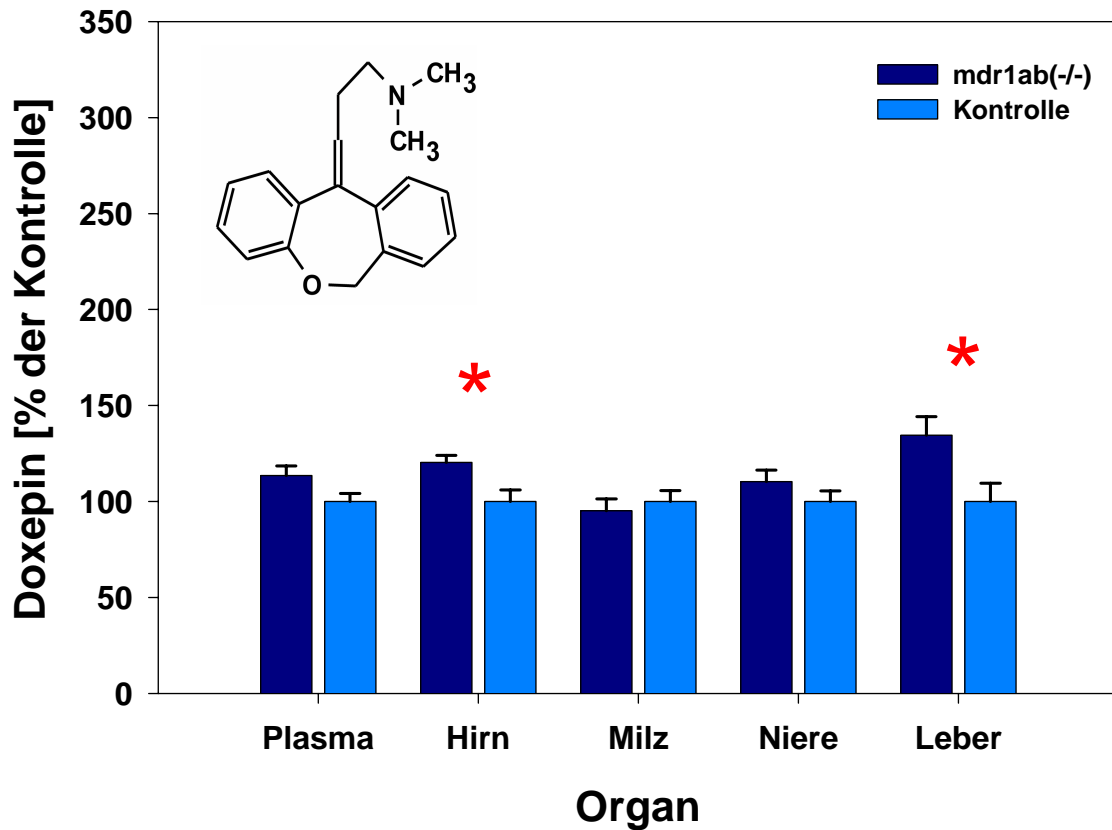


Abbildung 15: Organ- und Plasmakonzentrationen von Doxepin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 µg Doxepin/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

D-Doxepin

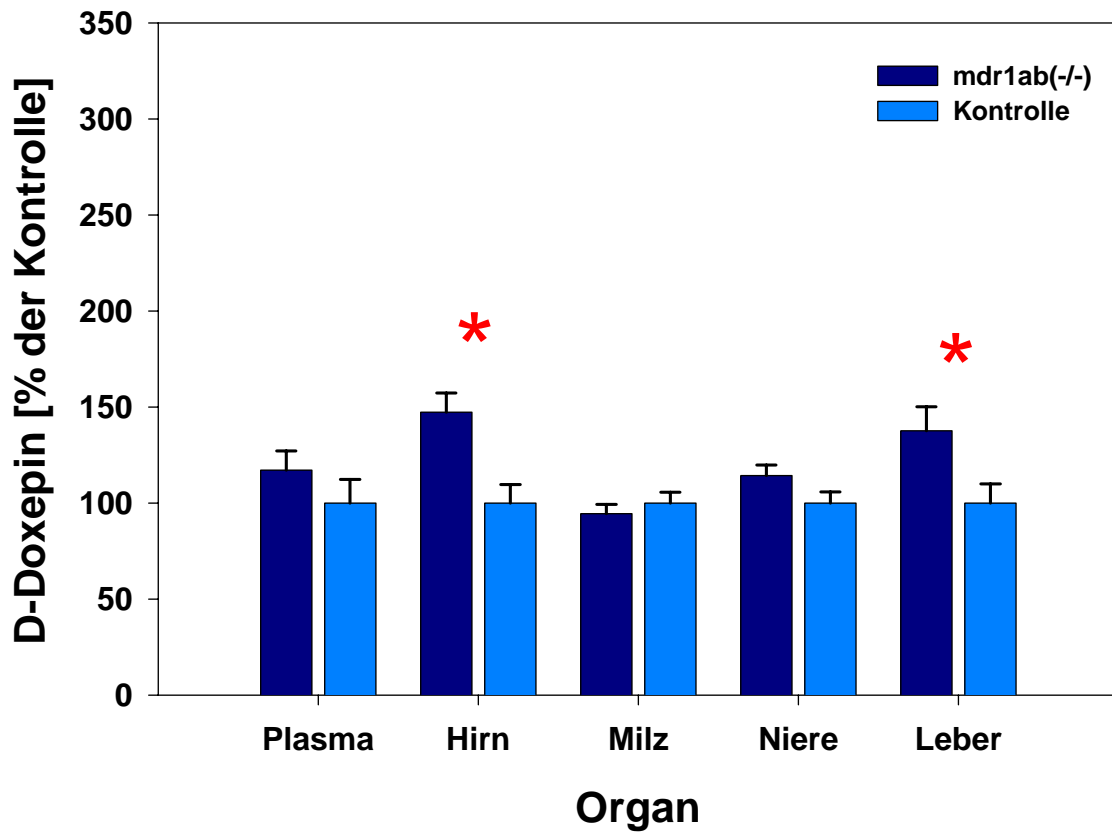


Abbildung 16: Organ- und Plasmakonzentrationen von Desmethyldoxepin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 10 µg Doxepin/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM.

3.2.1.4 Citalopram

Die Tiergruppengröße des Experiments war für die Mutanten- und Kontrollgruppe jeweils 10 weibliche Tiere. Diese waren im Alter von 12 bis 15 Wochen und zeigten keine signifikanten Gruppenunterschiede für die Gewichte, die $26,4 \pm 0,4$ g und $27,8 \pm 0,9$ g waren. Den Tieren wurde subkutan im Bereich des Nackens $1 \mu\text{g}$ Citalopram/g Körpergewicht injiziert und nach einer Stunde die Organkonzentrationen gemessen. Hochsignifikante Unterschiede bestehen zwischen den beiden Mausgruppen. In den Gehirnen der *mdr1ab*(-/-) Mäusen, die kein funktionstüchtiges P-Glykoprotein besitzen, fand sich eine 3fach höhere Citalopram-Konzentration als in den Gehirnen der Tierversuchsgruppe mit intaktem P-Glykoprotein. Keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen fand sich für die Plasma-, Milz-, Nieren- und Leberkonzentration (Abb. 17, Tabelle 12). Die Varianzanalyse zeigte entsprechend einen Gruppeneffekt [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(5,14) = 97,7$; Signifikanz von $F < 0,001$].

| Citalopram [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|--|---------------------|--------------|------------------|--------------|---------------------------|--------------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 28,95 | 1,85 | 33,23 | 1,48 | 0,9 | ns |
| Hirn | 455,13 | 15,46 | 153,55 | 8,28 | 3,0 | * |
| Milz | 555,88 | 42,52 | 610,94 | 48,44 | 0,9 | ns |
| Niere | 426,84 | 30,02 | 500,61 | 44,32 | 0,9 | ns |
| Leber | 128,12 | 6,45 | 128,47 | 8,78 | 1,0 | ns |
| Gruppeneffekt: $F(5,14) = 97,7$; Signifikanz von $F < 0,001$ | | | | | | |

Tabelle 12: Organkonzentrationen von Citalopram eine Stunde nach subkutaner Injektion von $1 \mu\text{g}$ Citalopram/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte \pm SEM und werden in ng/g Feuchtwicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

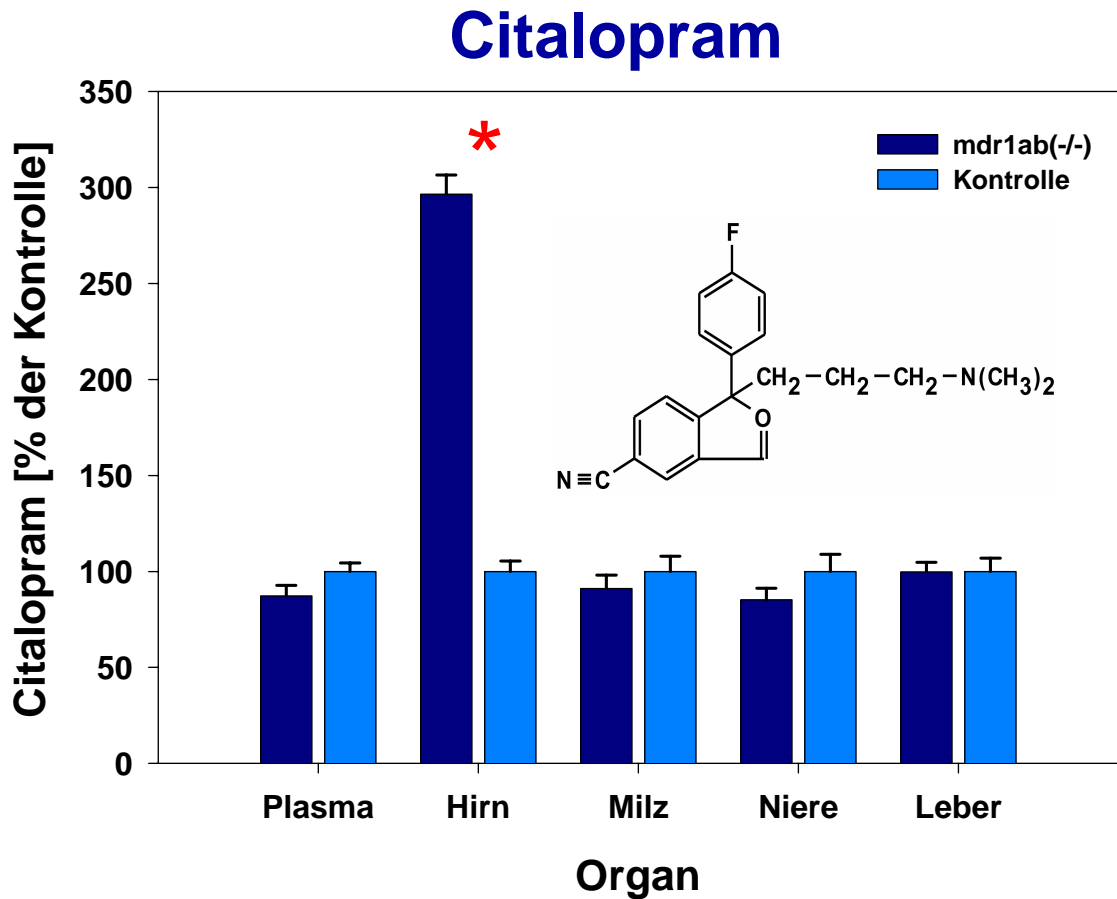


Abbildung 17: Organ- und Plasmakonzentrationen von Citalopram eine Stunde nach subkutaner Injektion von 1 μg Citalopram/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

3.2.1.5 Paroxetin

Eine Stunde nach subkutaner Injektion von 1 µg Paroxetin/g Körpergewicht fanden sich für das Paroxetin klare Unterschiede zwischen den mdr1ab(-/-) und mdr1ab(+/-) Hirnkonzentrationen (Abb. 18, Tab. 13). Die Paroxetin-Hirnkonzentrationen waren in den Knock-out-Mutanten mehr als doppelt so hoch wie in den Kontrollmäusen. In der MANOVA fandet sich ein signifikanter Gruppeneffekt [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(5,12) = 5,7$; Signifikanz von $F = 0,006$]. Die Paroxetin-Hirnkonzentrationen sind verantwortlich für diesen Gruppeneffekt. Für den Paroxetin-Versuch wurden männliche Mäuse im Alter von 26 bis 32 Wochen mit den Gewichten $39,0 \pm 1,3$ g und $38,1 \pm 1,6$ g für die Mutanten und die Kontrollen eingesetzt. Pro Tiergruppe wurden 9 Mäuse untersucht.

| Paroxetin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|--|---------------------|--------------|------------------|---------------|---------------------------|--------------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 150,42 | 31,52 | 110,53 | 7,92 | 1,4 | ns |
| Hirn | 455,02 | 33,80 | 212,80 | 29,45 | 2,1 | * |
| Milz | 848,61 | 61,99 | 875,86 | 79,95 | 1,0 | ns |
| Niere | 1528,02 | 82,62 | 1740,61 | 114,88 | 0,9 | ns |
| Leber | 585,35 | 33,94 | 648,67 | 71,75 | 0,9 | ns |
| Gruppeneffekt: $F(5,12) = 5,7$; Signifikanz von $F = 0,006$ | | | | | | |

Tabelle 13: Organkonzentrationen von Paroxetin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 1 µg Paroxetin/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

Paroxetin

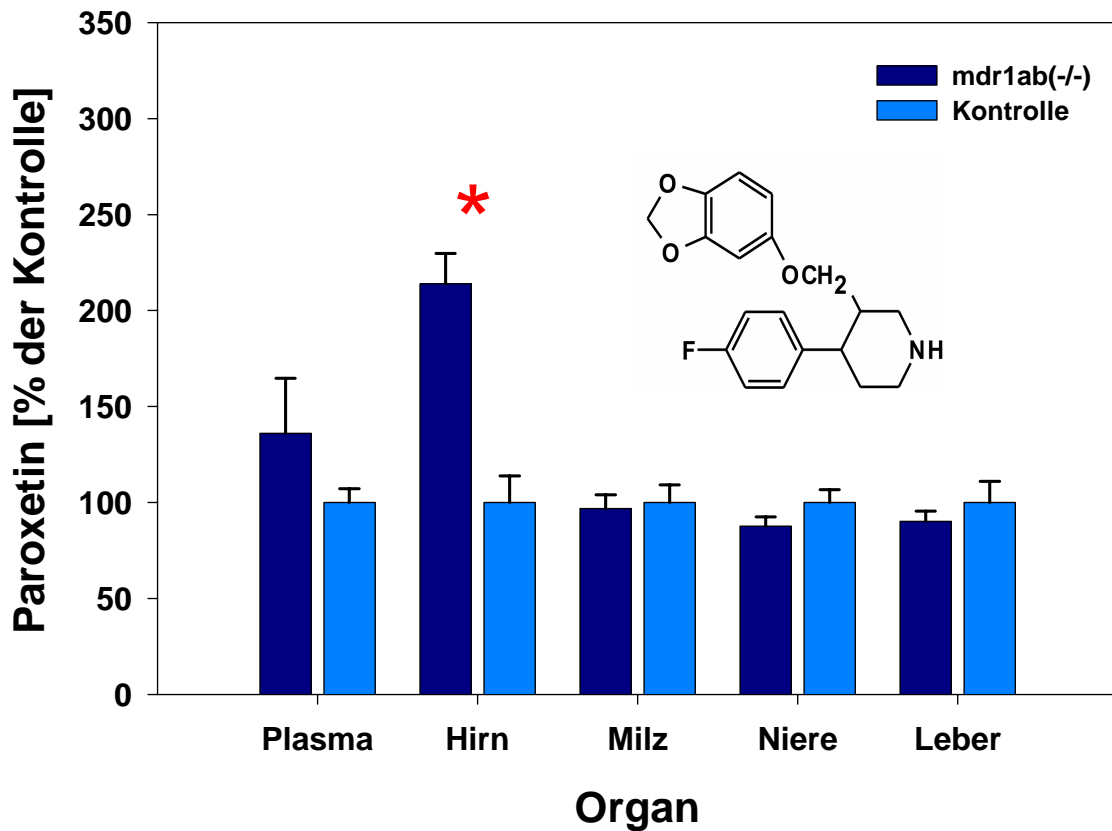


Abbildung 18: Organ- und Plasmakonzentrationen von Paroxetin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 1 μg Paroxetin/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

3.2.1.6 Mirtazapin

Keine signifikanten Verteilungsunterschiede in der Organverteilung des Mirtazapins ergab sich zwischen den beiden untersuchten Mausgruppen nach einmaliger subkutaner Injektion von 1 µg Mirtazapin/g Körpergewicht. Die Abbildung 19 zeigt gering höhere Plasma-, Hirn- und Leberkonzentrationen für die Mausmutanten, jedoch erreichen diese Unterschiede in der Varianzanalyse keine Signifikanz (Tab. 14). Für den Mirtazapin-Versuch wurden männliche Mäuse im Alter von 13 bis 16 Wochen mit den Gewichten $32,7 \pm 0,7$ g und $31,2 \pm 0,3$ g für die Mutanten und die Kontrollen eingesetzt (n=10/Gruppe).

| Mirtazapin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|--------------|------------------|--------------|---------------------------|--------------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 54,73 | 6,16 | 41,19 | 2,86 | 1,3 | ns |
| Hirn | 163,32 | 14,32 | 127,90 | 9,76 | 1,3 | ns |
| Milz | 198,26 | 12,90 | 189,51 | 15,47 | 1,0 | ns |
| Niere | 280,49 | 15,29 | 260,11 | 23,43 | 1,1 | ns |
| Leber | 129,50 | 18,19 | 103,86 | 7,25 | 1,2 | ns |
| Gruppeneffekt: F(5,14) = 1,5; Signifikanz von F = 0,26 | | | | | | |

Tabelle 14: Organkonzentrationen von Mirtazapin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 1 µg Mirtazapin/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Mirtazapin

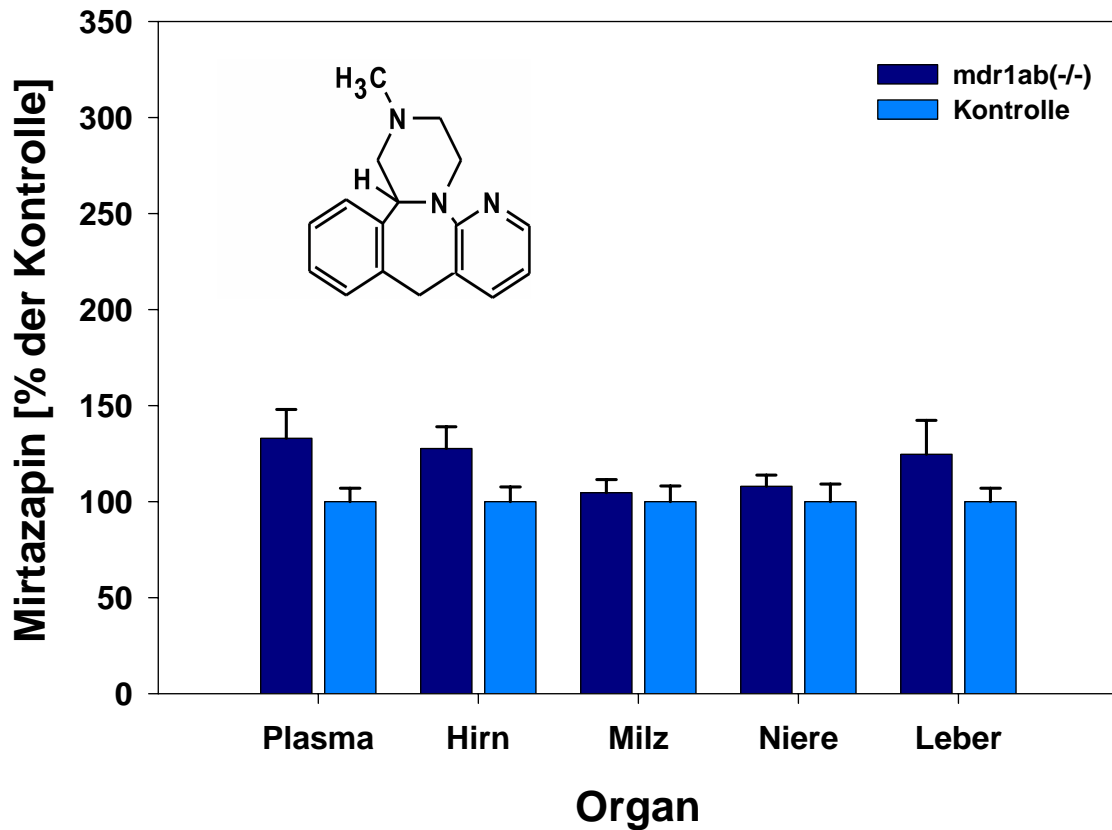


Abbildung 19: Organ- und Plasmakonzentrationen von Mirtazapin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 1 μg Mirtazapin/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

3.2.1.7 Melperon

Eine Stunde nach subkutaner Injektion von 2,5 µg des Butyrophenons Melperon/g Körpergewicht fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten des P-Glykoproteins und den Wildtypmäusen. Die Melperon-Konzentrationen im Plasma, Hirn, Milz, Niere, Leber, Hoden und der Lunge waren gleich. In jeder Mausgruppe wurden jeweils 7 männliche Tiere im Altern von 41-68 Wochen und den Gewichten $35,5 \pm 1,3$ g und $36,9 \pm 1,3$ g für die *mdr1ab(-/-)* und *mdr1ab(+/+)* Mäuse (Abb. 20). Die multivariate Analyse erbrachte keine signifikanten Unterschiede [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(7,6) = 3,9$; Signifikanz von $F = 0,1$].

| Melperon [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|--------|-----------|--------|---------------------------|-------------|
| | <i>mdr1ab (-/-)</i> | SEM | Kontrolle | SEM | <i>mdr1ab (-/-)/(+/+)</i> | Signifikanz |
| Plasma | 108,90 | 6,90 | 100,32 | 7,72 | 1,1 | ns |
| Hirn | 877,56 | 60,15 | 679,51 | 62,32 | 1,3 | ns |
| Milz | 1487,36 | 126,17 | 1417,60 | 154,58 | 1,0 | ns |
| Niere | 2334,27 | 383,63 | 1888,55 | 211,17 | 1,2 | ns |
| Leber | 1455,64 | 42,76 | 1431,89 | 63,72 | 1,0 | ns |
| Lunge | 1122,18 | 104,64 | 963,24 | 95,30 | 1,2 | ns |
| Hoden | 2112,89 | 137,68 | 1746,01 | 47,79 | 1,2 | ns |
| Gruppeneffekt: $F(7,6) = 3,0$; Signifikanz von $F = 0,1$ | | | | | | |

Tabelle 15: Organkonzentrationen von Melperon eine Stunde nach subkutaner Injektion von 2,5 µg Melperon/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

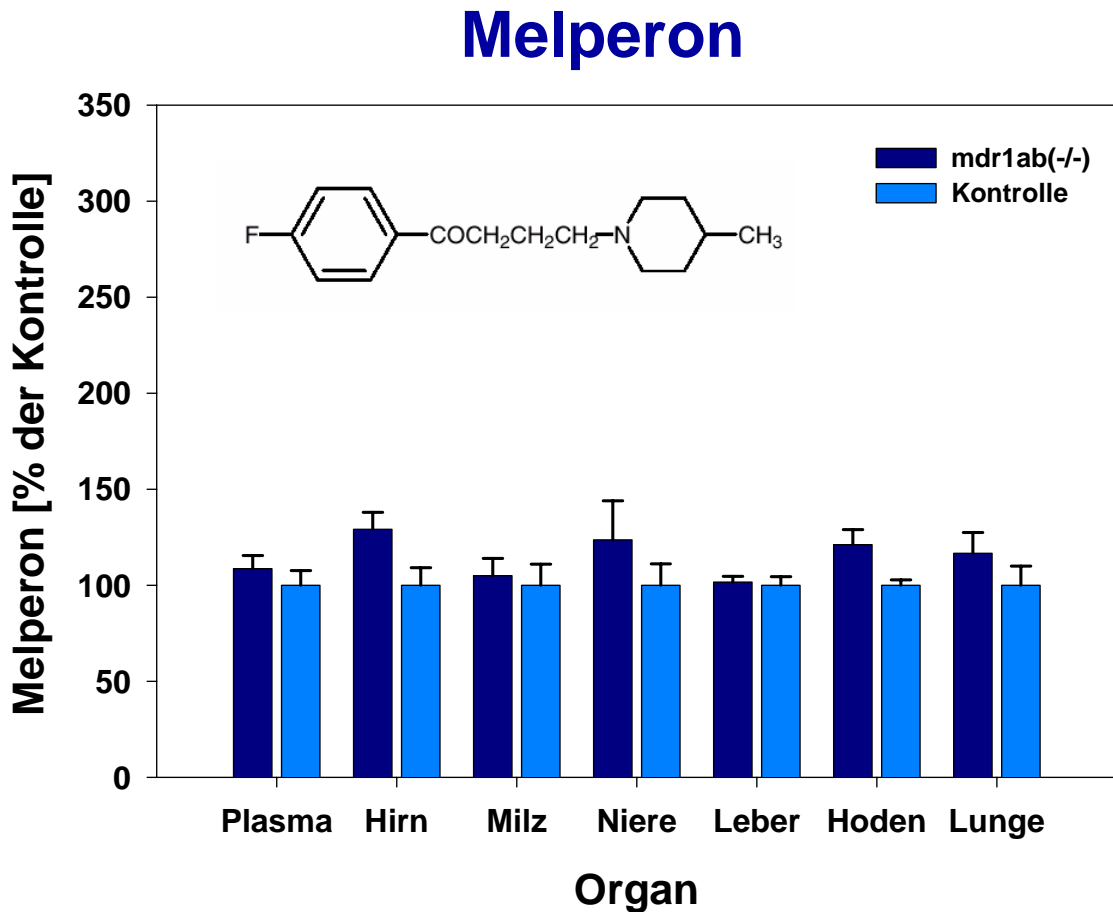


Abbildung 20: Organ- und Plasmakonzentrationen von Melperon eine Stunde nach subkutaner Injektion von 2,5 µg Melperon/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

3.2.1.8 Dextromethorphan

Eine Stunde nach subkutaner Injektion von 1 µg Dextromethorphan/g Körpergewicht zeigten sich deutliche signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Mausgruppen. In den mdr1ab Mutanten war die Hirnkonzentration mehr als doppelt so hoch wie in den untersuchten Kontrollmäusen. Keine Unterschiede erbrachten die Konzentrationsvergleiche im Plasma, der Milz und der Niere (Abb. 21, Tab. 16). [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(5,6) = 28,1$; Signifikanz von $F < 0,001$]. Die Mutanten- und Kontrollmäuse waren in einem Alter von 65-72 Wochen. Die Gruppengröße war jeweils 6 Tiere.

| Dextromethorphan [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|------------|------------------|------------|---------------------------|--------------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 8,06 | 0,82 | 6,08 | 0,63 | 1,3 | ns |
| Hirn | 13,51 | 1,15 | 6,39 | 0,54 | 2,1 | * |
| Milz | 33,61 | 4,01 | 37,78 | 3,33 | 0,9 | ns |
| Niere | 14,53 | 1,78 | 13,97 | 1,50 | 1,0 | ns |
| Gruppeneffekt: $F(5,6) = 28,1$; Signifikanz von $F < 0,001$ | | | | | | |

Tabelle 16: Organkonzentrationen von Dextromethorphan eine Stunde nach subkutaner Injektion von 1 µg Dextromethorphan/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

Dextromethorphan

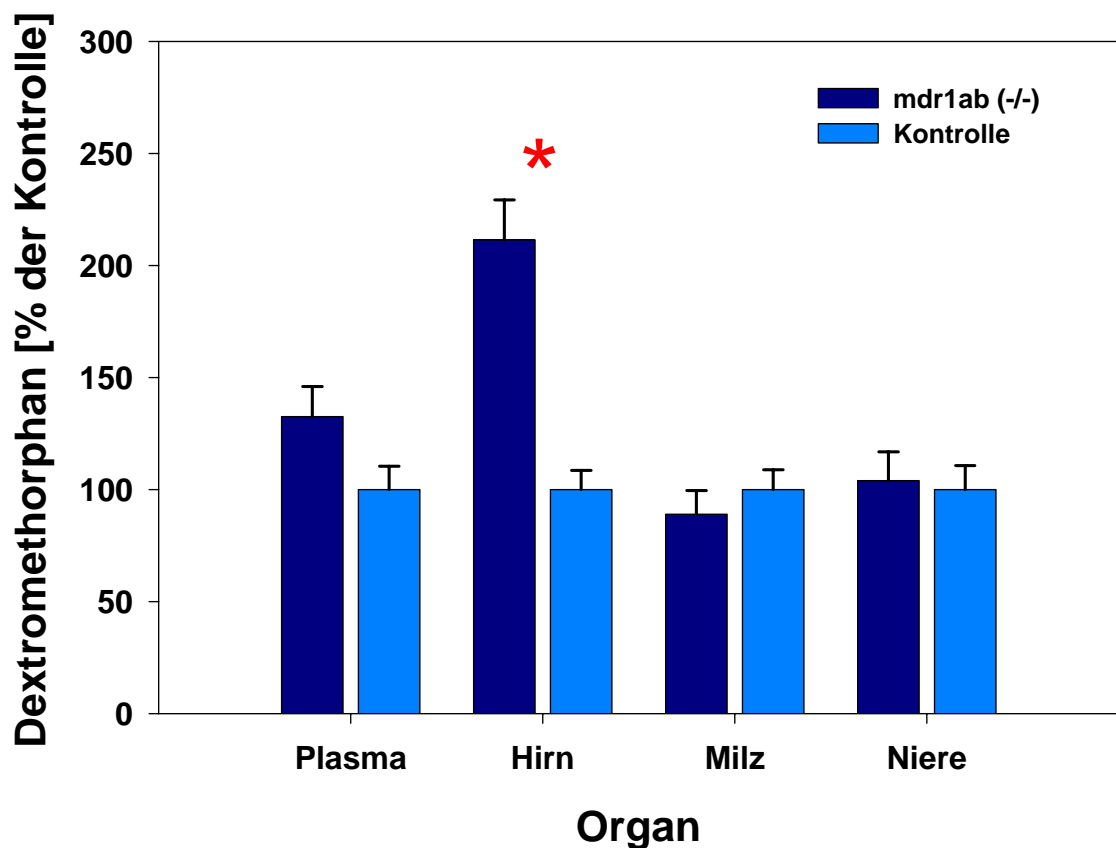


Abbildung 21: Organ- und Plasmakonzentrationen von Dextromethorphan eine Stunde nach subkutaner Injektion von 1 μg Dextromethorphan/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

3.2.1.9 **Venlafaxin** und Desmethylvenlafaxin

Pro Gruppe wurden 10 männliche Tiere untersucht. Die durchschnittlichen Gewichte der *mdr1ab*(-/-) und *mdr1ab*(+/+) Mäuse waren 28,9 g ± 0,4 g und 30,0 g ± 0,4 g bei einem Alter von 12 bis 16 Wochen. Den Versuchstieren wurde 5 µg Venlafaxin/g Körpergewicht subkutan im Bereich des Nackens injiziert. Eine Stunde danach fanden sich für Venlafaxin sowie auch für den Metaboliten, das Desmethylvenlafaxin, klare Hirnkonzentrationsunterschiede zwischen den untersuchten Mausgruppen. In den Gehirnen der P-Glykoprotein-Knock-out-Mäuse waren die Hirnkonzentrationen rund doppelt so hoch. Dies gilt für Venlafaxin sowie auch für Desmethylvenlafaxin. Der Wilks multivariater Signifikanztest erbrachte einen Gruppeneffekt: F (5,14) = 119,0; Signifikanz von F < 0,001 für Venlafaxin und F (5,14) = 24,5; Signifikanz von F < 0,001 für Desmethylvenlafaxin.

| Venlafaxin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|--------|-----------|--------|---------------------------|-------------|
| | <i>mdr1ab</i> (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | <i>mdr1ab</i> (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 227,67 | 17,10 | 178,37 | 11,28 | 1,3 | * |
| Hirn | 2014,32 | 98,31 | 877,93 | 27,25 | 2,3 | * |
| Milz | 2169,38 | 189,44 | 1971,86 | 115,21 | 1,1 | ns |
| Niere | 2236,60 | 181,81 | 1976,23 | 75,34 | 1,1 | ns |
| Leber | 826,23 | 68,51 | 603,78 | 29,30 | 1,4 | * |
| Gruppeneffekt: F(5,14) =119,0; Signifikanz von F <0,001 | | | | | | |

Tabelle 17: Organkonzentrationen von Venlafaxin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 5 µg Venlafaxin/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Venlafaxin

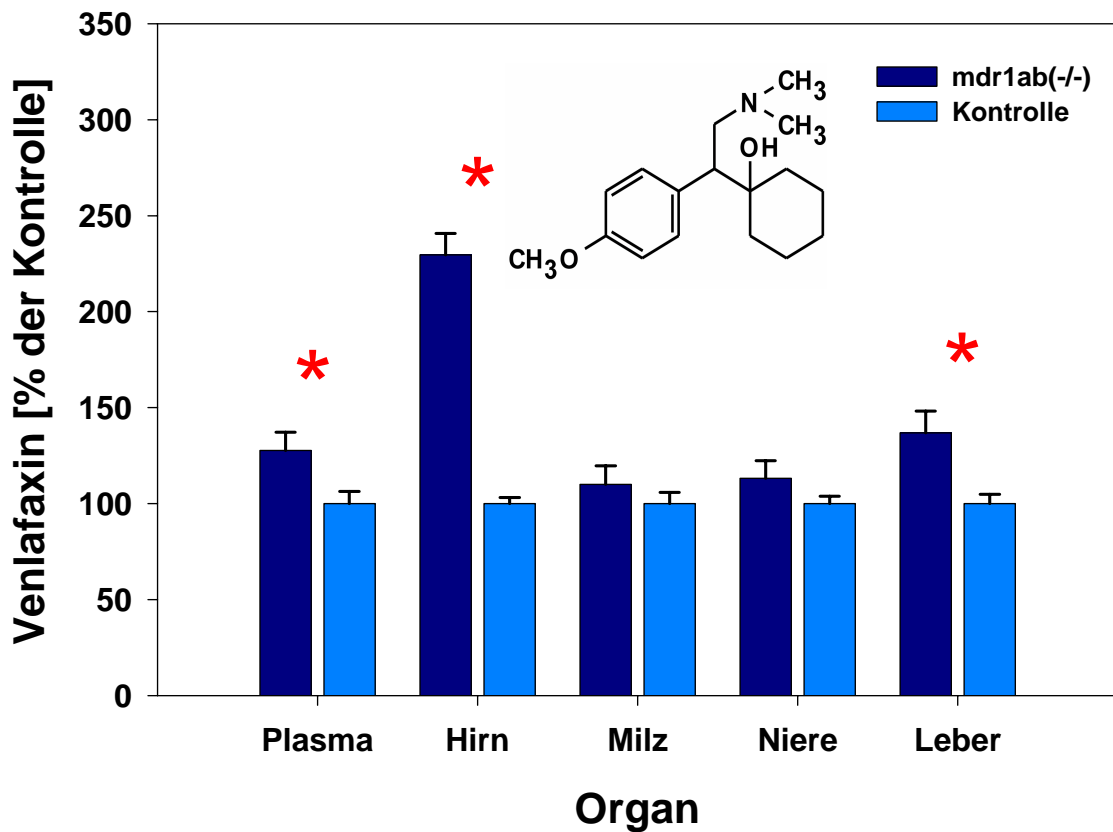


Abbildung 22: Organ- und Plasmakonzentrationen von Venlafaxin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 5 µg Venlafaxin/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

| D-Venlafaxin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|--|--------------|-------|-----------|-------|--------------------|-------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 47,43 | 2,78 | 42,64 | 3,13 | 1,1 | ns |
| Hirn | 110,85 | 4,24 | 59,44 | 2,71 | 1,9 | * |
| Milz | 251,55 | 21,45 | 259,44 | 11,41 | 1,0 | ns |
| Niere | 476,95 | 32,97 | 457,67 | 20,60 | 1,0 | ns |
| Leber | 225,99 | 19,50 | 215,70 | 14,35 | 1,0 | ns |
| Gruppeneffekt: F(5,14) =24,5; Signifikanz von F <0,001 | | | | | | |

Tabelle 18: Organkonzentrationen von Desmethylvenlafaxin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 5 µg Venlafaxin/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

D-Venlafaxin

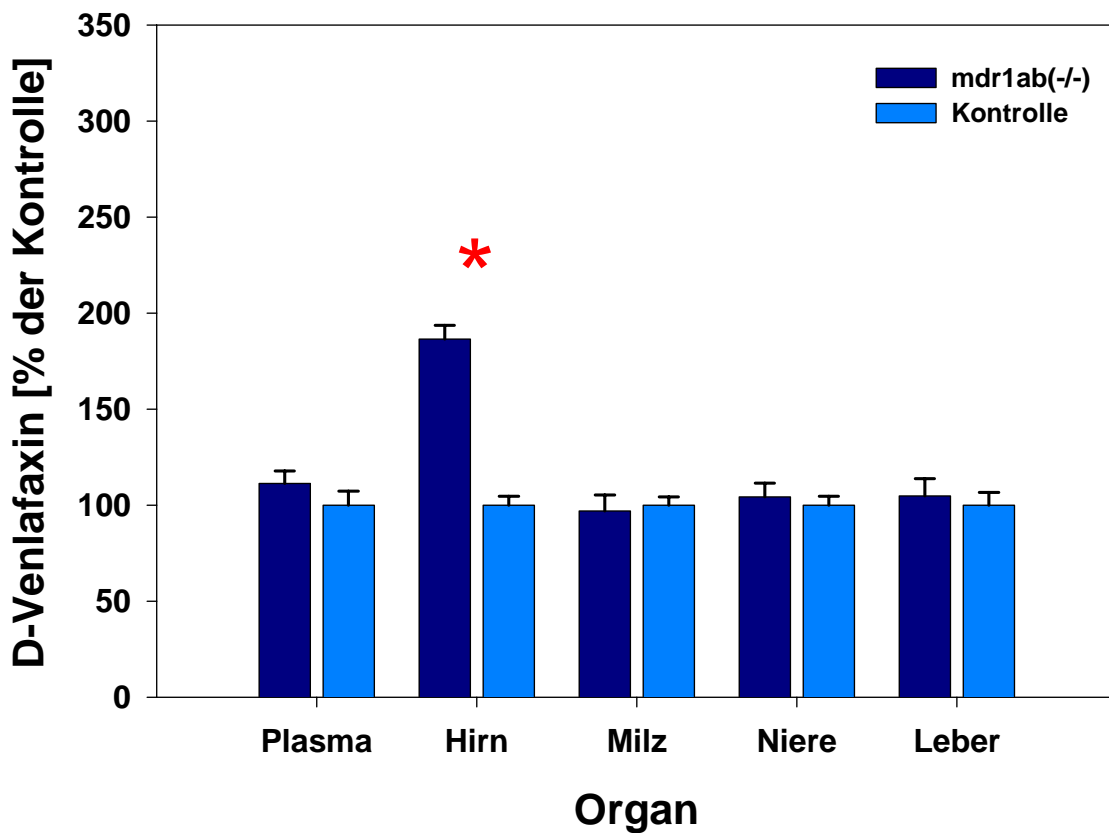


Abbildung 23: Organ- und Plasmakonzentrationen von Desmethylvenlafaxin eine Stunde nach subkutaner Injektion von 5 µg Venlafaxin/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p -Value $< 0,05$). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

3.2.2 Langzeitbehandlung mit repetitiver bzw. kontinuierlicher subkutaner Medikamentengabe

3.2.2.1 Amitriptylin nach repetitiver Gabe

Männliche mdr1ab(-/-) Mäuse (n = 7; 32,4 g ± 2,4 g) und FVB/N Wildtypmäuse (n = 7; 31,3 g ± 1,6 g) im Alter von 15 ± 4 Wochen wurden für die Versuche verwendet. Den Tieren wurden zweimal täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen subkutan im Bereich des Nackens 10 µg Amitriptylin/g Körpergewicht, gelöst in 0,9 % NaCl und 0,5 % Ethanol, verabreicht. 4 Stunden nach der letzten Injektion wurden die Plasma- und Organkonzentrationen ermittelt. Untersucht wurden die Konzentrationen des verabreichten Amitriptylins sowie seiner Metabolite Nortriptylin, E-Hydroxy-Amitriptylin, Z-Hydroxy-Amitriptylin, E-Hydroxy-Nortriptylin und Z-Hydroxy-Nortriptylin. Die Gehirnkonzentrationen aller Metaboliten waren deutlich höher in den P-Glykoprotein-Knock-out-Mutanten im Vergleich zu den FVB/N-Wildtypmäusen. Die Hodenkonzentrationen der Mutanten waren ebenfalls für alle untersuchten Metaboliten des Amitriptylins signifikant erhöht. Leicht erhöhte Plasmakonzentrationen in den Knock-out-Mutanten finden sich für Nortriptylin sowie E-Hydroxy-Amitriptylin (Abb. 24). Keine signifikanten Unterschiede finden sich in den Plasma- und Hirn-, Milz-, Niere-, Leber- Lunge- und Hoden-Amitriptylin-Konzentrationen.

Die Hirnkonzentrationen in den Knock-out-Mäusen waren für die Metabolite teilweise bis zum 10fachen höher als in den Kontrolltierhirnen (E-Hydroxy-Nortriptylin). Bis zu 7fach höhere Konzentrationen sind für Z-Hydroxy-Nortriptylin und 5fach höhere Konzentrationen für Z-Hydroxy-Amitriptylin zu ermitteln. Aber auch das E-Hydroxy-Amitriptylin war mehr als doppelt so hoch und das Nortriptylin 2,6fach höher in den Gehirnen der Mutanten ohne funktionsfähiges P-Glykoprotein.

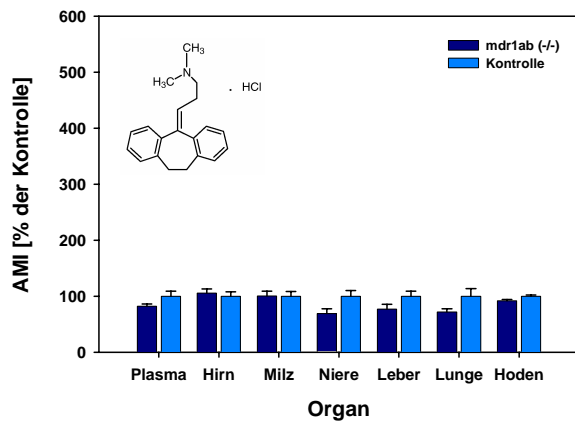
Die Plasma- und Organkonzentrationen des Amitriptylins und seiner Metaboliten sowie die Ergebnisse der Varianzanalyse (MANOVA) im Wilks multivariater Signifikanztest sind in Tabelle 19 dargestellt.

Abbildung 24: Organ- und Plasmakonzentrationen von Amitriptylin und Metaboliten 4 Stunden nach subkutaner Injektion von 10 µg Amitriptylin/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

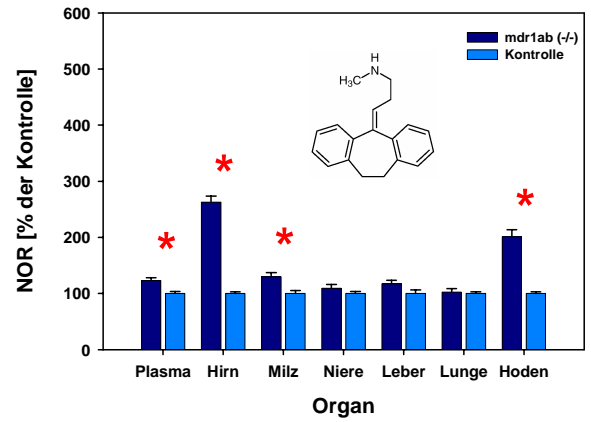
Tabelle 19: Organ- und Plasmakonzentrationen von Amitriptylin und Metaboliten 4 Stunden nach subkutaner Injektion von 10 µg Amitriptylin/g Körpergewicht.

* markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05); n.s. = nicht signifikant.. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben.

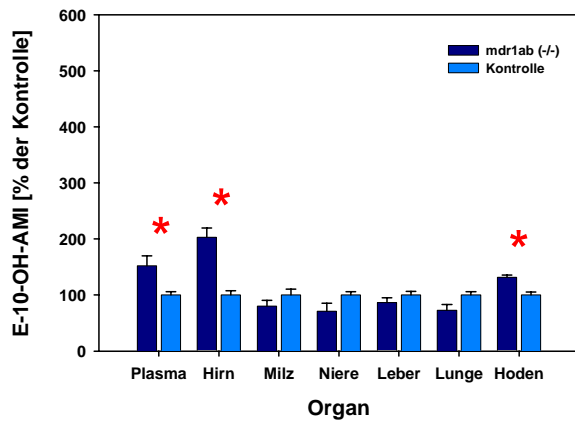
Amitriptylin



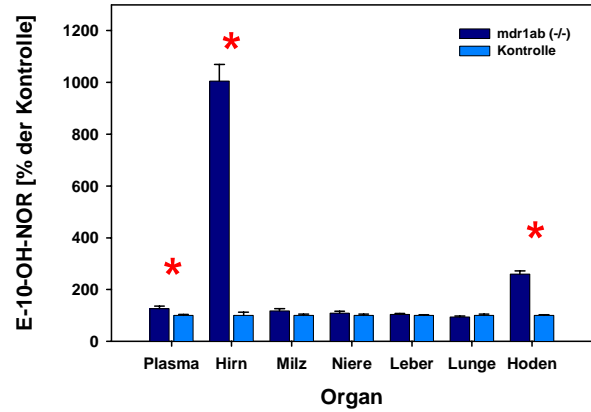
Nortriptylin



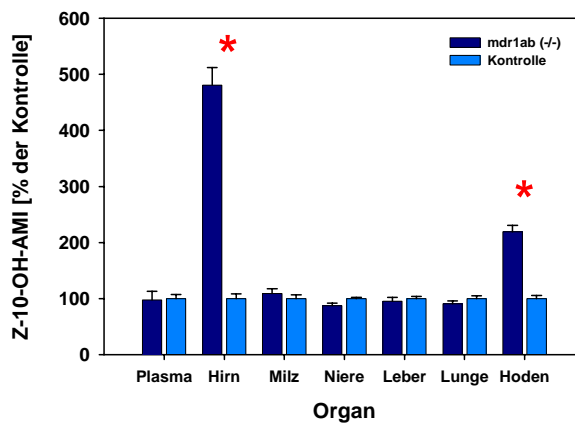
E-10-OH-Amitriptylin



E-10-OH-Nortriptylin



Z-10-OH-Amitriptylin



Z-10-OH-Nortriptylin

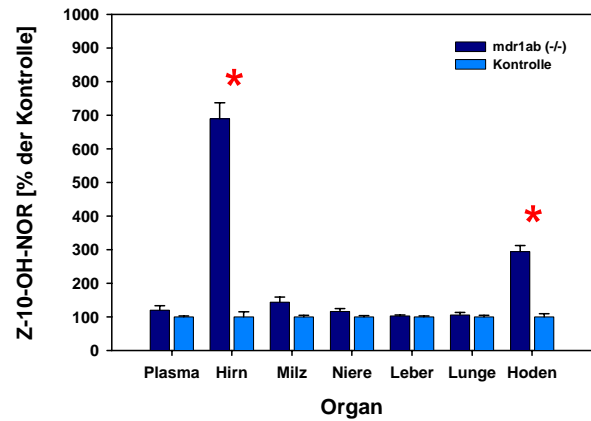


Abbildung 24

| AMI [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|--|--------------|--------|-----------|--------|--------------------|-------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 123,17 | 6,01 | 150,28 | 13,16 | 0,8 | ns |
| Hirn | 1642,93 | 113,12 | 1555,29 | 119,29 | 1,1 | ns |
| Milz | 2590,11 | 231,26 | 2583,95 | 212,48 | 1,0 | ns |
| Niere | 2064,89 | 252,53 | 3003,96 | 309,69 | 0,7 | ns |
| Hoden | 4539,53 | 117,48 | 4953,92 | 108,82 | 0,9 | ns |
| Lunge | 1997,71 | 154,09 | 2784,08 | 371,75 | 0,7 | ns |
| Leber | 681,00 | 78,98 | 887,58 | 79,91 | 0,8 | ns |
| Muskel | 525,85 | 77,97 | 405,39 | 55,32 | 1,3 | ns |
| Fett | 744,31 | 79,58 | 939,07 | 170,42 | 0,8 | ns |
| Gruppeneffekt: F(10,3) = 18,2; Signifikanz von F = 0,018 | | | | | | |
| E-OH-AMI [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 31,99 | 3,75 | 21,04 | 1,28 | 1,5 | * |
| Hirn | 69,79 | 5,63 | 34,33 | 2,59 | 2,0 | * |
| Milz | 138,22 | 8,58 | 171,80 | 17,93 | 0,8 | ns |
| Niere | 126,08 | 13,06 | 178,00 | 10,43 | 0,7 | ns |
| Hoden | 122,47 | 3,86 | 93,19 | 4,84 | 1,3 | * |
| Lunge | 115,34 | 8,15 | 158,11 | 9,26 | 0,7 | ns |
| Leber | 145,25 | 15,13 | 168,41 | 11,11 | 0,9 | ns |
| Muskel | 36,44 | 6,21 | 30,46 | 4,24 | 1,2 | ns |
| Fett | 36,44 | 10,78 | 24,09 | 1,55 | 1,5 | ns |
| Gruppeneffekt: F(9,4) = 14,0; Signifikanz von F = 0,011 | | | | | | |
| Z-OH-AMI [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 18,49 | 2,94 | 18,95 | 1,42 | 1,0 | ns |
| Hirn | 137,25 | 8,85 | 28,54 | 2,43 | 4,8 | * |
| Milz | 212,08 | 16,86 | 194,29 | 13,29 | 1,1 | ns |
| Niere | 259,98 | 12,44 | 297,22 | 6,99 | 0,9 | ns |
| Hoden | 321,48 | 16,71 | 146,76 | 8,47 | 2,2 | * |
| Lunge | 281,34 | 16,41 | 310,65 | 16,12 | 0,9 | ns |
| Leber | 190,81 | 13,89 | 200,48 | 7,97 | 1,0 | ns |
| Muskel | 65,72 | 7,56 | 42,71 | 5,32 | 1,5 | ns |
| Fett | 42,54 | 10,61 | 18,62 | 2,28 | 2,3 | ns |
| Gruppeneffekt: F(9,4) = 73,9; Signifikanz von F <0,001 | | | | | | |

Tabelle 19

| NOR [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|--------------|--------|-----------|--------|--------------------|-------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 165,78 | 7,08 | 134,69 | 4,86 | 1,2 | * |
| Hirn | 2425,34 | 98,37 | 922,16 | 27,34 | 2,6 | * |
| Milz | 3773,47 | 209,77 | 2904,74 | 158,38 | 1,3 | * |
| Niere | 4401,22 | 279,00 | 4024,56 | 139,57 | 1,1 | ns |
| Hoden | 3219,67 | 203,16 | 1601,88 | 52,45 | 2,0 | * |
| Lunge | 5277,40 | 317,22 | 5144,30 | 161,39 | 1,0 | ns |
| Leber | 2044,95 | 114,46 | 1744,52 | 109,92 | 1,2 | ns |
| Muskel | 956,39 | 88,24 | 619,51 | 76,94 | 1,5 | * |
| Fett | 297,01 | 69,42 | 129,77 | 15,03 | 2,3 | ns |
| Gruppeneffekt: F(9,4) = 221,3; Signifikanz von F <0,001 | | | | | | |
| E-OH-NOR [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 92,46 | 7,62 | 73,28 | 3,18 | 1,3 | * |
| Hirn | 339,28 | 22,13 | 33,78 | 4,25 | 10,0 | * |
| Milz | 353,59 | 24,34 | 299,85 | 17,26 | 1,2 | ns |
| Niere | 643,85 | 43,90 | 593,05 | 27,94 | 1,1 | ns |
| Hoden | 424,61 | 19,84 | 163,20 | 4,48 | 2,6 | * |
| Lunge | 775,05 | 34,54 | 825,65 | 40,05 | 0,9 | ns |
| Leber | 451,39 | 16,72 | 435,68 | 13,16 | 1,0 | ns |
| Muskel | 250,04 | 39,67 | 131,73 | 13,58 | 1,9 | ns |
| Fett | 74,01 | 13,94 | 31,39 | 2,20 | 2,4 | * |
| Gruppeneffekt: F(9,3) = 94,1; Signifikanz von F = 0,002 | | | | | | |
| Z-OH-NOR [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 104,70 | 11,28 | 86,98 | 2,31 | 1,2 | ns |
| Hirn | 261,50 | 18,12 | 37,93 | 5,66 | 6,9 | * |
| Milz | 258,52 | 28,12 | 180,24 | 8,94 | 1,4 | ns |
| Niere | 633,90 | 44,52 | 543,27 | 22,16 | 1,2 | ns |
| Hoden | 281,44 | 17,71 | 95,73 | 8,93 | 2,9 | * |
| Lunge | 646,63 | 45,22 | 610,81 | 30,31 | 1,1 | ns |
| Leber | 353,94 | 9,76 | 342,25 | 11,00 | 1,0 | ns |
| Muskel | 162,63 | 18,58 | 92,84 | 9,20 | 1,8 | * |
| Fett | 65,92 | 15,09 | 29,11 | 5,42 | 2,3 | ns |
| Gruppeneffekt: F(9,2) =56,1; Signifikanz von F = 0,018 | | | | | | |

Tabelle 19 (Fortsetzung)

3.2.2.2 **Citalopram** (osmotische Pumpen)

8 *mdr1ab*(-/-) sowie 8 *mdr1ab*(+/+) Mäusen wurden osmotische Alzet-Pumpen subkutan im Bereich des Nackens implantiert. Die Pumpen wurden so bestückt, dass jede täglich 60 µg Citalopram/Maus kontinuierlich abgab. Nach 11 Tagen wurden die Tiere getötet und die Citalopram-Plasma- und Organkonzentrationen mittels HPLC bestimmt. Die Gewichte der Versuchstiere waren 31,2 g ± 0,6 g und 29,8 g ± 1 g für die *mdr1ab*(-/-) und *mdr1ab*(+/+) Mäuse. Zum Versuchszeitpunkt waren die Mäuse 16-24 Wochen alt.

In den Gehirnen und Hoden der P-Glykoprotein-Knock-out-Mutanten war signifikant mehr Citalopram als in den Kontrollwildtypmäusen nachweisbar. In den Gehirnen der Knock-out-Mutanten ließ sich durchschnittlich 480 ng Citalopram/g Hirngewebe nachweisen, wogegen sich in den Gehirnen der Kontrollmäuse durchschnittlich ca. 158 ng Citalopram/g Hirngewebe nachzuweisen war (Tab. 20). Damit fand sich 3mal mehr Citalopram in den Gehirnen der Tiere ohne funktionsfähiges P-Glykoprotein (Abb. 25). Auch in den Hoden fand sich, wenn auch weniger ausgeprägt, signifikant mehr Citalopram in den Mutanten.

Die Varianzanalyse (MANOVA) erbrachte einen signifikanten Gruppeneffekt der Citalopram-Konzentrationen [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: F(7,8) = 35,4; Signifikanz von F < 0,001]. Verantwortlich für die Signifikanzen waren dabei die Hirn- und Hoden-Citalopram-Konzentrationen. Keine signifikanten Unterschiede fanden sich für den Konzentrationsvergleich im Plasma, Milz, Niere, Leber und Lunge.

| Citalopram [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|--------|-----------|--------|---------------------------|-------------|
| | <i>mdr1ab</i> (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | <i>mdr1ab</i> (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 89,37 | 8,65 | 106,71 | 7,60 | 0,8 | ns |
| Hirn | 480,93 | 27,39 | 158,27 | 15,84 | 3,0 | * |
| Milz | 468,29 | 42,16 | 446,96 | 46,93 | 1,0 | ns |
| Niere | 795,74 | 50,39 | 962,29 | 87,92 | 0,8 | ns |
| Leber | 240,33 | 16,40 | 238,02 | 18,46 | 1,0 | ns |
| Lunge | 1238,47 | 124,86 | 1238,71 | 105,37 | 1,0 | ns |
| Hoden | 687,92 | 28,30 | 428,19 | 35,05 | 1,6 | * |
| Gruppeneffekt: F(7,8) = 35,4; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | |

Tabelle 20: Organ- und Plasmakonzentrationen von Citalopram nach 11 Tagen subkutaner kontinuierlicher Gabe über osmotische Pumpen von 60 µg Citalopram/Tag. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Citalopram

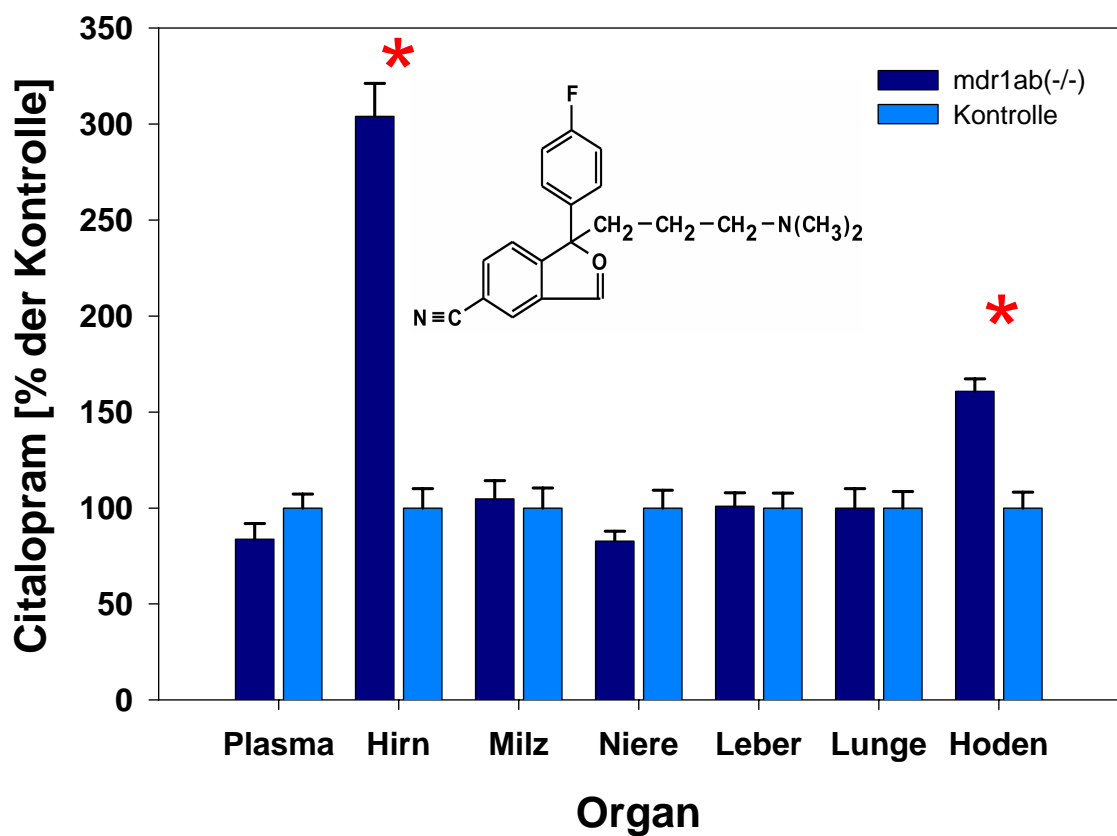


Abbildung 25: Organ- und Plasmakonzentrationen von Citalopram nach 11 Tagen subkutaner kontinuierlicher Gabe über osmotische Pumpen von 60 µg Citalopram/Tag, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

3.2.2.3 Venlafaxin und Desmethylvenlafaxin (osmotische Pumpen)

11 Tage nach subkutaner Implantation von osmotischen Pumpen, deren Pumpleistung täglich 300 µg Venlafaxin betrug, wurden die Versuchstiere getötet und die Plasma- und Organ-Venlafaxin- und Desmethylvenlafaxin-Konzentrationen bestimmt. Pro Versuchstiergruppe wurden 8 Tiere verwendet, deren durchschnittliches Gewicht $30,6 \pm 0,5$ g und $29,9 \pm 1$ g für die *mdr1ab(-/-)* und *mdr1ab(+/+)* Mäuse betrug. Die Tiere waren zum Versuchszeitpunkt zwischen 12 und 15 Wochen alt.

Es fanden sich signifikante Unterschiede für die Venlafaxin- und Desmethylvenlafaxin-Hirnkonzentrationen zwischen den beiden Mausgruppen. In den Gehirnen der *mdr1ab(-/-)* Knock-out-Mutanten fanden sich 1,7fach höhere Konzentrationen Venlafaxin und 4,1fach höhere Konzentrationen Desmethylvenlafaxin (Abb.26 und 27). In den Hoden war Venlafaxin und Desmethylvenlafaxin in der Gruppe der Mutanten leicht erhöht, wobei lediglich die Venlafaxin-Konzentrationen im Gruppenvergleich Signifikanz erreichte. Keine signifikanten Unterschiede waren zwischen den beiden Mausgruppen für die Konzentration im Plasma, Leber, Milz, Niere und Lunge zu detektieren (Abb. 26 und 27, Tab. 21 und 22).

Die Varianzanalyse erbrachte signifikante Gruppeneffekte für die Analyse der Venlafaxin- und Desmethylvenlafaxin-Versuche [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(7,8) = 30,7$; Signifikanz von $F < 0,001$] für Venlafaxin und [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(7,8) = 4,8$; Signifikanz von $F = 0,022$] für Desmethylvenlafaxin. Verantwortlich für die Signifikanzen waren für die injizierte Substanz die Hirn- und Hodenkonzentrationen und für den Metaboliten lediglich die Verteilung der Gehirnkonzentrationen.

Tabelle 21: Organ und Plasmakonzentrationen von Venlafaxin nach 11 Tagen kontinuierlicher subkutaner Venlafaxingabe mittels osmotischer Pumpen 300µg / Tag. Werte sind Mittelwerte \pm SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

| Venlafaxin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---------------------------|--------------|-------|-----------|-------|--------------------|-------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 70,57 | 4,22 | 71,37 | 3,34 | 1,0 | ns |
| Hirn | 456,32 | 19,76 | 261,14 | 9,54 | 1,7 | * |
| Milz | 564,20 | 23,00 | 581,95 | 11,31 | 1,0 | ns |
| Niere | 1054,88 | 37,58 | 1035,27 | 23,67 | 1,0 | ns |
| Leber | 323,22 | 17,09 | 314,59 | 22,03 | 1,0 | ns |
| Lunge | 672,59 | 36,14 | 747,38 | 36,16 | 0,9 | ns |
| Hoden | 842,61 | 9,88 | 715,92 | 21,29 | 1,2 | * |

Gruppeneffekt: F(7,8) = 30,7; Signifikanz von F <0,001

Venlafaxin

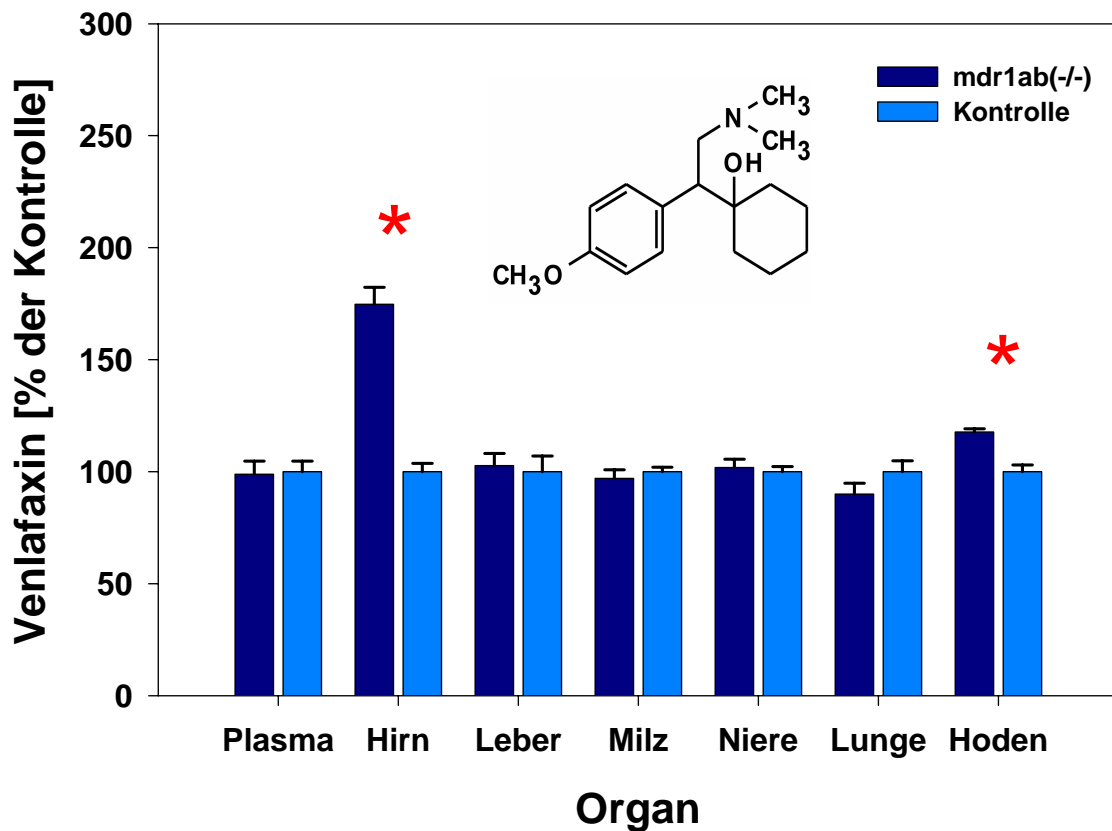


Abbildung 26: Organ und Plasmakonzentrationen von Venlafaxin nach 11 Tagen kontinuierlicher subkutaner Venlafaxingabe mittels osmotischer Pumpen 300 µg /

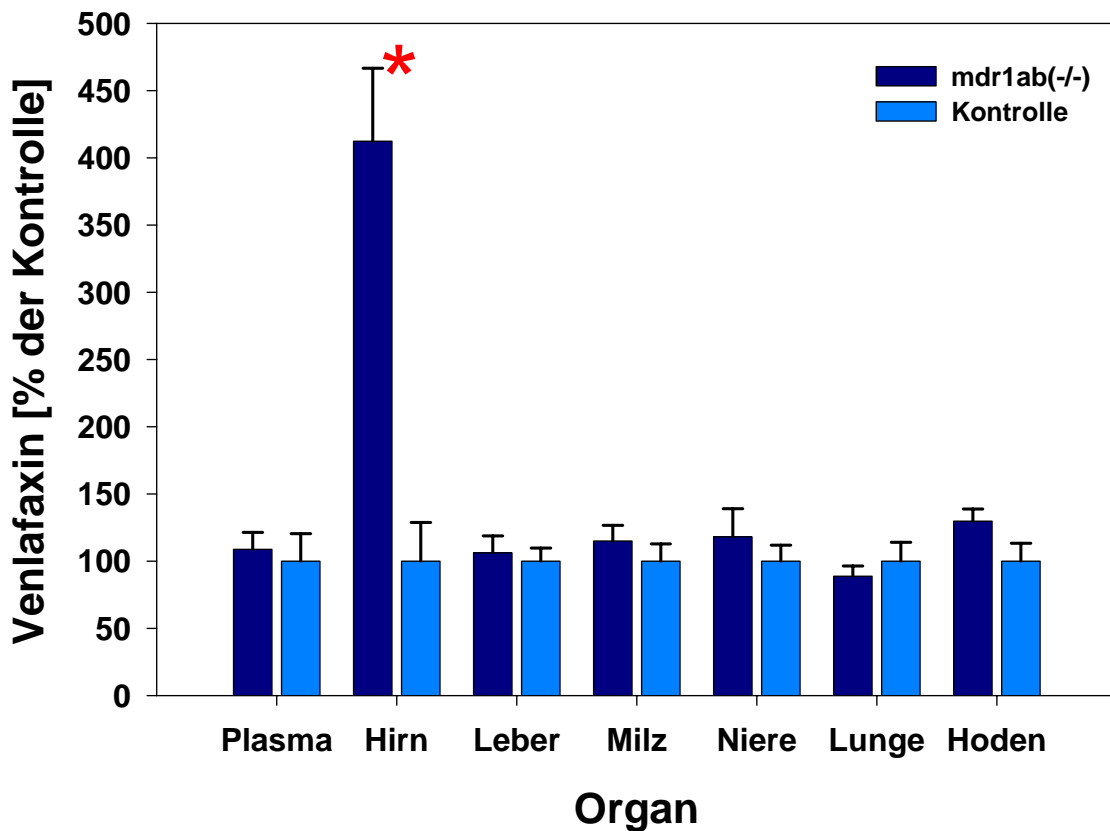
Tag, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

| D-Venlafaxin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|--------------|-------|-----------|-------|--------------------|-------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 5,98 | 0,70 | 5,50 | 1,12 | 1,1 | ns |
| Hirn | 36,99 | 4,86 | 8,97 | 2,57 | 4,1 | * |
| Milz | 33,80 | 3,42 | 29,42 | 3,76 | 1,1 | ns |
| Niere | 127,32 | 22,51 | 107,88 | 12,72 | 1,2 | ns |
| Leber | 88,22 | 10,60 | 83,15 | 8,15 | 1,1 | ns |
| Lunge | 44,91 | 3,85 | 50,63 | 7,09 | 0,9 | ns |
| Hoden | 39,19 | 2,64 | 30,18 | 4,01 | 1,3 | ns |
| Gruppeneffekt: F(7,8) = 4,8; Signifikanz von F = 0,022 | | | | | | |

Tabelle 22: Organ und Plasmakonzentrationen von Desmethyl-Venlafaxin nach 11 Tagen kontinuierlicher subkutaner 300µg / Tag Venlafaxingabe mittels osmotischer Pumpen. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Abbildung 27: Organ und Plasmakonzentrationen von Desmethyl-Venlafaxin nach 11 Tagen kontinuierlicher subkutaner 300 µg / Tag Venlafaxingabe mittels osmotischer Pumpen, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

D-Venlafaxin



3.2.2.4 Budipin (osmotische Pumpen)

11 Tage nach Implantation von osmotischen Pumpen, die 30 µg/24 Stunden Budipin kontinuierlich freisetzen, wurden jeweils 8 Tiere der mdr1ab(-/-) und mdr1ab(+/+) Mäuse getötet und die Budipin-Konzentrationen im Plasma und Organen gemessen (Gewichte: 29,0 g ± 0,9 g für mdr1ab(-/-); 28,0 g ± 0,5 für mdr1ab(+/+) Mäuse).

Deutlich mehr Budipin findet sich in Hirn und Hoden der mdr1ab(-/-) Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen. Keine signifikanten Unterschiede bestanden für Plasma, Milz, Niere, Leber und Lunge (Abb. 28, Tab. 23). In der Varianzanalyse ergab sich ein signifikanter Gruppeneffekt [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(7,7) = 62,1$; Signifikanz von $F < 0,001$].

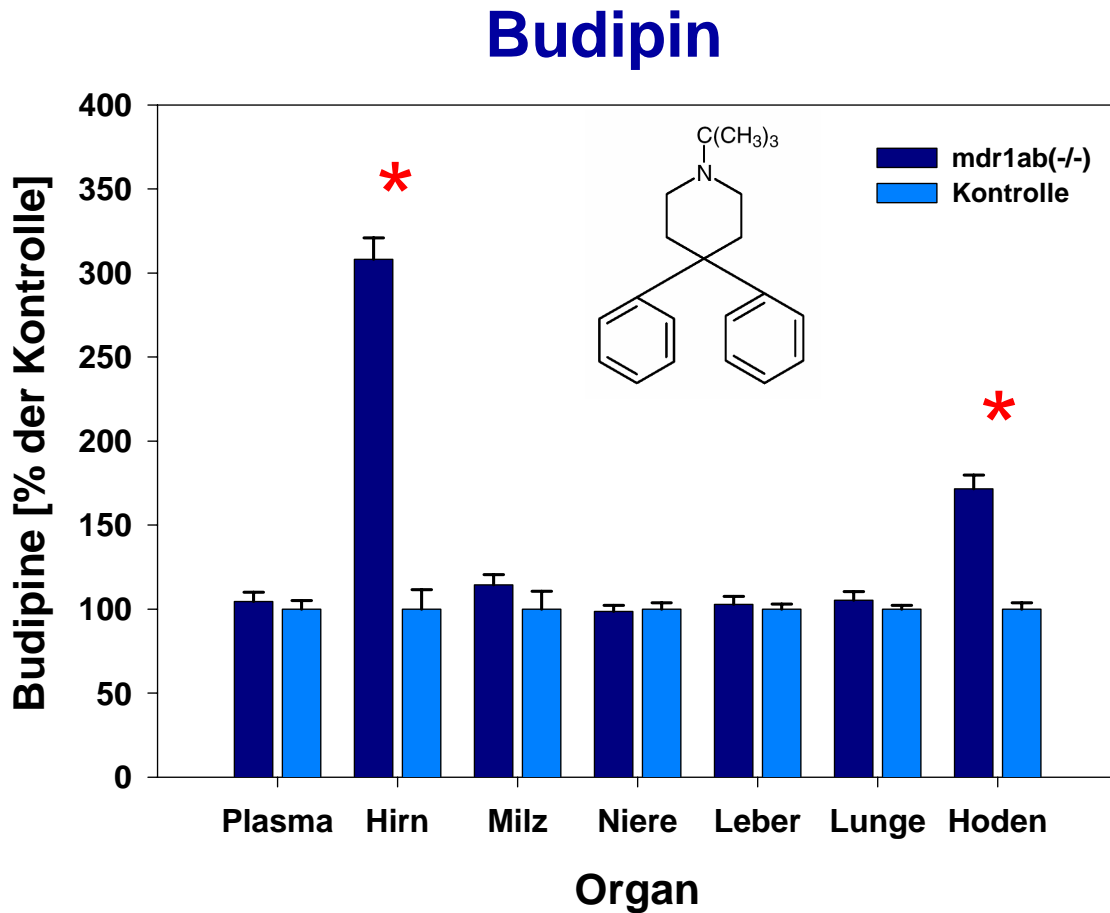


Abbildung 28: Organ und Plasmakonzentrationen von Budipin nach 11 Tagen kontinuierlicher subkutaner 30 µg / Tag Budipingabe mittels osmotischer Pumpen, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

Tabelle 23: Organ und Plasmakonzentrationen von Budipin nach 11 Tagen kontinuierlicher subkutaner 30 µg Budipingabe / Tag mittels osmotischer Pumpen. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

| Budipin [ng/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|--------------|------------------|--------------|---------------------------|--------------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 50,26 | 2,65 | 48,09 | 2,42 | 1,0 | ns |
| Hirn | 229,53 | 9,57 | 74,51 | 8,62 | 3,1 | * |
| Milz | 318,92 | 16,77 | 278,59 | 29,47 | 1,1 | ns |
| Niere | 636,68 | 23,84 | 645,76 | 23,76 | 1,0 | ns |
| Leber | 450,10 | 20,58 | 437,65 | 13,02 | 1,0 | ns |
| Lunge | 660,09 | 32,87 | 627,13 | 14,33 | 1,1 | ns |
| Hoden | 659,58 | 31,03 | 384,33 | 14,27 | 1,7 | * |
| Gruppeneffekt: F(7,7) = 62,1; Signifikanz von F<0,001 | | | | | | |

3.3 Endokrinologische Versuchsergebnisse

In diesem Ergebnisteil wird dargestellt, dass auch endogene Substanzen wie Steroide Substrate des P-Glykoproteins sein können und damit ihre Organverteilung durch die Funktion des Multidrug-resistance-Gens beeinflusst wird. Zunächst werden dabei die Versuchsergebnisse dargestellt, die die Organverteilung in den mdr1ab Knock-out-Mutanten und Wildtypen nach subkutaner bzw. peritonealer Gabe von Tritium-markierten Steroiden zeigen. Im weiteren werden die Versuchsergebnisse der endokrinologischen Charakterisierung von Mutanten und Kontrollen dargestellt. Komplettiert werden die Ergebnisse durch Funktionstests wie den Dexamethason-Suppressions-, Dexamethason-CRH(Corticotropin Releasing Hormon)- und CRH(Challenge)-Test.

3.3.1 Organverteilung nach subkutaner Injektion Tritium-markierter Steroide

3.3.1.1 Dexamethason (mdr1a(-/-) und FVB/N-Wildtypmäuse)

Jeweils 7 mdr1a(-/-) Knock-out-Mäusen und FVB/N-Wildtypkontrollen im Alter von 12 - 15 Wochen wurde intraperitoneal 5 ng des synthetischen Steroids [³H]-Dexamethason/g Körpergewicht injiziert. 2 Stunden danach wurden die Tiere getötet und die Radioaktivität im Plasma und den Organen bestimmt.

Signifikant und deutlich höhere Radioaktivitäten fanden sich im Cerebrum und Metenzephalon der mdr1a(-/-) Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen mit intaktem mdr1a-Gen. Eine geringere, jedoch signifikante [³H]-Dexamethason-Erhöhung fand sich in den Hoden der Mutanten. Keine Unterschiede waren zwischen den beiden Tiergruppen in den Leber-, Milz- und Nierenkonzentrationen zu ermitteln. In der Varianzanalyse (MANOVA) ergab sich ein signifikanter Gruppeneffekt [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(6,7) = 23,7$; Signifikanz von $F < 0,001$]. Zu den Signifikanzen trugen die Unterschiede der Cerebrum-, Metenzephalon- und Hodenkonzentrationen bei (Abb. 29, Tab. 24).

| Dexamethason [pg/g bzw. ml] | | | | | | |
|--|-------------|--------|-----------|--------|-------------------|-------------|
| | mdr1a (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1a (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 666,7 | 103,5 | 560,2 | 36,7 | 1,2 | ns |
| li Cerebrum | 615,5 | 89,4 | 129,0 | 11,1 | 4,8 | * |
| re Cerebrum | 622,7 | 93,1 | 126,3 | 11,6 | 4,9 | * |
| Metenzeph. | 632,6 | 98,8 | 129,6 | 12,5 | 4,9 | * |
| Milz | 704,8 | 133,2 | 531,7 | 55,1 | 1,3 | ns |
| Niere | 2726,5 | 242,5 | 2594,7 | 259,0 | 1,1 | ns |
| Leber | 30495,0 | 4808,0 | 37439,3 | 2101,9 | 0,8 | ns |
| Hoden | 654,8 | 33,9 | 310,7 | 16,4 | 2,1 | * |
| Gruppeneffekt: $F(6,7) = 23,7$; Signifikanz von $F < 0,001$ | | | | | | |

Tabelle 24: Organkonzentrationen von [³H]-Dexamethason zwei Stunden nach intraperitonealer Injektion von 5 ng [³H]-Dexamethason/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

Dexamethason

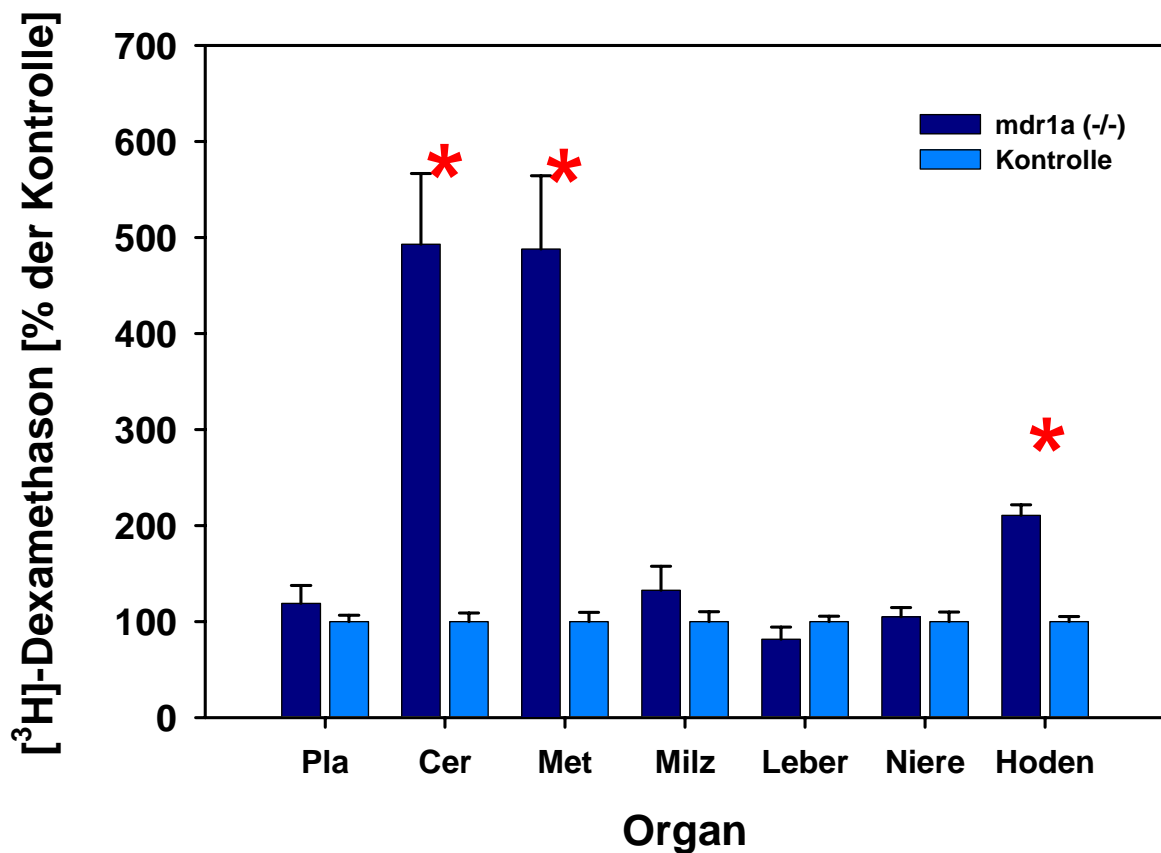


Abbildung 29: Organ- und Plasmakonzentrationen von $[^3\text{H}]$ -Dexamethason zwei Stunden nach intraperitonealer Injektion von 5 ng $[^3\text{H}]$ -Dexamethason/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

Pla = Plasma, Cer = Cerebrum, Met = Metenzephalon

3.3.1.2 Dexamethason (mdr1ab(-/-) und FVB/N-Kontrollmäuse

2 Stunden nach subkutaner Injektion von 5 ng [³H]-Dexamethason im Bereich des Nackens wurde die Radioaktivität im Plasma und den Organen gemessen. In jeder Tiergruppe wurden 8 Mäuse untersucht, die Gewichte waren in der mdr1ab(-/-) Gruppe 29,0 g ± 0,6 g, in der FVB/N-Kontrollgruppe 30,1 g ± 0,5 g. Die Mäuse wurden in einem Alter von 13 - 15 Wochen untersucht. Die [³H]-Dexamethason-Konzentrationen im Cerebrum, Metenzephalon, der Hypophyse, der Nebennieren und der Hoden unterschieden sich signifikant zwischen den Mutanten und Wildtypmäusen. Die Unterschiede waren im Gehirn am größten, so konnte 4,5 bis 5mal soviel Tritium-markiertes Dexamethason im Cerebrum und Metenzephalon der Mutanten nachgewiesen werden. Die Konzentrationsunterschiede zwischen den Mausgruppen stellen sich in der Hypophyse mit einer Ratio von 1,4 sehr gering dar und erreichen knapp das Signifikanzniveau. In den Nebennieren fand sich die 2,3fache Radioaktivität in den mdr1ab(-/-) Mäusen, verglichen mit den Kontrollen. Auch in den Hoden der Mutanten finden sich signifikant erhöhte [³H]-Dexamethason-Konzentrationen.

Die Varianzanalyse erbrachte signifikante Gruppeneffekte der [³H]-Dexamethason-Konzentrationen [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: F (11,4) = 41,7; Signifikanz von F = 0,001] (siehe Tab. 25, Abb. 30).

| Dexamethason [pg/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|------------|------------------|------------|---------------------------|--------------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 890,4 | 40,3 | 770,3 | 56,6 | 1,2 | ns |
| Cerebrum | 750,8 | 53,1 | 162,2 | 8,2 | 4,6 | * |
| Metenzeph. | 795,2 | 57,0 | 160,2 | 7,6 | 5,0 | * |
| Hypophyse | 1392,9 | 88,6 | 965,3 | 79,4 | 1,4 | * |
| Milz | 2055,4 | 355,1 | 1210,1 | 98,7 | 1,7 | ns |
| Niere | 3228,3 | 207,3 | 3027,9 | 218,4 | 1,1 | ns |
| Nebenniere | 1614,4 | 198,6 | 688,6 | 61,1 | 2,3 | * |
| Leber | 49583,0 | 2640,0 | 47870,6 | 2107,6 | 1,0 | ns |
| Hoden | 1052,9 | 79,7 | 537,8 | 52,6 | 2,0 | * |
| Fett | 507,3 | 59,7 | 428,8 | 42,6 | 1,2 | ns |
| Muskel | 744,8 | 68,4 | 516,7 | 41,8 | 1,4 | ns |
| Gruppeneffekt: F(11,4) = 41,7; Signifikanz von F = 0,001 | | | | | | |

Tabelle 25: Organkonzentrationen von [³H]-Dexamethason zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 5 ng [³H]-Dexamethason/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Dexamethason

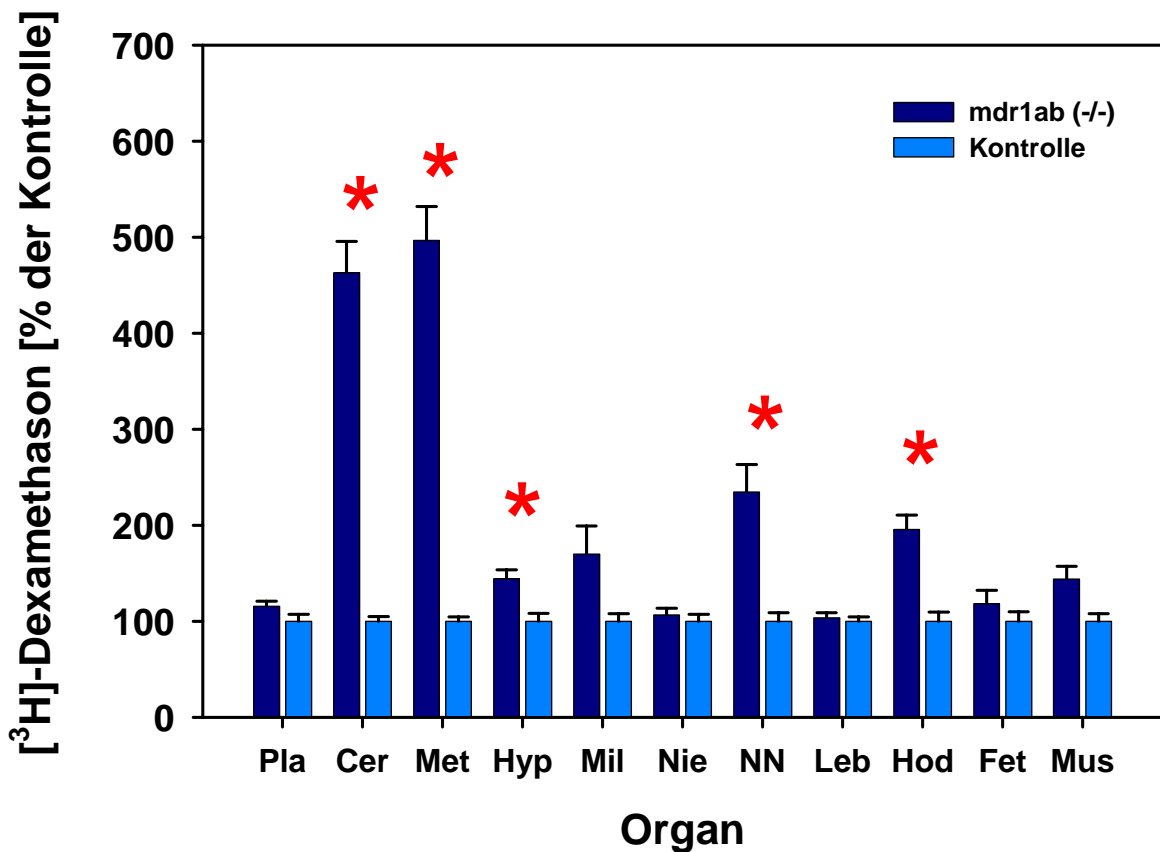


Abbildung 30: Organ- und Plasmakonzentrationen von [³H]-Dexamethason zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 5 ng [³H]-Dexamethason/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

Pla = Plasma, Cer = Cerebrum, Met = Metenzephalon, Hyp = Hypophyse, Mil = Milz, Nie = Niere, Nn = Nebenniere, Leb = Leber, Hod = Hoden, Fet = Fett, Mus = Muskel

3.3.1.3 Progesteron

2 Stunden nach subkutaner Injektion von 1,7 ng [³H]-Progesteron/g Körpergewicht fanden sich nur kleine, jedoch signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen Radioaktivitäten in den Gehirnen und Hoden der *mdr1ab(-/-)* Mutanten und der Kontrollmausgruppe (Abb. 31). In den Gehirnen der Mutanten war die [³H]-Progesteron-Konzentration ca. 20% höher als in den Kontrollen. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich für die Plasma-, Milz-, Nebennieren-, Leber- und Hypophysengruppenvergleiche. Die Varianzanalyse erbrachte einen signifikanten Gruppeneffekt der [³H]-Progesteron-Konzentration [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: F(7,6) = 5,8; Signifikanz von F = 0,024].

In diesem Versuch wurden in jeder Tiergruppe 7 männliche Tiere in einem Alter von 28 bis 32 Wochen verwendet. Die Körpergewichte betragen 33,2 g ± 0,5 g und 31,5 g ± 1,0 g für die *mdr1ab(-/-)* und die Kontrollmäuse.

| Progesteron [pg/g bzw. ml] | | | | | | |
|--|---------------------|-------|-----------|-------|---------------------------|-------------|
| | <i>mdr1ab (-/-)</i> | SEM | Kontrolle | SEM | <i>mdr1ab (-/-)/(+/+)</i> | Signifikanz |
| Plasma | 726,9 | 37,1 | 687,1 | 26,2 | 1,1 | ns |
| Hirn | 581,5 | 18,8 | 466,4 | 22,0 | 1,2 | * |
| Milz | 616,6 | 15,7 | 599,4 | 18,3 | 1,0 | ns |
| Nebenniere | 1983,8 | 204,9 | 1710,9 | 136,3 | 1,2 | ns |
| Leber | 8271,8 | 562,1 | 8082,8 | 524,7 | 1,0 | ns |
| Hoden | 955,1 | 48,9 | 793,4 | 30,9 | 1,2 | * |
| Hypophyse | 740,0 | 57,2 | 681,1 | 40,8 | 1,1 | ns |
| Gruppeneffekt: F(7,6) = 5,8; Signifikanz von F = 0,024 | | | | | | |

Tabelle 26: Organkonzentrationen von [³H]-Progesteron zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,7 ng [³H]-Progesteron/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Progesteron

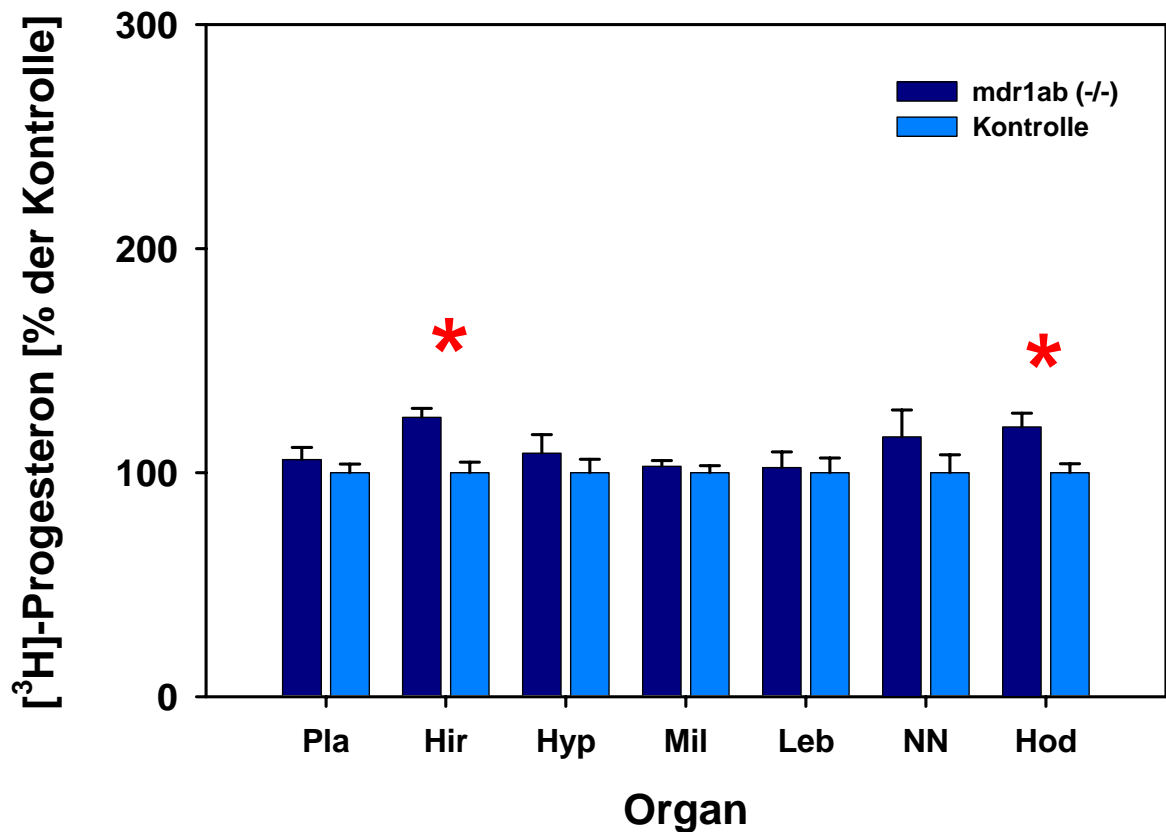


Abbildung 31: Organ- und Plasmakonzentrationen von [³H]-Progesteron zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,7 ng [³H]-Progesteron/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

3.3.1.4 Aldosteron

Die Gruppengröße der Versuchstiere war 7 männliche Mäuse im Alter von 31 bis 35 Wochen (Gewichte: *mdr1ab*(-/-): 35,8 g ± 0,9 g; *mdr1ab*(+/+) 30,8 g ± 1 g). 2 Stunden nach subkutaner Injektion von 1,7 ng [³H]-Aldosteron/g Körpergewicht konnte signifikant mehr Tritium-markiertes Aldosteron in den Gehirnen und den Hoden der Mutanten, verglichen mit den Wildtypen, nachgewiesen werden (Abb. 32). Das Verhältnis *mdr1ab*(-/-) zu *mdr1ab*(+/+) war für das Gehirn 1,7 und für die Hoden 1,4. Im multivariaten Signifikanztest zeigten sich signifikante Gruppeneffekte für die [³H]-Aldosteron-Konzentrationen [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: F (7,6) = 8,3; Signifikanz von F = 0,01] (siehe Tab. 27). Keine signifikanten Unterschiede fanden sich für die Plasma-, Hypophysen-, Milz-, Leber- und Nebennieren-konzentrationen.

| Aldosteron [pg/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|-------|-----------|-------|---------------------------|-------------|
| | <i>mdr1ab</i> (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | <i>mdr1ab</i> (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 473,8 | 33,0 | 405,6 | 27,5 | 1,2 | ns |
| Hirn | 205,3 | 18,1 | 123,9 | 7,4 | 1,7 | * |
| Milz | 324,9 | 22,3 | 292,3 | 35,9 | 1,1 | ns |
| Nebenniere | 415,3 | 127,7 | 395,8 | 57,2 | 1,0 | ns |
| Leber | 10657,8 | 638,6 | 9168,7 | 806,5 | 1,2 | ns |
| Hoden | 519,4 | 35,4 | 371,4 | 20,8 | 1,4 | * |
| Hypophyse | 260,0 | 21,0 | 251,3 | 18,7 | 1,0 | ns |
| Gruppeneffekt: F(7,6) = 8,3; Signifikanz von F = 0,01 | | | | | | |

Tabelle 27: Organkonzentrationen von [³H]-Aldosteron zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,7 ng [³H]-Aldosteron/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Aldosteron

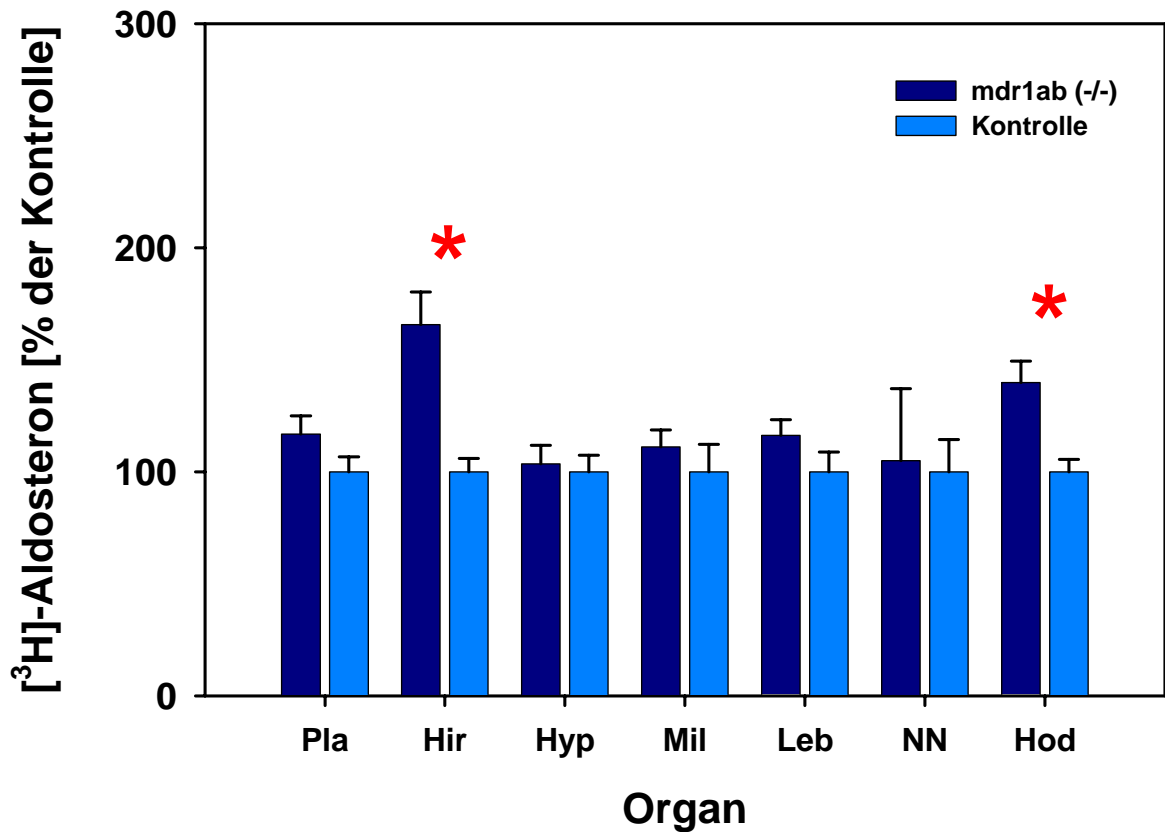


Abbildung 32: Organ- und Plasmakonzentrationen von $[^3\text{H}]$ -Aldosteron zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,7 ng $[^3\text{H}]$ -Aldosteron/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

3.3.1.5 Corticosteron

2 Stunden nach subkutaner Injektion von 1,6 ng [³H]-Corticosteron/g Körpergewicht fanden sich signifikante Gruppeneffekte der [³H]-Corticosteron-Konzentration in der Varianzanalyse (MANOVA) [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: F (7,6) = 4,7; Signifikanz von F = 0,04]. Verantwortlich für die Entwicklung der Signifikanzen waren die Konzentrationen im Gehirn und den Nebennieren. In den Gehirnen der mdr1ab(-/-) Knock-out-Mutanten konnte doppelt so viel Radioaktivität wie in den Gehirnen der Wildtyp-FVB/N-Mäuse nachgewiesen werden. 1,4- bzw. 1,5fach höhere Konzentration des Tritium-markierten Corticosterons war in den Nebennieren bzw. Hoden der Mutanten. Signifikant unterscheiden sich lediglich die Nebennierenkonzentrationen (Tab. 28). Die Tierversuchsgruppenstärke war 7 männliche Mäuse im Alter von 27 bis 32 Wochen mit den Körpergewichten 33,0 g ± 1,1 g und 31,9 g ± 1,5 g für die mdr1ab(-/-) und mdr1ab(+/+) Mäuse.

| Corticosteron [pg/g bzw. ml] | | | | | | |
|--|---------------------|------------|------------------|------------|---------------------------|--------------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 536,8 | 42,3 | 477,6 | 14,2 | 1,1 | ns |
| Hirn | 298,3 | 27,4 | 148,0 | 13,8 | 2,0 | * |
| Milz | 277,5 | 19,7 | 245,2 | 16,1 | 1,1 | ns |
| Nebenniere | 684,4 | 65,4 | 483,8 | 53,1 | 1,4 | * |
| Leber | 8007,4 | 747,0 | 9055,5 | 667,1 | 0,9 | ns |
| Hoden | 637,4 | 97,0 | 432,0 | 38,7 | 1,5 | ns |
| Hypophyse | 279,6 | 29,5 | 224,5 | 13,3 | 1,2 | ns |
| Gruppeneffekt: F(7,6) = 4,7; Signifikanz von F = 0,04 | | | | | | |

Tabelle 28: Organkonzentrationen von [³H]-Corticosteron zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,6 ng [³H]-Corticosteron/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Corticosteron

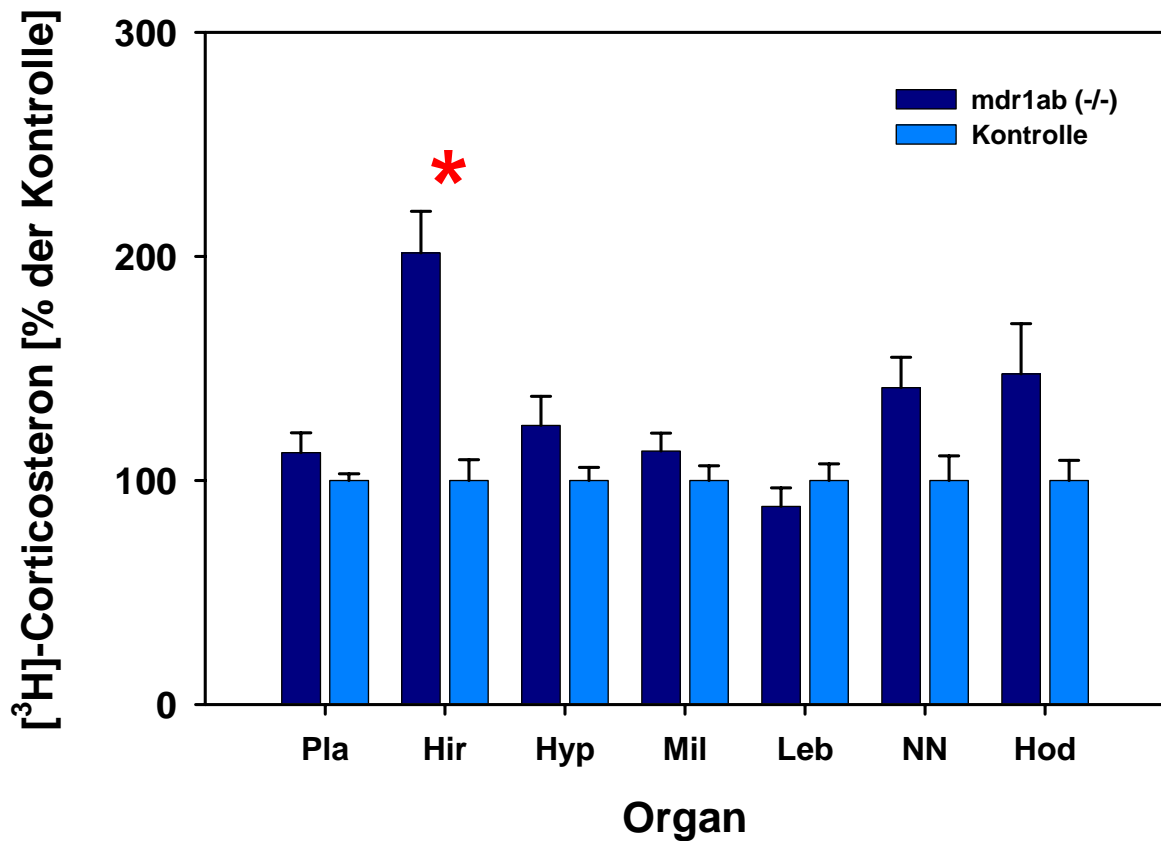


Abbildung 33: Organ- und Plasmakonzentrationen von $[^3\text{H}]$ -Corticosteron zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,6 ng $[^3\text{H}]$ -Corticosteron/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte $\pm \text{SEM}$ dar.

3.3.1.6 **Hydrocortison** (Cortisol)

Die [³H]-Cortisol-Konzentrationen in Plasma, Hirn, Milz, Hoden und Hypophyse differierten zwischen den *mdr1ab*(-/-) Mutanten und den Wildtypkontrollen 2 Stunden nach subkutaner Injektion von 1,7 ng [³H]-Hydrocortison/g Körpergewicht. Die Gruppengröße der männlichen Tiere war 7. Sie waren in einem Alter von 29 bis 34 Wochen. Die Gewichte waren 34,5 g ± 1,5 g und 32,4 g ± 0,9 g für die Mutanten und Kontrollen.

In den Gehirnen der Mutanten wurden die [³H]-Cortisol-Konzentrationen 4,6mal höher als in den Gehirnen der Wildtyp-Mutanten mit intaktem P-Glykoprotein gemessen. Wesentlich kleinere Konzentrationsunterschiede ergaben sich für die Hoden, Hypophyse, Milz, und Plasma. In der statistischen Analyse zeigten sich Gruppeneffekte für die [³H]-Cortisol-Konzentrationen [Wilks multivariater Signifikanz-test; Effekt der Gruppe: F (7,6) = 58,6; Signifikanz von F < 0,001].

Betrachtet man die [³H]-Cortisol-Konzentrationen als Covariate in der statistischen Analyse, so ergeben sich ebenfalls signifikante Gruppeneffekte [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: F (6,6) = 30,3; Signifikanz von F < 0,001]. An der Signifikanzentwicklung tragen unter Verwendung der Cortisol-Plasmakonzentrationen als Covariate lediglich die Hirn- und Hodenkonzentrationen bei. Für die Versuche wurden pro Gruppe 7 männliche Tiere verwendet, die ein Alter von 29 bis 31 Wochen hatten. Die Körpergewichte lagen bei 34,5 g ± 1,5 g und 32,4 g ± 0,9 g für die *mdr1ab*(-/-) und die *mdr1ab*(+/+) Mäuse.

| Hydrocortisol [pg/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|---------------------|-------|-----------|-------|---------------------------|-------------|
| | <i>mdr1ab</i> (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | <i>mdr1ab</i> (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 882,2 | 51,4 | 645,1 | 34,8 | 1,4 | * |
| Hirn | 535,7 | 24,3 | 116,6 | 5,5 | 4,6 | * |
| Milz | 541,6 | 28,8 | 436,1 | 27,3 | 1,2 | * |
| Nebenniere | 1243,4 | 211,7 | 773,4 | 68,4 | 1,6 | ns |
| Leber | 10899,4 | 480,5 | 10257,3 | 746,9 | 1,1 | ns |
| Hoden | 620,8 | 58,6 | 355,3 | 18,6 | 1,7 | * |
| Hypophyse | 779,0 | 66,3 | 569,1 | 45,3 | 1,4 | * |
| Gruppeneffekt: F(7,6) = 58,6; Signifikanz von F < 0,001 | | | | | | |

Tabelle 29: Organkonzentrationen von [^3H]-Hydrocortison zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,7 ng [^3H]-Hydrocortison/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte \pm SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant.

Hydrocortison

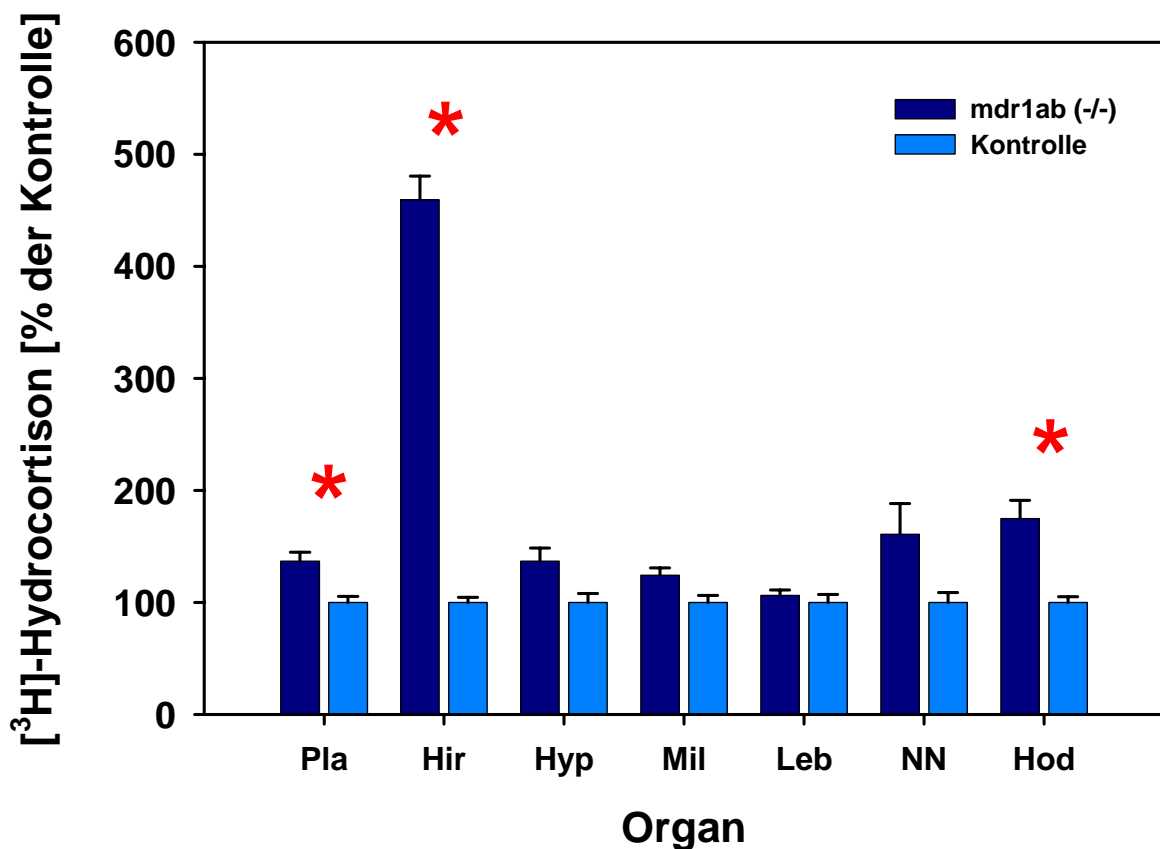


Abbildung 34: Organ- und Plasmakonzentrationen von [^3H]-Hydrocortison zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,7 ng [^3H]-Hydrocortison/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value $< 0,05$). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

3.3.1.7 Östradiol

2 Stunden nach der Injektion von 1,6 ng [³H]-Östradiol/g Körpergewicht zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Plasma und den Organen zwischen den beiden Versuchstiergruppen (Tab. 30, Abb. 35). Die Varianzanalyse erbrachte keinen signifikanten Gruppeneffekt der [³H]-Östradiol-Konzentrationen für Plasma, Hirn, Milz, Nebennieren, Nieren, Leber, Hoden und Hypophyse. Die Gewichte der mdr1ab (-/-) und Kontrollmäuse waren 31,5 ± 1,3 g und 31,7 ± 1,3 g.

| Östradiol [pg/g bzw. ml] | | | | | | |
|---|--------------|-------|-----------|-------|--------------------|-------------|
| | mdr1ab (-/-) | SEM | Kontrolle | SEM | mdr1ab (-/-)/(+/+) | Signifikanz |
| Plasma | 571,2 | 71,8 | 615,4 | 68,6 | 0,9 | ns |
| Hirn | 418,4 | 22,3 | 466,3 | 16,4 | 0,9 | ns |
| Milz | 428,5 | 41,4 | 452,3 | 18,0 | 0,9 | ns |
| Nebenniere | 521,3 | 62,3 | 523,7 | 18,7 | 1,0 | ns |
| Niere | 440,8 | 12,5 | 443,1 | 15,0 | 1,0 | ns |
| Leber | 1388,1 | 109,7 | 1864,2 | 140,2 | 0,7 | ns |
| Hoden | 611,0 | 34,6 | 698,5 | 23,0 | 0,9 | ns |
| Hypophyse | 2052,3 | 188,4 | 1912,4 | 171,8 | 1,1 | ns |
| Gruppeneffekt: F(8,5) = 1,0; Signifikanz von F = 0,54 | | | | | | |

Tabelle 30: Organkonzentrationen von [³H]-Östradiol zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,6 ng [³H]-Östradiol/g Körpergewicht. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in ng/g Feuchtgewicht für die Organe und ng/ml für das Plasma angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant.

Östradiol

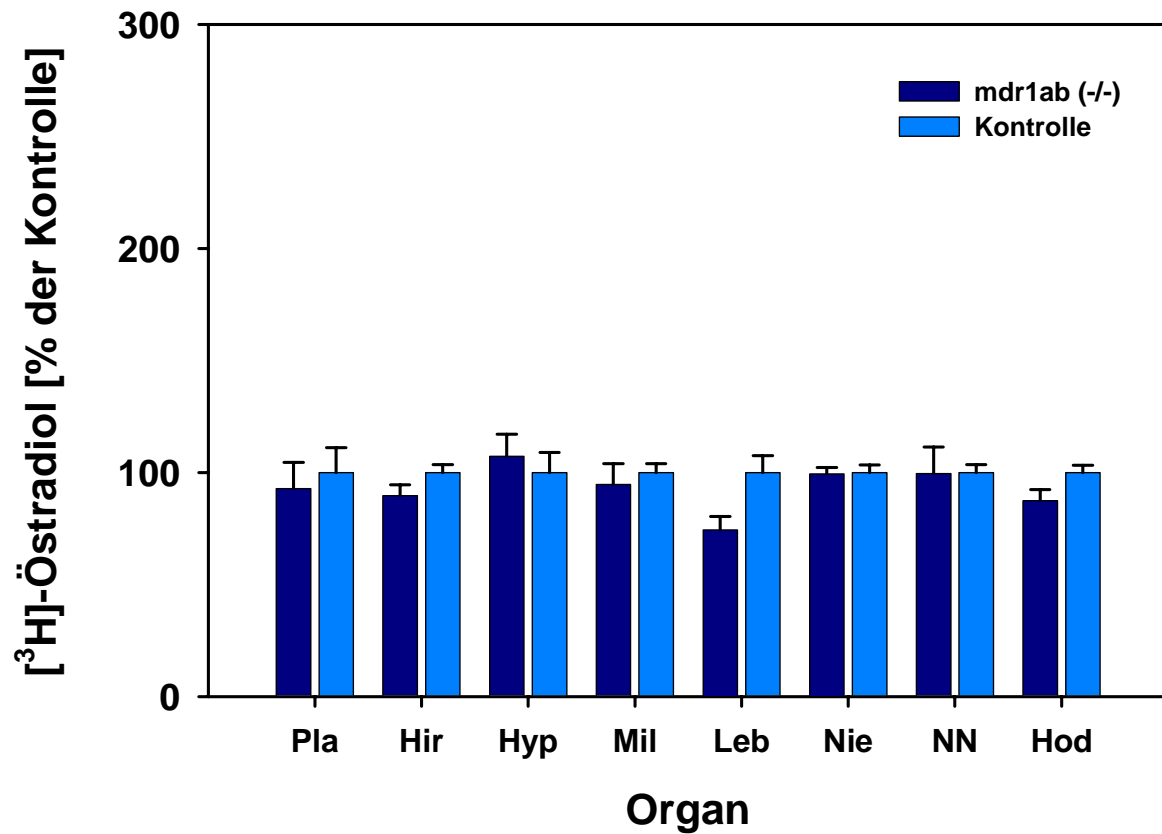


Abbildung 35: Organ- und Plasmakonzentrationen von [³H]-Östradiol zwei Stunden nach subkutaner Injektion von 1,6 ng [³H]-Östradiol/g Körpergewicht, dargestellt in % der Kontrolle. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (univariater F-Test in MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte ± SEM dar.

3.3.2 Plasma ACTH, Corticosteron und AVP unter Basal- und Stressbedingungen im mdr1ab(-/-) und FVB/N-Kontrollmäusen

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde den mdr1ab Mutanten und FVB/N-Kontrollen retroorbital Blut entnommen und die ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen im Radioimmunoassay bestimmt. Es wurde erstens unter „basalen“ Versuchsbedingungen abgenommen. Dies heißt, dass die Mäuse einzeln in Käfigen sitzend, mehrere Tage unter stressfreien Bedingungen gehalten wurden und dann morgens Blut entnommen wurde. Den gleichen Mäusen wurde nach 14 Tagen stressfreier Umgebung nach Stress ebenfalls retroorbital venöses Blut abgenommen. Am Morgen des Versuchstags wurden sie in den 5 min dauernden forced-swim-Test eingesetzt (siehe Methodenteil). Nach einer zeitlichen Latenz von 5 Minuten wurde das Blut entnommen und im RIA ACTH und Corticosteron sowie AVP bestimmt. Die mdr1ab (-/-) und Kontrollmäuse waren im Alter von 20 – 24 Wochen. In jeder Versuchsgruppe wurden 10 mdr1ab (-/-) und 10 mdr1ab (+/+) Tiere untersucht.

Die Varianzanalyse mit Meßwiederholungen erbrachten einen signifikanten Gruppeneffekt der Plasmakonzentrationen von ACTH [Effekt der Gruppe: $F(1,17) = 25,2$; Signifikanz von $F < 0,001$]. Signifikante Unterschiede zwischen Basal- und Stressbedingungen bestanden für die ACTH, Corticosteron und AVP Konzentrationen (Tabelle 31).

| | mdr1ab (-/-) | | | | Kontrollen, mdr1ab (+/+) | | | | Signifikanz | |
|---|---------------|-------|--------------|-------|--------------------------|-------|---------------|-------|-------------|---------|
| | Basal | | Stress | | Basal | | Stress | | Gruppe | Bas/Str |
| | [pg/ml] | SEM | [pg/ml] | SEM | [pg/ml] | SEM | [pg/ml] | SEM | | |
| ACTH | 151,9 | 26,7 | 684,4 | 57,2 | 274,1 | 45,1 | 1090,2 | 60,8 | * | * |
| Corticosteron | 9,4 | 3,5 | 88,2 | 6,0 | 6,2 | 1,4 | 103,8 | 6,2 | ns | * |
| AVP | 2017,9 | 187,7 | 851,5 | 134,2 | 1924,6 | 223,6 | 1370,2 | 228,1 | ns | * |
| Gruppeneffekt für ACTH: $F(1,17) = 25,2$; Signifikanz von $F < 0,001$ | | | | | | | | | | |
| Gruppeneffekt für Corticosteron: $F(1,17) = 1,4$; Signifikanz von $F = 0,25$ | | | | | | | | | | |
| Gruppeneffekt für AVP: $F(1,17) = 1,2$; Signifikanz von $F = 0,28$ | | | | | | | | | | |
| Basal-Stresseffekt für ACTH [Greenhouse-Geisser] $F(1,17) = 196$; Signifikanz von $F < 0,001$ | | | | | | | | | | |
| Basal-Stresseffekt für Corticosteron [Greenhouse-G.] $F(1,17) = 539$; Signifikanz von $F < 0,001$ | | | | | | | | | | |
| Basal-Stresseffekt für AVP [Greenhouse-G.] $F(1,17) = 15,6$; Signifikanz von $F = 0,001$ | | | | | | | | | | |
| Basal-Stress * Gruppeneffekt für ACTH [Greenh.-G] $F(1,17) = 6,7$; Signifikanz von $F = 0,019$ | | | | | | | | | | |
| Basal-Stress * Gruppeneffekt für Corticost. [Greenh.-G] $F(1,17) = 7,9$; Signifikanz von $F = 0,012$ | | | | | | | | | | |
| Basal-Stress * Gruppeneffekt für AVP. [Greenh.-G] $F(1,17) = 1,6$; Signifikanz von $F = 0,23$ | | | | | | | | | | |

Tabelle 31: ACTH, Corticosteron und AVP Plasmakonzentrationen unter Basal- und Stressbedingungen. Werte sind Mittelwerte \pm SEM und werden in pg/ml für die Plasmakonzentrationen angegeben. * = signifikante Differenz ($p < 0,05$); n.s. = nicht signifikant (Varianzanalyse mit Meßwiederholungen)

ACTH in *mdr1ab* (-/-) und FVB/N Kontrollen

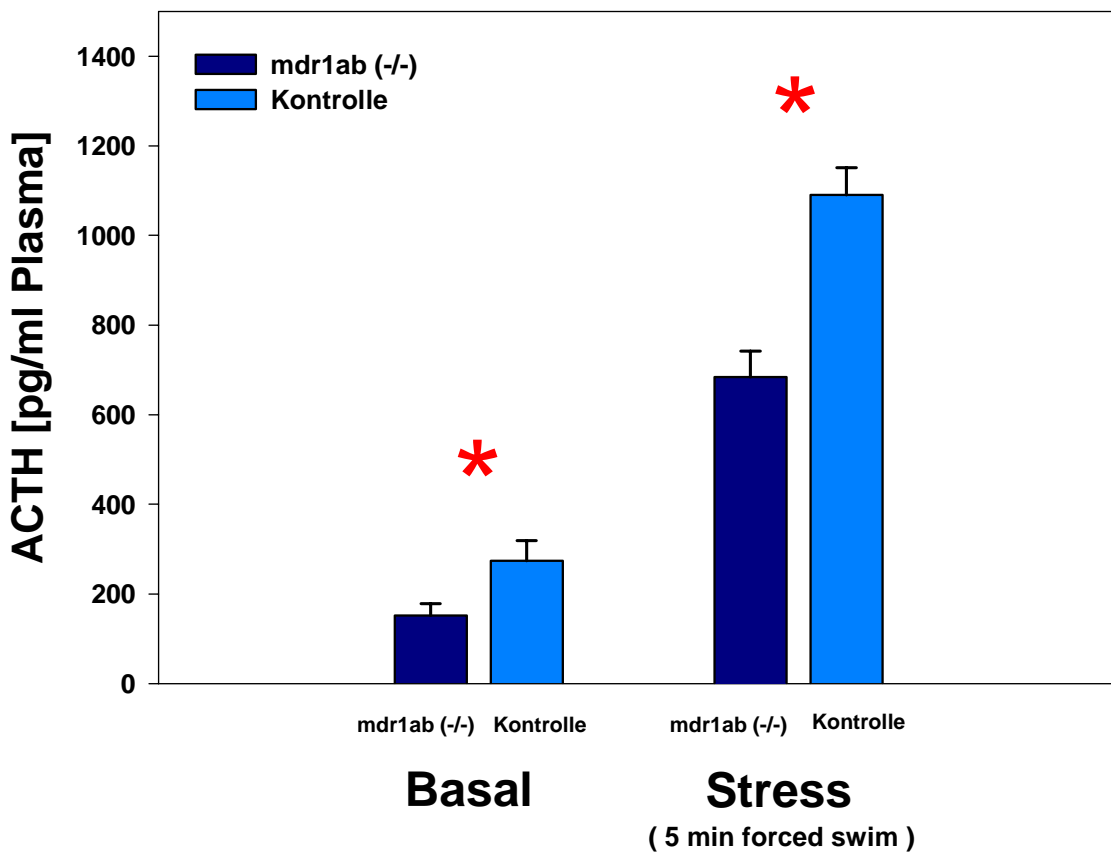


Abbildung 36: ACTH Plasmakonzentrationen unter Basal und Stressbedingungen. Es sind die ACTH-plasmakonzentrationen in pg/ml dargestellt. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (p -Value $< 0,05$). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

Corticosterone in *mdr1ab*(-/-) und FVB Kontrollen

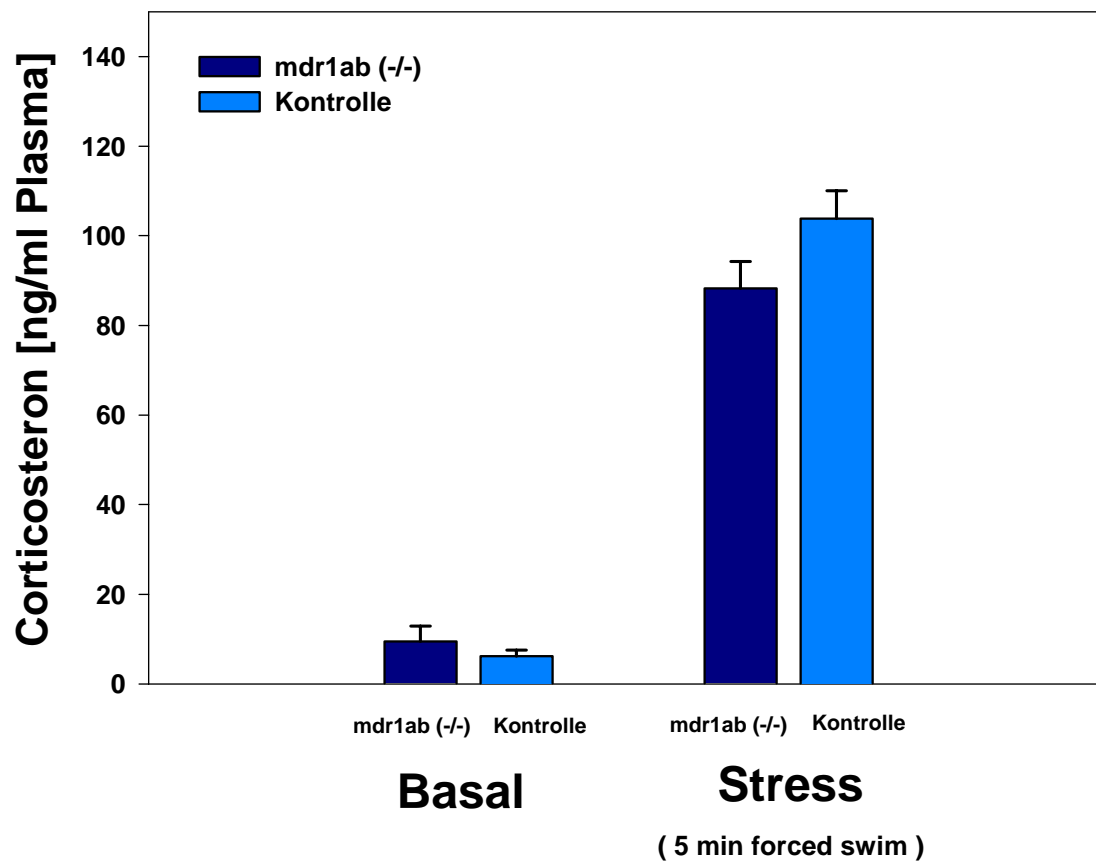


Abbildung 37: Corticosteron Plasmakonzentrationen unter Basal und Stressbedingungen. Es sind die Corticosteronplasmakonzentrationen in ng/ml dargestellt. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

AVP in *mdr1ab*(-/-) und FVB Kontrollen

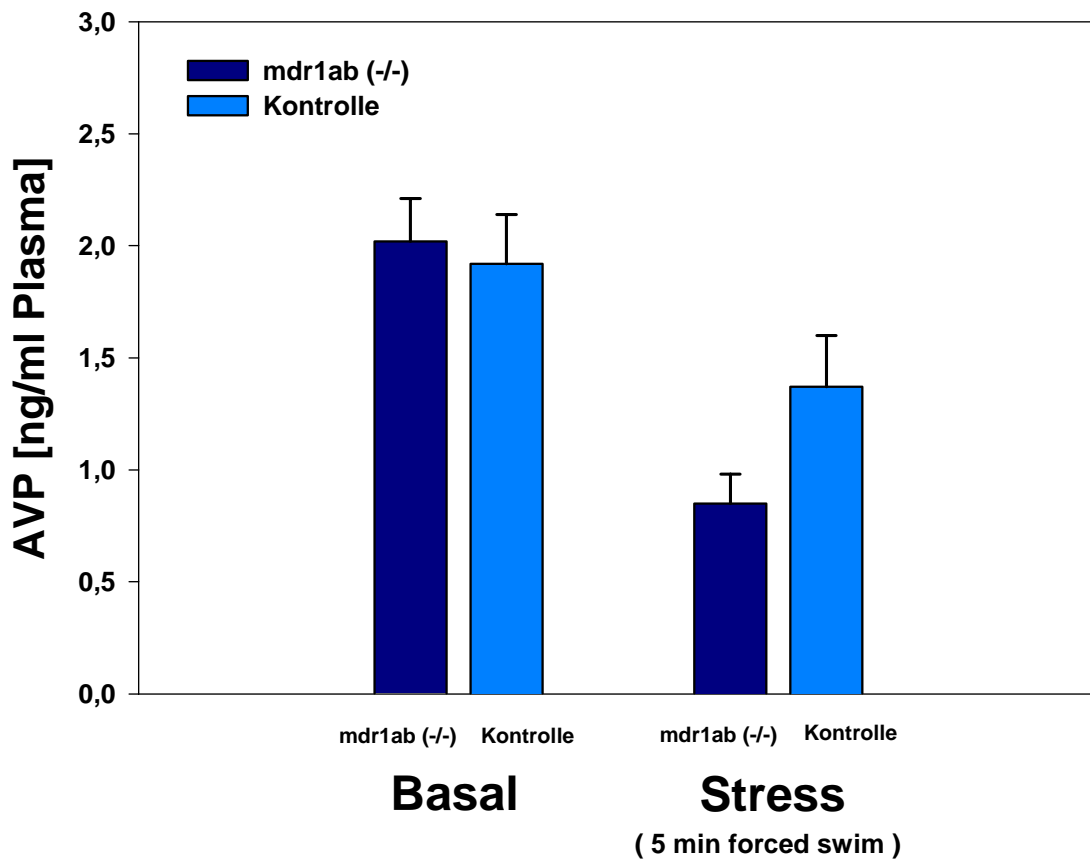


Abbildung 38: AVP Plasmakonzentrationen unter Basal und Stressbedingungen. Es sind die AVPplasmakonzentrationen in ng/ml dargestellt. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (p -Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

3.3.3 Dexamethason-Suppressionstest

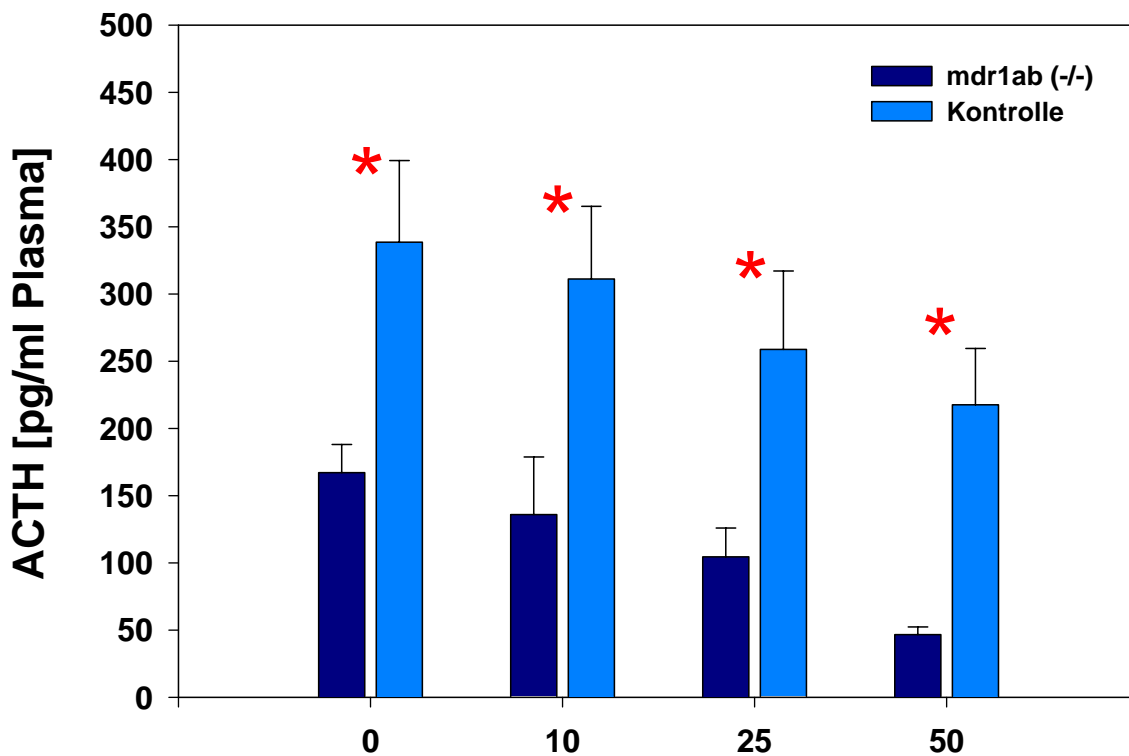
Einzel sitzenden und in den Tagen vor Stressbedingung abgeschirmten Mäusen wurde morgens um 8.00 Uhr subkutan Dexamethason in den Konzentrationen 10, 25, 50 ng/g Körpergewicht bzw. NaCl injiziert. Die Tiere blieben dann bis 14.00 Uhr unter stressfreien Bedingungen in ihren Käfigen und wurden nach Halothan-Narkose dekapitiert. Aus dem gewonnenen Plasma wurden die ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen gemessen. Pro Dexamethason-Konzentration und Versuchstiergruppe wurden 7 Mäuse verwandt. Die Mäuse waren in einem Alter von 13 - 16 Wochen mit den Gewichten in der *mdr1ab* Gruppe von $29,1 \text{ g} \pm 0,7 \text{ g}$ und der Kontrollgruppe von $28,9 \text{ g} \pm 0,7 \text{ g}$. Mit zunehmender injizierter Dexamethason-Menge nahmen die gemessenen Corticosteron-Konzentrationen und ACTH-Konzentrationen in den *mdr1ab*(-/-) und den *mdr1ab*(+/+) Mäusen ab (Abb. 39 und 40). Der durch das Dexamethason erfolgte supprimierende Effekt auf die Corticosteron-Konzentrationen im Plasma war nach einer Injektion von 25 ng/g Körpergewicht zwischen beiden Tiergruppen signifikant unterschiedlich.

Deutlich signifikante Unterschiede zwischen beiden Tierversuchsgruppen ergeben die Messergebnisse der Plasma-ACTH-Konzentrationen. Nach jeder injizierten Dexamethason- sowie auch nach Vehikel-Injektion waren die ACTH-Konzentrationen in den Knock-out-Mäusen signifikant niedriger (Abb. 39). Unter allen Versuchsbedingungen waren die ACTH-Plasma-Konzentrationen in den Knock-out-Mutanten weniger als 50% der Kontrollmäuse.

Die Varianzanalyse (MANOVA) erbrachte einen signifikanten Gruppeneffekt der ACTH und Corticosteron Plasmakonzentrationen [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Gruppe: $F(2,47) = 21,9$; Signifikanz von $F < 0,001$]. Verantwortlich für die Signifikanzen waren die ACTH und die Corticosteron Plasmakonzentrationen.

Signifikante Dosiseffekte erbrachte die Varianzanalyse [Wilks multivariater Signifikanztest; Effekt der Dosis: $F(6,94) = 5,2$; Signifikanz von $F < 0,001$]. Verantwortlich für die Signifikanzen waren die ACTH und die Corticosteron Werte.

Dexamethason Suppressions Test



s.c. Injektion von Dexamethason [ng/g Körpergewicht]

(s.c. Injektion 08:00; Blutgewinnung 14:00)

Abbildung 39: ACTH im Plasma nach Dexamethason-Suppressionstest.

ACTH Plasmakonzentrationen nach subkutaner Injektion von 0, 10, 25, 50 ng Dexamethason/g Körpergewicht um 8:00 Uhr und Blutgewinnung um 14:00 Uhr. Dargestellt in pg/ml Plasma. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

Dexamethason Suppressions Test

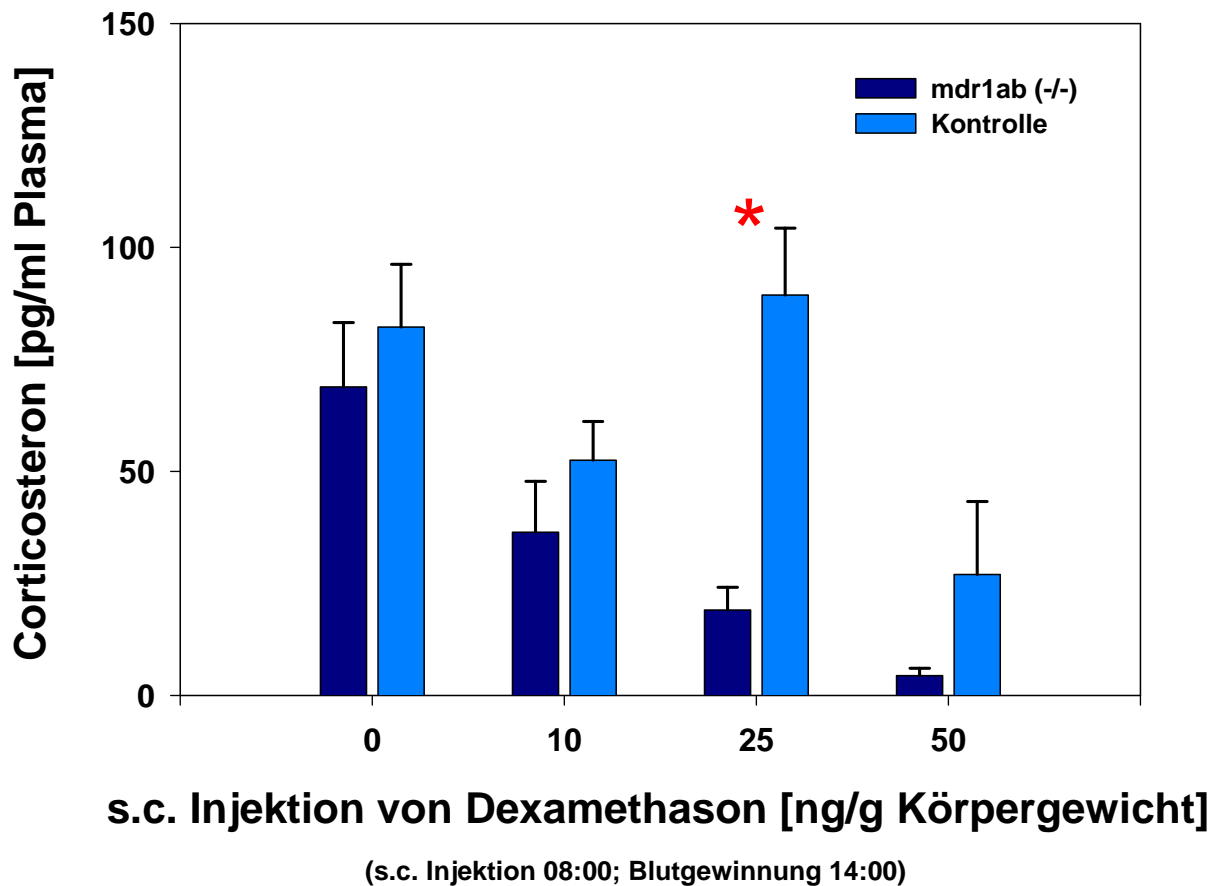


Abbildung 40: Corticosteron im Plasma nach Dexamethason-Suppressionstest.

Corticosteron Plasmakonzentrationen nach subkutaner Injektion von 0, 10, 25, 50 ng Dexamethason/g Körpergewicht um 8:00 Uhr und Blutgewinnung um 14:00 Uhr. Dargestellt in ng/ml Plasma. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (MANOVA, p-Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

3.3.4 Dexamethason-CRH-Test

Wie im Methodenteil beschrieben, wurde *mdr1ab* und Kontrollmäusen morgens um 8.00 Uhr 25 ng Dexamethason/g Körpergewicht injiziert. Die Tiere blieben dann, wie die Tage zuvor, alleine im Käfig sitzend in stressfreier Umgebung, bis ihnen dann mittags um 14:00 Uhr 5, 10 oder 20 ng CRH/g Körpergewicht oder NaCl als Vehikel-Lösung subcutan injiziert wurde. 30 min danach wurde ihnen retroorbital Blut entnommen und die ACTH- und Corticosteron-Plasma-Konzentrationen gemessen. Jede Maus wurde in den vier Untersuchungen eingesetzt und erhielt somit jede CRH-Dosis. Zwischen den Experimenten lagen mindestens 14 Tage die die Mäuse in Stressfreier Umgebung verbrachten.

| | | <i>mdr1ab</i> (-/-) | | <i>mdr1ab</i> (+/+) | |
|---|---------------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| | CRH [ng/g KG] | Mittelwert | SEM | Mittelwert | SEM |
| Corticosteron [ng/ml] | 0,0 | 27,8 | 11,3 | 60,7 | 16,3 |
| | 5,0 | 153,4 | 11,2 | 187,3 | 21,0 |
| | 10,0 | 145,0 | 11,1 | 174,9 | 17,1 |
| | 20,0 | 160,4 | 10,5 | 185,4 | 12,2 |
| ACTH [pg/ml] | 0,0 | 247,4 | 104,1 | 326,8 | 79,3 |
| | 5,0 | 2569,0 | 310,9 | 2614,7 | 349,4 |
| | 10,0 | 2212,8 | 212,8 | 3125,2 | 366,4 |
| | 20,0 | 2935,0 | 227,6 | 3509,5 | 238,7 |
| Gruppeneffekt für ACTH: F(1,18) = 3,24; Signifikanz von F = 0,09 | | | | | |
| Gruppeneffekt für Corticosteron: F(1,18) = 6,2; Signifikanz von F = 0,023 | | | | | |
| CRH-Dosiseffekt für ACTH [Greenhouse-Geisser] F(2,7,48) = 67,8; Signifikanz von F < 0,001 | | | | | |
| CRH-Dosiseffekt für Corticosteron [Greenhouse-G.] F(2,36) = 49; Signifikanz von F < 0,001 | | | | | |
| CRH-Dosis * Gruppeneffekt für ACTH [Greenh.-G] F(2,7,48) = 1,7; Signifikanz von F = 0,176 | | | | | |
| CRH-Dosis * Gruppeneffekt für Corticost. [Greenh.-G] F(2,36) = 0,51; Signifikanz von F = 0,956 | | | | | |

Tabelle 32: Dexamethason CRH-Test. ACTH, und Corticosteron Plasmakonzentrationen sind in Abhängigkeit von der eingesetzten CRH-Konzentration im Dexamethason-CRH-Test dargestellt. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in pg/ml für die ACTH und ng/ml für die Corticosteron Plasmakonzentrationen angegeben (Die statischen Auswertedaten der Gruppeneffeneffekte, CRH-Dosiseffekte und deren Kombination der Varianzanalyse mit Meßwiederholungen sind dargestellt.)

Die statistische Auswertung erbringt einen signifikanten Gruppeneffekt für die Corticosteronplasmakonzentrationen. Nach Injektion von Vehikel (NaCl) waren die Corticosteronkonzentrationen in den *mdr1ab*(-/-) Mäusen $27,8 \pm 11,3$ und in den Kontrollen $60,7 \pm 16,3$ ng/ml Plasma. Einen CRH-Dosiseffekt gab es sowohl für die ACTH wie die Corticosteronkonzentrationen.

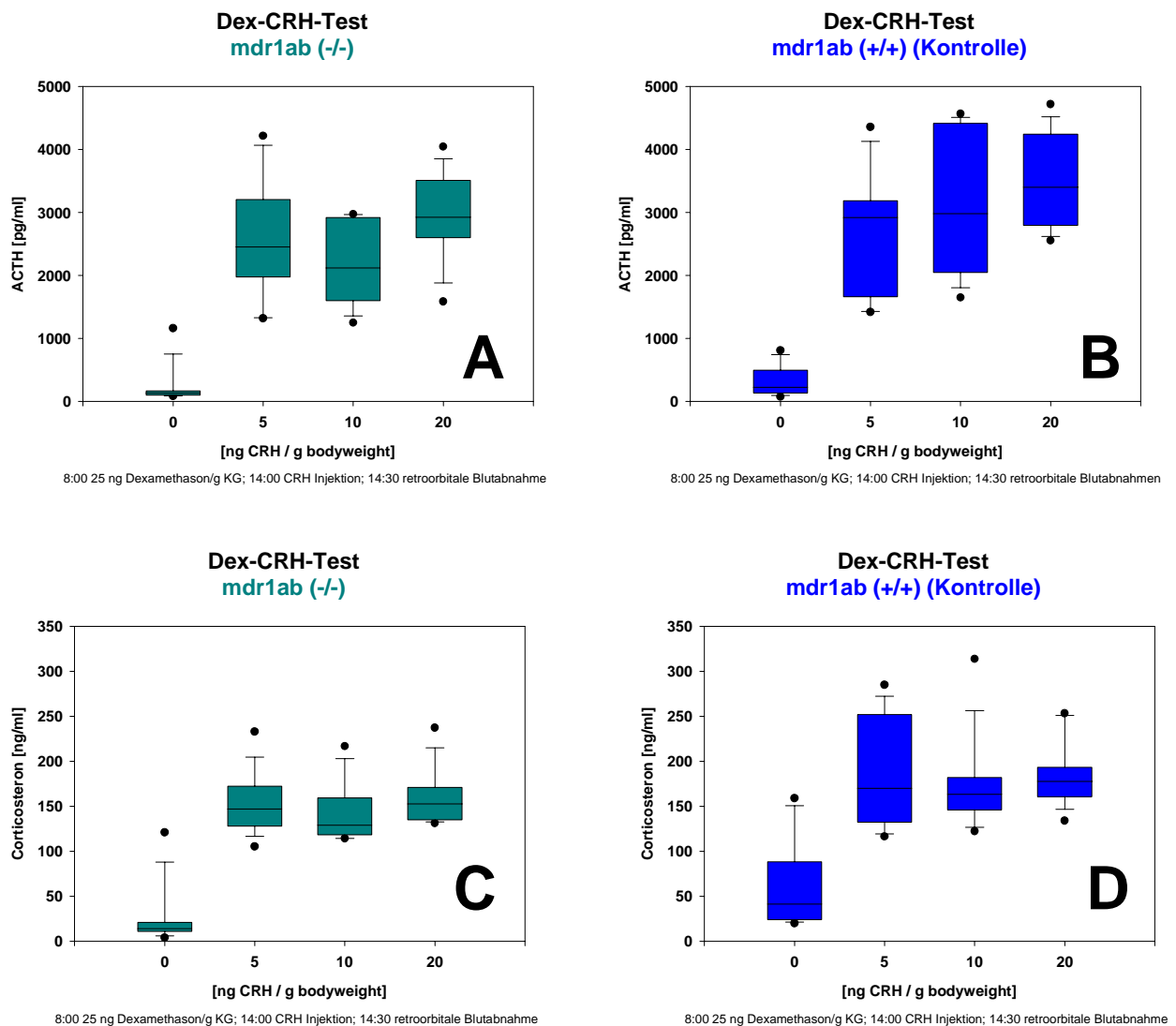


Abbildung 41: Dexamethason-CRH Test. Die Ergebnisse sind als Boxplot dargestellt, wobei A und B die ACTH Plasmawerte im Dex.CRH.Test in Abhängigkeit von der CRH-Konzentration zeigen. C und D stellen die Corticosteron Plasmakonzentrationen dar. *mdr1ab* (-/-) =A und C; *mdr1ab*(+/+)=B und D.

3.3.5 CRH-Challenge-Test

Stressfrei gehaltenen Mäusen wurde 5ng CRH/ g Körpergewicht bzw. NaCl als Vehikel injiziert und 30 min danach retroorbital Blut entnommen und darin die Corticosteron- und ACTH-Konzentrationen bestimmt. Jeder Maus wurden im ersten Versuch CRH injiziert und im Zweiten der nach 14 Tagen stressfreier Umgebung erfolgte Vehikel (0,9% NaCl).

Die Varianzanalyse mit Meßwiederholungen erbrachten einen signifikanten Gruppeneffekt der Plasmakonzentrationen von Corticosteron [Effekt der Gruppe: F (1,14) = 6,9; Signifikanz von F < 0,001].

Signifikante Unterschiede zwischen Vehikel und CRH-Injektionsbedingungen bestanden für die ACTH, Corticosteron und AVP Konzentrationen (Tabelle 33).

| | mdr1ab (-/-) | | | | Kontrollen, mdr1ab (+/+) | | | | Signifikanz | |
|---|--------------|------|---------------|-------|--------------------------|------|---------------|-------|-------------|----------|
| | Vehikel | | CRH | | Vehikel | | CRH | | | |
| | [pg/ml] | SEM | [pg/ml] | SEM | [pg/ml] | SEM | [pg/ml] | SEM | Gruppe | Veh/CRH |
| ACTH | 189,0 | 15,4 | 1125,2 | 168,0 | 419,1 | 66,7 | 1150,8 | 163,4 | ns | * |
| Corticosteron | 37,5 | 6,1 | 225,8 | 36,3 | 78,6 | 12,2 | 281,7 | 8,5 | * | * |
| Gruppeneffekt für ACTH: F(1,14) = 1,56; Signifikanz von F = 0,23 | | | | | | | | | | |
| Gruppeneffekt für Corticosteron: F(1,14) = 6,9; Signifikanz von F = 0,02 | | | | | | | | | | |
| Vehikel-CRH-Effekt für ACTH [Greenhouse-Geisser] F(1,14) = 55,9; Signifikanz von F < 0,001 | | | | | | | | | | |
| Vehikel-CRH-Effekt für Corticosteron [Greenhouse-G.] F(1,14) = 137,5; Signifikanz von F < 0,001 | | | | | | | | | | |
| Vehikel-CRH * Gruppeneffekt für ACTH [Greenh.-G] F(1,14) = 0,8; Signifikanz von F = 0,37 | | | | | | | | | | |
| Vehikel-CRH * Gruppeneffekt für Corticost. [Greenh.-G] F(1,14) = 0,2; Signifikanz von F = 0,66 | | | | | | | | | | |

Tabelle 33: ACTH, und Corticosteron Plasmakonzentrationen unter Vehikel und CRH-Injektionsbedingungen. Werte sind Mittelwerte ± SEM und werden in pg/ml für die Plasmakonzentrationen angegeben. * = signifikante Differenz (p < 0,05); n.s. = nicht signifikant (Varianzanalyse mit Meßwiederholungen). (Die statischen Auswertedaten der Gruppeneffekte, Vehikel-CRH-Injektionseffekte und deren Kombination der Varianzanalyse mit Meßwiederholungen sind dargestellt.)

ACTH in *mdr1ab* (-/-) und FVB Kontrollen CRH-Test

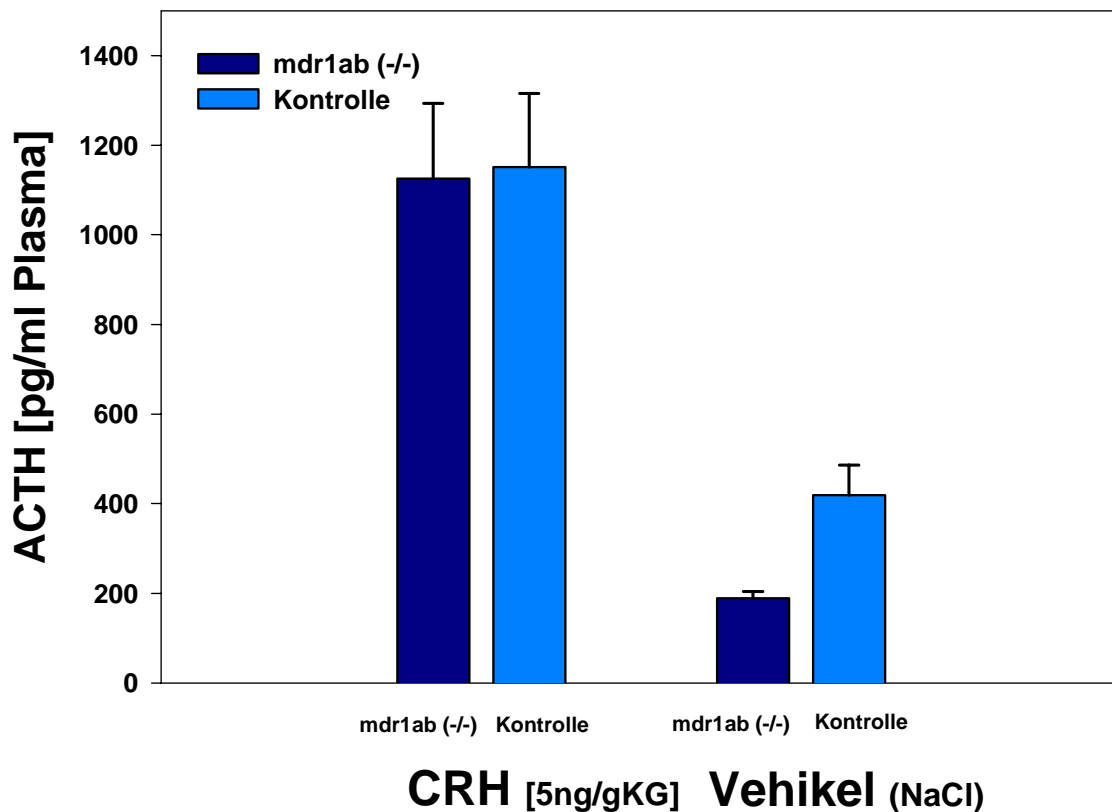


Abbildung 42: ACTH Plasmakonzentrationen nach CRH bzw Vehikel Injektion. Es sind die ACTH-plasmakonzentrationen in pg/ml dargestellt. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (p -Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

Corticosterone in *mdr1ab*(-/-) und FVB Kontrollen CRH-Test

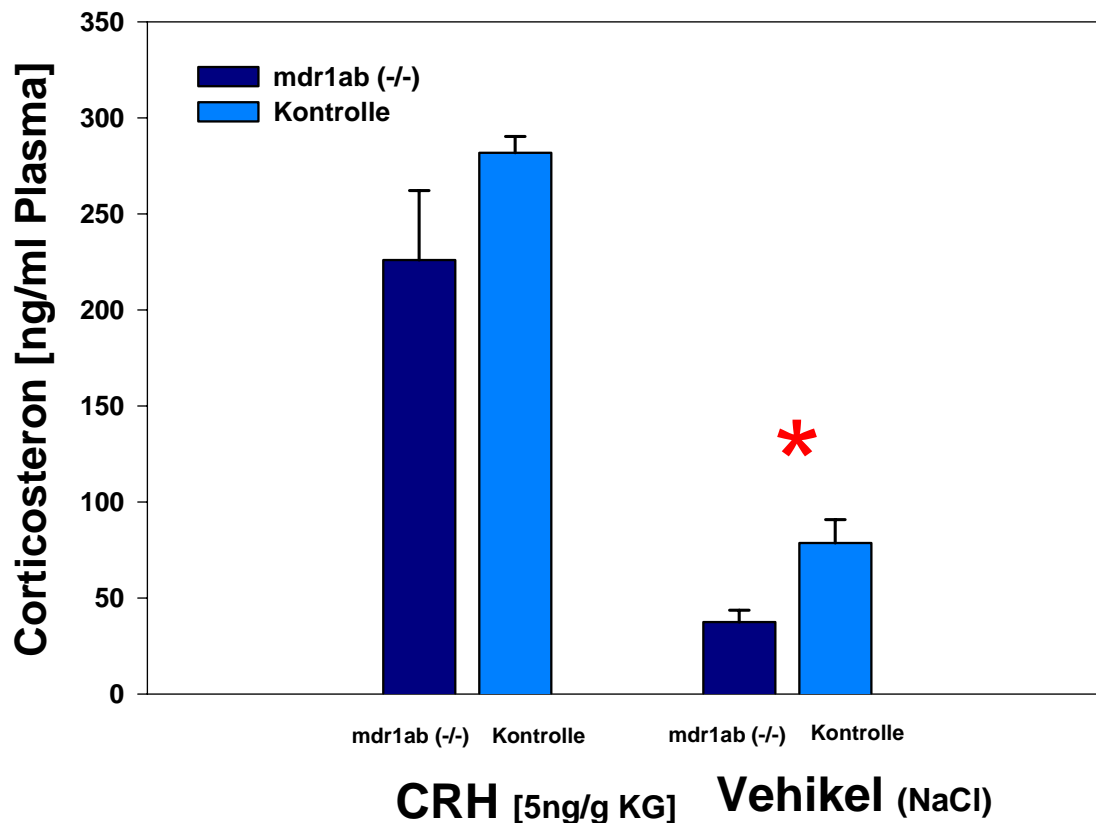


Abbildung 43: Corticosteron Plasmakonzentrationen nach CRH bzw Vehikel Injektion. Es sind die ACTH-plasmakonzentrationen in ng/ml dargestellt. * markieren einen signifikanten Unterschied zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen (p -Value < 0,05). Die Balken stellen die Mittelwerte \pm SEM dar.

4 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu zeigen, dass zentral wirksame Medikamente wie auch endogen vorkommende Substanzen, wie Steroide, Substrate des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke sein können und dass daraus folgernd deren Hirnkonzentrationen eine Folge der P-Glykoprotein-Funktion ist.

Interessant ist dieser Umstand, weil zentral wirksame Medikamente natürlich in ausreichend hoher Konzentration am Wirkort vorliegen müssen, um ihre gewünschte Wirkung zu entfalten. Die Steroidhirnkonzentrationen haben einen wesentlichen Einfluss auf die neuronale Funktion und nehmen erheblichen Einfluss auf die Aktivierung und Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierensystems.

Da hinter beiden Fragestellungen ein sehr komplexes System steht, das ggf. auch wieder einen Einfluss auf das P-Glykoprotein selbst hat, wurde für die Untersuchungen das Tiermodell gewählt. Es wurden Knock-out-Mäuse untersucht, bei denen das Multi-Drug-Resistance-Gen der Maus, das *mdr1a* sowie das *mdr1b* nicht mehr in funktionstüchtiger Form vorliegt (eine sog. Doppel-Knock-out-Mutante). Zum Vergleich wurden jeweils FVB/N-Kontrollmäuse untersucht, die den gleichen genetischen Hintergrund besaßen. Für die Doppel-Knock-out-Mutante haben wir uns entschieden, da man dem *mdr1a* und *mdr1b*-Gen zusammen die gleiche Funktion zuschreibt, die das MDR1-Gen des Menschen hat. Nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass beim Knock-out nur das *mdr1a*, das das vorwiegend gebildete P-Glykoprotein an der Blut-Hirn-Schranke ist, unter bestimmten Versuchsbedingungen, z.B. toxischer Exposition, das *mdr1b* vermehrt exprimiert wird und die Funktion des *mdr1a* übernimmt.

4.1 Methodendiskussion

Für die Untersuchungen zur Pharmakokinetik zentral wirksamer Medikamente war es zunächst erforderlich, die Nachweisverfahren der zu untersuchenden Substanzen zu entwickeln. Dies stellte eine hohe Anforderung dar, da aus inhaltlichen Gründen sehr unterschiedliche Medikamente mit unterschiedlicher biologischer Wirkungsweise und unterschiedlichen Strukturformeln und Molekulargewichten ausgewählt wurden. Es

wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode und eine HPLC-Messmethode entwickelt, die eine hohe Flexibilität aufweisen und mit der sehr unterschiedliche Substanzen mit zum Teil sehr unterschiedlichen chemischen Eigenschaften wie der Lipophilie untersucht werden können. Das Extraktionsverfahren musste eine hohe Wiederfindung für die jeweiligen Substanzen haben und das HPLC-Verfahren musste Substanzen im unteren Nanogramm-Bereich detektieren. Um diese Empfindlichkeit und Selektivität zu erreichen, haben wir uns für ein Flüssig-Flüssig-Extraktionsverfahren entschieden, in dem zunächst die Substanzen durch Alkalisierung hydrophob gemacht werden. Dadurch reichern sie sich beim Ausschütteln in der organischen Phase, der n-Hexan-Phase, an. In einem zweiten Schritt wird die separierte organische Phase dann wieder angesäuert und die zu untersuchenden Substanzen reichern sich entsprechend ihrer Hydrophilie in einer wässrigen Phosphorsäurephase an. Diese Phosphorsäurephase wurde nach entsprechenden Zentrifugationsschritten für die weitere HPLC-chromatographische Aufarbeitung eingesetzt. Für die Plasmaprobeaufarbeitung war die Zusammensetzung der organischen Phase mit Isoamylalkohol und n-Hexan nicht von vordringlicher Bedeutung und die Wiederfindungen für die Substanzen in den untersuchten Bereichen davon weitestgehend unabhängig (Abb. 8). Eine Ausnahme stellte die Plasma-Desmethyl-Venlafaxin-Extraktion dar. Für die Extraktion der gesuchten Substanzen aus Organhomogenaten stellte sich die Aufarbeitung komplizierter dar, da die Fettphase der Homogenate eine „konkurrierende organische Phase“ zur n-Hexan-Phase darstellte. Es musste jeweils die organische n-Hexan-Phase mit Isoamylalkohol modifiziert werden, um eine optimale Wiederfindung für die zu suchenden Substanzen und den internen Standard zu erreichen (Abb. 7). Höhere Isoamylalkohol-Konzentrationen können nach chemischen Eigenschaften der zu extrahierenden Substanz die Wiederfindung fördern, wie z.B. beim Venlafaxin, oder ab einer bestimmten Konzentration deutlich reduzieren, wie z.B. bei den trizyklischen Antidepressiva Amitriptylin, Doxepin oder Trimipramin. Betroffen sind davon auch Citalopram, Paroxetin, Mirtazapin und Budipin (Abb. 7). Aus diesem Grund war es erforderlich, alle Substanzen zu untersuchen und den optimalen Isoamylgehalt der organischen Phase für die Substanz selbst und den internen Standard herauszufinden. Die Resultate sind in Tabelle 6 dargestellt. Für alle untersuchten Substanzen, die nach diesem Extraktionsverfahren aufgearbeitet wurden, waren Wiederfindungsraten von über 85%, in den meisten Fällen über 95% erreicht worden. Eine Ausnahme stellte das Desmethylvenlafaxin mit einer Wiederfindungsrate von

35-45% dar. Die Inter- und Intraassay-Gesamt-variationskoeffizienten lagen für die Tests zwischen 5 und 15%. An jedem Versuchstag wurden entsprechende Standards und Kontrollen zur Präzisions- und Richtigkeitskontrolle mitgemessen.

Bei der Auswahl des HPLC-Systems haben wir uns für eine Lösung entschieden die es ermöglicht, alle Substanzen durch geringe Modifikation der Methodik an einer HPLC-Anlage zu messen und die es ermöglicht, für einen Versuch die verabreichte Substanz und seine Metaboliten in einem Lauf zu messen. Wir haben uns für eine reversed phased modifizierte C18-Festphase und eine wässrige Acetonitril-Phase im Gradientensystem entschieden. Es wurden unterschiedliche stationäre Phasen von diversen Anbietern getestet und die im Methodenteil näher bezeichnete Phenomenex-Säule ausgewählt, da diese die beste Trennleistung in unserem System bot und die erforderlichen Empfindlichkeiten und qualitativen Voraussetzungen erfüllte (Daten nicht näher dargestellt). Um eine höhere Trennschärfe und einen niedrigeren Gegendruck im HPLC-System zu erreichen, wurde die Säule im Säulenofen bei 60° gehalten. Durch Verwendung eines Gradientensystems konnten in einem HPLC-Lauf auch Substanzen mit sehr unterschiedlichen lipophilen Eigenschaften gemessen werden. Dies war erforderlich bei Substanzen, bei denen auch die Metabolite mitbestimmt werden mussten, wie z.B. beim Amitriptylin, bei dem die Metabolite wesentlich hydrophilere Eigenschaften haben. Zum weiteren konnte durch die Verwendung eines Gradientensystems die Empfindlichkeit durch schärfere, höhere Peaks verbessert werden. Abbildung 9 zeigt Beispiel-HPLC-Chromatogramme, wie sie während der Untersuchungen angefertigt wurden.

Neben den chromatographischen Rahmenbedingungen wurde die Empfindlichkeit und die Nachweisgrenze durch die Detektionssysteme bestimmt. Es wurden UV- und Fluoreszenzmessungen, je nach chemischen Eigenschaften der zu bestimmenden Substanzen, vorgenommen. Wenn möglich, wurde UV-Absorption und Fluoreszenz gleichzeitig gemessen, um in Kombination ausgewertet zu werden. Dies erhöhte die Selektivität der zu bestimmenden Substanzen. Zur Quantifizierung der Proben wurden die ermittelten Flächen unter den Peaks der zu detektierenden Substanzen in Bezug auf die Flächen unter den Peak des internen Standards des gleichen Chromatogramms gebracht. Die Quantifizierung erfolgte über zuvor erstellte Eichkurven, die mit gespikten Plasma- bzw. Organhomogenaten hergestellt wurden. Beispiele der Eichkurven sind für Venlafaxin und Desmethylvenlafaxin in Abbildung 10 dargestellt.

4.2 Einfluss des P-Glykoproteins auf die Blut-Hirn-Schrankenfunktion von zentral wirksamen Medikamenten

Die Hirnkonzentrationen von zentral wirksamen Medikamenten, wie Antidepressiva, Neuroleptika, Antiparkinson-Mittel und weitere können nach peripherer Verabreichung von der Funktion des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke bestimmt werden. Dies ist ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Für Substrate des P-Glykoproteins gilt an der Blut-Hirn-Schranke, dass ihre Penetration ins Gehirn durch den aktiven Rücktransport, verursacht durch das P-Glykoprotein in den Endothelzellen der kleinen Hirnkapillaren, behindert wird und dass dadurch ihre Hirnkonzentrationen niedrig gehalten werden. Gestützt wird diese Aussage durch die Ergebnisse der dargestellten Untersuchungen, wobei die unterschiedlichen Versuchskonzepte unterschiedliche Aussagen zulassen.

Zunächst sollte geprüft werden, ob und welche Substanzen Substrate des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke sind. Dazu wurden Versuche konzipiert, in denen den Mäusen die zu untersuchenden Substanzen peripher, meist subkutan, verabreicht wurden und dann nach einer zeitlichen Latenz die Plasma- und Hirnkonzentrationen gemessen wurden. Gleichzeitig wurden jeweils auch Vergleichsorgane, wie die Milz, Leber und weitere untersucht, in denen das P-Glykoprotein nicht oder nicht an einer Blut-Organ-Schranke exprimiert wird. Die Untersuchungen mit einmaliger Injektion wurden mit Trimipramin, Doxepin, Citalopram, Paroxetin, Mirtazapin, Melperon, Dextromethorphan und Venlafaxin durchgeführt.

Der Kritikpunkt einer solchen Untersuchung ist, dass nach einmaliger Verabreichung und nur einem Messzeitpunkt eine unterschiedliche zeitliche Pharmakokinetik auch unterschiedliche Serum- und Hirnkonzentrationen zwischen den Knock-out-Mäusen und den Kontrolltieren bedingen kann. Aus diesem Grunde wurde für das Amitriptylin beispielhaft eine Kinetikuntersuchung durchgeführt, in der nach einmaliger Injektion zu 4 unterschiedlichen Zeitpunkten Medikamentenspiegel und Metabolitenspiegel in Plasma, Gehirn und Vergleichsorganen bestimmt wurden. Es zeigten sich keine oder nur geringgradige Unterschiede in der Pharmakokinetik des Amitriptylins und seiner Metaboliten im Plasma und den untersuchten Vergleichsorgankonzentrationen zwischen den mdr-Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen. Auch war der zeitliche Verlauf der Medikamenten- und Metabolitenkonzentrationsänderungen in den Gehir-

nen mit und ohne funktionstüchtigem P-Glykoprotein gleich. Lediglich die Absolutkonzentrationen unterschieden sich ganz erheblich mit höheren Werten in den *mdr1ab*-Knock-out-Mutanten.

Eine weitere Möglichkeit, unterschiedliche zeitliche pharmakokinetische Faktoren als Ursache für unterschiedliche Hirnkonzentrationen auszuschließen, ist die kontinuierliche Gabe der zu untersuchenden Substanz. Aus diesem Grunde haben wir Versuche durchgeführt, die dies mittels subkutan implantierter osmotischer Alzet-Pumpen gewährleisten. Es wurden mit Citalopram und Venlafaxin zwei Medikamente ausgewählt, die zuvor in den Einmal-Spritzversuchen als Substrate des P-Glykoprotein identifiziert wurden. Der Vergleich der Versuche mit einmaliger Injektion und nach kontinuierlicher Verabreichung über osmotische Pumpen über 10 Tage ergab im Wesentlichen identische Ergebnisse mit ähnlichen Hirnkonzentrationsunterschieden zwischen den *mdr1ab*-Mutanten und den Kontrollmäusen. Diese Resultate lassen vermuten, dass auch bei den anderen untersuchten Substanzen keine wesentlichen zeitlichen pharmakokinetischen Unterschiede zwischen den Mausgruppen nach einmaliger Injektion bestehen. Für die Interpretation der Versuche nach Einmalinjektion mit Trimipramin, Doxepin, Paroxetin, Mirtazapin, Melperon, Dextromethorphan ist die gleiche Pharmakokinetik zwischen den Tiergruppen eine wichtige Voraussetzung, wenngleich diese durch die dargestellten Versuche nicht belegt ist.

Bei den Versuchen nach Langzeitbehandlung, entweder mit osmotischen Pumpen oder nach repetitiven Injektionen, ergeben sich weitere Gesichtspunkte der Interpretation. So kann die wiederholte Gabe eines Medikamentes selbst Einfluss auf das P-Glykoprotein nehmen, entweder durch direkte Beeinflussung der Funktion oder über Induktion einer vermehrten oder verminderten Expression.

Die Bedeutung des P-Glykoproteins für seine Substrate wurde in der Einleitung diskutiert. Da es in der gefäßlumenzugewandten Seite der Endothelzellen der kleinen Hirnkapillaren exprimiert wird und seine Funktion darin besteht, Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle zu transportieren, folgt daraus ein Rücktransport seiner Substrate in das Blut und ein verminderter Übertritt in das Gehirnkompartment. Für zentral wirksame Medikamente, die Substrate des P-Glykoproteins sind, hat dies erhebliche Konsequenzen. Dadurch, dass diese Medikamente dann an der Blut-Hirn-Schranke durch das P-Glykoprotein in den Endothelzellen am Übertritt in das Gehirn behindert werden, bleiben die Hirnkonzentrationen niedrig.

Solch niedrige Hirnkonzentrationen könnten die Ursache dafür sein, dass die Medikamente möglicherweise ihre erhoffte Funktion nicht entfalten. Die Folge wäre Therapieversagen bzw. die Entwicklung einer Therapieresistenz. Neben den übrigen pharmakobiologischen Ursachen könnte somit eine „Überfunktion“ des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke der Grund für eine solche Therapieresistenz sein. Entsprechend der Therapieresistenz, wie sie in der Onkologie beschrieben ist (siehe Einleitung), ist es vorstellbar, dass auch eine multiple Therapieresistenz aufgrund des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke auftreten kann, wenn die eingesetzten Substanzen jeweils P-Glykoprotein-Substrate sind. Aus diesem Grund ist es erforderlich, Substrate und Nicht-Substrate zu identifizieren, um im Falle einer Therapieresistenz auf Pharmaka zurückzugreifen, die keine Substrate des P-Glykoproteins sind.

Unsere Versuche haben ergeben, dass nicht jede von uns untersuchte Substanz Substrat des P-Glykoproteins ist und dass eine deutliche Variation zwischen den untersuchten Substanzen besteht. So ergab sich im Vergleich der Citalopram-Hirnkonzentrationen zwischen *mdr1ab*-Mutanten und Kontrollmäusen ein deutlicher Unterschied mit einer ca. 3fach höheren Medikamentenkonzentration in den Mutanten. Der Vergleich der Hirnkonzentrationen nach peripherer Gabe von Mirtazapin erbrachte dagegen keinen Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen.

Kürzlich konnten wir für Amitriptylin an *mdr1a*-Knock-out-Mäusen und Kontrollmäusen zeigen, dass Amitriptylin und seine Metabolite Substrate des P-Glykoproteins sind (Uhr et al. 2000). Die unter 3.2.1.1 dargestellten Ergebnisse an *mdr1ab*(-/-) und *mdr1ab*(+/+) Knock-out-Mäusen bestätigen diese Ergebnisse. Ebenfalls fanden sich die größten Unterschiede zwischen den Mutanten und Kontrollgruppen in den Hirnkonzentrationen des E-10-OH-Amitriptylins und des Z-10-OH-Amitriptylins. Für das Amitriptylin ergeben sich interessanterweise die größten Konzentrationsunterschiede in den ersten 2 Stunden nach Einmalinjektion. Nach 4 Stunden, nachdem bereits 2/3 der höchsten gemessenen Konzentrationen wieder ausgeschieden sind, gleichen sich die Kurven der *mdr1ab*(-/-) und Kontrollmutanten wieder an. Gegensätzlich dazu sind die Ergebnisse der Metaboliten. Hier ist mit zunehmender Dauer nach Einmalinjektion eine Zunahme der Differenz der Hirnkonzentrationen in den beiden Mausgruppen zu beobachten. Dies gilt insbesondere für das Nortriptylin sowie für das E-Hydroxy-Nortriptylin und das Z-Hydroxy-Nortriptylin, dessen Konzentrationen auch

noch nach 4 Stunden in beiden Mausgruppen ansteigen (Abb. 11). Warum sich für die Hydroxy-Amitriptyline die größten Konzentrationsunterschiede in den Hirnkonzentrationen der beiden Mausgruppen ergaben, kann nicht sicher beantwortet werden. Zu diskutieren bleibt auch ein konzentrationsabhängiger Effekt. So sind die Hirnkonzentrationen von Amitriptylin nach Einmalinjektion 10fach höher als die der Metabolite (Tab. 7). Da das P-Glykoprotein ein sättigbares Protein ist, könnten kleinere Differenzen zwischen den Kontrolltiergruppen bei höheren Konzentrationen möglicherweise hierdurch erklärt sein. Deutlich zeigen die Ergebnisse, dass keine zeitlichen Unterschiede der Pharmakokinetik zwischen den beiden Maustiergruppen bestehen (Abb. 11 und 12, Tab. 7). Dies gilt für die Gehirnkonzentrationen sowie für die Konzentrationen der Vergleichsorgane und des Plasmas. In Plasma, Milz, Niere, Leber und Lunge zeigten sich darüber hinaus auch keine Gruppenunterschiede der Konzentrationen.

In den Versuchen, in denen *mdr1ab(-/-)* Mäusen und Kontrolltieren 10 Tage lang wiederholt zweimal täglich Amitriptylin subkutan injiziert wurde, stellen sich die Ergebnisse anders, aber gut passend zu den Kinetik-Experimenten dar. Nach repetitiver 10 Tage-Applikation von Amitriptylin gab es keine Amitriptylin-Hirnkonzentrationsunterschiede zwischen den Mutanten und den Kontrolltieren. Es bestanden aber erhebliche Konzentrationsunterschiede der Metaboliten in den Gehirnen der *mdr1ab(-/-)* und der Wildtypmäuse. Interessanterweise sind die Unterschiede zwischen den Tiergruppen dort am größten, wo in den Amitriptylin-Kinetik-Experimenten der Zuwachs der Veränderung zwischen der 120 min und der 240 min Messung am größten war.

Auffällig ist, dass die Amitriptylin-Konzentrationen sowie die Metabolite E-Hydroxy-Amitriptylin und Z-10-Hydroxy-Amitriptylin auch nach 10tägiger repetitiver Gabe nicht im Gehirn akkumulieren, wogegen die Nortriptylin-Konzentrationen und seine Metabolite E-Hydroxy-Nortriptylin und Z-10-Hydroxy-Nortriptylin nach repetitiver Gabe in wesentlich höheren Konzentrationen im Gehirn der Tiere, sowohl der Mutanten als auch der Kontrolltiere, vorlagen (vergleiche Tab. 7 und Tab. 19). So waren die Hirnkonzentrationen nach 10tägiger repetitiver Gabe mehr als 10 mal so hoch wie nach Einmalinjektion. Das Verhältnis zwischen *mdr1ab(-/-)* Mutanten und Kontrollmäusen blieb dabei gleich (siehe Abb. 11 und 24, Tab. 7 und 19).

Auch wenn die Amitriptylin-Hirnkonzentrationskinetikkurven sich nach 4 Stunden zunehmend wieder angleichen und auch erwarten lassen, dass nach wiederholter Gabe keine wesentlichen Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Mausgruppen bestehen, so bleibt die Frage, warum dies so ist und warum, wie oben beschrieben, Amitriptylin und seine Metabolite nach wiederholter Gabe nicht im Gehirn akkumulieren, wogegen Nortriptylin und seine Metabolite dies tun. Obwohl Amitriptylin eines der häufigst genutzten Antidepressiva ist und seit 40 Jahren klinische Erfahrungen bestehen, sind die Kenntnisse des Amitriptylins an und auf die Blut-Hirn-Schranke limitiert. In den frühen 80er Jahren zeigten Preskorn et al. (1982), dass Amitriptylin die Permeabilität an der Blut-Hirn-Schranke verändert und vermuteten eine Assoziation zum therapeutischen Effekt. Coudore et al. (1994, 1996) studierten die Pharmakokinetik von Amitriptylin und seinen Metaboliten im Plasma und Gehirn von Mäusen und Ratten. Sie zeigten dabei, dass die Substanz wie auch die Metaboliten, die im Plasma vorkamen, auch im Gehirn vorkamen, wenn auch in veränderten Konzentrationsverhältnissen zueinander. Nach interperitonealer Injektion beobachteten sie in Mäusen einen hohen Blut-Hirn-Schrankentransfer von Amitriptylin und Nortriptylin und in niedrigerer Konzentration auch der hydroxylierten Metabolite. Coudore et al. hypothetisierten, dass die Hydrophilie der hydroxylierten Metaboliten den schnellen Übertritt und die Intensität durch die Blut-Hirn-Schranke limitiert. Wir vermuten einen erheblichen Beitrag des P-Glykoproteins an diesen Beobachtungen. Im Widerspruch hierzu stehen Ergebnisse nach repetitiver Injektion in Ratten, bei denen eine starke Zunahme von zerebralen Konzentrationen der hydroxylierten Metabolite des Nortriptylins beobachtet wurden. Die Anreicherung von Nortriptylin und deren Metabolik konnten wir auch in den Mäusen beobachten. Diese Ergebnisse zeigten, wie auch in unseren Ergebnissen, die große Differenz nach akuter und repetitiver Medikamentenverabreichung.

Zwei weitere Studien sind in diesem Zusammenhang diskussionswürdig. Vaga et al. (1996) zeigten, dass Amitriptylin in der Lage ist, das P-Glykoprotein in Mauslymphomzellen zu inhibieren. Dies könnte erklären, warum nach repetitiver Gabe die Hirnkonzentrationen insgesamt höher waren, nicht jedoch den Unterschied der einzelnen Permeabilitäten der unterschiedlichen Metaboliten in Abhängigkeit von der Funktion des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke. Gleiches gilt für die von Sarmiento et al. (1990) beobachtete Zunahme der Dichte der pinozytischen Vesikel in den Kapillarendothelzellen nach Amitriptylin-Gabe. Eine Zunahme der pino-

zytotischen Aktivität könnte ebenfalls den Gruppenunterschied im Penetrationsverhalten der unterschiedlichen Metabolite zwischen Einmalinjektion und repetitiver Injektion nicht erklären. Eine alternative Hypothese könnte sein, dass das P-Glykoprotein, da es ein sättigbarer Transporter ist, nach repetitiver Gabe saturiert ist und somit nicht mehr in der Lage ist, ausreichend Amitriptylin gegen einen Konzentrationsgradienten aus dem Gehirn zu transportieren. Hiergegen spricht jedoch zum einen der Befund, dass die Amitriptylin-Konzentration nach repetitiver Gabe im Vergleich zur Einmalgabe nicht ansteigt und zum anderen, dass die spezifischen P-Glykoprotein-Effekte der Metaboliten zwischen den beiden Maustiergruppen in unseren Experimenten weiter erhalten bleiben. Dies wäre sonst nur dadurch zu erklären, dass diese eine wesentlich höhere Bindungsaffinität als das Amitriptylin zum P-Glykoprotein hätten. Insgesamt ist diese Hypothese sehr unwahrscheinlich.

Eine durch die Langzeitbehandlung erhöhte Expression oder direkte hemmende Wirkung auf das P-Glykoprotein können die beobachteten Phänomene ebenfalls schwer erklären. Wahrscheinlicher ist anzunehmen, dass andere, noch nicht näher spezifizierte Transportsysteme, ähnlich dem P-Glykoprotein, an der Blut-Hirn-Schranke aktiv sind und die dargestellten Unterschiede dadurch erklären könnten, dass diese ihre Substrate wieder nach anderen Kriterien erkennen. So könnten Amitriptylin und Metabolite Substrate dieser Transporter sein, wogegen Nortriptylin und Metabolite dies nicht sein könnten. Dies würde die beobachteten Effekte der Nortriptylin-Anreicherung im Gegensatz zum Amitriptylin erklären können. Mögliche Kandidaten sind zum Beispiel das multidrug-resistance associated.

Zusammenfassend bleibt aber festzustellen, dass sich klare Unterschiede zwischen den Mausgruppen, die das P-Glykoprotein in funktionstüchtiger Form exprimieren und denen ohne P-Glykoprotein ergeben und dass zumindest die Metabolite des Amitriptylins auch nach repetitiver Gabe in deutlich höheren Konzentrationen in den Gehirnen der Knock-out-Mutanten nachzuweisen sind. Dies gilt auch für die absoluten Konzentrationen. Insbesondere akkumuliert das Nortriptylin in den Gehirnen der Knock-out-Mutanten. Die Hirnkonzentrationen sind 2,6mal höher als in den Kontrollmäusen (Tab. 19). Für die klinische Wirksamkeit sind sowohl Amitriptylin wie auch Nortriptylin verantwortlich. Die Gesamtkonzentration von Amitriptylin, Nortriptylin und den Metaboliten sind in den Knock-out-Mutanten ca. doppelt so hoch wie in den Kon-

trollmäusen. Ein solcher Konzentrationsunterschied könnte, übertragen auf die Therapie beim Menschen, zwischen Wirksamkeit und Unwirksamkeit unterscheiden.

Neben Amitriptylin wurden zwei weitere trizyklische Antidepressiva untersucht, das Trimipramin (3.2.1.2) und das Doxepin (3.2.1.3). Nach einmaliger subkutaner Injektion fanden sich eine Stunde danach signifikante Unterschiede in den Hirnkonzentrationen zwischen den *mdr1ab(-/-)* und *mdr1ab(+/+)* Mäusen für Trimipramin, seinen Metaboliten Desmethyltrimipramin sowie Doxepin und seinen Metaboliten Desmethyldoxepin. In beiden Versuchen ergaben sich nur geringe Konzentrationsunterschiede mit bis zu 1,5fach höheren Konzentrationen jeweils der Metaboliten in den Gehirnen der Knock-out-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Daraus folgt, dass Trimipramin und Doxepin wie auch deren Metaboliten nur schwache Substrate des P-Glykoproteins sind. Damit ist relativ unwahrscheinlich, dass das P-Glykoprotein bei diesen Substanzen einen klinischen Effekt über die Hirnkonzentrationsänderungen ausübt.

Für die untersuchten selektiven Serotonin-re-uptake Inhibitoren Paroxetin und Citalopram fanden sich deutliche Unterschiede für die Aufnahme der verabreichten Substanzen in das Gehirn zwischen den P-Glykoprotein-Knock-out-Mutanten und den Kontrollmäusen. Eine Stunde nach subkutaner Injektion von Paroxetin waren mehr als 2fach höhere Paroxetin-Konzentrationen in den Gehirnen der Mutanten als in den Kontrolltieren. Die Plasma- und Vergleichsorgankonzentrationen waren dagegen nicht unterschiedlich. Die statistische Auswertung erbrachte jeweils hoch signifikante Ergebnisse (Tab. 12, Tab. 13).

Citalopram wurde im Einmalinjektionsversuch sowie nach Langzeitgabe über osmotischen Pumpen untersucht. In beiden Versuchen ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Eine Stunde nach subkutaner Injektion von Citalopram war die Hirnkonzentration in den *mdr1ab(-/-)* Mäusen dreifach höher als in den Kontrollmäusen bei vergleichbaren Konzentrationen im Plasma und untersuchten Vergleichsorganen (Abb. 17, Tab. 12). 10 Tage nach kontinuierlicher Verabreichung von Citalopram über subkutan gelegene osmotische Pumpen waren die Hirnkonzentrationen in den Knock-out-Mäusen ähnlich wie bei Einmalinjektion 3mal höher als in den Kontrollmäusen.

Ebenfalls ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen im Plasma und in den untersuchten Kontrollorganen Milz, Niere, Leber und Lunge (Tab.20, Abb. 25). Signifikant höher war Citalopram in den Hoden der Mutanten. In den Hoden ist ebenfalls eine Blut-Organ-Schranke exprimiert, in der das P-Glykoprotein in den Endothelzellen exprimiert wird (siehe Einleitung). Diese Experimente belegen den bedeutenden Einfluss des P-Glykoproteins für die Penetration von Citalopram ins Gehirn sowohl nach Einmalinjektion wie auch nach kontinuierlicher Gabe.

Das Antidepressivum Mirtazapin zeigte eine Stunde nach Einmalinjektion keine Konzentrationsveränderungen zwischen den untersuchten *mdr1ab(-/-)* und *mdr1ab(+/+)* Mäusen in den untersuchten Organen Hirn, Milz, Niere, Leber und dem Plasma (Abb. 19, Tab. 15). Somit ist Mirtazapin kein Substrat des P-Glykoproteins und seine Hirnkonzentrationen stehen nicht in Abhängigkeit von der Funktion des Multi-Drug-Resistance-Gens. Unter Annahme des Vorliegens einer Therapieresistenz, bedingt durch das P-Glykoprotein, wäre Mirtazapin somit eine gute Therapiealternative.

Das Antidepressivum Venlafaxin und sein Metabolit wurden als deutliche Substrate des P-Glykoproteins identifiziert (Abb. 22 und 23, Tab. 17 und 18). In den Versuchen mit einmaliger subkutaner Injektion von Venlafaxin wie auch in den Versuchen der Langzeitverabreichung mit osmotischen Pumpen zeigten sich deutliche Unterschiede der Hirnpenetration zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontroll-Wildtypmäusen. Nach Einmalinjektion waren ca. doppelt so hohe Venlafaxin- und Desmethylvenlafaxin-Konzentrationen in den Gehirnen der Mutanten nachweisbar. Nach elftägiger, kontinuierlicher Venlafaxin-Gabe waren Venlafaxin 1,7fach höher und Desmethylvenlafaxin über 4mal so hoch in den Gehirnen der Tiere ohne funktionsfähiges P-Glykoprotein. Die untersuchten Vergleichsorgane zeigten, wie auch das Plasma, keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Versuchstiergruppen. Somit zeigt sich für das Venlafaxin wie auch für das Citalopram eine deutliche Parallelität zwischen Einmalinjektionsversuchen und nach kontinuierlicher Gabe. Dieser Umstand erleichtert die Interpretation der Versuchsergebnisse nach Einmalinjektion.

Melperon ist ein Butyrophenon und Neuroleptika. Es zeigte keine signifikanten Unterschiede der Penetration ins Gehirn und andere Organe in unserem P-Glykoprotein-Tierversuchsmodell nach Einmalinjektion. Soweit ohne Pharmakokinetik und Langzeittherapie zu beurteilen, ist es kein P-Glykoprotein-Substrat. Haloperidol, ebenfalls ein Butyrophenon, war in vitro-Versuchen ebenfalls kein P-Glykoprotein-Substrat (Schinkel et al. 1996).

Dextromethorphan ist eine zentral wirksame Substanz, die gegen Husten verabreicht wird und die ebenfalls zur Phänotypisierung des Cytochrom P450 CYP2D6 (Härtter et al. 1996) verwendet wird. Das Dextromethorphan zeigte sich ebenfalls als Substrat des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke und war eine Stunde nach subkutaner Injektion in einer mehr als doppelt so hohen Konzentration in den Hirnen der Knock-out-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen nachweisbar (Abb. 21, Tab. 17). Der Umstand, dass Dextromethorphan ein Substrat des P-Glykoproteins ist, kann die Versuchsergebnisse der Phänotypisierung des CYP2D6 stören. Die Phänotypisierung des Cytochroms erfolgt über Serumkonzentrationquotientenbildung des Dextromethorphans zu seinen Metaboliten. Ein aktives P-Glykoprotein in der Darmmukosa könnte die Serumkonzentrationen dabei durch Rücktransport der Substanz in den Darm gering halten. Interessanterweise bestehen Substrathomologien des P-Glykoproteins zum Cytochrom CYP3A4.

Budipin ist ein NMDA-Antagonist, der in der Antiparkinson-Therapie eingesetzt wird. Budipin zeigte sich in unseren Versuchen nach Langzeit-Therapie über subkutan implantierte, osmotische Pumpen ebenfalls als Substrat des P-Glykoproteins. Die Gehirnkonzentrationen in den Knock-out-Mäusen waren über 3mal so hoch wie in den Kontrollmäusen (Abb. 28, Tab. 23). Ebenfalls ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Mausgruppen für die Hodenkonzentrationen. Keine Unterschiede bestanden in den Vergleichsgruppen. Die Versuche belegen wie unterschiedlich die Substrate des P-Glykoproteins sein können und dass das Konzept der Therapieresistenzentwicklung durch die P-Glykoprotein-Aktivität für viele unterschiedliche Erkrankungen des Zentralnervensystems die medikamentös behandelt werden gilt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das P-Glykoprotein eine wesentliche Rolle in der Pharmakokinetik von zentral wirksamen Substanzen spielt. Es ist

festzuhalten, dass es Unterschiede zwischen den untersuchten Substanzen gibt. Es wurden Medikamente sehr unterschiedlicher Struktur und sehr unterschiedlicher Wirkungsweise untersucht. Diese waren entweder, wie das Mirtazapin und das Melperon, keine Substrate des P-Glykoproteins, oder Substrate in unterschiedlicher Intensität. Die Hirnkonzentrationsunterschiede in den untersuchten Mausgruppen mit funktionfähigem P-Glykoprotein und ohne waren 2- bis 3fach für Citalopram, Venlafaxin, Paroxetin und Budipin und bis zu 10fach für die Amitriptylin-Metabolite. Verglichen mit den von Schinkel und anderen beschriebenen Substraten wie Invermectin und Digoxin sind die Hirnkonzentrationsunterschiede zwischen den Knock-out-Mäusen und den Mutanten für die von uns untersuchten Substanzen eher gering (siehe Einleitung). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass bei den in dieser Arbeit untersuchten Medikamenten zuvor eine Selektion über klinische Studien stattgefunden hat. Substanzen, die starke Substrate des P-Glykoproteins sind, penetrieren nur in so geringen Konzentrationen in das ZNS, dass diese auch keine zentrale Wirksamkeit hätten entfalten können und somit auch keine Wirksamkeit in klinischen Studien gezeigt hätten. Solche Substanzen wären nicht zur klinischen Anwendung gekommen. Wir haben bewusst Substanzen untersucht, die zum Teil seit Jahren im routinemäßigen klinischen Gebrauch sind und für die es einen klinischen Wirksamkeitsnachweis gibt. Dies ist sicher der Grund dafür, warum Substanzen, die sehr gute Substrate des P-Glykoproteins sind, keinen Einzug in die klinische Verwendung für die Therapie zentraler Erkrankungen haben. Auf der anderen Seite ist durchaus vorstellbar, dass eine 2- oder 3fach höhere Hirnkonzentration darüber entscheiden kann, ob ein zentral wirksames Medikament wirkt oder seine Wirkung verfehlt.

Kann sich also eine Therapieresistenz bei einem Patienten entwickeln, weil die Hirnkonzentration des verabreichten Medikaments durch die Funktion des P-Glykoproteins so niedrig gehalten wird, dass diese für eine ausreichende Therapie nicht mehr hoch genug sind? Dieser Patient müsste sich in seiner P-Glykoprotein-Funktion von all denen unterscheiden, die in klinischen Studien eine klinische Wirksamkeit des Medikaments zeigen konnten. Natürlich zeigen auch in klinischen Studien bei weitem nicht alle Patienten positive Effekte. Gibt es also individuelle Unterschiede in der Funktion des P-Glykoproteins? Dieses ist sehr anzunehmen. Dafür sprechen individuelle genetische Unterschiede und unterschiedliche Umwelteinflüsse, die einen inhibitorischen oder aktivierenden Einfluss auf das P-Glykoprotein oder

deren Expression haben. Zu den Umwelteinflüssen zählen sicherlich Ernährung und insbesondere auch Komedikation.

Unser Tiermodell unterscheidet sich hier deutlich. Wir haben es mit genetisch identischen Tieren mit dem genetischen Hintergrund FVB/N zu tun. Der genetische Unterschied zwischen beiden Tiergruppen besteht lediglich in dem Vorhandensein des Multi-Drug-Resistance-Gens. Weiterhin leben die Mäuse unter sehr standardisierten Tierstallbedingungen mit standardisiertem Tierfutter und standardisiertem Tagesablauf. Dies ist sicher neben der analytischen Qualität der Grund für sehr niedrige Variationskoeffizienten der Versuchsergebnisse.

Neben den pharmakologischen Kenntnissen weiß man überraschenderweise noch relativ wenig über den hereditären Polymorphismus des MDR1-Gens in der menschlichen Bevölkerung. Diese genetische Varianz ist wahrscheinlich von Bedeutung für die intraindividuelle Variabilität der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik vieler Medikamente, insbesondere der Substrate des P-Glykoproteins, wie in dieser Arbeit gezeigt. Mickley et al. (1998) identifizierten 2 Polymorphismen im Exon 21 und 24 in medikamentenselektierten Zelllinien und Malignomzelllinien sowie in gesunden Probanden. Ein erster systematischer Screen des MDR1-Gens auf seinen Polymorphismus hin wurde von Hoffmeyer et al. (2000) durchgeführt. Dabei wurden 15 single nucleotide Polymorphismen detektiert, wovon 6 in der kodierenden Region waren. 3 davon veränderten die primäre Aminosäuresequenz des Proteins. Für die unterschiedlichen genetischen Veränderungen siehe auch den Review-Artikel Kerb et al. (2001). Eine phänotypische Konsequenz wurde bislang nur für den SNP (single nucleotide Polymorphismus) im Exon 26 dargestellt. Die intestinale P-Glykoprotein-Expression und die Aufnahme von oral verabreichtem P-Glykoprotein-Substrat korrelierte mit dem jeweiligen Polymorphismus (Hoffmeyer et al. 2000).

Individuelle Funktionsunterschiede des P-Glykoproteins könnten sich durch Umweltbedingungen einschließlich Komedikation ergeben. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, können sehr unterschiedliche Substanzen die Funktionsweise des P-Glykoproteins beeinflussen. Solche Hemmstoffe können sehr unterschiedlicher Natur sein. Sie können von Nahrungsmitteln wie Grapefruitsaft (Kane u. Lipsky 2000) bis zu sehr unterschiedlichen Medikamenten als Komedikation (siehe Einleitung, Tab. 3) gehen.

Auch die Medikation selbst oder deren Metabolite könnte einen Einfluss auf das P-Glykoprotein nehmen. Es ist vorstellbar, dass Medikamente die Expression des P-Glykoproteins fördern oder hemmen bzw. dass sie selbst oder ihre Metabolite einen hemmenden Effekt auf die Funktion des P-Glykoproteins haben. Dies ist der Grund, warum weiterführende Untersuchungen erforderlich sind, die nachweisen, ob sich nach Langzeittherapie einer bestimmten Substanz oder eines Medikaments die Funktion des P-Glykoproteins verändert und ob die Expression auf Protein- und mRNA Ebene verändert wird. Es ist vorstellbar, dass auch nicht zentral wirksame Medikamente die Expression des P-Glykoproteins steigern können und damit die Hirnkonzentrationen von gleichzeitig verabreichten zentral wirksamen Medikamenten verringern. Für Johanniskraut, einem Therapeutikum der Depression konnte gezeigt werden, dass es die Expression des P-Glykoproteins im Darm erhöht (Dürr et al. 2000). Sollte dies auch für die Expression des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke gelten, so wäre eine Komedikation von Johanniskraut als antidepressiv wirkende Substanz bei gleichzeitiger Gabe von z.B. Citalopram, das Substrat des P-Glykoproteins ist, keine gute Kombination. Die Gabe von Johanniskraut führte dann zu einer vermehrten P-Glykoprotein-Expression in den Endothelzellen der Hirnkapillaren und damit zu einem vermehrten aktiven Rücktransport des Citaloprams ins Blut, dies vermindert die Hirnkonzentration und erhöht die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Therapieresistenz. Auf der anderen Seite könnten Medikamente, die das P-Glykoprotein in seiner Funktion hemmen, als Komedikation verabreicht, einen Augmentationseffekt und eine bessere Wirksamkeit eines zentral wirksamen Medikaments, das Substrat des P-Glykoproteins ist, verursachen. Eine Hemmung des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke kann aber auch zu ungewünschten ZNS-Nebenwirkungen von peripher wirkenden Medikamenten führen, die eigentlich die Blut-Hirn-Schranke aufgrund der P-Glykoprotein-Funktion nicht passieren. Beispiele sind das Domperidon und das Loperamid (Schinkel et al. 1996) (siehe Einleitung).

Insgesamt ist festzustellen, dass es sich möglicherweise um ein sehr kompliziertes, leicht beeinflussbares System handelt, das erhebliche Kenntnisse der verabreichten Substanzen erforderlich macht. Es sei auch nochmals darauf hingewiesen, dass das therapeutische Drug-Monitoring, wie es routinemäßig in der Klinik angewandt wird, keine endgültigen Aussagen über Hirnkonzentrationen machen kann. Das therapeutische Drug-Monitoring, das Aussagen über die Medikamentenkonzentrationen im

Plasma macht, kann nicht ausschließen, dass die Gehirnkonzentrationen für eine ausreichende Therapie zu gering sind, obwohl ausreichende Plasmakonzentrationen erreicht wurden. So könnte z.B. ein Patient mit ausreichend hohen Paroxetin- oder Citalopram-Plasmaspiegeln nicht auf die entsprechende medikamentöse Therapie respondieren, weil seine Hirnkonzentrationen durch ein hochaktives, hochexprimiertes P-Glykoprotein in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke zu niedrig bleiben. Es muss darauf hingewiesen werden, dass dies alles hypothetische Betrachtungsweisen sind und dass es zur Zeit noch keine klinischen Untersuchungen gibt, die dies be- oder widerlegen.

Da es keine sicheren strukturellen Merkmale gibt, die Substrate oder Inhibitoren des P-Glykoproteins erkennen lassen, macht dies Untersuchungen der einzelnen Substanzen erforderlich (siehe Einleitung). Komplizierend kommt hinzu, dass man nicht immer davon ausgehen kann, dass die Ergebnisse, die in Zellkultur gewonnen werden, auch auf den Gesamtorganismus mit der Komplexität der Blut-Hirn-Schranke übertragen werden können. Roschat et al. (1999) fanden in einem Monolayer Rinder-Gehirngefäß-Endothelzellsystem, dass Citalopram in diesem System kein Substrat des aktiven Effluxsystems ist. Dies steht im Widerspruch zu unseren tierexperimentellen Ergebnissen. Dies gilt für die Versuche nach Einmalinjektion sowie auch für die mit kontinuierlicher Citalopram-Verabreichung über osmotische Pumpen. In der Arbeit von Roschat et al. wurde das P-Glykoprotein mit Cyclosporin A inhibiert. Dieser Vergleich zeigt wie schwierig es ist, In-vitro-Studien auf die In-vivo-Situation zu übertragen. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, die in der Maus gewonnenen Ergebnisse auf das humane System zu übertragen, da natürlich auch hier genetische Unterschiede bestehen, die sowohl das Substratspektrum verändern können wie auch die Ansprechbarkeit auf endogene wie auch exogene Einflüsse.

4.3 Einfluss des P-Glykoproteins auf die Blut-Hirn-Schrankenfunktion von Steroiden und auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch endogene Substanzen Substrate des P-Glykoproteins sein können und dass deren Hirnkonzentrationen von der Funktion des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke abhängt.

Im ersten Teil dieser Untersuchungen wurden Tritium-markierte Steroide *mdr1ab*(-/-) und *mdr1ab*(+/+) Mäusen subkutan verabreicht und die Verteilung im Gehirn, Plasma und den weiteren zu untersuchenden Organen gemessen. Im zweiten Teil dann wurden funktionelle Tests durchgeführt, die eine endokrinologische Charakterisierung der P-Glykoprotein-Knock-outs und der Kontroll-Wildtypmäuse vornahm.

Es wurde zunächst die Verteilung von Tritium-markiertem Dexamethason in *mdr1a*(-/-) und Kontrollmäusen sowie in *mdr1ab*(-/-) und Kontrollmäusen nach peripherer Gabe untersucht. Dabei fanden sich für die *mdr1a* Einfach-Knock-out-Mutanten und die *mdr1ab* Doppel-Knock-out-Mutanten im Vergleich jeweils zu den FVB/N-Kontrollmäusen fast identische Versuchsergebnisse. In den Gehirnen der Mutanten ohne P-Glykoprotein waren ca. 5mal so hohe Dexamethason-Konzentrationen nachweisbar wie in den Kontrollmäusen (Abb. 29 und 30). Dies bedeutet, dass Dexamethason in der einfachen wie auch in der Doppel-Knock-out-Maus in gleichem Umfang in das Gehirn penetriert. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass das *mdr1b*-Gen in der einfachen *mdr1a* Knock-out-Mutante nicht die Funktion des *mdr1a*-Gens übernehmen kann. Diese Aussage gilt für die Versuche nach Einmalinjektion. Es ist nicht sicher, ob nicht nach Langzeitexposition von P-Glykoprotein-aktivierenden Substanzen das *mdr1b*-Gen vermehrt exprimiert wird und dann kompensatorisch die Funktion des *mdr1a* Genprodukts übernimmt. Unter normalen Zuchtbedingungen ist das *mdr1a*-Gen Produkt, das in der Maus und den Nagern vorwiegend gebildete P-Glykoprotein an der Blut-Hirn-Schranke (siehe Einleitung) (Schinkel et al. 1994, Tatsuta et al. 1992). Meijer et al. (1998) konnten in *mdr1a*(-/-) und Kontrollmäusen ebenfalls nachweisen, dass das synthetische Glucocorticoid Dexamethason ein Substrat des P-Glykoproteins *in vivo* ist. Darüber hinausgehend konnten wir an *mdr1ab*(-/-) Doppel-Knock-out zeigen, dass es signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der Nebennieren gab (Tab. 25). So waren die Nebennieren-Dexamethason-Konzentrationen in den Knock-out-Mäusen mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu den Wildtypmäusen. In den Hoden fand sich ebenfalls ca. die doppelte Menge des radioaktiv markierten Dexamethasons im Vergleich zu den Kontrollen.

Ähnlich wie in den Medikamentenversuchen zu beobachten oder in der Literatur als detoxifizierende Funktion beschrieben, bestätigt sich für die endogenen Substanzen das Konzept der wichtigen Funktion des P-Glykoproteins in den Blut-Organ-Schranken wie der Blut-Hirn- und Blut-Hoden-Schranke. Auch für die endokrinen Substanzen bestand ein Unterschied zwischen den Mutanten und den Wildtypen für Hirn und Hoden, wogegen Organe wie Milz, Leber und Niere allenfalls marginale Gruppenunterschiede zeigten.

Kritisch ist diesen Versuchen anzumerken, dass es sich um Einmalinjektionen handelte und nur zu einem Zeitpunkt gemessen wurde. Die Pharmakokinetik in den beiden untersuchten Tiergruppen könnte jedoch unterschiedlich sein. Dadurch hätte sich zum untersuchten Zeitpunkt ein verzerrtes Bild der Hirnpenetration ergeben können. Des Weiteren wurde das Dexamethason indirekt über die Radioaktivität der Tritiummarkierung gemessen. Eine Verstoffwechslung des Dexamethasons könnte theoretisch dazu führen, dass auch Tritium-markierte Metaboliten eine unterschiedliche Hirnpenetration des Dexamethasons zwischen den beiden Tiergruppen vortäuschen. Dies ist jedoch bei Kenntnis der Dexamethason-Metabolisierung unwahrscheinlich. Die gleichen Kritikpunkte gelten für die Steroid-Verteilungsexperimente mit Aldosteron, Progesteron, Corticosteron, Cortisol und Östradiol.

Zwei Stunden nach subkutaner Injektion von Tritium-markiertem Progesteron zeigten sich nur sehr geringe, jedoch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen (Abb. 31, Tab. 26). Es bleibt jedoch zu vermuten, dass diese geringen Unterschiede ohne wesentliche biologische Bedeutung bleiben. Udea et al. (1992), Bourgeois et al. (1993) und Yang et al. (1989) zeigten, dass Progesteron im Zellkulturmodell kein Substrat des P-Glykoproteins ist. Interessanterweise hatte Progesteron einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des P-Glykoproteins.

Aldosteron, Corticosteron und Cortisol (Hydrocortison) erwiesen sich in unseren Experimenten als mittel bis gute Substrate des P-Glykoproteins. Zwei Stunden nach subkutaner Injektion der Tritium-markierten Substanzen waren jeweils höhere Konzentrationen in den Gehirnen der Knock-out-Mutanten nachweisbar. Für Aldosteron war der Unterschied das 1,7fache (Abb. 32), für Corticosteron das 2fache (Abb. 33) und für Hydrocortison das 4,6fache (Abb. 34). Im Experiment mit Hydrocortison waren neben den Hirnkonzentrationen auch signifikant höhere Konzentrationen in Milz, Hoden und Hypophyse nachweisbar (Tab. 29). Bedingt sind diese Konzentrationsun-

terschiede jedoch durch den erhöhten Hydrocortisongehalt im Plasma der Mutanten. Wertet man die Daten mit den Plasma-Konzentrationen als Kovariate aus, so bleibt zwischen den beiden Mausgruppen für die Hirnkonzentrationen lediglich ein signifikanter Unterschied (statistische Auswertung nicht dargestellt). Die Konzentrationsunterschiede im Plasma sind durch die exkretorische Aktivität des P-Glykoproteins in Leber, Niere und Darm bedingt (siehe Einleitung) und werden häufig bei guten P-Glykoprotein-Substraten gefunden. Ebenfalls stellen sich die Hodenkonzentrationen für Aldosteron, Corticosteron und Hydrocortison bei statistischer Auswertung mit Plasma als Kovariate signifikant in den Knock-out-Mutanten erhöht dar. Dies belegt die Bedeutung des P-Glykoproteins in den Endothelzellen der Gefäße, die Teil einer Blut-Organ-Schranke sind, wie eben die Blut-Hirn- oder Blut-Hoden-Schranke. Aldosteron, Corticosteron und Cortisol (Hydrocortison) werden durch aktiven Transport des P-Glykoproteins aus den Endothelzellen der Gehirn- und Hodenkapillaren zurück ins Blut transportiert und die Organkonzentrationen dadurch gering gehalten. Ohne aktives P-Glykoprotein bleibt dieser Rücktransport aus. Das ist der Grund, warum die Gehirn- und Hoden-Aldosteron-, -Corticosteron- und -Cortisol-Konzentrationen in den *mdr*-Knock-out-Mäusen höher sind.

Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich für die Untersuchung nach subkutaner Injektion von Tritium-markiertem Östradiol. Östradiol ist somit kein Substrat des P-Glykoproteins.

Karssen et al. (2001) beschreiben in ihrer Arbeit, dass Corticosteron, das Glucocorticoidhormon der Nager, kein Substrat des P-Glykoproteins sei. Dies steht im Kontrast zu unseren Ergebnissen. Wir fanden 2fach höhere Konzentrationen in den *mdr1ab*(-/-) Knock-out-Mäusen (Abb. 33, Tab.28). Diese differierenden Ergebnisse sind möglicherweise in unterschiedlichen Versuchsbedingungen begründet. So ist zu erwähnen, dass Karssen und Mitarbeiter ihre Untersuchung an Einzel-Knock-out-Mäusen mit nur *mdr1a* ausgeknocktem P-Glykoprotein durchgeführt haben. Nicht sicher kann bei ihnen eine kompensatorische Hochregulation des *mdr1b*-Gens ausgeschlossen werden. Jedoch muss auf der anderen Seite angeführt werden, dass in unseren Vergleichsuntersuchungen zwischen *mdr1a*- und den *mdr1ab*-Knock-out-Mäusen nach Gabe von Tritium-markiertem Dexamethason keine Unterschiede zwischen *mdr1a* und *mdr1ab* Mäusen bestanden. Ein weiterer wesentlicher Unterschied bestand darin, dass Karssen und Mitarbeiter ihre Versuche an adrenaletomierten Tieren durch-

führten. Somit könnten Unterschiede in den Kontrolltieren bestehen, die durch endogene Einflüsse auf die Funktion des P-Glykoproteins ausgelöst werden. So ist bislang der Einfluss des Corticosterons oder dessen Fehlen, wie in adrenaletomierten Tieren, auf das P-Glykoprotein nicht untersucht. Wir haben unsere Versuchsbedingungen, wie im Methodenteil beschrieben, so gewählt, um den Transport der Steroide unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Dazu haben wir die Knock-out-Tiere und Kontrolltiere unverändert unter stressfreier Bedingung gehalten und die injizierten Tritium-markierten Steroide möglichst niedrig konzentriert eingesetzt, damit diese nur einen kleinen Anteil an den endogen vorkommenden Steroiden ausmachten und keine endokrinologischen Reaktionen auftraten. Karssen und Mitarbeiter wählten ein Versuchsdesign mit adrenaletomierten Tieren, weil sie beabsichtigten, die Bindung von radioaktiven Liganden zum Steroidrezeptor im Gehirn durch Autoradiographie zu messen. Dieser Ansatz reflektiert nicht nur die Aufnahme durch die Blut-Hirn-Schranke, sondern ist auch beeinflusst durch unterschiedliche Parameter, wie die Bindungscharakteristik der Gehirnglucocorticoidrezeptoren. Des Weiteren beeinflusst die Adrenaletomie selbst die Permeabilitätseigenschaften der Blut-Hirn-Schranke, ein Effekt, der durch Corticosteron wieder rückgängig gemacht werden kann (Long u. Holaday 1985).

Man kann vermuten, dass Steroide, die an der Position 11 und an der Position 17 hydroxyliert sind, bessere Substrate des P-Glykoproteins sind als solche ohne Hydroxylgruppe an diesen Positionen (Udea et al. 1992, Udea et al. 1997, Bourgeois et al 1993). Dexamethason und Hydrocortison haben an der 11er- und 17er-Position der Steroidgrundstruktur Hydroxylgruppen und sind von den von uns untersuchten Steroiden die besten Substrate des P-Glykoproteins. Ähnliche Ergebnisse fanden Udea et al. (1992) in Zellkultur in LLC Nierenzellen, die mit humanem MDR1 transfiziert wurden. Es wurde der Transport von markierten Steroiden untersucht. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen von Bourgeois et al. von 1993, die das Verhältnis des Zelltodes von P-Glykoprotein selektionierten und nicht-sektionierten Maus-mdr1-Zellen untersuchten und den größten Unterschied der LD₅₀ zwischen diesem Zelltypen für Hydrocortison und Dexamethason fanden. Corticosteron und Aldosteron haben an der 11er Position eine Hydroxylgruppe und zeigen sich in unseren Experimenten als mittelgradige Substrate des P-Glykoproteins, wogegen Progesteron keine Hydroxylgruppe in der 11er- und 17er-

Position hat und in unseren Experimenten den geringsten Unterschied zwischen den Mausgruppen mit P-Glykoprotein und ohne P-Glykoprotein bezüglich der Hirnpenetration zeigte.

Neben der detoxifizierenden Wirkung des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke, wie dies im Pharmakokinetik-Teil dieser Arbeit beschrieben wurde, käme dem P-Glykoprotein somit an der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige regulatorische Funktion zu. Die Bedeutung wird dadurch unterstrichen, dass Glucocorticoide potente Modulatoren der neuronalen Aktivität und Funktion sind (Joels u. de Kloet 1992). Glucocorticoide sind in unterschiedliche Verhaltens- und kognitive Prozesse involviert (Lupien u. McEwen 1997) und sie koordinieren die Freisetzung einer Reihe von Neuropeptiden. Diese werden in Bezug auf die Krankheitsentstehung, z.B. der Depression (Major Depression), diskutiert (Holsboer 1999, 2000). Im Zusammenspiel mit anderen Komponenten des Stresshormonsystems erhalten Glucocorticoide die Basalaktivität des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierensystems (HPA-Systems) und kontrollieren die Sensitivität des Systems auf Stress (Review: de Kloet et al. 1998). Auf der anderen Seite terminieren Glucocorticoide die stressinduzierte HPA-Systemaktivität über negatives Feedback über den hypothalamischen Nucleus paraventricularis und den Hippokampus. Die somit hier vorherrschenden Glucocorticoid-Konzentrationen, die durch das P-Glykoprotein in der Aufnahme ins Gehirn beeinflusst werden, sind somit maßgeblich für eine negative Feedback-Hemmung. Somit ist die Kontrolle des Zugangs der Corticosteroide in das Gehirn durch das P-Glykoprotein von erheblicher Bedeutung und nimmt einen profunden Einfluss auf die Aktivität und Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierensystems, sowohl unter Stress wie auch unter basalen Bedingungen.

Darüber hinaus ist bekannt, dass Glucocorticoid-Überexposition oder Glucocorticoid-Mangel einen potentiell schädigenden Einfluss auf die neuronale Integrität und Funktion haben (Review: de Kloet u. Joels 1996, Lucassen et al. 2001). Während ein akuter Glucocorticoid-Mangel zu einem selektiven Verlust von hippokampalen Granuloneuronen führt (Sloviter et al. 1989), führt bei Glucocorticoid-Überexposition, wie dies z.B. bei Patienten mit Cushing-Syndrom der Fall ist, zu einer Hippokampus-Volumenreduktion, die jedoch nach Einstellung der Hypercorisolämie komplett reversibel ist (Starkman et al. 1999).

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse, wie wichtig die Funktion des P-Glykoproteins an der endogenen Barriere der Blut-Hirn-Schranke für die Aufnahme und die Homeostase von Steroiden in das Gehirn ist. Um diesen Effekt weiter zu untersuchen und auch die Auswirkung auf das regulatorische HPA-System zu untersuchen, wurden funktionelle Tests durchgeführt und die beiden Mausgruppen unter Basal- und Stressbedingungen weiter charakterisiert. Dabei ergaben sich überraschende Versuchsergebnisse.

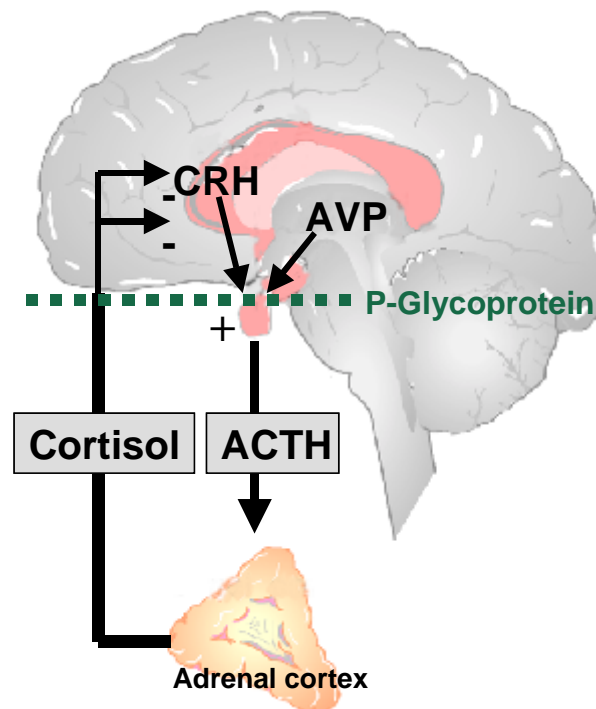


Abbildung 44: HPA-(Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren) Achse

Die Abbildung zeigt den Regelkreis der HPA-Achse mit dem negativen Feedback des Cortisols auf die CRH-Produktion und den induzierenden Effekt des CRH und AVP auf die ACTH-Produktion. Cortisol ist ein gutes Substrat des P-Glykoproteins und reduziert deren Hirnpenetration. Dadurch greift das P-Glykoprotein in diesen Regelkreis ein. Die Expression des P-Glykoproteins in den Nebennieren ist nicht dargestellt.

mdr1ab(-/-) und mdr1ab(+/-) Kontrollmäusen wurde, nachdem sie einzeln sitzend in stressfreier Umgebung verbrachten, morgens unter Basalbedingungen sowie im Stresstest (forced swim) Blut entnommen und dieses auf Corticosteron, ACTH und AVP-(Arginin-Vasopressin) untersucht. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen bezüglich der Corticosteron-Konzentrationen im Plasma. Wie zu erwarten war, waren unter Stressbedingungen die Corticosteron-Konzentrationen angestiegen, jedoch in beiden Gruppen gleichsinnig (Abb. 37, Tab. 31). Ebenfalls ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den AVP-Plasmakonzentrationen zwischen beiden Tierversuchsgruppen, sowohl unter Basal- wie auch unter Stressbedingungen (Abb. 38). Deutliche signifikante Unterschiede fanden sich sowohl unter Basal- wie auch unter Stressbedingungen für die ACTH-Plasmakonzentrationen. Diese waren sowohl unter Basal- wie auch unter Stressbedingungen in den mdr1ab(-/-) Doppel-Knock-out-Mutanten deutlich niedriger (Abb. 36, Tab. 31). Unter Stressbedingungen waren die ACTH-Konzentration höher, jedoch bleiben die ACTH-Werte auch unter Stressbedingungen deutlich signifikant niedriger in den mdr1ab(-/-) Knock-out-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen.

Diese Ergebnisse werden im Dexamethason-Suppressionstest bestätigt. In diesem Test wurden entweder Vehikel oder unterschiedliche Konzentrationen an Dexamethason morgens um 8.00 Uhr subkutan den beiden Tiergruppen injiziert und dann um 14.00 Uhr Blut entnommen. In der Vehikel-Gruppe finden sich die gleichen Verhältnisse wie in den oben beschriebenen Versuchsergebnissen unter Basalbedingungen. Ebenfalls finden sich keine signifikanten Unterschiede für die Corticosteron-Plasmakonzentrationen, aber deutlich signifikante Unterschiede in den ACTH-Plasmakonzentrationen mit ca. doppelt so hohen ACTH-Werten im Plasma der Kontrollmäuse. Der unterschiedliche Blutentnahmemodus in den Versuchen spielt offenbar keine entscheidende Rolle. In den Messungen unter Basalbedingungen wurde retroorbital Blut entnommen, im Dexamethason-Suppressionstest wurde „trunk blood“ verwendet.

Im Dexamethason-Suppressionstest setzt sich der Effekt der unterschiedlichen ACTH-Konzentrationen im Plasma zwischen den beiden Mausgruppen auch nach Gabe von 10, 25 und 50 ng/g Körpergewicht Dexamethason fort. Mit zunehmender verabreichter Dexamethason-Dosis werden die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen deutlicher. Insgesamt nehmen die ACTH-Konzentrationen in beiden Grup-

pen ab. Betrachtet man die Corticosteron-Werte im Plasma, so finden sich im Dexamethason-Suppressionstest nach Gabe von 25 ng/g Körpergewicht signifikante Unterschiede zwischen den *mdr1ab(-/-)* und *mdr1ab(+/+)* Mausgruppen. In der statistischen Auswertung konnten signifikante Gruppen- und Dexamethasondosis-Effekte festgestellt werden, für die jeweils die ACTH und Corticosteron-Plasmakonzentrationen verantwortlich waren. Diese Daten sind so zu interpretieren, dass Dexamethason, wie in den Penetrationsversuchen mit Tritium-markierten Substanzen gezeigt wurde, in höherer Konzentration in die Gehirne der Knock-out-Mäuse gelangt und hier supprimierend auf das HPA-Achsensystem wirkt. Der Dexamethason-Suppressionstest sollte die Frage beantworten, ob in den Knock-out-Mäusen ohne P-Glykoprotein möglicherweise weniger peripher verabreichtes Dexamethason erforderlich ist, um das HPA-Achsensystem zu supprimieren. Dies ist der Fall.

Im Dexamethason CRH-Test konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Mausgruppen für die Versuche nach CRH-Gabe dargestellt werden. Der Dexamethason-Test wurde mit 25 ng Dexamethason/g Körpergewicht durchgeführt, da im Dexamethason-Suppressionstest bei dieser Konzentration eine signifikante Corticosteron-Plasmakonzentrationsabnahme in den Mutanten im Gegensatz zu den Kontrollen auftrat. Unter diesen unterschiedlich supprimierten Bedingungen wurde CRH gegeben, um zu überprüfen, ob die der CRH-Produktion nachgeschalteten Systeme der HPA-Achse durch die unterschiedliche Dexamethason-Penetration ins Gehirn in ihrer Funktion verändert werden. Es konnten für die untersuchten CRH-Konzentrationen keine Unterschiede dargestellt werden. Dies liegt möglicherweise aber an zu hoch gewählten CRH-Konzentrationen und sollte zunächst mit Vorsicht interpretiert werden. Auch bei der niedrigst gewählten 5 ng/g Körpergewicht waren maximale Effekte zu beobachten, die durch höhere Dosen nicht mehr steigerbar waren. Die signifikanten Dosiseffekte in Tabelle 32 für die ACTH- und Corticosteron-Plasmakonzentrationen kommen dadurch zustande, dass die Vehikel-Untersuchungen in der Auswertung miteingefasst wurden. Verzichtet man auf diese, ist kein Dosiseffekt mehr zwischen 5 bis 20 ng CRH/g Körpergewicht mehr nachweisbar (Daten nicht dargestellt). Eine Verkomplizierung der Versuche mit niedrigeren CRH-Konzentrationen scheint sinnvoll.

Der CRH-Test, in dem den beiden Versuchstiergruppen 5 ng CRH/g Körpergewicht subkutan injiziert wurde, erbrachte für die Versuche nach CRH-Gabe keine signifi-

kanten Unterschiede zwischen P-Glykoprotein Knock-out-Mäusen und Kontrollen (Abb. 42, Abb. 43). In den Versuchen nach Vehikelinjektion waren Unterschiede zwischen den ACTH- und Corticosteron-Plasmakonzentrationen zu beobachten. Die Mutanten hatten jeweils erniedrigte Werte, die für die Corticosteron-Plasmaspiegel auch signifikant unterschiedlich waren (Tab. 33). Zur Interpretation dieser Ergebnisse und zur weiteren Charakterisierung der HPA-Achsenfunktion in Abhängigkeit von P-Glykoprotein sind weitere Untersuchungen erforderlich, die zum Teil schon begonnen wurden, dessen Ergebnisse aber für diese Arbeit noch nicht zur Verfügung stehen. Dazu zählt erstens die Bestimmung der Steroidkonzentrationen in den Gehirnen der beiden Mausgruppen unter Basalbedingungen.

Unsere Versuchsergebnisse erbrachten unterschiedliche Resultate bezüglich der Corticosteron-Plasmakonzentrationen zwischen Mutanten und Kontrollen. Dies mag an den unterschiedlichen Versuchsbedingungen liegen. Unter Basalbedingungen waren keine Unterschiede aufgetreten, wogegen nach Vehikelinjektion im CRH-Test deutlich höhere Corticosteron-Konzentrationen im Plasma der Kontrollen zu messen waren. Höhere ACTH- und Corticosteron-Plasmakonzentrationen in den Kontrolltieren ließen sich so erklären, dass das P-Glykoprotein Corticosteron an der Blut-Hirnschranke zurücktransportiert und dadurch die Penetration ins Gehirn im Vergleich zu den Mutanten vermindert. Die daraus zu folgendern niedrigen Corticosteroid-Hirnkonzentrationen könnten dann im Hypothalamus einen geringeren supprimierenden Effekt auf die CRH-Produktion ausüben. Eine höhere CRH-Produktion würde wiederum an der Hypophyse eine stärkere ACTH-Ausschüttung bedingen. Höhere ACTH-Blutkonzentrationen würden die Corticosteroid-Ausschüttung der Nebennieren fördern. In den Mutanten ohne P-Glykoprotein fehlt der aktive Rücktransport der Steroide mit der Folge höherer Hirnkonzentrationen und schlussendlich niedrigeren ACTH-Blutkonzentrationen.

Unter Basalbedingungen waren die Corticosteron-Blutkonzentrationen jedoch zwischen den Tiergruppen gleich. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Dissoziation zwischen ACTH und Corticosteron könnte sein, dass das P-Glykoprotein auch in den Nebennieren eine zentrale Rolle spielt (siehe Einleitung). Darüber hinaus ist das *mdr1b*-Gen in hoher Konzentration in den Mausnebenieren exprimiert (Gruol et al. 1999, Croob et al. 1989). Die Funktion des *mdr1b* P-Glykoproteins auf die Funktion der adrenokortikalen Zellen ist jedoch bislang nicht ausreichend untersucht. Mögli-

cherweise führt dies zu einer schlechteren Corticosteronausschüttung der Nebennieren in den Knock-out-Mäusen mit konsekutiver Modulation der Funktion der Steroidsynthetisierenden Enzyme. Eine weitere Möglichkeit ist das unterschiedliche Corticosteroid-induzierende oder sekretierende Faktoren, die nicht ACTH sind und zu denen unterschiedliche Neuropeptide und Zytokine gehören, auch durch den P-Glykoprotein Knock-out betroffen sind und direkt am Nebennierenkortex kompensatorisch eine Aktivierung in den *mdr1ab(-/-)* Mäusen vornehmen, um normale zirkulierende Plasmaglukokortikoid-Spiegel zu erzeugen.

Zusammenfassend liefern die Befunde deutliche Hinweise dafür, dass das P-Glykoprotein in die regulatorischen endokrinologischen Systeme, wie der HPA-Achse, eingreift. Inwieweit hierin auch die Möglichkeit der Dysregulation mit konsekutiver Krankheitsentstehung besteht, bleibt abzuwarten.

Interessant ist auch die Vorstellung, dass z.B. toxische Substanzen oder Medikamente, die die Funktion des P-Glykoproteins beeinflussen, damit gleichzeitig komplexe, z.B. endokrinologische System verändern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit zeigt den Einfluss und die Bedeutung des P-Glykoproteins auf die Blut-Hirn-Schrankenfunktion von zentral wirksamen Medikamenten und Steroiden.

Das P-Glykoprotein ist das Genprodukt des Multi-Drug-Resistance-Gens. Es ist ein transmembranäres Protein, dessen Funktion darin besteht, seine Substrate unter Energieverbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle zu transportieren. Das P-Glykoprotein wird u.a. an der Blut-Hirn-Schranke auf der dem Gefäßlumen zugewandten Seite der Endothelzellen der kleinen Hirngefäße exprimiert. Es behindert die Penetration seiner Substrate in das Gehirn, indem es sie aktiv zurück ins Blut transportiert und damit die Hirnkonzentrationen niedrig hält.

An *mdr1ab(-/-)* Doppel-Knock-out-Mäusen ohne funktionsfähiges P-Glykoprotein und Kontrollmäusen konnten wir zeigen, dass auch wichtige und klinisch häufig genutzte Medikamente, die zur Therapie zentralvenös verursachter Erkrankungen eingesetzt werden, in ihrer Penetration ins Gehirn durch das P-Glykoprotein beeinflusst werden. Für diese Experimente wurden HPLC-Messmethoden entwickelt, die selektiv und sensitiv genug waren, um Plasma- und Gewebshomogenat-Medikamentenkonzentrationen aus der Maus zu bestimmen.

Die Antidepressiva Amitriptylin, Citalopram, Paroxetin und Venlafaxin sowie zum Teil auch deren Metabolite erwiesen sich als gute Substrate des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke. Im einzelnen wurden Experimente nach peripherer Einmalinjektion, nach Langzeittherapie mit osmotischen Pumpen und pharmakokinetische Experimente durchgeführt. Für die Substrate des P-Glykoproteins, zu dem auch das Antitussivum Dextromethorphan und das Antiparkinsonmittel Budipin gehörten, zeigten sich höhere Medikamentenkonzentrationen in den Gehirnen der Tiere, die kein funktionstüchtiges P-Glykoprotein im Vergleich zu Kontrolltieren hatten. So waren die Hirnkonzentrationen von Citalopram, Venlafaxin und Paroxetin in den Gehirnen der Mutanten nach peripherer Gabe zwei- bis dreimal höher als in den Kontrolltieren. Für Amitriptylin konnte in Kinetik- und Langzeitstudien gezeigt werden, dass die Hirnkon-

zentrationen der Metabolite in Tieren ohne funktionstüchtiges P-Glykoprotein bis 10fach höher waren als bei den Tieren, in dem ein aktiver Rücktransport durch das P-Glykoprotein in den Endothelzellen der Hirnkapillaren an der Blut-Hirn-Schranke zurück ins Blut stattfindet. Der Einfluss des P-Glykoproteins auf die therapeutische Wirksamkeit zentral wirksamer Medikamente und die Entwicklung von Therapieresistenz bei intaktem aktivem P-Glykoprotein und deren Beeinflussung wird diskutiert. Nicht alle Medikamente stellten sich als Substrate des P-Glykoproteins heraus, so waren Trimipramin, Doxepin und deren Metabolite nur sehr schwache Substrate. Mir tazapin und das Neuroleptikum Melperon waren kein Substrat.

Auch endogen vorkommende Steroide wie Aldosteron, Corticosteron und Cortisol und synthetische Steroide wie Dexamethason zeigten sich als Substrate des P-Glykoproteins an der Blut-Hirn-Schranke. In *mdr1ab(-/-)* Knock-out-Mäusen waren deren Hirnkonzentrationen nach peripherer Gabe bis 5fach höher als in *mdr1ab(+/+)* Kontrollmäusen. Progesteron und Östradiol erwiesen sich nicht als Substrate. Es besteht eine Abhängigkeit der Hydroxylierung in der 11er und 17er Position des Steroidrings zur Substratausprägung.

Die regulatorische Funktion des P-Glykoproteins auf den Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achsenregelkreis wird diskutiert. Es bestanden deutliche endokrinologische Differenzen zwischen den Knock-out-Mutanten und den Kontrollen. Die ACTH-Plasmakonzentrationen waren in den *mdr1ab(-/-)* Mutanten unter Basal- und Stressbedingungen sowie in den Funktionstesten deutlich und signifikant erniedrigt. Des weiteren fanden sich Differenzen in endokrinologischen Funktionstesten wie dem Dexamethason-Suppressionstest. Die wichtige regulatorische Funktion sowie deren Beeinflussbarkeit durch Umweltfaktoren, u.a. auch Komedikation, und genetische Faktoren wie Polymorphismen werden erörtert.

In der vorliegenden Arbeit wird deutlich gezeigt, welche Kontrollfunktion das P-Glykoprotein auf die Hirnpenetration von zentral wirksamen Medikamenten, aber auch endogen vorkommenden Substanzen, wie Steroide nimmt. Die Konsequenzen daraus könnten im ersten Fall die Entstehung von Therapieresistenz und Wechselwirkungen im Nebenwirkungsprofil von Medikamenten sein und im zweiten Fall eine wichtige regulatorische Interaktion zum Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achsensystem.

6 LITERATUR

Ambudkar SV, Lelong ICH, Zhang J, Cardarelli CO, Gottesman MM, Pastan I (1992) Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterisation of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8472-8476

Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:361-398

Arceci RJ, Croop JM, Horwitz SB, Housman D (1988) The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4350-4354

Arceci RJ, Baas F, Raponi R, Horwitz SB, Housman D, Croop JM (1990) Multidrug resistance gene expression is controlled by steroid hormones in the secretory epithelium of the uterus. *Mol Reproduction Develop* 25:101-109

Biedler JL, Riehm H (1970) Cellular resistance to actinomycin D in chinese hamster cells in vitro: cross resistance radioautographic and cytogenic studies. *Cancer Res* 30:1174-1184

Biegel D, Spencer DD, Pachter JS (1995) Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties in vitro. *Brain Res* 692:183-189

Bourgeois S, Gruol DJ, Newby RF, Rajah FM (1993) Expression of an mdr gene is associated with a new form of resistance to dexamethasone-induced apoptosis. *Mol Endocrinol* 7:840-851

Bradbury MWB (1993) The blood-brain barrier. *Exp Phys* 78:453-472

Callaghan R, Riordan JR (1993) Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* 268:16059-16064

Chen CJ, Chin JE, Ueda K, et al. (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47:381-389

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, et al. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:695-698

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 38:1277-1287

Coudore F, Fialip J, Eschalier A, Lavarenne J (1994) Mice plasma and brain pharmacokinetics of amitriptyline and its demethylated and hydroxylated metabolites after half-life repeated administration. Comparison with acute administration. *Fundam Clin Pharmacol* 8:525-531

Coudore F, Besson A, Eschalier A, Lavarenne J, Fialip J (1996) Plasma and brain pharmacokinetics of amitriptyline and its desmethylated and hydroxylated metabolites after one and six half-life repeated administrations to rats. *Gen Pharmacol* 27:215-219

Croop J, Guild B, Housman D (1987) Genetics of multidrug resistance: relationship of a cloned gene to the complete multidrug resistance phenotype. *Cancer Res* 47:5982-5988

Croop JM, Raymond M, Haber D, et al. (1989) The three mouse multidrug resistance (*mdr*) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol* 9:1346-1350

de Kloet ER, Joels M (1996) Corticosteroid hormones in neuroprotection and brain damage. *Curr Opin Endocrinol* 3:184-192

de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19:269-301

Devault A, Gros P (1990) Two members of the mouse *mdr* gene family confer multidrug resistance with overlapping but distinct drug specificities. *Mol Cell Biol* 10:1652-1663

Drion N, Lemaire M, Lefauconnier J-M, Scherrmann J-M (1996) Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine. *J Neurochem* 67:1688-1693

Dürr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ, Fattinger K (2000) St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 68:598-604

Fojo AT, Ueda K, Salmon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:265-269

Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Ling V (1986a) Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* 324:485-489

Gerlach JH, Kartner N, Bell DR, Ling V (1986b) Multidrug resistance. *Cancer Surveys* 5:25-46

Goldstein GW, Betz AL (1986) The blood-brain barrier. *Sci Am* 255:70-79

Gottesman MM, Hrycyna CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I (1995) Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu Rev Genet* 29:607-649

Gottesman MM, Pastan I (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62:385-427

Gruol DJ, Vo QD, Zee MC (1999) Profound differences in the transport of steroids by two mouse P-glycoproteins. *Biochem* 58:1191-1199

Gros P, Croop J, Housman D. (1986a) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47:371-380

Gros P, Croop J, Roninson I, Varshavski A, Housman D (1986b) Isolation and characterization of DANN sequences amplified in multidrug resistant hamster cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:377-341

Gros P, Raymond M, Bell J, Housman D (1988) Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Mol Cell Biol* 8:2770-2778

Härtter S, Baier D, Dingemanse J, Ziegler G, Hiemke C (1996) Automated determination of dextromethorphan and its main metabolites in human plasma by HPLC and column switching. *Ther Drug Monit* 18:297-303

Hegmann EJ, Bauer HC, Kerbel RS (1992) Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells. *Cancer Res* 52:6969-6975

Higgins CF, Callaghan R, Linton KJ, Rosenberg MF, Ford, RC (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Semin Cancer Biol* 8:135-142

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3473-3478

Holsboer F (1999) The rationale for the corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonist to treat depression and anxiety. *J Psychiatr Res* 33:181-214

Holsboer F (2000) The corticosteroid hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23:477-501

Jetté L, Murphy GF, Leclerc J, Béliveau R (1995) Interaction of drugs with P-glycoprotein in brain capillaries. *Biochem Pharmacol* 50:1701-1709

Joels M, de Kloet ER (1992) Control of neuronal excitability by glucocorticoid hormones. *Trans Neuroscience* 15:25-30

Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152-162 = Ref ID 90

Kane GC, Lipsky JJ (2000) Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc* 75:933-942

Karssen AM, Meijer OC, van der Sandt ICJ, Lucassen PJ, de Lange EC, de Boer AG, de Kloet ER (2001) Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology* 142:2686-2694

Kartner N, Riordan JR, Ling V (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cells. *Science* 221:1285-1288

Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U (2001) ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2:51-64

Kim RB, Fromm MF, Wandel C, et al. (1998) The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* 101:289-294

König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461:377-394

Landgraf R, Gerstberger R, Montkowski A, Probst JC, Wotjak CT, Holsboer F et al. (1995) Release of vasopressin and oxytocin within the brain and into blood: microdialysis and antisense targeting. In: Saito T, Kurokawa K, Yoshida S (eds) *Neurohypophysis: Recent Progress of Vasopressin and Oxytocin Research*. Elsevier, Amsterdam, pp 243-256

Lee CG, Gottesman MM, Cardarelli CO, et al. (1998) HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry* 37:3594-3601

Levin VA (1980) Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J Med Chem* 23:682-684

Lincke CR, van der Blik, AM, Schuurhuis GJ, van der Velde-Koerts T, Smit JJM, Borst P (1990) Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cell transfected with a wild-type human *mdr1* complementary DNA. *Cancer Res* 50:1779-1785

Long JB, Holaday JW (1985) Blood-brain barrier: endogenous modulation by adrenal-cortical function. *Science* 227:1580-1583

Loo TW, Clarke DM (1996) Inhibition of oxidative cross-linking between engineered cysteine residues at position-332 in predicted transmembrane segments (TM) 6 and (TM) 975 in predicted TM12 of human P-glycoprotein by drug substrates. *J Biol Chem* 271:27482-27487

Loo TW, Clarke DM (1999) Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochem Cell Biol* 77:11-23

Lucassen PJ, Müller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, Hoogendijk WJG, de Kloet ER, Swaab DF (2001) Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure. *Am J Pathol* 158:453-468

Lupien SJ, McEwen BS (1997) The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev* 24:1-27

Meijer OC, de Lange EC, Breimer DD, de Boer AG, Workel JO, de Kloet ER (1998) Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in *mdr1A* P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinol* 139:1789-1793

Mickley LA, Lee JS, Weng Z et al. (1998) Genetic polymorphism in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines and human tumors. *Blood* 91:1749-1756

Pardridge WM (1988) Recent advances in blood-brain barrier transport. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 28:25-39

Preskorn SH, Raichle ME, Hartman BK (1982) Antidepressants alter cerebrovascular permeability and metabolic rate in primates. *Science* 217(4556):250-252

Raymond M, Rose E, Housman D, Gros P (1990) Physical mapping, amplification and overexpression of the mouse *mdr* gene family in multidrug resistant cells. *Mol Cell Biol* 10:1642-1654

Roninson IB, Chin JE, Choi K, Gros P, Housman D, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I (1986) Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4538-4542

Rochat B, Baumann P, Audus KL (1999) Transport mechanisms for the antidepressant citalopram in brain microvessel endothelium. *Brain Res* 831:229-236.

Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF (1997) Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2,5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem* 272:10685-10694

Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 268:6077-6080

Sarkadi B, Price EM, Boucher RC, Germann UA, Scarborough GA (1992) Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high-activity drug-stimulated membrane ATPase. *J Biol Chem* 267:4854-4858

Sarmiento A, Albino-Teixeira A, Azevedo I (1990) Amitriptyline-induced morphological alterations of the rat blood-brain barrier. *Eur J Pharmacol* 176:69-74

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, et al. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77:491-502

Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P (1995) Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 96:1698-1705

Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97:2517-2524

Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, et al. (1997) Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4028-4033

Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 8:161-170

Schinkel AH (1999) P-glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Delivery Rev* 36:179-194

Schoenlein PV (1993) Molecular cytogenetics of multiple drug resistance. *Cytotechnology* 12:63-80

Schoenlein PV (1994) Role of gene amplification in drug resistance. *Cancer Treat Res* 73:167-200

Seelig A (1998) A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 251:252-261

Sloviter R, Valiquette G, Abrams G, Ronk EC, Sollas AI, Neubort SL (1989) Selective loss of hippocampal granule cells in the mature rat brain after adrenalectomy. *Science* 243:535-538

Smith AJ, van Helvoort A, van Meer G, Szabó K, Welker E, Szakács G, Váradi A, Sarkadi B, Borst P (2000) MDR3 P-glycoprotein, a phospholipid translocase, transport several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem* 275:23530-23539

Sonveaux N, Shapiro AB, Goormaghtigh E, Ling V, Ruyschaert J-M (1996) Secondary and tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. *J Biol Chem* 271:24617-24624

Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, et al. (1997) Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2031-2035

Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Berent S, Schork MA, Schteingart DE (1999) Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry* 46:1595-1602

Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsuruo T, Itoyama S, Mori S (1988) Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res* 48:1926-1929

Sugawara I (1990) Expression and functions of P-glycoprotein (mdr1 gene product) in normal and malignant tissues. *Acta Pathol Jpn* 40:545-553

Tanigawara Y, Okamura N, Hirai M, Yasuhara M, Ueda K, Kioka N, Komano T, Hori R (1992) Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J Pharm Exp Ther* 263:840-845

Tatsuta T, Naito M, Oh-hara T, Sugawara I, Tsuruo T (1992) Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *J Biol Chem* 267:20383-20391

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7735-7738

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 37:159-164

Tsuji A, Terasaki T, Takabatake Y, et al. (1992) P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Life Sci* 51:1427-1437

Tsuji A, Tamai I, Sakata A, Tenda Y, Terasaki T (1993) Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain by a multidrug transporter. P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 146:1096-1099

Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y (1981) Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 41:1967-1972

Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pasan I (1987) Expression of full-length DNA for the human MDR1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3004-3008

Ueda K, Okamura N, Hirai M, et al. (1992) Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 267:24248-2425

Ueda K, Taguchi Y, Morishima M (1997) How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin Cancer Biol* 8:151-159

Uhr M, Steckler T, Yassouridis A, Holsboer F (2000) Penetration of amitriptyline, but not of fluoxetine, into brain is enhanced in mice with blood-brain-barrier deficiency due to Mdr1a P-glycoprotein gene disruption. *Neuropsychopharmacol* 22:380-387

Varga A, Nugel H, Baehr R, et al. (1996) Reversal of multidrug resistance by amitriptyline in vitro. *Anticancer Res* 16:209-211

van der Bliek AM, Borst P (1989) Multidrug resistance. *Adv Cancer Res* 52:165-203

Wolf DC, Horwitz SB (1992) P-glycoprotein transports corticosterone and is photoaffinity-labeled by the steroid. *Int J Cancer* 52:141-146

Yang CP, DePinho SG, Greenberger LM, Arceci RJ, Horwitz SB (1989) Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *J Biol Chem* 264:782-788

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer bedanken, der mir die Gelegenheit gab, die Arbeiten am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München durchzuführen. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Thomas Bartolomaeus der Abteilung Zoomorphologie und Systematik der Tiere der Universität Bielefeld für die Betreuung der Arbeit.

Besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Neurochemischen Labors im Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München sowie Frau Federkiel für die Hilfe beim Anfertigen des Manuskripts.