

Messung des neurotoxischen Potentials und
der Organverteilung Makrozyklischer Laktone
in *mdr1*-defizienten Mäusen

Christina Elisabeth Ohl



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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2015

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

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

**Messung des neurotoxischen Potentials und
der Organverteilung Makrozyklischer Laktone
in *mdr1*-defizienten Mäusen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Christina Elisabeth Ohl, geb. Janko

Tierärztin aus Wiesbaden

Gießen 2014

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

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

Gutachter: Prof. Dr. J. Geyer
Prof. Dr. S. Mazurek

Tag der Disputation: 29.01.2015

FÜR MEINE ELTERN IRMTRAUT UND FRIEDRICH

FÜR MEINEN MANN MATTHIAS

IN LIEBE UND DANKBARKEIT

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	IV
Verzeichnis der Tabellen	IV
Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1. Der <i>Multidrug</i> -Transporter P-Glycoprotein	1
1.1.1. Die Blut-Hirn-Schranke	1
1.1.2. Die Proteinfamilie der ABC-Transporter	2
1.1.3. Die Entdeckung des P-Glycoproteins	3
1.1.4. Vorkommen des P-Glycoproteins	4
1.1.5. Die <i>mdr1</i> ^{-/-} -Maus	4
1.2. Der <i>MDR1</i> -Defekt des Hundes	6
1.2.1. Der Ivermectin-sensitive Collie	6
1.2.2. Die Entdeckung des <i>MDR1</i> -Defekts	8
1.2.3. Rassenverteilung	11
1.3. Antiparasitär wirksame Makrozyklische Laktone (ML)	13
1.4. Der GABA _A -Rezeptor	14
1.5. Ziel dieser Arbeit	16
2. Versuchstiere	17
3. Material	20
3.1. Applikationslösungen für <i>in vivo</i> Versuche	20
3.1.1. Applikationslösung für die orale Applikation mit [³ H]Ivermectin, [³ H]Moxidectin und [³ H]Milbemycinoxim	20
3.1.2. Applikationslösung für die <i>spot-on</i> Applikation mit [³ H]Moxidectin	21
3.1.3. Applikationslösung für die Dosisfindungsstudien am Rotarod mit Ivermectin, Selamectin, Moxidectin und Milbemycinoxim	21
3.1.4. Applikationslösung für die Antagonisierungsversuche mit Ivermectin und Selamectin	22
3.2. Materialien für die Genotypisierung der CF-1 Mauslinie	23
3.2.1. Primer	23
3.2.2. Hitzebeständige DNA-Polymerasen	24
3.2.3. Längenstandards	24
3.2.4. Agarose Gelelektrophorese	25

3.2.5.	Puffer und Medien	26
3.2.6.	Kommerzielle Kits und sonstige Materialien	26
3.3.	Chemikalien	27
3.4.	Radioaktiv-markierte Substanzen	28
3.5.	Geräte	29
3.6.	Verbrauchsmaterialien	30
4.	Methoden	31
4.1.	<i>In vivo</i> Applikationen	31
4.1.1.	<i>Per os</i> Applikation	31
4.1.2.	<i>Spot-on</i> Applikation	31
4.1.3.	Gewinnung der Organ-, Blut- und Urinproben	31
4.2.	Genotypisierung der CF-1 Mauslinie	32
4.2.1.	Isolierung von DNA aus Gewebe	32
4.2.2.	Isolierung von Total-RNA aus Gewebe	32
4.2.3.	cDNA-Synthese aus Total-RNA	33
4.2.4.	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	34
4.2.5.	Primerauswahl und Lage der Primer	34
4.2.6.	Polymerase-Kettenreaktion	35
4.2.7.	Native Gelelektrophorese	37
4.2.8.	Aufreinigung der PCR-Amplifikate	38
4.2.9.	Aufreinigung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen	39
4.2.10.	Sequenzierung und Auswertung	39
4.3.	Rotarod-Methode	40
5.	Ergebnisse	44
5.1.	Genotypisierung der CF-1-Mauslinie	44
5.2.	Organverteilung und Gehirnpenetration von Makrozyklischen Laktone	46
5.2.1.	Gewebe- und Gehirnkonzentrationen von Ivermectin	47
5.2.2.	Gewebe- und Gehirnkonzentrationen von Moxidectin	48
5.2.3.	Gewebe- und Gehirnkonzentrationen von Milbemycinoxim	53
5.3.	Etablierung der Rotarod-Methode	55
5.4.	Dosisfindungsstudien mit Hilfe des Rotarods	57
5.4.1.	Applikation des Lösungsmittels	57

5.4.2.	Ivermectin	58
5.4.3.	Moxidectin	59
5.4.4.	Milbemycinoxim	61
5.4.5.	Selamectin	62
5.4.6.	Vergleich des neurotoxischen Potenzials von Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim	64
5.5.	Versuch der Antagonisierung der Neurotoxizität von Ivermectin durch Selamectin	66
6.	Diskussion	69
6.1.	Die <i>mdr1</i> -Knockout Maus im Tierversuch	69
6.2.	Vergleichende Neurotoxizität von Makrozyklischen Laktonen im <i>mdr1</i> -Knockout Mausmodell	70
6.2.1.	Unterschiedliche Neurotoxizität der Makrozyklischen Laktone bei <i>MDR1</i> -defekten Hunden	70
6.2.2.	Gehirnpermeation von ML in Pgp-defizienten und Wildtyp Mäusen	74
6.2.3.	Messung des neurotoxischen Potenzials der ML	79
6.3.	Antagonisierung und Therapie einer ML Intoxikation	88
7.	Zusammenfassung	91
8.	Summary	92
9.	Literaturverzeichnis	93
10.	Danksagungen	108
11.	Erklärung	110

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1: Modell eines ABC-Transporters am Beispiel des <i>MDR1</i> -Transporters in der BHS	2
Abb. 1.2: Die nt230(del4) <i>MDR1</i> -Mutation des Hundes	9
Abb. 1.3: Die Aufgaben von P-Glycoprotein beim Arzneistofftransport	11
Abb. 1.4: Modell des GABA _A -Rezeptors	15
Abb. 4.1: Darstellung des Rotarods	40
Abb. 4.2: Schematische Laufperformance-Kurve	42
Abb. 5.1: Genotypisierung der homozygoten <i>CF-1 PGP-mutant</i> (PGP ^{mut}) und <i>CF-1 Wildtyp</i> (PGP ^{wt}) Maus auf DNA- (A,B) und RNA-Ebene (C,D)	45
Abb. 5.2: Gehirnkonzentrationen von [³ H]Moxidectin nach <i>spot-on</i> Applikation an PGP ^{wt} - und PGP ^{mut} -Mäusen	52
Abb. 5.3: Schematische Darstellung des ersten Trainingsprogramms auf dem Rotarod	55
Abb. 5.4: Graphische Darstellung des Trainingsverlaufs auf dem Rotarod	56
Abb. 5.5: Laufperformance nach Applikation des Lösungsmittels	58
Abb. 5.6: Graphische Darstellung des neurotoxischen Potenzials von Makrozyklischen Laktone	63
Abb. 5.7: Darstellung der neurotoxischen Dosisäquivalenzen	65
Abb. 5.8: Darstellung der AOC nach Applikation von 0,35 mg/kg IVM, MOX und MIL an PGP ^{mut} -Mäuse	66
Abb. 5.9: Versuch der Antagonisierung einer IVM-Vergiftung mit SEL	68
Abb. 6.1: Gehirnkonzentrationen von Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim in Wildtyp und <i>mdr1</i> -defizienten Mäusen	77
Abb. 6.2: Darstellung des unterschiedlichen Verhaltens der ML an der BHS	78
Abb. 6.3: Strukturformeln von Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim	83
Abb. 6.4: Die Wirkung von Ivermectin am Glutamat-gesteuerten Chlorid Kanal von <i>C.elegans</i>	85
Abb. 6.5: Atomare Interaktion zwischen Ivermectin und dem Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanal	85

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1.1: Weltweite Rasseverteilung der nt230(del4) <i>MDR1</i> -Mutation des Hundes (modifiziert nach Geyer & Janko, 2012)	12
Tabelle 4.1: Bewertungsschema der Laufleistung auf dem Rotarod	41
Tabelle 5.1: Gewebekonzentrationen von [³ H]Ivermectin in PGP ^{wt} - und PGP ^{mut} -Mäusen	48
Tabelle 5.2: Gewebekonzentrationen von [³ H]Moxidectin in PGP ^{wt} - und PGP ^{mut} -Mäusen	50
Tabelle 5.3: Gewebekonzentrationen von [³ H]Milbemycinoxim in Wildtyp und <i>mdr1</i> -defizienten Mäusen	54
Tabelle 6.1: Vergleich der Gehirn-Plasma-Koeffizienten	76

Abkürzungen

%	Prozent
[³ H]	Tritium
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
ABC	ATP-binding-cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AOC	Area over the curve
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Base pair, Basenpaar
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	Complementary DNA
CEA	Collie Eye Anomalia
Ci	Curie
Cl ⁻	Chlorid-Ion
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dpm	Disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FE	Flächeneinheiten
fmol	Femtomol
G	Gauge (Außendurchmesser)
g	Gramm
GluCl-Kanal	Glutamat-gesteuerter Chlorid-Kanal
GPK	Gehirn/Plasma-Koeffizient

h	Stunde
IVC	Isolated ventilated cages (isoliert belüftete Käfige)
IVM	Ivermectin
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampère
MD	Membrandomäne
MDCK	Madin-Darby canine kidney
<i>MDR1</i>	Multidrug-resistance Protein/Gen
mg	Milligramm
MIL	Milbemycinoxim
min	Minute
ML	Makrozyklische Laktone
ml	Milliliter
MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic acid
MOX	Moxidectin
MuLV	murines Leukämievirus
N ₂	Stickstoff
NBD	Nukleotid-Bindungsstelle
<i>p.o.</i>	<i>Per os, per oral</i>
Pgp	P-Glycoprotein
PGP ^{mut}	<i>CF-1 PGP-mutant</i> Maus
PGP ^{wt}	<i>CF-1 Wildtyp</i> Maus
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rounds per minute (Drehungen pro Minute)
s.c.	Subkutan
SEL	Selamectin
SPF	Spezifiziert pathogen-frei

Abkürzungen

TAE	Tris-Acetat-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Der *Multidrug*-Transporter P-Glycoprotein

1.1.1. Die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bildet bei Vertebraten die Grenze zwischen der Blutbahn und dem Gehirn. Wesentliche Bestandteile dieser Schranke sind die Endothelzellen, welche die feinen Blutkapillaren auskleiden, und die Basalmembran. Durch *tight junctions* sind die Endothelzellen eng miteinander verbunden. Im Gegensatz zu Endothelgewebe in der Peripherie weist das Endothel in den Gehirnkapillaren keine Fenestrierungen oder Zwischenzellspalten auf, wodurch man auch von einem kontinuierlichen Endothel spricht. Des Weiteren werden noch Perizyten und Astrozyten zu der BHS gezählt, welche wie eine Hülle von außen um die Kapillaren angeordnet sind. Alle drei Zelltypen zeigen starke Zell-Zell-Interaktionen (Wolf et al., 1996; Pardridge, 2005; Bundgaard & Abbott, 2008).

Die BHS ist für den Transport von lebenswichtigen Nährstoffen in das ZNS zuständig. Gleichzeitig hat sie eine schützende Funktion als selektive Barriere für Endo- und Xenobiotika. Ebenfalls ist sie auch für den Efflux von Stoffen (Stoffwechselprodukte, Metabolite etc.) aus dem Gehirn in die Blutbahn verantwortlich (Risau et al., 1990; Ohtsuki, 2004). Um all diese Funktionen und auch das Milieu im Gehirn aufrecht zu erhalten, ist die BHS weitgehend undurchlässig. Frei diffundieren können fast ausschließlich lipophile Stoffe; bestimmte Stoffe wie Wasser oder Harnstoff sind in der Lage parazellulär durch die *tight junctions* zu diffundieren (Egleton & Davis, 2005; Fromm, 2010). Daneben gibt es noch Kanal-Proteine, wie z.B. die Aquaporine, welche den Wasserhaushalt entlang des osmotischen Gradienten regulieren, oder Carrier-vermittelte Transporter, wie z.B. der Glukosetransporter GLUT1, welcher Glukose nur entlang eines Konzentrationsgefälles und ohne Energieverbrauch transportieren kann (Bloch & Manley, 2007; Farrell et al., 1991).

Maßgeblich für die funktionelle Barriere sind verschiedene Transportproteine, die in der luminalen Membran der Endothelzellen sitzen und unter ATP-Verbrauch für einen Efflux von Xenobiotika sorgen oder die Passage durch die Endothelzelle hin zum ZNS verhindern. Eine

wichtige Rolle übernimmt hier das P-Glycoprotein, welches eine hohe Expression an der BHS zeigt (Thiebaut et al., 1987, 1989; Cordon-Cardo et al., 1989).

1.1.2. Die Proteinfamilie der ABC-Transporter

Das P-Glycoprotein (Pgp), auch als *MDR1*-Transporter bezeichnet, gehört wie einige andere Transporter in der BHS zur Familie der *ATP-binding-cassette* (ABC)-Transporter. Die ABC-Transporter bestehen klassischer Weise aus zwei Membrandomänen mit je sechs transmembranären Segmenten (α -Helices) und zwei zytosolischen Domänen. Die jeweiligen Segmente der Membrandomänen bestimmen die Substratspezifität. Die zytosolischen Domänen sind in der Lage ATP zu hydrolysieren, weshalb sie auch als *ATP-binding-cassette* (ABC)-Domäne oder Nukleotid-Bindungsdomäne bezeichnet werden (Schneider & Hunke, 1998). Die ABC-Domänen bestehen aus zwei Sequenzmotiven, den sogenannten Walker A- und Walker B-Motiven, die durch etwa 90-120 Aminosäuren voneinander getrennt sind und in allen ATP-bindenden Proteinen zu finden sind.

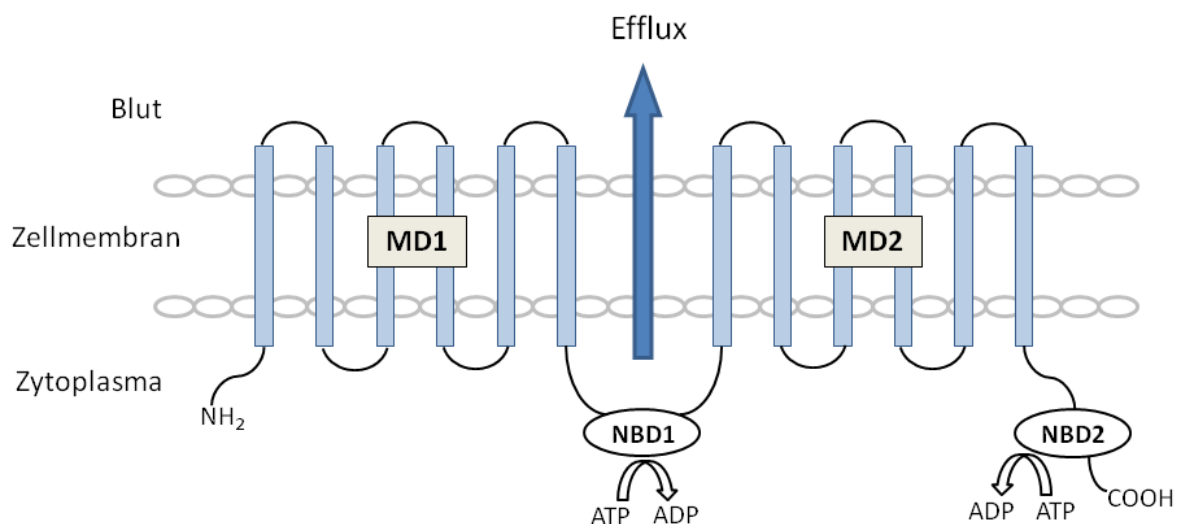


Abb. 1.1: Modell eines ABC-Transporters am Beispiel des *MDR1*-Transporters in der BHS

Der *MDR1*-Transporter in der Blut-Hirn-Schranke besteht aus zwei Membrandomänen (MD) mit je 6 transmembranären Segmenten sowie zwei Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD), an welchen ATP zu ADP hydrolysiert wird. Unter diesem ATP-Verbrauch pumpt der Transporter Substrate aus dem Zytoplasma zurück in das Blutkompartiment.

Ein drittes, hoch konserviertes Sequenzmotiv, das sich nach dem Walker B-Motiv anschließt, ist spezifisch für alle Mitglieder der ABC-Transporterfamilie und wird daher als ABC-Signatur bezeichnet. Bei den ABC-Transportern handelt es sich um Pumpen, die in eine Richtung, meist aus dem Zytoplasma heraus, Substrate und Arzneistoffe herauspumpen (Schneider & Hunke, 1998; Dean et al., 2001). Die Familie der ABC-Transporter wird in die Subfamilien A bis G untergliedert. P-Glycoprotein ist das erste Mitglied der Subfamilie B (ABCB1) und wird vom *MDR1(ABCB1)*-Gen codiert (Dean & Annilo, 2005).

1.1.3. Die Entdeckung des P-Glycoproteins

Die Funktion von Pgp wurde erstmals an Tumorzellen einer Hamster-Ovarzelllinie entdeckt. Der überexprimierte Transporter konnte aus der Zellmembran isoliert und als Verursacher der multiplen Resistenz der Zellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika charakterisiert werden (*MDR = multidrug resistance*). Eindringende Arzneistoffe wurden durch den Efflux-Transporter wieder aus der Zelle gepumpt. Das Protein veränderte somit die Permeabilität der Zellmembran, wodurch auch der Name P-Glycoprotein entstand (P = Permeabilität) (Juliano & Ling, 1976).

Die im Jahr 1987 isolierte cDNA aus einer gegen Kolchizin, Vinblastin und Doxorubicin resistenten Krebszell-Linie konnte als codierende DNA für Pgp identifiziert werden (Chen et al., 1986; Ueda et al., 1987). Das *MDR1* Gen existiert in allen Säugetieren, bei Nagern wie z.B. der Maus unterscheidet man allerdings zwischen einem *mdr1a* und *mdr1b* Gen.

In den ersten Jahren nach der Entdeckung spielte Pgp vor allem in der Krebsforschung eine wichtige Rolle; einige Chemotherapeutika konnten als Substrate identifiziert werden (Lehnert, 1994). Heute weiß man, dass das Substratspektrum von Pgp sehr viel größer ist. Neben den Chemotherapeutika, wie z.B. den Vinca-Alkaloiden Vinblastin und Vincristin, Doxorubicin oder Paclitaxel, zählen auch Immunsuppressiva (Cyclosporine), Makrozyklische Laktone (Ivermectin, Moxidectin, Doramectin etc.), Antiinfektiva (Erythromycin, Rifampicin, Ketoconazol), Herzglycoside und andere herzwirksame Medikamente (Digoxin, Verapamil, Diltiazem), Opioide (Morphin, Loperamid, Butorphanol, Fentanyl), Steroidhormone (Cortisol, Dexamethason, Aldosteron) sowie einige andere Stoffe, wie z.B. Cimetidin, Acepromacin,

Domperidon oder Ondansetron zum Substratspektrum (Fromm, 2004; Gerloff, 2004; Marzolini et al., 2004; Ohtsuki & Terasaki, 2007; Ueda et al., 1992).

1.1.4. Vorkommen des P-Glycoproteins

Neben der funktionellen Bedeutung in der Zellmembran von Krebszellen wird Pgp noch in anderen Geweben stark exprimiert. Wie bereits oben erwähnt, findet man es z.B. in der Membran der Endothelzellen in der Blut-Hirn-Schranke. Des Weiteren ist es in der luminalen (apikalen) Bürstensaummembran des Dünndarms zu finden, wo es eine Barrierefunktion übernimmt und die Aufnahme von bestimmten Substraten aus dem Darm vermindert. Ebenfalls in der apikalen Membran sitzt *MDR1* in den Nierentubuli und in der kanalikulären Hepatozytenmembran in der Leber. In diesen beiden Organen sorgt der Transporter für die Ausscheidung von Substraten aus dem Körper. Weitere Expressionsorgane sind Plazenta (apikal in den Synzytiotrophoblasten), Hoden, Nebennierenrinde und hämatopoetische Stammzellen (Thiebaut et al., 1987, 1989; Cordon-Cardo et al., 1989, 1990; Sugawara et al., 1988; Chaudhary et al., 1991, 1992; Ginn, 1996). *MDR1* spielt einerseits eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme und der Ausscheidung von Arzneistoffen. Aber vor allem stellt das Protein eine entscheidende Schutzbarriere gegenüber Arzneistoffen und möglichen toxischen Substanzen dar, in dem es das Eindringen in das ZNS und in die Fortpflanzungsorgane verhindert.

1.1.5. Die *mdr1*^{-/-}-Maus

Die Identifizierung der Substrate fand zunächst in reinen *in vitro* Studien statt. Es wurden zum einen Modelle verwendet, die neben der Expression verschiedener Transporter in der Zellmembran vor allem eine hohe Expression an Pgp aufwiesen, wie z.B. die Caco-2 Zelllinie. Zum anderen transfizierte man das Protein zunächst in Zellen, um dann den Transport der Testsubstanz in *transwell*-Verfahren oder auch mit Hilfe von Vesikelpräparationen nachzuweisen. Hier werden auch heute noch MDCK (Madin-Darby canine kidney) - Zellen verwendet (Sarkadi et al., 2006; Hellinger et al., 2012).

Mit Hilfe der *mdr1*-Knockout Maus konnten erstmals funktionelle *in vivo* Studien durchgeführt werden und Knockout-Tiere mit Wildtyp-Tieren verglichen werden. Wie bereits oben erwähnt, besitzt die Maus ein *mdr1a* (auch als *mdr3* bezeichnet) und ein *mdr1b* Gen. Beide zusammen bilden das Pendant zum *MDR1* Gen des Menschen. Trotzdem werden beide Gene in der Maus nicht gleichstark in allen Organen exprimiert. Besonders hoch sind die RNA-Level für *mdr1a* im Gehirn, im Darm, in der Leber und im Hoden. Dagegen wird *mdr1b* überwiegend in der Nebenniere, der Plazenta, dem Uterus und den Ovarien exprimiert. Gleiche Level zeigen beide Gene in Niere, Herz, Lunge, Thymus und Milz (Croop et al., 1989, Schinkel et al., 1994). Im Jahre 1994 gelang es Schinkel und Mitarbeitern durch eine gerichtete Mutation zunächst eine *mdr1a*-Knockout Maus und später eine *mdr1a,b*-Doppelknockout Maus zu generieren (Schinkel et al., 1994, 1997a). Rein vom Phänotyp zeigten die Knockout-Tiere zunächst keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren. Auch konnten keinerlei Veränderungen der physiologischen Parameter festgestellt werden. Die Knockout-Tiere waren lebensfähig und fruchtbar. Einzig eine im Alter vermehrt auftretende Colitis bei den Knockout-Tieren konnte vermerkt werden (Panwalla et al., 1998). Durch Zufall wurde die Unverträglichkeit von Makrozyklischen Laktonen bei fehlendem Pgp entdeckt; bis zu diesem Zeitpunkt war noch nicht bekannt, dass die Makrozyklischen Laktone in das Substratspektrum von Pgp fallen.

Die Tiere wurden in einer kontrollierten, keimfreien Haltung untergebracht. Es konnte trotzdem nicht verhindert werden, dass sich eine Milbeninfektion ausbreitete und auch die *mdr1a*^{-/-}-Mäuse behandelt werden mussten. Klassischerweise werden die Tiere mit dem Makrozyklischen Lakton Ivermectin (IVM) behandelt, in dem sie mit einer Lösung eingesprüht werden und den Wirkstoff so über die Haut aufnehmen. Es lässt sich allerdings dabei nicht verhindern, dass die Tiere einen Teil der Substanz während der Fellpflege oral aufnehmen. Der Arzneistoff wird trotzdem gut von den Tieren vertragen. Nach der Verabreichung des Arzneistoffes zeigten nur die *mdr1a*^{-/-}-Mäuse zunächst Ataxien, Festliegen, Stupor und schließlich komatöse Zustände. Der größte Teil der Tiere verstarb schließlich. Nach diesem Ereignis wurde eine geplante Toxizitäts-Studie durchgeführt, mit dem Ergebnis, dass die *mdr1a*-Knockout Maus 50- bis fast 100-fach sensitiver auf Ivermectin reagierte als die Wildtyp Maus. Die LD₅₀-Werte für die Knockout-Maus lagen bei 0,7-0,8 mg/kg, dagegen lagen die Werte der Wildtyp Maus bei 50-60 mg/kg. Ebenso wurden die

Organkonzentrationen beider Mauslinien 24 Stunden nach oraler Gabe von radioaktiv-markiertem Ivermectin gemessen und man stellte im Gehirn 87-fach höhere Werte bei der Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp Maus fest. In fast allen anderen Organen lagen die Konzentrationen 3- bis 4-mal höher. Dies ließ sich nur durch eine höhere Aufnahme der Substanz bei fehlendem Pgp-Transporter aus dem Darm erklären (Schinkel et al, 1994, 1997). Neben der künstlich generierten Knockout-Maus wurde im Jahr 1995 in den Merck Research Laboratories eine Subpopulation der CF-1 Mauslinie entdeckt, die ebenfalls überempfindlich auf Avermectine reagierte (Lankas et al., 1997). Bei weiteren Untersuchungen dieser Subpopulation entdeckte man, dass die Tiere kein Pgp in den Gehirnkapillaren aufwiesen. Grund dafür ist eine Insertion eines murinen Leukämie-Virus in das *mdr1a*-Gen, so dass es zu einem nicht korrekten Splicing im *mdr1a*-Transcript und schlussendlich zur Expressierung eines nicht funktionsfähigen P-Glycoproteins kommt (Umbenhauer et al., 1997; Pippert & Umbenhauer, 2001; Jun et al., 2000). Bei Applikationsstudien konnte diese Überempfindlichkeit mit einer bis zu 70-fach höheren Gehirnkonzentration nach oraler Gabe von 0,2 mg/kg Ivermectin belegt werden (Kwei et al., 1999).

Es zeigt sich also, dass Makrozyklische Laktone eine der wichtigsten Substratgruppen des Pgp darstellen. Für die Tiermedizin hatte diese Erkenntnis eine sehr große Bedeutung. Seit den 70er Jahren kannte man bereits eine Ivermectin-Unverträglichkeit bei Hunden der Rasse Collie. Jetzt konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass diese Collies, vergleichbar zu den Mäusen, einen genetischen Defekt im *mdr1* Gen aufweisen könnten.

1.2. Der *MDR1*-Defekt des Hundes

1.2.1. Der Ivermectin-sensitive Collie

Zu Beginn der 80er Jahre wurde immer wieder von Fällen berichtet, bei denen Hunde, zumeist der Rasse Collie, mit Ivermectin-haltigen Präparaten für Rinder und Pferde behandelt wurden und im Anschluss eine Mydriasis, Tremor und Ataxien entwickelten. Ivermectin wurde in den USA zur Herzwurm-Prophylaxe angewendet, allerdings waren Präparate speziell für Hunde zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf dem Markt (Seward, 1983;

Easby, 1984). Um diesen Nebenwirkungen weiter auf den Grund zu gehen, wurde eine kontrollierte Studie an Beagle durchgeführt, die eine gute Verträglichkeit der Substanz in therapeutischer Dosierung von 0,2 mg/kg zeigten. Auch eine einmalige Gabe von 2 mg/kg oder 0,5 mg/kg über 14 Tage verlief ohne Auftreten von toxischen Nebenwirkungen. Ab einer einmaligen Gabe von 2,5 mg/kg zeigten die Hunde erstmals eine Mydriasis, bei steigender Dosierung bis zu 10 mg/kg starken Tremor und Ataxien. Die extrapolierte LD₅₀ lag für den Beagle bei 80 mg/kg (Campbell & Benz, 1984). Warum aber einige Collies deutlich sensibler auf den Wirkstoff reagierten und bei welcher Dosierung die ersten Nebenwirkungen auftraten, war noch nicht geklärt. Daher führten *Pulliam und Mitarbeiter* im Jahre 1985 eine Studie nur mit Collies durch. Es wurden 16 Collies unterschiedlichen Alters, sowohl männlich als auch weiblich, eingesetzt. Zur Hälfte wiesen sie eine CEA (Collie Eye Anomalie) auf. Aufgeteilt in vier Gruppen wurden 50 µg, 200 µg und 600 µg/kg Ivermectin verabreicht, eine Gruppe diente als unbehandelte Kontrollgruppe. Jeweils zwei Hunde zeigten nach Gaben von 200 µg/kg und 600 µg/kg neurotoxische Vergiftungsanzeichen, zwei von diesen vier Hunden verstarben an den Folgen der Vergiftung. Ein Zusammenhang zwischen Geschlecht, Alter, CEA und der Sensitivität gegenüber Ivermectin konnte nicht gefunden werden (Pulliam et al., 1985). Weitere Studien folgten, bei denen Collies mit aufsteigender Dosis Ivermectin behandelt wurden und daraufhin in Gruppen mit und ohne klinische Anzeichen einer Vergiftung bzw. in Gruppen mit milden und schweren Anzeichen einer Vergiftung eingeteilt werden konnten. Hier zeigten einige Tiere sogar schon bei der Gabe von 100 µg/kg leichte Vergiftungsanzeichen. Dosisabhängige Vergiftungsanzeichen und der zeitliche Verlauf konnten genauer beschrieben werden (Paul et al., 1987), Plasmaproben vor und nach der Gabe von Ivermectin an IVM-sensitive und nicht-sensitive Collies wurden gesammelt und analysiert. Aber auch diese Studie gab keinen näheren Hinweis auf die IVM-Unverträglichkeit, da die IVM-Konzentrationskurven im Plasma bei beiden Gruppen fast identisch verliefen (Tranquilli et al., 1989). Des Weiteren wurde die in den USA zugelassene Ivermectin-Formulierung zur Prophylaxe gegen Herzwürmer an IVM-sensitiven Collies angewendet. Bis zu einer 10-fachen Überdosierung (60 µg/kg) zeigte keiner der Hunde eine toxische Nebenwirkung (Fassler et al., 1991).

Neben Ivermectin wurden auch andere Makrozyklische Laktone an Collies getestet, z.B. Milbemycin D, Milbemycinoxim und Moxidectin. Milbemycin D wurde bis zu einer Dosierung von 5 mg/kg über 10 Tage oral verabreicht und es wurden bei fast allen Collies schwere Zeichen einer Vergiftung festgestellt (Sasaki et al., 1986, 1988a, 1988b). Dagegen konnte Milbemycinoxim über 10 Tage in einer Dosierung von 2,5 mg/kg oral verabreicht werden und lediglich ein Collie zeigte ganz leichte Vergiftungsanzeichen (Sasaki et al., 1990). Die Verabreichung einer Einzeldosis von 12,5 und 25 mg/kg erzeugte ebenfalls keinerlei toxische Nebenwirkungen (Sasaki et al., 1990). In einer späteren Studie, in welcher ausschließlich IVM-sensitive Collies eingesetzt wurden, zeigten zwei von fünf Hunden nach Gabe von 5 mg/kg leichte Anzeichen einer Vergiftung und nach Gabe von 10 mg/kg sogar fünf von fünf Hunden diese Anzeichen (Tranquilli et al., 1991).

Moxidectin wurde ebenfalls an identifizierten IVM-sensitiven Collies verabreicht. Es wurden 30, 60 und 90 µg/kg oral gegeben, ohne eine Vergiftung feststellen zu können (Paul et al., 2000).

Die Frage, warum manche Collies auf die Makrozyklischen Laktone mit neurotoxischen Nebenwirkungen reagierten, konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt werden. Ebenso blieb die Frage offen, warum manche Hunde stärker und manche schwächer auf die Substanzen reagierten und warum es einen so großen Dosis-Spielraum zwischen den einzelnen ML gibt.

Erst mit der Generierung der *mdr1a*-Knockout Maus und dem Bekanntwerden der Überempfindlichkeit dieser Mauslinie gegenüber Makrozyklischen Laktonen (Schinkel et al., 1994) sowie durch die Untersuchungen an der CF-1 Subpopulation, welche ebenfalls eine Sensitivität gegenüber ML aufwiesen und bei denen festgestellt wurde, dass sie kein Pgp in der BHS exprimieren (Umbenhauer et al., 1997), gab es erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der ML-Unverträglichkeit des Hundes und der Funktion von Pgp.

1.2.2. Die Entdeckung des *MDR1*-Defekts

Auf Grund der bisherigen Erkenntnisse lag die Hypothese nahe, dass ein defektes P-Glycoprotein in der BHS der Grund für die Überempfindlichkeit der Collies sein könnte. Durch Sequenzierung des *mdr1* Gens von sensitiven und nicht-sensitiven Collies entdeckten

Mealey und Mitarbeiter 2001 als erste eine 4-Basenpaar Deletion an Position 230 des offenen Leserahmens auf Exon 4 des *mdr1* Gens. Diese sog. nt230(del4) Mutation (syn. *MDR1-1Δ*, *ABCB1-1Δ*) führt zu einer Verschiebung des *MDR1*-Leserahmens ab Aminosäure (AS) 75 und resultiert in einem verfrühten Stopcodon an AS-Position 91. Das daraus resultierende Protein repräsentiert nur noch ca. 7% des Gesamtproteins, welches normalerweise ein Größe von 1281 AS aufweist, und konnte mittels Western Blot nicht mehr nachgewiesen werden (Roulet et al., 2003). Weitere Untersuchungen zeigten, dass alle IVM-sensitiven Collies den Defekt homozygot auf beiden Allelen trugen, während die nicht-sensitiven Collies einen heterozygoten Genotyp oder den homozygot intakten Genotyp aufwiesen (Mealey et al., 2001).

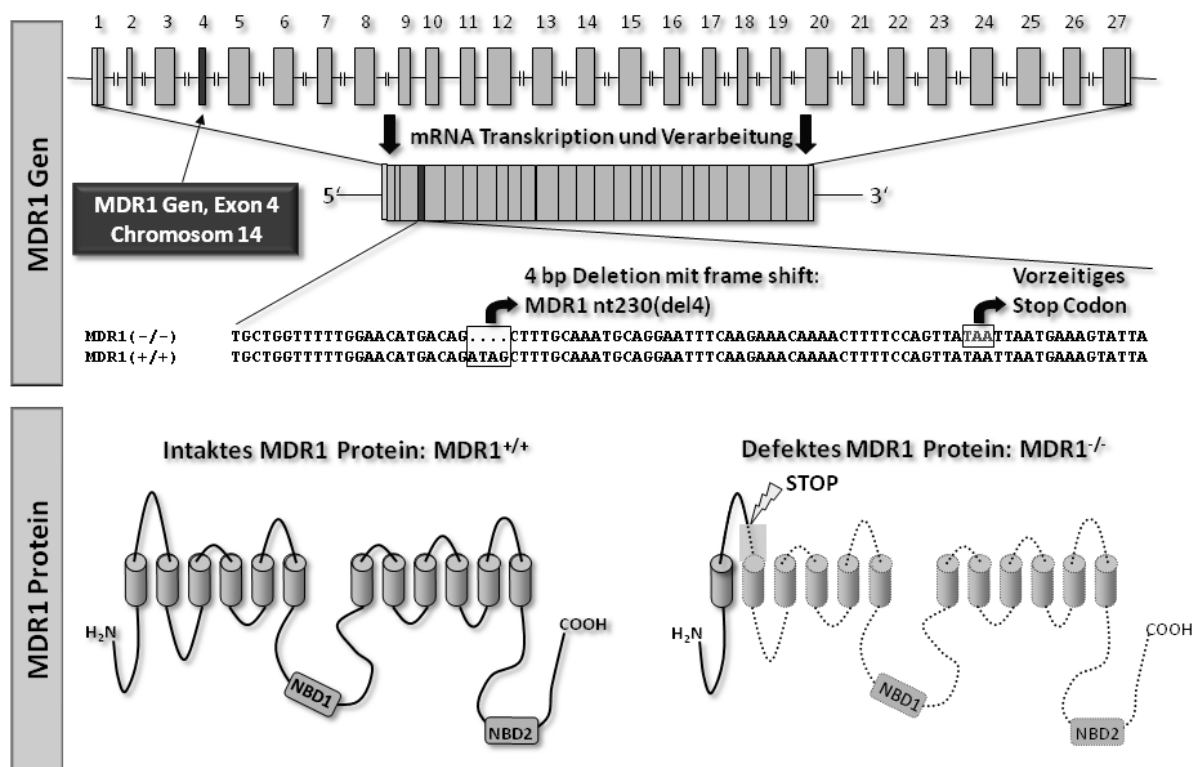


Abb. 1.2: Die nt230(del4) *MDR1*-Mutation des Hundes

Das *MDR1* Gen des Hundes liegt auf Chromosom 14 und besteht aus 27 Exonen. Insgesamt besteht der Leserahmen aus 3846 Basenpaaren, welche für die 1281 Aminosäuren des caninen Pgp codieren. Die 4 Basenpaar(bp)-Deletion in Exon 4 führt zu einem vorzeitigen Stopcodon (TAA) und damit zu einer unvollständigen Translation des Proteins. Dieses ist funktionsunfähig (modifiziert nach Geyer & Janko, 2012).

Es wurden weitere Substanzen auf ihre Verträglichkeit bei fehlender Funktion des P-Glycoproteins untersucht, sowohl an Hunden als auch an der *mdr1*^{-/-}-Maus. Dabei führte z.B. das Antidiarrhoikum Loperamid schon in therapeutischer Dosierung zu Vergiftungserscheinungen bei *MDR1*-defekten Hunden (Hugnet et al., 1996; Sartor et al., 2004; Schinkel et al., 1996).

Weitere Substanzen wie Vinca-Alkaloide, Ondansetron, Cyclosporin, Chinidin und Verapamil wurden zunächst nur an *mdr1*-Knockout Mäusen getestet und als Pgp-Substrate identifiziert. Sie führten bei den Knockout-Tieren zu erhöhten Gehirnkonzentrationen und Vergiftungsanzeichen (Schinkel et al., 1994, 1995b, 1996; Doran et al., 2005). Entsprechendes gilt vermutlich auch für Hunde mit *MDR1*-Defekt.

Acepromazin und Butorphanol zeigten bei *MDR1*-defekten Collies eine deutlich ausgeprägtere sedative Wirkung als bei Hunden mit intaktem Pgp (Mealey, 2006). Ebenfalls wurde von einem *MDR1*-defekten Collie berichtet, welcher Vergiftungserscheinungen nach Gabe von Digoxin zeigte (Henik et al., 2006). *Mealey und Mitarbeiter* präsentierten im Jahre 2008 eine Studie, in der 34 Hunde mit einem Lymphom im Rahmen einer Chemotherapie mit Vincristin behandelt wurden. Acht Hunde trugen homo- oder heterozygot den *MDR1*-Defekt. Es zeigte sich, dass diese Hunde deutlich anfälliger für eine Vincristin-induzierte Myelosuppression mit folgender Neutropenie und Thrombozytopenie waren.

Seit Bekanntwerden der nt230(del4) *MDR1*-Mutation wurden verschiedene Methoden zum Nachweis benutzt. Eine der häufigsten Methoden ist die Amplifikation der Region um das Basenpaar nt230 auf Exon 4 mittels PCR und anschließender Gel-Elektrophorese (Neff et al., 2004; Mealey et al., 2005, Geyer et al., 2005a, 2005b, 2007). Um größere Gruppen von Tieren, z.B. auch im Rahmen eines diagnostischen Tests, untersuchen zu können, entwickelten *Geyer und Mitarbeiter* eine Real-time PCR basierte Methode, welche zwei Allel-spezifische Fluoreszenz-markierte Sonden nutzt, um spezifisch entweder das Wildtyp-Allel oder das mutierte Allel nachzuweisen (Klintzsch et al., 2009). Je nach Signal kann man so zwischen einem Hund ohne Gendefekt (*MDR1*(+/+)), mit homozygotem Gendefekt (*MDR1*(-/-)) oder einem heterozygotem Defekt (*MDR1*(+/-)) unterscheiden (Klintzsch et al., 2009).

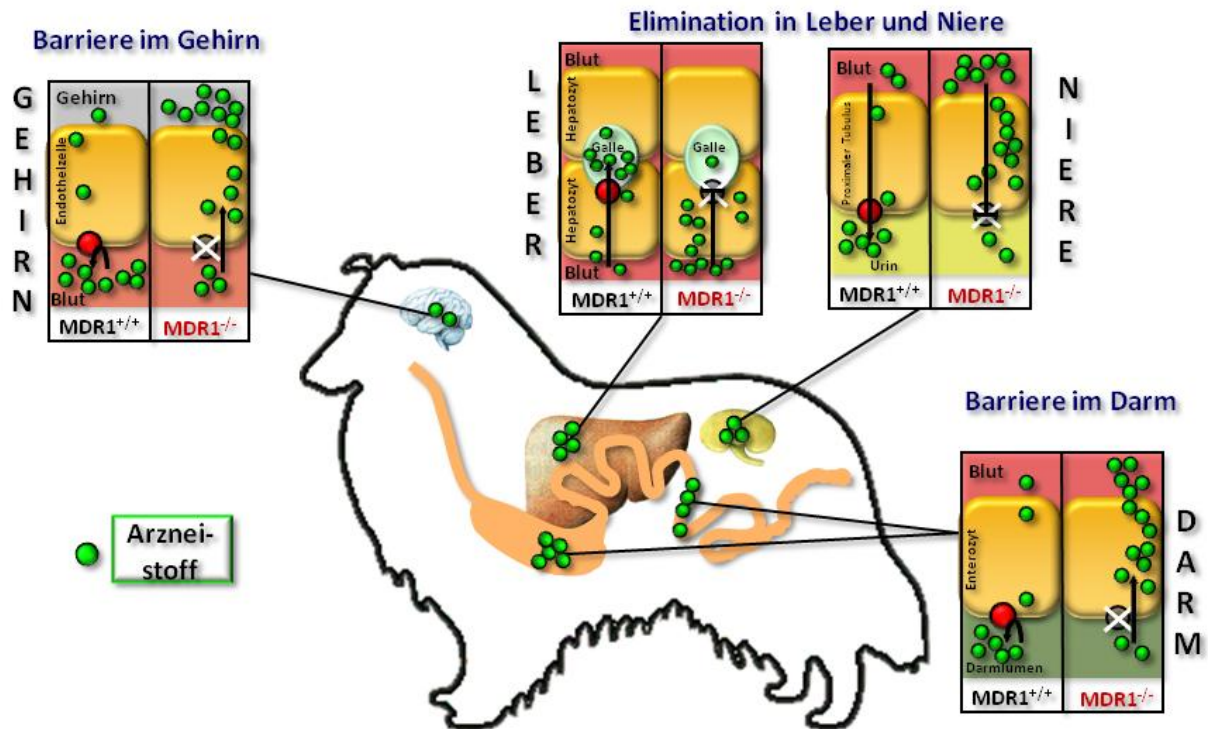


Abb. 1.3: Die Aufgaben von P-Glycoprotein beim Arzneistofftransport

Der ATP-getriebene Effluxtransporter Pgp (roter Kreis) pumpt seine Substrate aus der Zelle. Bei intaktem Protein wird der Eintritt von Arzneistoffen in den Organismus nach oraler Aufnahme limitiert, die Elimination über Niere und Leber gefördert und das Eindringen der Substanz in das zentrale Nervensystem verhindert. Bei Hunden, die den *MDR1*-Gendefekt tragen, ist die enterale Aufnahme von Arzneistoffen verbessert, dagegen die Ausscheidung über Urin und Galle reduziert und die Permeation über die Blut-Hirn-Schranke erhöht (modifiziert nach Geyer & Janko, 2012).

1.2.3. Rassenverteilung

Von Anfang an wurde nicht nur von Collies, sondern auch von Hunden anderer Rassen berichtet, die mit Vergiftungserscheinungen auf die Gabe von Ivermectin reagierten. Nach Bekanntwerden des Gendefekts und der Entwicklung von Nachweismethoden wurden ca. 15.000 Hunde weltweit auf die Genmutation untersucht (Gramer et al., 2011). Neben dem Collie (Lang- und Kurzhaar) konnten noch 12 weitere Rassen als Träger des Defektes identifiziert werden: Longhaired Whippet, Shetland Sheepdog, Miniatur Australian Shepherd, Silken Windhound, Mc Nab, Australian Shepherd, Wäller, Weißer Schweizer Schäferhund, Alter Englischer Schäferhund (Bobtail), Englischer Schäferhund, Deutscher Schäferhund und Border Collie (Neff et al., 2004; Geyer et al., 2005b; Mealey et al., 2008;

Gramer et al., 2011). In mehreren Studien ließ sich beweisen, dass der Collie das höchste Vorkommen der Mutation auf einem der beiden Allele aufweist (*MDR1*(-) Allel), nämlich zwischen 51-56% in den USA (Neff et al., 2004; Mealey et al., 2002, 2008), 55-59% in Deutschland (Geyer et al., 2005b; Gramer et al., 2011), ca. 60% in Großbritannien (Tappin et al., 2008) und 56% in Australien (Mealey et al., 2005). Die Verteilung für die restlichen Rassen ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Auch viele Mischlingshunde sind von dem Gendefekt betroffen. Dagegen konnte bei weiteren Rassen, welche züchterisch oder genetisch mit der Collie-Linie verwandt sind, der Gendefekt nicht nachgewiesen werden, z.B. beim Bearded Collie, Kelpie, Australian Cattle Dog und dem Greyhound (Neff et al., 2004; Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011).

Mit dem heutigen Wissensstand sollten die Hunde der gelisteten Rassen vor einer Therapie mit den oben genannten problematischen Arzneistoffen auf den *MDR1*-Gendefekt getestet werden, ebenso wie alle Mischlingshunde, bei denen der Verdacht besteht, dass eine dieser Rassen eingekreuzt wurde. Die Gefahr einer lebensbedrohlichen Vergiftung nach Anwendung eines Pgp-Substrates kann damit kalkulierbar gemacht werden und den Hund schützen.

Tabelle 1.1: Weltweite Rasseverteilung der nt230(del4) *MDR1*-Mutation des Hundes (modifiziert nach Geyer & Janko, 2012)

Hunderasse	Anteil der Allel-Frequenz (%) <i>MDR1</i> (-)	Referenz
Collie	55 – 57	[Neff et al., 2004; Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011]
Longhaired Whippet	42	[Neff et al., 2004]
Shetland Sheepdog	7– 35	[Neff et al., 2004; Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011; Geyer et al., 2005b;Tappin et al., 2008]
Miniatur Australian Shepherd	20 – 26	[Neff et al., 2004; Mealey et al., 2008]
Silken Windhound	18	[Neff et al., 2004]
McNab	17	[Neff et al., 2004]
Australian Shepherd	17 – 46	[Neff et al., 2004; Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011; Geyer et al., 2005b]

Hunderasse	Anteil der Allel-Frequenz (%) <i>MDR1</i> (-)	Referenz
Wäller	17 – 19	[Gramer et al., 2011; Geyer et al., 2005b]
Weißer Schweizer Schäferhund	14	[Gramer et al., 2011]
Altenglischer Schäferhund (Bobtail)	1 – 11	[Neff et al., 2004; Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011; Tappin et al., 2008]
Englischer Schäferhund	7	[Neff et al., 2004]
Deutscher Schäferhund	6	[Mealey et al., 2008]
Border Collie	1 – 2	[Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011; Geyer et al., 2005b; Tappin et al., 2008]
Rasse-Mischlinge	6 – 7	[Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011]
Mischlinge ohne Rassezuordnung	2 – 7	[Mealey et al., 2008; Gramer et al., 2011]

Tabelle enthält nur Daten von Studien, bei denen mindestens 30 Hunde einer Rasse getestet wurden.

1.3. Antiparasitär wirksame Makrozyklische Laktone (ML)

Makrozyklische Laktone werden in die zwei Gruppen der Avermectine und der Milbemycine unterteilt. Zu den Avermectinen gehören Ivermectin, Selamectin, Doramectin, Abamectin und Eprinomectin. Sie sind alle Fermentationsprodukte des Strahlenpilzes *Streptomyces avermitilis* (Campbell & Benz, 1984; Paradis et al., 1998). Während Ivermectin und Abamectin jeweils eine Mischung aus zwei Avermectinen darstellen, sind die restlichen Avermectine Einzelsubstanzen. Die Milbemycine werden ebenfalls von *Streptomyces spp.* fermentiert. Zu dieser Gruppe gehören Moxidectin, Milbemycinoxim und Milbemycin D. Alle ML sind stark lipophil und lassen sich nur schlecht bis gar nicht in Wasser lösen. Sie besitzen eine vermizide und ektoparasitizide Wirkung, welche auf einer schlaffen Paralyse des Parasiten beruht (Campbell et al., 1983; Campbell & Benz, 1984). In Nerven- und Muskelzellen kommt es zu einer gestörten Reizüberleitung, da die ML an Glutamat- und GABA-gesteuerten Chloridkanälen einen erhöhten Chlorid-Einstrom bewirken, die Zellen dadurch hyperpolarisieren und eine Erregungsüberleitung schlussendlich blockiert wird (Turner & Schaeffer, 1989).

Die neurotoxische Wirkung der ML im Säuger wird mit der Bindung an GABA_A-Rezeptoren im ZNS erklärt (Kane et al., 2000). Allerdings wird das Eindringen der ML in das ZNS mit Hilfe einer intakten BHS verhindert. Fehlt aber Pgp als Effluxtransporter in der BHS, z.B. auf Grund eines genetischen Defekts, kann es zu lebensbedrohlichen Vergiftungen bei der Verabreichung von ML kommen.

Trotz ihrer engen Verwandtschaft und ihrer strukturellen Ähnlichkeit unterscheiden sich die einzelnen Substanzen sehr stark in ihrer Dosierung und Verträglichkeit. Während Ivermectin zur Herzwurmprophylaxe in einer Dosierung von nur 6 µg/kg angewendet wird, können andere ML deutlich höher dosiert werden (z.B. Selamectin: 6 mg/kg; Moxidectin: 2,5 mg/kg) und werden zum Teil auch von Hunden mit *MDR1*-Defekt vertragen.

Es ist bis heute noch nicht für alle ML bekannt, wie stark sie in das Gehirn bei fehlendem Pgp penetrieren. Die Bestimmung der absoluten Gehirnkonzentrationen nach Gabe von ML würde eine Aussage über die therapeutische Sicherheit dieser Stoffe ermöglichen. Weiterhin fehlen Daten über neurotoxische Grenzdosen, d.h., ab welcher Dosierung tatsächlich eine Vergiftung beginnt und in wieweit eine Überdosierung schädliche Folgen haben kann.

1.4. Der GABA_A-Rezeptor

Der GABA_A Rezeptor gehört zu der Superfamilie der Cys-Loop Rezeptoren. Zu dieser Familie gehören unter anderem noch der Glycin-, der 5-HT₃ (Serotonin)- sowie der nikotinerge Acetylcholinrezeptor. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die in ihrer N-terminalen Domäne eine Disulfid-Brückenbindung zwischen zwei Cysteinen aufweisen, wodurch eine Schleife (*loop*) entsteht. Man unterscheidet je nach zu transportierendem Ion zwischen exzitatorischen oder Kationen- und inhibitorischen oder Anionenkanälen. Der GABA_A-Rezeptor gehört zu der zweiten Klasse und stellt einen Kanal für Chlorid (Cl⁻)-Ionen dar (Sine & Engel, 2006).

Alle Cys-Loop-Rezeptoren sind Pentamere. Sie bestehen aus fünf unterschiedlichen, nicht verbundenen Untereinheiten, welche kreisförmig angeordnet eine Pore bilden. Jede Untereinheit wiederum besteht aus vier Transmembransegmenten (M1-M4). Für die Bildung der Ionen-leitenden Pore sind die M2-Segmente einer jeden Untereinheit ausschlaggebend. Zusätzlich weisen die Cys-Loop-Rezeptoren eine intrazelluläre Schleife zwischen M3 und M4

auf. Die Liganden-Bindungsstellen liegen jeweils zwischen zwei Untereinheiten im N-terminalen Bereich (Price et al., 2007).

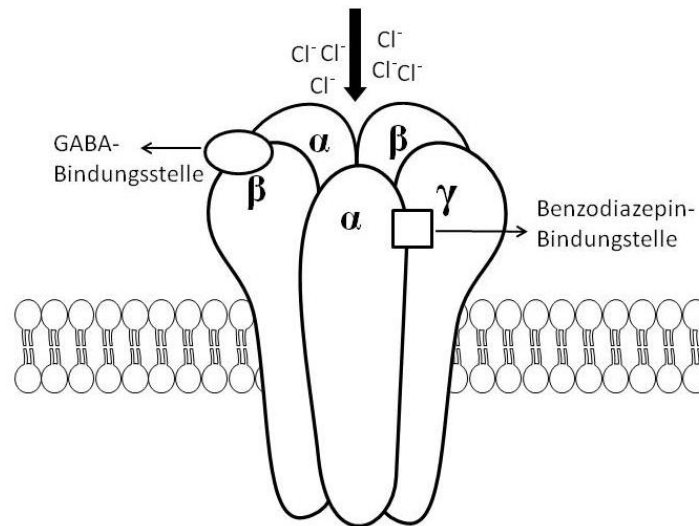


Abb. 1.4: Modell des GABA_A-Rezeptors

Schematische Darstellung eines GABA_A-Rezeptors, bestehend aus zwei α, zwei β und einer γ-Untereinheit. Die Untereinheiten bestehen wiederum aus vier Transmembransegmenten. Die kreisförmig angeordneten Untereinheiten umschließen die mittig liegende Pore. Durch diese strömen Chlorid (Cl⁻)-Ionen in die Zelle ein. Die Bindungsstelle für GABA sowie für die Benzodiazepine konnte bereits identifiziert werden.

Beim GABA_A-Rezeptor von Säugetieren wurden mittlerweile 19 verschiedene Untereinheiten (α₁₋₆, β₁₋₃, γ₁₋₃, δ, ε, π, ρ₁₋₃, θ) identifiziert. Die häufigste Zusammensetzung besteht aus zwei α-, zwei β- und einer γ-Untereinheit (Smith & Olsen, 1995). Der GABA_A-Rezeptor weist neben der Bindungsstelle für seinen Liganden γ-Aminobuttersäure (GABA) auch eine Bindungsstelle für Benzodiazepine und Barbiturate auf. Mittlerweile konnte an Rattenneuronen eine Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren durch Ivermectin gezeigt werden (Dawson et al., 2000). Des Weiteren konnte auch MOX als Ligand des GABA_A-Rezeptors identifiziert werden, da bei gleichzeitiger Gabe einer geringen Menge an GABA die Wirkung von MOX potenziert werden konnte (Ménez et al., 2012). Es ist also davon auszugehen, dass auch die anderen ML Liganden des GABA_A-Rezeptors sind.

1.5. Ziel dieser Arbeit

Auf der Grundlage der dargestellten Erkenntnisse war es Ziel dieser Arbeit, die Gehirngängigkeit und die absoluten Gehirnkonzentrationen der ML Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim im Zusammenhang mit einem fehlenden *MDR1*-Transporter im Mausmodell zu untersuchen. Des Weiteren sollte eine Methode entwickelt werden, mit welcher die Neurotoxizität dieser ML messbar und darstellbar gemacht werden kann, um die neurotoxischen Grenzdosen der einzelnen Substanzen zu bestimmen und miteinander zu vergleichen. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit sollte damit insbesondere eine Aussage über das unterschiedliche neurotoxische Potenzial einzelner ML getroffen werden.

2. Versuchstiere

Für die Applikationsstudien wurden männliche und weibliche *mdr1*-defiziente und Wildtyp Mäuse verwendet. Für die Experimente am Rotarod kamen ausschließlich *CF-1 PGP-mutant* Mäuse zum Einsatz.

Bei der CF-1 Mauslinie entdeckte man 1995 im *Department of safety assessment* der *Merck Research Laboratories* in West Point, Pennsylvania, eine Subpopulation, die eine Überempfindlichkeit gegenüber Avermectinen zeigte. In einer ersten Studie wurden die Mäuse zunächst auf ihre Sensitivität gegenüber Abamectin getestet und in je eine Gruppe mit Abamectin-empfindlichen Mäusen und eine Gruppe mit unempfindlichen Mäusen aufgeteilt (Lankas et al., 1997). In den nächsten Jahren konnte auf molekularbiologischer Ebene die CF-1 Mauslinie weiter charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass ein Gendefekt vorliegt, der nur auf das *mdr1a*-Gen der Maus limitiert ist. Mit Hilfe einer Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) war eine Unterscheidung zwischen Abamectin-sensitiven und -resistenten CF-1 Mäusen möglich (Umbenhauer et al., 1997). Die CF-1 Mauslinie stellte ab diesem Zeitpunkt eine gute Alternative zur *mdr1a*^{-/-}-Knockout Maus dar und wurde für Applikationsstudien mit *MDR1* relevanten Substanzen verwendet (Kwei et al., 1999; Cisternino et al., 2001). Die eigentliche genetische Disposition der CF-1 Subpopulation konnte im Jahr 2000 dadurch gezeigt werden, dass die Insertion eines murinen Leukämievirus (MuLV) die Expression eines intakten *mdr1a*-Proteins verhindert (Jun et al., 2000; Pippert & Umbenhauer, 2001). Daher eignete sich diese Mauslinie sehr gut für die in dieser Arbeit durchgeführten Applikations- und Neurotoxizitätsstudien.

Je zwei Zuchtpärchen der *CF-1 Wildtyp* Linie und der *CF-1 PGP-mutant* Linie wurden von der Firma Charles River (CR Laboratories, Research Models and Services, Sulzfeld) kommerziell bezogen. Die Aufrechterhaltung der beiden strikt voneinander getrennten Linien erfolgte über gezielte Anpaarungen. Nach dem Absetzen von der Mutter im Alter von 4 Wochen wurden die Jungtiere nach Geschlechtern getrennt und in Gruppen zu maximal 7 Tieren zusammengesetzt.

Zusätzlich wurden *mdr1a,b*-Doppelknockout Mäuse sowie FVB-Wildtyp Mäuse verwendet. Bei den *mdr1a,b*^{-/-}-Mäusen wurde sowohl das *abcb1a* als auch das *abcb1b* Gen gezielt ausgeschaltet. Während das *mdr1a*-Protein vor allem an der Blut-Hirn-Schranke, im Dünndarm und an der Blut-Hoden-Schranke exprimiert wird, findet man das *mdr1b*-Protein vor allem in der Nebenniere, der Niere und im trächtigen Uterus. Die Generierung erfolgte im Labor von Dr. Alfred Schinkel in den Niederlanden durch doppelte *target deletion* mittels homologer Rekombination transfizierter embryonaler Stammzellen.

Für die vorliegende Arbeit kamen ausschließlich männliche *mdr1a,b*^{-/-}-Mäuse zum Einsatz, welche direkt von der Firma Taconic (European Customer Service, 8680 Ry, Denmark/ Production Site Germantown, NY, USA) im Alter von 8 Wochen bezogen wurden. Als Wildtyp-Kontrollen wurden FVB Mäuse verwendet, welche den genetischen Hintergrund der *mdr1a,b*-Doppelknockout Mäuse darstellen. Der Bezug erfolgte zusammen mit den Knockout-Tieren über die Firma Taconic.

Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen (*spezifiziert-pathogen-freie Bedingungen*) gehalten und in einzeln belüfteten Käfigen (IVC-Käfige) oder Filterdeckel-Macrolon-Käfigen der Firma Tecniplast untergebracht. Es herrschte ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere hatten stets freien Zugang zu Futter und Wasser, welches zuvor, ebenso wie die Einstreu (Fa. LasVendi Produkt Grade 6), autoklaviert wurde. Das Futter stammte von der Firma Altromin. Für die Rotarod-Studien wurden die *CF-1 PGP-mutant* Mäuse aus der SPF-Haltung in die konventionelle Haltung umgesiedelt. Die Mäuse blieben, wenn möglich, in ihrem Gruppenverband. Teilweise mussten aber auch neue Gruppen gebildet werden, was in der Regel problemlos funktionierte. Die Unterbringung im Versuchsraum erfolgte in Käfigen der Firma Ehret EBECO Tecniplast. Es herrschte ebenfalls ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus. Es standen Standard-Nagerfutter der Firma Altromin und Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung.

Erforderliche Genehmigungen

Das Regierungspräsidium Gießen genehmigte alle hier beschriebenen Versuche unter folgenden Aktenzeichen:

V54-19c 20-15(1) Gl 18/11-Nr.5/2009	(Applikationsstudien)
V54-19c 20-15 c Gl 18/11 Nr.A37/2008	(Organentnahme)
V54-19c 20-15(1) Gl 18/11-Nr.64/2008	(Rotarod-Studie)

3. Material

3.1. Applikationslösungen für *in vivo* Versuche

3.1.1. Applikationslösung für die orale Applikation mit [³H]Ivermectin, [³H]Moxidectin und [³H]Milbemycinoxim

Für die *per os* Applikationen standen die Makrozyklischen Laktone Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim sowohl als radioaktive, mit Tritium ([³H]) markierte Substanzen als auch als nicht-radioaktive Kaltsubstanzen zur Verfügung. Ivermectin lag als Mischung aus 80% 22,23-Dihydroavermectin B_{1a} und 20% 22,23-Dihydroavermectin B_{1b} vor. Moxidectin lag sowohl als Reinsubstanz als auch als Mischung mit Imidacloprid vor. Dabei handelte es sich um das *spot-on* Präparat *Advocate*® der Firma Bayer. Die Firma Novartis stellte Milbemycinoxim als Reinsubstanz zur Verfügung. Es handelte sich hierbei um eine Mischung aus einer Methyl- und einer Ethyl-Form (17,7% : 82,3%), auch als A3- und A4-Komponente bezeichnet. Diese Mischung wird üblicherweise auch in den veterinärmedizinischen Präparaten verwendet.

Zur Erstellung der Applikationslösung wurde zunächst anhand der gewählten Dosierung und der Anzahl der Mäuse die benötigte Menge an Kaltsubstanz ermittelt und in einem passenden Lösungsmittel gelöst. Zum Einsatz kam entweder Sesamöl oder 1,2-Propandiol und Glycerinformal im Verhältnis 56% : 44%. Moxidectin im Präparat *Advocate*® ist bereits vom Hersteller in Benzylalkohol gelöst, so dass dieser auch zur weiteren Verdünnung der Lösung verwendet wurde.

Die radioaktiven Substanzen erhielt man in Ethanol gelöst und die Lagerung erfolgte bei -80°C. Jede dieser Lösungen liegt in einer definierten Konzentration, angegeben in µCi/µl, vor. Für jedes Tier wurden ca. 2,5 µCi eingesetzt. Für die jeweiligen Versuche entnahm man die entsprechende Menge der radioaktiven Substanz, es folgte die Verdampfung des Ethanols mit Hilfe von gasförmigem Stickstoff (N₂) und schließlich das erneute Lösen in der vorbereiteten Kaltsubstanz-Lösung.

Vor jedem Versuch wurde das Durchschnittsgewicht der Versuchsgruppe ermittelt und auf dieses eine Applikationsmenge von 100 µl festgesetzt. Die genauen Applikationsvolumina

wurden dann für jede Maus und deren Gewicht errechnet. Die Applikationsmenge von 150 µl/Tier wurde dabei nicht überschritten.

Nach der Herstellung einer jeden Applikationslösung erfolgte die Entnahme von je dreimal 5 µl als Standards der Applikationslösung. Die Standards wurden vorab im Szintillatorkounter gemessen. So konnten die genauen Werte (µCi/µl) errechnet und die tatsächlich applizierten Dosen an jede Maus ermittelt werden.

Die Szintillatorflüssigkeit setzte sich wie folgt zusammen:

Isopropanol	300ml
Aqua bidest.	300ml
Rotiszint eco plus	6000ml

3.1.2. Applikationslösung für die *spot-on* Applikation mit [³H]Moxidectin

Für die *spot-on* Applikationen kam nur Moxidectin zum Einsatz. Als Kaltsubstanz verwendete man sowohl *Advocate*® als auch die Reinsubstanz. Für die *spot-on* Versuche wurden je 10 µCi der radioaktiven Substanz an jede Maus verabreicht. Es wurde ebenfalls, wie bereits beschrieben, zunächst eine Kaltlösung hergestellt, welche auf die mit N₂ abgedampfte radioaktive Substanz gegeben wurde. Die Reinsubstanz Moxidectin wurde bei diesem Versuch in Ethanol gelöst, um von der Haut besser aufgenommen zu werden. Das Applikationsvolumen betrug zwischen 10-15 µl pro Tier. Nach der Herstellung der Applikationslösung folgte die Ermittlung der Standards wie oben beschrieben.

3.1.3. Applikationslösung für die Dosisfindungsstudien am Rotarod mit Ivermectin, Selamectin, Moxidectin und Milbemycinoxim

Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim wurden als Reinsubstanzen verwendet, gelöst in einer Mischung aus 1,2-Propandiol und Glycerinformal (56% : 44%). Die Applikation erfolgte oral mit Hilfe einer Schlundsonde.

Bei den Dosisfindungsstudien erhielt jede Maus eine andere Dosierung. Die Maus, an die die höchste Dosis appliziert wurde, erhielt auch das größte Applikationsvolumen von 100 µl. Aus

diesen beiden Größen wurde die Konzentration der Applikationsstammlösung ermittelt. Die Volumina für die restlichen Mäuse errechneten sich jeweils daraus.

Bekamen alle Mäuse die gleiche Dosis einer Substanz, wurde zunächst das Durchschnittsgewicht der Versuchsgruppe ermittelt und die Konzentration der Stammlösung anschließend so eingestellt, dass 100 µl an eine Maus mit dem Durchschnittsgewicht appliziert werden konnten. Für die abweichenden Gewichte konnten dann die entsprechenden Volumina errechnet werden.

Selamectin lag bereits gelöst in Isopropylalkohol als *spot-on* Präparat *Stronghold 15mg*[®] (Firma Pfizer) vor. Für jede Maus wurde die zu applizierende Menge an Selamectin errechnet, die passende Menge aus der Stammlösung herausgenommen und mit Sesamöl auf das Applikationsvolumen von 100 µl aufgefüllt.

3.1.4. Applikationslösung für die Antagonisierungsversuche mit Ivermectin und Selamectin

Nach der Herstellung einer Stammlösung mit Ivermectin wurde die Reinsubstanz in 1,2-Propandiol und Glycerinformal im beschriebenen Verhältnis gelöst. Für die anschließende Applikation mit Selamectin kam wieder *Stronghold 15mg*[®] als Ausgangslösung zur Anwendung, mit Sesamöl auf das gewünschte Volumen aufgefüllt. Da bei dieser Versuchsreihe alle Mäuse die gleiche Dosis erhalten haben, wurden zwei Lösungen mit bekannter Konzentration hergestellt und nach Gewicht der Maus die passende Menge abgenommen.

3.2. Materialien für die Genotypisierung der CF-1 Mauslinie

3.2.1. Primer

Genotypisierung auf RNA-Ebene

Primerpaare	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _m (C°)
Primerpaar A (Exon3-Exon16)	<i>Mdr1a</i> cDNA 1F	gatggaacttgaagaggacc	58,0
	<i>Mdr1a</i> cDNA 2R	catgtggtccacagatgct	57,0
Primerpaar B (Exon16-Exon20)	<i>Mdr1a</i> cDNA 3F	agcatctgtggaccacatg	57,0
	<i>Mdr1a</i> cDNA 4R	cgagcctggtggtcagt	57,0
Primerpaar C (Exon20-Exon24)	<i>Mdr1a</i> cDNA 5F	acgatgctgctcaagtg	52,0
	<i>Mdr1a</i> cDNA 6R	tgaactgacctgccccca	55,0
Primerpaar D (Exon24-Exon28)	<i>Mdr1a</i> cDNA 7F	tggggcaggtcagttca	55,0
	<i>Mdr1a</i> cDNA 8R	acttaacatcttacatgggtcac	57,0

Diese Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried) synthetisiert.

Genotypisierung auf DNA-Ebene

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _m (C°)
β-Aktin-F	cgaggcccagagcaagagag	63,5
β-Aktin-R	atgggcacagtgtgggtgac	61,4
GAPDH-F	acgggaagctcactggcatg	61,4
GAPDH-R	ccaccacctgttctgttag	61,4
Intron22-F (F1)	tgggtagatgtgttgggaggtg	62,1
Intron22-R (R1)	tgtgtgaatttgggaaactgcctc	61,0
MuLV-F (F3)	caggctgggcagtcaatcactc	64,0
MuLV-R (R2)	gccagctaactgcagtaacgcc	64,0
Exon22-F (F2)	tgaaaacttccgcactgttgcctc	61,0
Exon23-R (R3)	gaaaaatacatcatggcctgggtg	61,0

Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und der Firma Metabion international AG (Martinsried) synthetisiert.

3.2.2. Hitzebeständige DNA-Polymerasen

Bezeichnung	Hersteller
Fast Start High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
→ Mischung aus einer <i>Taq</i> Polymerase und einer Polymerase mit 3'→5' Exonuklease-Aktivität, um eine hohe Lesegenauigkeit zu erreichen (<i>proofreading activity</i>)	
→ bei einer Temperatur von unter 75°C inaktiv und erst durch eine 2-4 minütige Inkubation bei 95°C aktiviert (<i>hot start</i>)	
ThermoPrime Taq DNA Polymerase	ABgene, Hamburg
→ <i>Taq</i> Polymerase	
Expand High Fidelity^{Plus} PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
→ Mischung aus einer <i>Taq</i> -Polymerase und einer Polymerase mit <i>proofreading activity</i>	
→ Polymerase mit deutlich höherer Ausbeute im Vergleich zu <i>Taq</i> -Polymerasen	

3.2.3. Längenstandards

Agarose-Gelelektrophorese		
GeneRuler DNA Ladder Mix	100, 200, 300, 400, 500 , 600, 700, 800, 900, 1000 , 1200, 1500, 2000, 2500, 3000 , 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp	Fermentas GmbH, St.Leon-Roth
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	100, 200, 300, 400, 500 , 600, 700, 800, 900, 1000 , 1200, 1500, 2000, 3000 bp	Fermentas GmbH, St.Leon-Roth
GeneRuler Low Range DNA Ladder	25, 50, 75, 100 , 150, 200, 300 , 400, 500, 700 bp	Fermentas GmbH, St.Leon-Roth
peqGOLD High Range RTU RNA Ladder	200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000 bp	PeqLab, Erlangen

3.2.4. Agarose Gelelektrophorese

Native Gelelektrophorese (DNA)

10x TAE-Puffer (1 l) (Stocklösung)	TRIS	400 mM	484,0 g
	Essigsäure		114,2 ml
	0,25 M EDTA, pH 8,0	100 mM	400,0 ml
	→ als 1x Puffer verwendet		
6x DNA Loading Dye (Fermentas GmbH, St.Leon-Roth)	TRIS-HCl (pH 7,6)	10 mM	
	Bromphenolblau	0,03%	
	Xylen Cyanol FF	0,03%	
	Glycerin	60,0%	
	EDTA	60 mM	
EB-Färbelösung	Ethidiumbromid in H ₂ O	1 µg/µl	
1,5% Agarosegel	Agarose		1,5 g
	1x TAE Puffer		100,0 ml

Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (RNA)

DEPC-ddH₂O (1 l)	DEPC [1 mg/ml]	0,1%	1,0 ml
	ddH ₂ O		1,0 l
	→ über Nacht inkubiert		
	→ autoklaviert		
10x MOPS-Puffer (400 ml)	MOPS	200 mM	16,74 g
	Natriumacetat	100 mM	3,28 g
	20 mM EDTA	1 mM	20,0 ml
	DEPC-ddH ₂ O		380,0 ml
	→ pH 7,0 (NaOH)		
	→ lichtgeschützt gelagert		
	→ als 1x Puffer verwendet		
Agarosegel	Agarose		1,0 g
	DEPC-ddH ₂ O		40,0 ml
	10x MOPS-Puffer		5,0 ml

	→ erhitzt, bis Agarose gelöst		
	Formaldehyd		7,0 ml
	→ nach Zugabe von Formaldehyd		
	Gel sofort gegossen		
1,3 Roti-Load RNA (Ladepuffer) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	Formamid	63,7%	
	MOPS	12,7 mM	
	Natriumacetat	5,1 mM	
	EDTA	0,6 mM	
	Formaldehyd	8,2%	
	Bromphenolblau	0,03%	
	Ethidiumbromid	0,006%	

3.2.5. Puffer und Medien

10x DNA-Isolationspuffer I (50 ml)	NaOH	250 mM	0,5 g
	EDTA	2 mM	0,04 g
	→ als 1x Puffer verwendet		
10x DNA-Isolationspuffer II (50 ml)	TRIS-HCl (pH 8,0)	400 mM	3,2 g
10x PBS-Puffer (1 l)	NaCl	1380 mM	80,0 g
	KCl	27 mM	2,0 g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	100 mM	26,8 g
	KH ₂ PO ₄	18 mM	2,4 g
	→ pH 7,4 (HCl)		
	→ autoklaviert		
	→ als 1x Puffer verwendet		

3.2.6. Kommerzielle Kits und sonstige Materialien

QIAamp DNA Mini Kit (DNA Isolation von Gewebe)	Qiagen GmbH, Hilden
Hi Yield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
<i>RNAlater</i> Tissue Collection: RNA Stabilization Solution	Applied Biosystems, Darmstadt

Tri Reagent	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
SuperScript III First-Strand Synthesis System (cDNA Synthese)	Invitrogen GmbH, Darmstadt
DNase I	Fermentas GmbH, St.Leon-Roth
Wasser für die Molekularbiologie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.3. Chemikalien

1,2-Propandiol (C ₃ H ₈ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Advocate</i> (Moxidectin+Imidacloprid)	Bayer HealthCare, Leverkusen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Benzylalkohol 99% (C ₇ H ₈ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform (CHCl ₃)	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (> 99,5%), reinst (C ₂ H ₆ O)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EB)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (CH ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formamid (CHONH ₂)	Roth, Karlsruhe
Glycerinformal (C ₄ H ₈ O ₃)	Fluka, Steinheim
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Roth, Karlsruhe
Ivermectin	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	J.T.Baker,Deventer, Niederlande
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Milbemycinoxim (Mischung A3- und A4-Komponente)	Novartis Animal Health, Basel
Milbemycinoxim A3 (Methyl Form)	Novartis Animal Health, Basel
Milbemycinoxim A4 (Ethyl Form)	Novartis Animal Health, Basel

MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)	Sigma, Steinheim
Moxidectin	Bayer Healthcare, Leverkusen
Natriumacetat (C ₂ H ₃ O ₂ Na)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Macherey-Nagel, Düren
Rotiszinteco plus	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sesamöl	Aldrich, Steinheim
Stickstoff, flüssig (N ₂)	Messer, Griesheim
Stronghold 15 mg	Pfizer Ltd., Kent, UK
TRIS	Roth, Karlsruhe
TRIS-HCl	Roth, Karlsruhe

3.4. Radioaktiv-markierte Substanzen

Substanz	Spezifische Aktivität (Ci/mmol)*	Konzentration (µM)	fmol/dpm	Hersteller
[³ H]Ivermectin	20,0	50,0	0,0227275	American Radiolabeled Chemicals, St.Louis, USA
[³ H]Moxidectin	14,0	71,43	0,0324679	Amersham Radiolabeling Service, Cardiff, UK
[³ H]Milbemycinoxim	2,256 (0,779 mCi/ml)	345,25	0,2014581	Novartis Isotope Laboratories, Basel, CH
[³ H]Milbemycinoxim A3 (methyl form)	2,354 (0,818 mCi/ml)	347,53	0,1930924	Novartis Isotope Laboratories, Basel, CH
[³ H]Milbemycinoxim A4 (ethyl form)	2,351 (0,77 mCi/ml)	327,47	0,1933144	Novartis Isotope Laboratories, Basel, CH

*Soweit nicht anders angegeben, beträgt die Konzentration 1 mCi/ml

3.5. Geräte

Analysewaagen

Precisa 3000C-6000D

Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz

AE 240

Mettler-Toledo, Gießen

AEJ 220-4M

Kern, Balingen-Frommern

C30 Microbalance

Cahn Instruments, Cerritos, CA, USA

BioPhotometer

Eppendorf, Hamburg

Electrophoresis Power Supply EPS 3500

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Elektrophorese-Kammern

Werkstatt MZI, Gießen

14,5 x 6,5 cm

35,5 x 11,0 cm

Gelschlitten

Werkstatt MZI, Gießen

7,5 x 5,0 cm

12,0 x 18,0 cm

Heizblock

PeqLab, Erlangen

Image Master VDS

GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

Knopfkanüle (18G, 22G)

Unimed S.A., Lausanne, Schweiz

Magnetrührer RCT IKAMAG

IKA Werke GmbH, Staufen

Operationsbesteck

HEBUmedical, Tuttlingen

Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)

Gilson, Middleton, USA

Eppendorf, Hamburg

Biohit, Rosbach v.d.H.

Rotarod

Werkstatt MZI, Gießen

Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)

Werkstatt MZI, Gießen

Thermocycler

Primus 96 advanced gradient

PeqLab, Erlangen

GenAmp PCR System 2400

Perkin Elmer, Rodgau

Ultra-Turrax T25

IKA Werke GmbH, Staufen

UV-Transilluminator

Bachofer, Reutlingen

Vortexer VF2

IKA Werke GmbH, Staufen

Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter	Perkin Elmer, Rodgau
Wärmeschrank	MELAG Medizintechnik, Berlin
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifugen	
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg

3.6. Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Einmalkanülen BD Microlance (20G, 30G)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einmalspritzen BD Plastipak (2 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einmalvenenkatheder	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einwegskalpell	megro GmbH, Wesel
Feindosierspritze	
BD Plastipak 1 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
B. Braun Injekt-F 1 ml	B. Braun, Melsungen
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
PCR-Tubes, 0,2 ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
	Nerbe plus, Winsen/Luhe
RNase away	Molecular Bio Products, San Diego, CA, USA
RNase Zap Wipes	Ambion, Darmstadt
UV-transparente Einmalküvetten	Sarstedt, Nümbrecht

4. Methoden

4.1. *In vivo* Applikationen

4.1.1. *Per os* Applikation

Vor der oralen Applikation wurde den Tieren für ca. 1 bis 2 Stunden das Futter entzogen, Wasser war die ganze Zeit verfügbar. Die Mäuse wurden vor Versuchsbeginn gewogen und das Applikationsvolumen berechnet. Es wurden zwischen 100 und 150 µl der Applikationslösung mit der Schlundsonde an jede Maus appliziert und jede Spritze vor und nach der Applikation gewogen, um die tatsächliche Applikationsmenge zu ermitteln. Nach der Applikation erhielt jede Maus einen Einzelkäfig und direkten Zugang zu Futter.

4.1.2. *Spot-on* Applikation

Den Mäusen wurde vor dem Versuch das Fell im Bereich zwischen den Schulterblättern bzw. im Nacken mit einer Schere entfernt (ca. 6x6 mm) und 10 µl der *spot-on* Lösung mit einer Pipette langsam auf die Haut aufgetragen. Danach wurden die Tiere wieder einzeln in Käfige gesetzt.

4.1.3. Gewinnung der Organ-, Blut- und Urinproben

Nach Ablauf der Versuchszeit zwischen 4 und 24 Stunden wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet, eine Herzpunktion durchgeführt und das somit gewonnene Blut in EDTA-Blutröhrchen überführt. Die Tiere wurden dann auf dem Rücken fixiert, die Bauch- und Brusthöhle eröffnet und die folgenden Organe und Gewebe entnommen: Herz, Lunge, Gehirn, Leber, Milz, Nieren und Nebennieren, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Hoden bzw. Ovarien, Blase, Fettgewebe, Muskelgewebe und Haut. Die Harnblase wurde vor der Entnahme punktiert und der Urin gewonnen. Die entnommenen Organe wurden in zuvor gewogene 2 ml- bzw. 15 ml-Reaktionsgefäße überführt und rückgewogen, um das Organgewicht zu ermitteln. Magen, Dünn- und Dickdarm wurden ausgespült und die

jeweiligen Inhalte separat aufgefangen. Während Aliquots (100 µl) der Blut- und Urinproben sowie der Magendarminhalt sofort mit Szintillatoröl versetzt und gemessen werden konnten, mussten die restlichen Organe zunächst mit 3 M Kalilauge (KOH) versetzt und über Nacht bei 40°C lysiert werden. Anschließend wurden die Proben homogenisiert und jeweils 100 µl einer Probe mit 2 ml Szintillatoröl versetzt und im Counter gemessen.

4.2. Genotypisierung der CF-1 Mauslinie

4.2.1. Isolierung von DNA aus Gewebe

Die DNA wurde mit Hilfe zweier Methoden isoliert.

Zum einen wurde je eine *CF-1 Wildtyp* Maus und eine *CF-1 PGP-mutant* Maus durch Genickbruch getötet, anschließend Leber und Gehirn entnommen und diese bei -80°C eingefroren. Für die Isolierung wurden dann je 200 mg von jedem Organ verwendet, mit PBS versetzt und mit dem UltraTurrax homogenisiert. Aus 100 µl einer jeden Probe erfolgte schließlich mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits die DNA-Isolierung.

Zum anderen wurde die DNA aus Schwanzbiopsien direkt gewonnen. Die Proben wurden dafür zunächst mit 75 µl DNA-Isolationspuffer I für 45 min bei 96°C inkubiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 75 µl des DNA-Isolationspuffers II wurde mittels Photometer der Gehalt an DNA ermittelt (µg/µl) und die Proben bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

4.2.2. Isolierung von Total-RNA aus Gewebe

Für die RNA-Isolierung wurden ebenfalls Leber und Gehirn von *CF-1 Wildtyp* Mäusen und *CF-1 PGP-mutant* Mäusen gewonnen. Je eine Probe eines jeden Gewebes wurde mit 2 ml Tri Reagent versetzt und mit dem UltraTurrax dreimal je eine Minute homogenisiert. Zwischen den einzelnen Behandlungen wurde der UltraTurrax mit DEPC-Wasser und NaOH gereinigt. Nach einer Zentrifugation bei 10.500 rpm für 10 min bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das entstandene Pellet mit Chloroform versetzt, kräftig

geschüttelt und 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Eine weitere Zentrifugation führte schließlich zu einer Phasentrennung. In der obersten, wässrigen Phase befand sich die RNA, welche in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Interphase, welche die DNA enthielt, sowie die rote proteinhaltige Phase wurden eingefroren. Die RNA wurde mit Isopropanol versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch eine weitere Zentrifugation entstand ein RNA-Pellet. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen wurde der Alkohol sorgfältig abgezogen, das Pellet getrocknet und schließlich mit Wasser (30-50 µl) resuspendiert. Anschließend erfolgten eine Konzentrationsmessung mittels Photometrie und die Überprüfung der Reinheit durch eine denaturierende Gelelektrophorese. Bis zur Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

4.2.3.cDNA-Synthese aus Total-RNA

Mit Hilfe des Enzyms *DNase I* der Firma Fermentas wurde zunächst ein Teil der gewonnenen RNA einem sog. *DNase-Verdau* unterzogen. Das Enzym spaltet dabei einzel- und doppelsträngige DNA, welche noch in der RNA vorhanden sein könnte, und reinigt die RNA so nochmals auf. Es wurde pro 1 µg eingesetzter RNA 1 µl 10x Reaction buffer mit MgCl_2 , 1 µl *DNase I* und 1 µl *RNase Out* hinzugefügt und mit DEPC-Wasser auf 9 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde dann für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend 1 µl 25 mM EDTA zugegeben und noch einmal bei 65°C für 10 min inkubiert.

Die cDNA-Synthese erfolgte sowohl aus *DNase-verdauter* als auch aus *unverdauter* RNA mit dem *SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Pro Reaktion wurde entweder 1 µg verdaute oder 5 µg unverdaute RNA eingesetzt, zu jedem Ansatz wurde 1 µl *random hexamers* Primer sowie 1 µl 10mM *dNTP Mix* hinzu pipettiert und -wenn nötig- mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Es folgte die Denaturierung der Proben bei 65°C für die Dauer von 5 min und anschließend das Abkühlen auf Eis für 1 min. Nach Zugabe von 10 µl des *cDNA Synthesis Mix*, bestehend aus 2 µl 10x *RT buffer*, 4 µl 25mM MgCl_2 , 2 µl 0,1M DTT, 1 µl *RNase OUT* und 1 µl *SuperScript III RT*, wurden die Proben zunächst 10 min bei 25°C und anschließend 50 min bei 50°C inkubiert. Die cDNA-Synthese wurde schließlich durch das Erhitzen auf 85°C für die Dauer von 5 min gestoppt. Die cDNA wurde in Aliquots bei -20°C gelagert, für die anschließende PCR wurden jeweils 2 µl der cDNA eingesetzt.

4.2.4. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe dieser Gelelektrophorese wurde die Qualität der RNA kontrolliert. Zur Herstellung des Gels wurde zunächst 1 g Agarose mit 40 ml DEPC-Wasser erhitzt und die Agarose verflüssigt. Zu der heißen Agarose wurden 5 ml kalter 10x MOPS-Puffer und 7 ml kaltes Formaldehyd dazugegeben und direkt im Anschluss das Gel gegossen. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x MOPS-Puffer gefüllt und das erstarrte Gel hineingelegt, der Laufpuffer während der gesamten Laufzeit mit Hilfe von zwei Magnetrührern durchmischt. 1 µg RNA wurden anschließend mit 1,3x Ladepuffer *Roti-Load RNA* (Roth) vermischt und anschließend auf 65°C für 10 min erhitzt. Die so denaturierte RNA wurde danach auf Eis gesetzt und in die Taschen des Gels überführt. Als Längenstandard dienten 3 µl *peqGOLD High Range RTU RNA-Leiter* gemischt mit 6 µl Ladepuffer *Roti-Load RNA* (Roth).

Der Einlauf der Proben erfolgte bei 30 mA für ca. 15 min. Die anschließende Auftrennung der RNA erfolgte bei 60 mA. Nach dem Lauf wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und mit dem UV-Transilluminator beurteilt. Wenn eine reine, nicht-degradierte RNA vorlag, wurde eine Bande bei 5.000 bp (28S-rRNA) und eine zweite Bande bei 1.800 bp (18S-rRNA) sichtbar. Eine degradierte RNA stellte sich als lange Schmierbande dar.

4.2.5. Primerauswahl und Lage der Primer

Die Primer für die Genotypisierung auf RNA-Ebene wurden aus der Veröffentlichung von *Pippert & Umbenhauer* 2001 übernommen, die Primer für die Genotypisierung auf DNA-Ebene hingegen mit Hilfe des Programms *Oligo 4.0* ausgewählt.

Bei der Wahl der Primer wurde versucht, folgende Grundregeln einzuhalten:

- Am 3'-Ende tragen die Primer ein AC, AG, TC oder TG.
- Der (G+C)-Gehalt eines Primers sollte zwischen 50-60% liegen.
- Um Primer-Dimere zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass die Primer nicht untereinander und nicht mit sich selbst komplementär sind.
- ΔG war für eine Loopstruktur größer Null.
- Für jeden Primer wurde die Schmelztemperatur T_m nach folgender Formel ermittelt:

$$T_m = 69,3 + 41 \times \frac{(\text{Anzahl G} + \text{Anzahl C})}{\text{Primerlänge}} - \frac{650}{\text{Primerlänge}}$$

Bei der PCR von *mdr1*-Fragmenten musste beachtet werden, dass die Maus sowohl ein *mdr1a* als auch ein *mdr1b* Gen aufweist, welche sich in den Exon-Sequenzen kaum unterscheiden. Daher wurde die Sequenzspezifität aller Primer vor dem Gebrauch genau überprüft, um eine Fehlhybridisierung zu vermeiden.

Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und der Firma Metabion international AG (Martinsried) synthetisiert und vor dem Einsatz auf eine Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt.

Lage der Primer für die DNA-Genotypisierung:

Das erste Primerpaar lag mit Vorwärts- und Rückwärtsprimer im Intron 22 und diente als Positiv-Kontrolle der PCR. Die weiteren Primer wurden so gewählt, dass die Region von Exon 22 bis Exon 23 überspannt wurde. Des Weiteren wurden Primer für den murinen Leukämievirus gewählt, welcher bei den *CF-1 PGP-mutant* Mäusen zwischen Intron 22 und Exon 23 insertiert ist.

Lage der Primer für die cDNA-Genotypisierung:

Die hier übernommenen Primerpaare A-D nach *Pippert & Umbenhauer 2001* waren so gewählt, dass der gesamte Leserahmen überspannt wurde.

4.2.6. Polymerase-Kettenreaktion

Für die Genotypisierung auf DNA-Ebene wurden die Polymerasen *Thermo Prime Taq DNA Polymerase* (ABgene), *Expand High Fidelity^{plus}* und *Fast Start High Fidelity* (Roche) verwendet. Das optimale Ergebnis mit der höchsten Lesegenauigkeit wurde dabei mit der *Fast Start High Fidelity* Polymerase erzielt, welche dann auch für die Genotypisierung auf RNA/cDNA-Ebene eingesetzt wurde.

Für jede Polymerase gab es ein speziell zusammengestelltes Puffersystem, welches für jeden Reaktionsansatz folgende Mischungsverhältnisse aufwies:

	Thermo Prime Taq	Expand High Fidelity^{Plus}	Fast Start High Fidelity
Enzym	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
10x Puffer	5,0 µl	10,0 µl	5,0 µl
MgCl ₂	3,6 µl	-	-
dNTP-Mix	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Vorwärts-Primer	2,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Rückwärts-Primer	2,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
DNA bzw. cDNA	0,5-10 µl	2,0-4,0 µl	1,0-4,0 µl
ddH ₂ O	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl

Die jeweils eingesetzte Menge der DNA/cDNA betrug zwischen 100 und 500 ng. Die bestmöglichen Ergebnisse wurden dabei mit 100 ng (≈ 2 µl) erzielt. Bei der *Thermo Prime Taq* Polymerase musste noch zusätzlich MgCl₂ zugegeben werden. Dieses war bei den anderen beiden Polymerasen bereits im 10x Puffer enthalten. Bei einer größeren Probenzahl wurde ein *Master Mix* der Reagenzien hergestellt, der in die PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt wurde. Anschließend wurde die DNA und zum Schluss das Enzym hinzugegeben. Die Proben wurden gemischt und herunter zentrifugiert und im *Thermocycler Primus 96 advanced gradient* (PeqLab) oder im *GenAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer) inkubiert.

Für die Genotypisierung wurde ein Touchdown-PCR-Protokoll gewählt. Dabei wurde in den ersten 10 Zyklen eine hohe Anlagerungstemperatur gewählt. Dies hatte den Vorteil, dass man eine höhere Spezifität für die Primerhybridisierung erreichte und die Entstehung insbesondere von Primer-Dimeren verringert wurde. Die niedrigere Anlagerungstemperatur in den folgenden 25 - 35 Zyklen steigerte anschließend die Ausbeute.

Bei der Wahl der Anlagerungstemperatur richtete man sich nach der Schmelztemperatur (T_m) der Primer. Bei der Genotypisierung auf genomischer Ebene entsprach die Anlagerungstemperatur der Schmelztemperatur bzw. wurde maximal 3°C unterschritten ($T_m - 3^\circ\text{C}$). Über die nächsten 10 Zyklen wurde die Temperatur um jeweils 0,5°C pro Zyklus

gesenkt (*touchdown*), so dass in den abschließenden 30-35 Zyklen eine Anlagerungstemperatur von minimal $T_m - 8^\circ\text{C}$ erreicht wurde.

Bei der Genotypisierung auf RNA-Ebene lag die anfängliche Anlagerungstemperatur zwischen 1°C und maximal 3°C über der Primer-Schmelztemperatur ($T_m + 3^\circ\text{C}$) und nach dem *touchdown* maximal 2°C unter T_m ($T_m - 2^\circ\text{C}$).

Die Zeiten der Primer-Verlängerung variierten ebenfalls. Diese richteten sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Im Allgemeinen gilt, dass 1 kb pro Minute durch die Polymerase gebildet werden kann.

PCR-Protokoll für die Genotypisierung der CF-1 Mauslinie

	Genotypisierung (DNA-Ebene)		Genotypisierung (RNA-Ebene)	
Initial-Denaturierung	95°C	2:00 min	95°C	2:00 min
Denaturierung	95°C	0:30 min	95°C	0:30 min
Primer-Anlagerung	max. $T_m - 3^\circ\text{C}$ (-0,5°C/Zyklus)	0:30 min	max. $T_m + 3^\circ\text{C}$ (-0,5°C/Zyklus)	0:30 min
Primer-Verlängerung	72°C	1:30 min	72°C	0:30 min - 2:00 min
} 10 Zyklen				
Denaturierung	95°C	0:30 min	95°C	0:30 min
Primer-Anlagerung	min $T_m - 8^\circ\text{C}$	0:30 min	min $T_m - 2^\circ\text{C}$	0:30 min
Primer-Verlängerung	72°C	1:30 min	72°C	0:30 min - 2:00 min
} 30-35 Zyklen				
Final-Verlängerung	72°C	7:00 min	72°C	7:00 min
Kühlung	4°C	∞	4°C	∞

4.2.7. Native Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Darstellung von DNA-Fragmenten wurde die native Gelelektrophorese verwendet. Da vor allem Fragmente im Bereich von 200 - 2000 Basenpaaren dargestellt werden sollten, wurden 1,5%-Gele verwendet. Dazu wurden 1,5 g Agarose mit 100 ml TAE-

Puffer zum Kochen gebracht und die Agarose gelöst. Das warme, gegossene Gel härtete in der Gelkammer vollständig aus. Danach wurde der Kamm für die einzelnen Geltaschen gezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer überführt, welche mit 1x TAE gefüllt war. Jeweils 10 µl der Probe wurden mit 2 µl 6x Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. In die äußeren Geltaschen wurden 8 µl des Längenstandards *Gene Ruler DNA Ladder Mix* (MBI Fermentas) eingesetzt. Die Elektrophorese lief für kleine Gele (max. 8 Proben) bei 70 mA (5 W; 0,07 kV) bzw. für große Gele (max. 15 Proben) bei 140 mA (28 W; 0,19 kV) und wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblaufront 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Die Gele wurden anschließend ca. 15 min mit Ethidiumbromid (1 µg/µl) gefärbt, danach für die gleiche Zeit gewässert und schließlich mit dem UV-Transilluminator ausgewertet.

4.2.8. Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Die Aufreinigung der PCR-Amplifikate direkt aus den PCR-Ansätzen erfolgte mit dem *HiYield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit* der Firma SLG (Gauting). Ziel war es, mittels Spin-Säulchen, die mit einer Glasfaser-Matrix ausgestattet sind, die DNA-Amplifikate von den restlichen Bestandteilen, wie z.B. Reaktionspuffer oder dNTPs, zu trennen.

Der gesamte PCR-Ansatz (maximal 40 µl) wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit dem fünffachen Volumen *DF Puffer* durch Vortexen vermischt. Dieser Ansatz wurde dann in ein Spin-Säulchen, welches in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gesteckt wurde, gegeben und in einer Tischzentrifuge für 30 s bei 13.200 Umdrehungen/min (*full speed*) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen, anschließend 600 µl des Waschpuffers hinzugefügt und für eine Minute inkubiert. Danach wurde wieder 30 Sekunden bei *full speed* zentrifugiert, erneut der Durchfluss verworfen und das Spin-Säulchen für weitere drei Minuten zentrifugiert. So wurde die Glasfaser-Matrix in dem Säulchen getrocknet. Das getrocknete Spin-Säulchen wurde abschließend in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, zwischen 15 – 50 µl des Elutionspuffers zentral auf die Matrix gegeben und für zwei Minuten stehen gelassen. Nach erneuter Zentrifugation von zwei Minuten befand sich die eluierte DNA dann im Durchfluss.

4.2.9. Aufreinigung der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung wurden die Gele intensiv mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend auf einem UV-Transilluminator betrachtet. Mit einem sterilen Einweg-Skalpell wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Für die Aufreinigung wurde ebenfalls das *HiYield PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit* (SLG, Gaoting) verwendet. Zu dem ausgeschnittenen Fragment wurden 500 µl *DF Puffer* hinzugefügt, mit der Probe vermischt und anschließend die Ansätze bei 55°- 60°C für ca. 10 - 15 Minuten inkubiert, um das Gelstückchen zu lösen. Während dieser Zeit wurde das Reaktionsgefäß immer wieder geschwenkt. Zur Weiterverarbeitung musste die Probe wieder auf Raumtemperatur abgekühlt werden. Es wurde ein Spinsäulchen in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und die Probe in dieses Säulchen überführt. Nach der Zentrifugation bei *full speed* für 30 Sekunden wurde der Durchfluss verworfen. Die Probe wurde dann zweimal mit 600 µl Waschpuffer gewaschen und zum Schluss noch einmal für 3 min trocken zentrifugiert. Das Spinröhrchen wurde in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die Glasfasermatrix wiederum mit 15-50 µl Elutionspuffer für 2 min inkubiert. Die gereinigte DNA befand sich nach der abschließenden Zentrifugation im Durchfluss. Die DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend sequenziert.

4.2.10. Sequenzierung und Auswertung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma *GATC* (Konstanz) durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 30 µl des PCR-Produkts bzw. des Primers in separate 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Das PCR-Produkt lag hierbei in einer Konzentration von 10-50 ng/µl vor und musste gegebenenfalls noch mit ddH₂O aufgefüllt werden. Die Primer wiesen eine Konzentration von 10 pmol/µl auf.

4.3. Rotarod-Methode

Das Rotarod wurde in der Werkstatt des Mehrzweckinstituts (MZI) gebaut. Es handelt sich um eine Apparatur von 52,5 x 31 x 27 cm, in der sich mittig eine stabförmige, rotierende Walze mit einem Durchmesser von 2,5 cm befindet. Auf dieser Walze vollbringen die Mäuse ihre Laufleistung. Durch drei Trennwände wird die Walze in 4 separate Laufbahnen von je 6 cm Breite unterteilt. Die Drehgeschwindigkeit der Walze liegt zwischen 6 und 60 rpm (rounds per minute) und kann über einen Geschwindigkeitsmesser eingestellt werden.

Für jede Laufbahn ist ein separater Zeitmesser eingebaut, um die Gesamtlaufzeit einer jeden Maus messen zu können. Die Laufzeitmessung wird über Knopfdruck gestartet und automatisch beim Herunterfallen der Maus von der Walze gestoppt, da hierbei eine Lichtschranke unterhalb der Walze unterbrochen wird. Unter jeder Laufbahn steht eine Blechschale, in der die Mäuse aufgefangen werden, wenn sie von der Walze fallen.

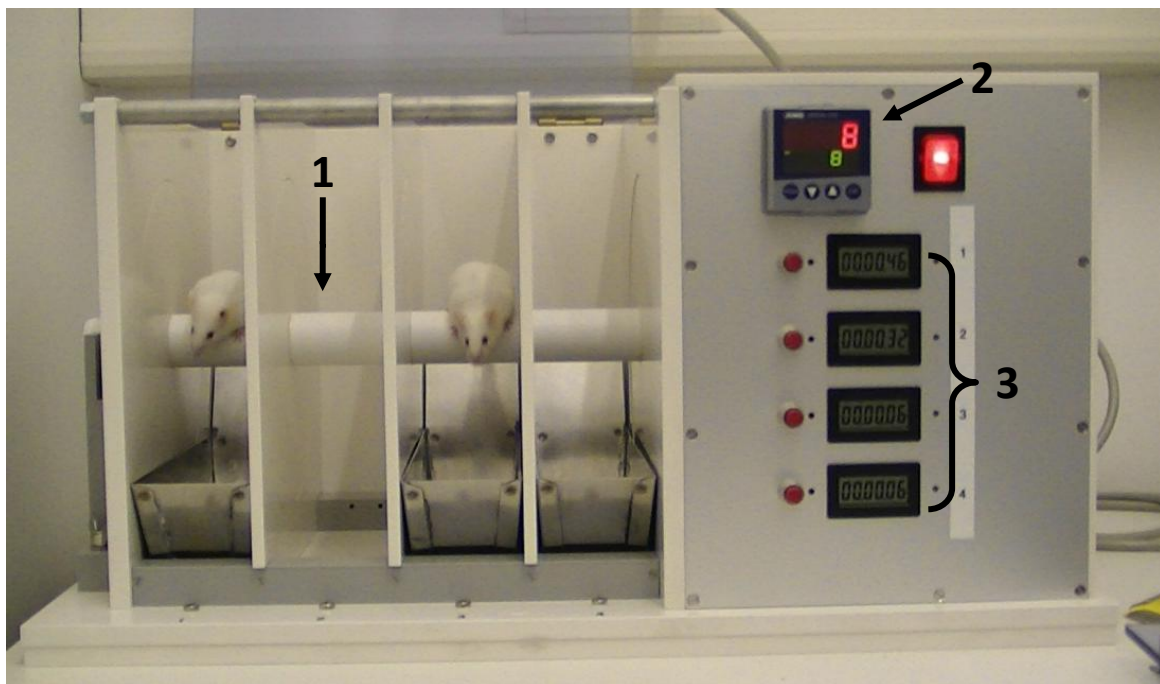


Abb. 4.1: Darstellung des Rotarods

Die rotierende Walze (1) wird durch Trennwände in 4 Laufbahnen unterteilt. Mit Hilfe des Geschwindigkeitsreglers (2) wird die Laufgeschwindigkeit in rpm eingestellt. Die Laufzeit kann mit 4 unabhängigen Stoppuhren gemessen werden (3).

Die Laufbahnen sind an der Rückseite mit einer Platte verschlossen, an der Vorderseite können die Laufbahnen mit 4 Plexiglas-Schiebern und an der Oberseite mit einem Plexiglas-Deckel verschlossen werden.

Für diese Methode wurden ausschließlich *CF-1 PGP-mutant* Mäuse im Alter von 6 bis 14 Monate verwendet. Diese wurden zunächst aus der SPF-Haltung in die konventionelle Haltung gebracht und über 14 Tagen an einen umgekehrten Tag-Nacht-Rhythmus gewöhnt. Das Training und die Versuche mit den Mäusen wurden ausschließlich in der Nachtphase durchgeführt. Während der Eingewöhnungszeit wurden lediglich die Käfige gesäubert und die Mäuse täglich auf die Hand des Experimentators gesetzt, um sie an den Menschen zu gewöhnen.

Nach dieser Zeit begann die Trainingsphase auf dem Rotarod. Dazu wurden die Tiere ein- bis zweimal täglich auf das Rotarod gesetzt und daran gewöhnt, auf der rotierenden Walze zu laufen. Die anfängliche Geschwindigkeit lag zwischen 6-10 rpm und wurde mit zunehmender Laufsicherheit gesteigert, bis die Zielgeschwindigkeit von 16 rpm erreicht war und die Mäuse mit dieser Geschwindigkeit zwei Minuten durchlaufen konnten. Dieser Prozess dauerte ca. 4 bis 6 Wochen.

Die Laufleistung wurde anhand eines Punktesystems von 0 bis 5 Punkten bewertet. Eine Maus erhielt null Punkte, wenn sie überhaupt nicht auf dem Rotarod laufen konnte, fünf Punkte wurden für eine Laufleistung von zwei Minuten bei 16 rpm vergeben (s. Tab. 4.1).

Punkte	Laufzeiten	Beobachtungen
0	0:00 min	Laufen auf dem Rotarod unmöglich
1	0:00–0:29 min	Ataktisches und diskontinuierliches Laufen
2	0:30–0:59 min	bzw. Kriechen auf dem Rotarod
3	1:00–2:00 min	Kontinuierliches Laufen auf dem Rotarod mit milder Ataxie
4	1:00–1:59 min	Uneingeschränktes und kontinuierliches Laufen
5	2:00 min	auf dem Rotarod

Tabelle 4.1: Bewertungsschema der Laufleistung auf dem Rotarod

Die Laufleistung konnte mit Hilfe dieses Punkteschemas graphisch dargestellt werden. Auf der x-Achse wurde die Zeit (Trainingstage bzw. Stunden nach Applikation) und auf der y-Achse die Laufperformance (0 - 5 Punkte) aufgetragen. Um den Grad der Vergiftung bzw. der verminderten Laufleistung darzustellen, wurde für jede Maus die *area over the curve* (AOC) ermittelt (s. Abb. 4.2, schraffierte Fläche). Diese diente insbesondere dem Vergleich des neurotoxischen Potenzials einzelner Makrozyklischer Laktone. Dafür wurde zunächst ein zeitlicher Fixpunkt „t“ festgesetzt, dann die *area under the curve* (AUC) errechnet und diese schließlich von der Gesamtfläche abgezogen. Als zeitliche Fixpunkte wurden folgende gewählt: t = 24 Stunden nach Applikation (Initialphase der Vergiftung), t = 58 Stunden nach Applikation (Ende der „Recovery“-Phase, nach der die meisten Mäuse wieder die volle Laufleistung erlangt haben) und t = 120 Stunden nach Applikation (Versuchslänge). So ergab sich eine Grundfläche von 120, 290 bzw. 600 FE (Flächeneinheiten). Die AOC konnte dann prozentual zur Gesamtfläche ermittelt werden.

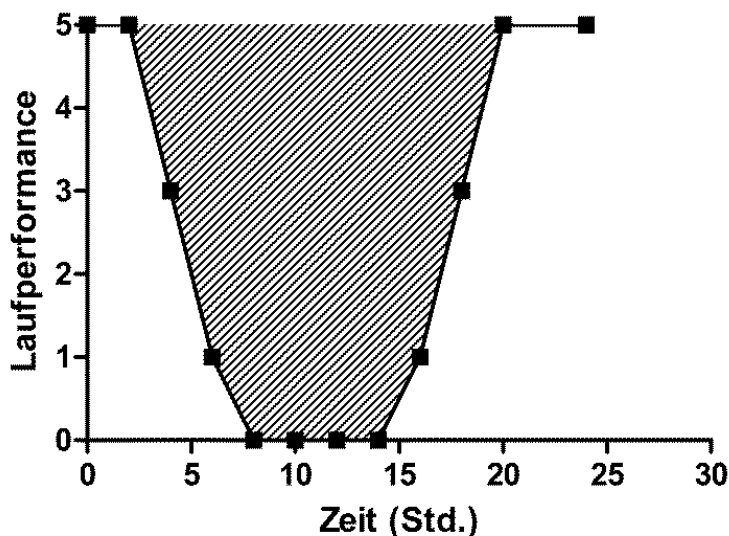


Abb. 4.2: Schematische Laufperformance-Kurve

Nur sicher laufende Mäuse wurden für einen Versuch eingesetzt. Am Tag eines Versuches wurden die jeweiligen Mäuse morgens um 7:00 Uhr einzeln in Käfige gesetzt, für ca. eine Stunde wurde das Futter entzogen, Wasser stand die ganze Zeit zur Verfügung.

Um 8:00 Uhr wurde mit der *per os* Applikation unter Verwendung von Schlundsonden mit 18 G begonnen. Direkt nach der Applikation wurden die Mäuse wieder in ihren Käfig gesetzt und Futter *ad libitum* angeboten.

Nach der Applikation wurden die Laufleistungen für mindestens 24 Stunden im 2-Stunden-Rhythmus mit Hilfe des Rotarod gemessen. Wenn die Laufperformance durch die applizierte Substanz über einen längeren Zeitraum eingeschränkt war, wurden die Mäuse solange überprüft, bis sie wieder eine vollständige Laufleistung erreicht hatten. Die Mäuse wurden nach dem Versuch wieder zu ihrer Mausgruppe zurückgesetzt. Im Durchschnitt dauerte eine Versuchsreihe zwischen 3 und 5 Tagen.

5. Ergebnisse

5.1. Genotypisierung der CF-1-Mauslinie

Durch den Erwerb von Zuchtpaaren konnte die *CF-1 Wildtyp* und *CF-1 PGP-mutant* Linie als eigene Zucht im Zentralen Tierlabor (ZTL) der JLU Gießen etabliert werden. Die Nachzuchten für die Versuchsreihen mussten regelmäßig auf ihren Genstatus hin überprüft werden, so dass die Etablierung einer Genotypisierungsmethode vonnöten war.

Die Insertion des murinen Leukämivirus (MuLV) befindet sich genau am Übergang zwischen Intron 22 und Exon 23 des *mdr1a*-Gens der Maus. Die Primer lagen demnach im Intron 22 (F1 und R1), im Exon 22 (F2) sowie im Exon 23 (R3). Zusätzlich wurden zwei Primer gewählt, die im Virus selbst lokalisiert waren (F3/R2) (Abb. 5.1 A, B). Mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen konnte auf DNA-Ebene der Bereich von Exon 22 bis Exon 23 überspannt werden und die mögliche Insertion des MuLV detektiert werden. Dabei dienten die Primer F1 und R1 als interne Positivkontrolle der Polymerase-Kettenreaktion. Mit den Kombinationen aus F1/R2, F2/R2 und F3/R3 konnte eine *CF-1 PGP-mutant* Maus sicher identifiziert werden (Abb. 5.1 A). Bei einer homozygoten *CF-1 PGP-mutant* Maus ist bei allen Primerkombinationen ein Amplifikat entstanden, so dass eindeutig die Virusinsertion detektiert werden konnte. Dagegen zeigt die homozygote *CF-1 Wildtyp* Maus nur in der Positivkontrolle ein Amplifikat.

Auf RNA-Ebene wurde ebenfalls eine Genotypisierung durchgeführt. Hierzu wurde das *mdr1a*-Gen *full-length* mit Hilfe der Primerpaare A-D in vier Fragmenten amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenzen der Amplikate von Primerpaar A, B und D waren bei *CF-1 Wildtyp* und *CF-1 PGP-mutant* identisch, lediglich die Sequenz von Primerpaar C unterschied sich bei den Mauslinien (Abb. 5.1 C). Dieses Primerpaar überspannt Exon 21 bis Exon 24, also auch den Bereich der Mutation. Zwei Ereignisse konnten bei der *CF-1 PGP-mutant* Maus in diesem Sequenzabschnitt festgestellt werden: zum einen wird das komplette Exon 23 deletiert, so dass ein Amplifikat von 379 Basenpaaren entsteht; zum anderen wird das Exon 23 durch die Virussequenz ersetzt, das Amplikon ist dann 601 Basenpaare groß. Beide Ereignisse treten mit gleicher Intensität auf (Abb. 5.1 D).

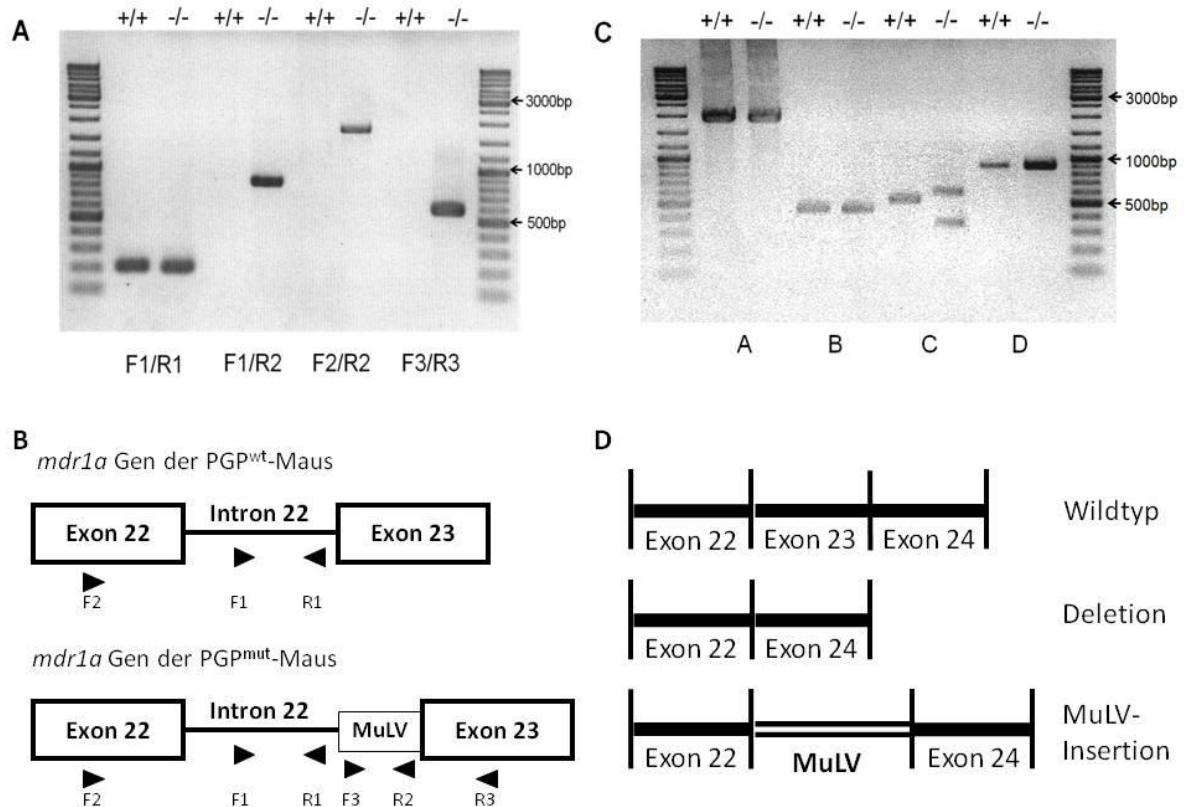


Abb. 5.1: Genotypisierung der homozygoten CF-1 PGP-mutant (PGP^{mut}) und CF-1 Wildtyp (PGP^{wt}) Maus auf DNA- (A,B) und RNA-Ebene (C,D)

(A) Mit der gewonnenen DNA von CF-1 PGP-mutant (-/-) und CF-1 Wildtyp (+/+) Mäusen wurde die PCR mit unterschiedlichen Primerkombinationen durchgeführt. (B) Die Primer waren in Exon 22, Intron 22 und Exon 23 des *mdr1a*-Gens lokalisiert. Die Amplifikate aus den Primerkombinationen F1/R2, F2/R2 und F3/R3 sind der spezifische Nachweis für die CF-1 PGP-mutant Maus. Die Primer F1/R1 dienen der internen PCR Kontrolle. (C) Auf RNA-Ebene wurde der gesamte Leserahmen des *mdr1a*-Gens mit Hilfe der vier Primerpaare A-D amplifiziert. Das Primerpaar C überspannt die Sequenz von Exon 21 bis 24 und beinhaltet die Sequenz der Mutation. (D) Bei der CF-1 PGP-mutant Maus ist entweder das komplette Exon 23 deletiert oder das Exon 23 ist durch die Virussequenz ersetzt (modifiziert nach Janko & Geyer, 2013).

Durch das Wegfallen des Exon 23 fehlen 47 Aminosäuren im P-Glycoprotein von Position 926 bis 972. Dagegen führt das Einfügen der Virussequenz zur Bildung von 73 fehlerhaften Aminosäuren und schlussendlich zum Abbruch der Translation auf Grund eines frühzeitigen Stopcodons.

Standardmäßig wurde die Genotypisierung auf RNA-Ebene nicht bei jeder Maus experimentell durchgeführt, sondern nur an einer repräsentativen Gruppe von Mäusen jeder Linie.

5.2. Organverteilung und Gehirnpenetration von Makrozyklischen Laktone

Bei der Behandlung von Säugetieren mit ML spielt Pgp für die Organverteilung eine entscheidende Rolle. Die ML binden in niedrigeren Organismen an GABA- und Glutamat-abhängige Chloridkanäle im zentralen Nervensystem und führen zu einer schlaffen Lähmung und schließlich zum Tod des Parasiten. Im Säuger dagegen verhindert Pgp das vermehrte Eindringen dieser Arzneistoffe in das ZNS und damit auch eine Bindung an die dort befindlichen GABA-abhängigen Chloridkanäle. Daher gelten die ML in ihrer therapeutischen Dosierung als sehr sichere Antiparasitika in Säugetieren.

Trotzdem fiel schon seit den 70er Jahren eine Unverträglichkeit mit ML insbesondere bei britischen Hütehunden, wie z.B. dem Collie, auf. Diese äußerte sich in einer anfänglichen Mydriasis, einer Ataxie in der Hinterhand bis hin zu stupösen bis komatösen Zuständen. 2001 konnten *Mealey und Mitarbeiter* eine 4-Basenpaar Deletion im *mdr1* Gen des Hundes identifizieren, welche zu einem frühzeitigen Stopcodon führt und Hunde mit homozygotem Gendefekt kein funktionales Pgp mehr exprimieren. Daher führt der Einsatz von ML bei diesen Hunden unter Umständen zu lebensbedrohlichen Intoxikationen. Hierbei entscheidend ist insbesondere, welches der ML appliziert wurde. Während Ivermectin und Doramectin schon in therapeutischen Dosierungen zu neurotoxischen Nebenwirkungen führen, kann man Moxidectin, Selamectin und Milbemycinoxim auch in höheren Dosierungen verabreichen, ohne klinische Anzeichen einer Vergiftung auszulösen. Es ist daher zu vermuten, dass die einzelnen Makrozyklischen Laktone auch in Abwesenheit des Pgp eine unterschiedliche Gehirnpenetration aufweisen oder aber im zentralen Nervensystem unterschiedlich mit dem GABA_A-Rezeptor interagieren (Geyer & Janko, 2012). In der folgenden Versuchsreihe sollte diese Fragestellung mit Hilfe zweier Mausmodelle näher untersucht werden. Es wurde radioaktiv markiertes Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim an Pgp-defiziente Mäuse appliziert, um die Gewebeverteilung und insbesondere die absoluten Gehirnkonzentrationen zu ermitteln. Anschließend wurde die Neurotoxizität dieser Substanzen vergleichend auf dem Rotarod untersucht.

5.2.1. Gewebe- und Gehirnkonzentrationen von Ivermectin

Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass Ivermectin (IVM) in Abwesenheit von Pgp stärker in das Gehirn penetriert und auch höhere Gehirnkonzentrationen aufweist (Geyer et al., 2009). Diese Studien wurden an *mdr1a,b*-Doppelknockout Mäusen durchgeführt, bei denen also beide *mdr1* Gene durch gerichtete Mutation ausgeschaltet wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde IVM an je vier *CF-1 PGP-mutant* und vier *CF-1 Wildtyp* Mäuse appliziert, um die Vergleichbarkeit zur Doppelknockout-Maus zu überprüfen. Dazu wurde mittels Schlundsonde radioaktiv markiertes Ivermectin in einer Dosierung von 0,2 mg/kg (0,23 µmol/kg) oral an die Mäuse appliziert. Diese Dosierung entspricht der üblichen therapeutischen Dosierung.

Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen, ebenso Urin, Kot und Blut gewonnen und die absoluten Ivermectin-Konzentrationen in den einzelnen Organen und Geweben gemessen. Im Vergleich konnten bei der *CF-1 PGP-mutant* Maus in allen Organen höhere Ivermectin-Konzentrationen festgestellt werden, dabei traten signifikante Unterschiede insbesondere in Gehirn, Herz, Niere, Leber, Muskel, Milz und den Hoden auf. Alle Gewebekonzentrationen sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Besonders hervorzuheben ist die 67,4-fach höhere IVM-Konzentration im Gehirn der *CF-1 PGP-mutant* Maus im Vergleich zur *CF-1 Wildtyp* Maus. Die absoluten Konzentrationen betrugen dabei 88,2 ng/g (100,8 pmol/g) zu 1,3 ng/g (1,5 pmol/g). In vorangegangenen Studien mit der *mdr1a,b*-Doppelknockout Maus lag dieses Verhältnis bei 59:1 (Geyer et al., 2009). Es konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass die *CF-1 PGP-mutant* Maus kein funktionelles Pgp an der Bluthirnschranke mehr exprimiert und diese Mauslinie somit ein vergleichbares Mausmodell zur *mdr1a,b*-Doppelknockout Maus darstellt.

Tabelle 5.1: Gewebekonzentrationen von [³H]Ivermectin in PGP^{wt}- und PGP^{mut}-Mäusen

Gewebekonzentrationen 24 h nach der oralen Applikation von 0,2 mg/kg (0,23 µmol/kg) [³H]Ivermectin (IVM) an *CF-1 Wildtyp* (PGP^{wt}) und *CF-1 PGP-mutant* (PGP^{mut}) Mäuse. Pro Gruppe wurden je 4 Tiere eingesetzt und die Werte als Mittelwert ± SD angegeben.

* $p < 0.05$ PGP^{mut}-Maus vs. PGP^{wt}-Maus (ungepaarter *t*-test).

Ivermectin			
	PGP ^{wt} (pmol/g od. pmol/ml)	PGP ^{mut} (pmol/g od. pmol/ml)	Ratio (mut/wt)
Gehirn	1,5 ± 0,2	100,8 ± 26,2	67,4*
Leber	44,3 ± 2,4	286,3 ± 112,2	6,5*
Dünndarm	49,7 ± 3,3	208,5 ± 97,7	4,2
Dickdarm	173,6 ± 22,5	297,2 ± 193,6	1,7
Magen	41,0 ± 8,6	96,0 ± 49,3	2,3
Niere	26,7 ± 2,9	142,3 ± 35,5	5,3*
Hoden	7,9 ± 0,7	69,8 ± 21,0	8,8*
Milz	11,8 ± 0,3	57,9 ± 15,1	4,9*
Fettgewebe	24,6 ± 2,2	97,9 ± 58,9	4,0
Muskelgewebe	1,9 ± 0,5	10,7 ± 4,7	5,5*
Herz	14,7 ± 2,6	85,9 ± 26,6	5,8*
Lunge	14,6 ± 0,6	144,1 ± 101,9	9,9
Plasma	9,8 ± 0,8	33,3 ± 16,8	3,4

5.2.2. Gewebe- und Gehirnkonzentrationen von Moxidectin

Aufgrund der Ergebnisse der Ivermectin-Studie (5.2.1) konnte das CF-1 Mausmodell für die Applikationsstudien als geeignet angesehen werden. Deshalb wurde im nächsten Schritt Moxidectin in der Dosierung 0,2 mg/kg (0,31 µmol/kg) an je sechs *CF-1 Wildtyp* und sechs *CF-1 PGP-mutant* Mäuse oral appliziert. Es wurde zum einen Moxidectin in einer Mischung mit Imidacloprid (*Advocate*®, Bayer), zum anderen Moxidectin als Reinsubstanz verwendet. Die Reinsubstanz wurde in 1,2-Propandiol und Glycerinformal im Verhältnis 56% : 44% gelöst, die *Advocate*® Lösung lag bereits gelöst in Benzylalkohol vor, welcher auch

zur weiteren Verdünnung genutzt wurde. Bei der Applikation von *Advocate*[®] wurden männliche Tiere, bei der Reinsubstanz dagegen weibliche Tiere verwendet.

Bei beiden Versuchsreihen wurden in allen Organen der *CF-1 PGP-mutant* Mäuse höhere Konzentrationen an Moxidectin nachgewiesen. Signifikante Konzentrationsunterschiede im Vergleich zur *CF-1 Wildtyp* Maus zeigten sich insbesondere in Gehirn, Niere, Leber, Hoden bzw. Ovarien sowie im Herz und Muskelgewebe (Tab. 5.2).

Bei der Applikation von Moxidectin als Reinsubstanz lag die absolute Gehirnkonzentration der *CF-1 PGP-mutant* Maus bei 89,9 ng/g (140,2 pmol/g) und somit 15,6-fach höher als bei der *CF-1 Wildtyp* Maus (5,8 ng/g bzw. 9,0 pmol/g). Dieses Verhältnis lag bei der Applikation von *Advocate*[®] mit 104,0 ng/g (162,2 pmol/g) zu 4,1 ng/g (6,4 pmol/g) etwas höher. Die Gehirnkonzentrationen von Moxidectin und Ivermectin in der *CF-1 PGP-mutant* Maus sind somit annähernd identisch.

Bei beiden Versuchsreihen fiel allerdings auf, dass Moxidectin auch bei der *CF-1 Wildtyp* Maus stärker in das zentrale Nervensystem penetrierte als Ivermectin. Dies wurde durch die höheren absoluten Substanzkonzentrationen im Gehirn deutlich. Um diese Aussage weiter zu untermauern, wurde der Gehirn-Plasma-Koeffizient bestimmt. Je größer dieser Wert ist, desto mehr von der Substanz ist vom Plasmakompartiment in das Gehirn übergetreten. Für Moxidectin lag dieser bei $0,52 \pm 0,07$ (Reinsubstanz) bzw. $0,62 \pm 0,17$ (*Advocate*[®]) und damit wesentlich höher als für Ivermectin ($0,15 \pm 0,02$).

Insgesamt zeigten sich geringe Unterschiede in den einzelnen Organkonzentrationen, je nachdem, ob man die Reinsubstanz Moxidectin oder die Mischung mit Imidacloprid verabreicht hatte. Insbesondere die unterschiedliche Anlagerung im Fettgewebe lässt sich mit dem unterschiedlichen Geschlecht der Versuchsgruppen erklären, da die männlichen Tiere im Durchschnitt immer schwerer waren und somit auch der Anteil des Fettgewebes an der Gesamtmasse größer war. Das generelle Organverteilungsmuster von Moxidectin wird aber durch Imidacloprid weder bei den Wildtyp Mäusen noch bei den *mdr1*-defizienten Mäusen beeinflusst.

Tabelle 5.2: Gewebekonzentrationen von [³H]Moxidectin in PGP^{wt}- und PGP^{mut}-Mäusen

Gewebekonzentrationen 24 h nach der oralen Applikation von 0,2 mg/kg (0,31 µmol/kg) [³H]Moxidectin an *CF-1 Wildtyp* (PGP^{wt}) und *CF-1 PGP-mutant* (PGP^{mut}) Mäuse. Pro Gruppe wurden je 6 Mäuse eingesetzt und die Werte als Mittelwert ± SD angegeben.

* $p < 0.05$ PGP^{mut}-Maus vs. PGP^{wt}-Maus (ungepaarter *t*-test).

	Moxidectin & Imidacloprid (<i>Advocate</i> ®)			Moxidectin (Reinsubstanz)		
	PGP ^{wt} (pmol/g oder pmol/ml)	PGP ^{mut} (pmol/g oder pmol/ml)	Ratio (mut/wt)	PGP ^{wt} (pmol/g oder pmol/ml)	PGP ^{mut} (pmol/g oder pmol/ml)	Ratio (mut/wt)
Gehirn	6,4±1,1	162,2±56,3	25,3*	9,0±1,6	140,2±46,5	15,6*
Leber	112,3±31,8	245,9±65,4	2,2*	124,8±38,4	234,2±85,2	1,9*
Dünndarm	100,0±44,6	293,6±79,1	2,9*	86,7±32,8	149,9±59,6	1,7
Dickdarm	302,8±270,5	450,2±153,5	1,5	105,1±28,4	218,3±88,0	2,1*
Magen	76,0±37,3	241,3±141,0	3,2*	153,2±34,5	242,6±148,5	1,6
Niere	91,6±15,9	217,9±60,1	2,4*	95,8±21,5	200,2±73,9	2,1*
Hoden	21,8±6,9	128,5±58,6	5,9*			
Ovarien				158,8±59,8	396,6±124,4	2,5*
Milz	59,8±15,8	119,0±31,7	2,0*	58,7±13,6	105,1±36,5	1,8*
Fettgewebe	141,3±43,7	259,3±100,6	1,8	96,9±25,0	149,3±74,1	1,5
Muskelgewebe	15,9±2,0	40,4±15,1	2,5*	10,0±3,1	30,7±17,6	3,1*
Herz	56,6±10,6	128,4±48,2	2,3*	59,8±14,7	139,9±54,3	2,3*
Lunge	61,3±14,8	130,1±33,5	2,1*	61,3±10,3	129,8±49,9	2,1*
Plasma	11,5±5,6	22,2±17,6	1,9	18,3±5,1	21,5±8,7	1,2

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Moxidectin (*Advocate*®) in einer Konzentration von 2,5 mg/kg (3,9 µmol/kg) als *spot-on* Applikation bei je 4-5 Mäusen jeder Linie angewendet. Es ergab sich hierbei die grundsätzliche Problematik, dass die Mäuse stets in der Lage waren, die applizierte Lösung durch ihr ausgeprägtes Putzverhalten auch oral aufzunehmen. Der geplante Versuchsaufbau und die vorgesehene Versuchslänge von 72 Stunden konnten deshalb nicht eingehalten werden, da die Mäuse der *CF-1 PGP-mutant* Linie schon früher Merkmale einer ML-Vergiftung zeigten und somit alle Mäuse vor Versuchsende getötet werden mussten.

Im ersten Teilversuch wurde die *Advocate*®-Lösung mit Benzylalkohol verdünnt und pro Maus ca. 10 µl im Bereich der Schwanzwurzel auf die Haut aufgetragen, nachdem das Fell in diesem Bereich vorher entfernt wurde. Trotzdem erfolgte die Aufnahme der Lösung über die Haut nur sehr langsam. Nach 24 Stunden zeigten die *CF-1 PGP-mutant* Mäuse erste Anzeichen einer ML-Intoxikation und der Versuch musste abgebrochen werden. In Gehirn, Leber, Hoden, Milz, Fett- und Muskelgewebe wurden signifikant höhere Konzentrationen an Moxidectin bei den *CF-1 PGP-mutant* Mäusen nachgewiesen. Die absolute Gehirnkonzentration lag bei der *CF-1 PGP-mutant* Maus mit 576,2 ng/g (898,9 pmol/g) 18-fach höher im Vergleich zur *CF-1 Wildtyp* Maus mit 32,4 ng/g (50,5 pmol/g) (Abb. 5.2).

Im zweiten Teilversuch wurde Moxidectin als Reinsubstanz verwendet und in Ethanol gelöst, welches nach Applikation auf die Haut schneller verdunstet. In Abwandlung zur ersten Applikations-Stelle wurde die Lösung nun auf die Haut zwischen den Schulterblättern aufgetragen. Es wurden im Durchschnitt 15 µl pro Tier aufgetragen. Trotz der verbesserten Applikationsart zeigten die *CF-1 PGP-mutant* Mäuse nach 48 Stunden erneut erste Anzeichen einer Vergiftung wie Tremor, Kreislaufen, Verbuddeln in der Einstreu und Koma. Nach 50 Stunden wurde auch diese Versuchsreihe abgebrochen, die Mäuse getötet und die Organanalyse durchgeführt. In allen Organen konnten bei der *CF-1 PGP-mutant* Maus wiederum höhere Konzentrationen an Moxidectin als beim Wildtyp festgestellt werden, welche in Gehirn und Hoden signifikant höher lagen. Im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe war die Gehirnkonzentration bei den *CF-1 PGP-mutant* Mäusen jedoch nur 9,8-fach höher im Vergleich zu den *CF-1 Wildtyp* Mäusen (527,1 ng/g bzw. 822,3 pmol/g vs. 53,6 ng/g bzw. 83,6 pmol/g), lag insgesamt aber auch auf deutlich höherem Niveau als für die *per os* Applikation mit 0,2 mg/kg (Abb. 5.2).

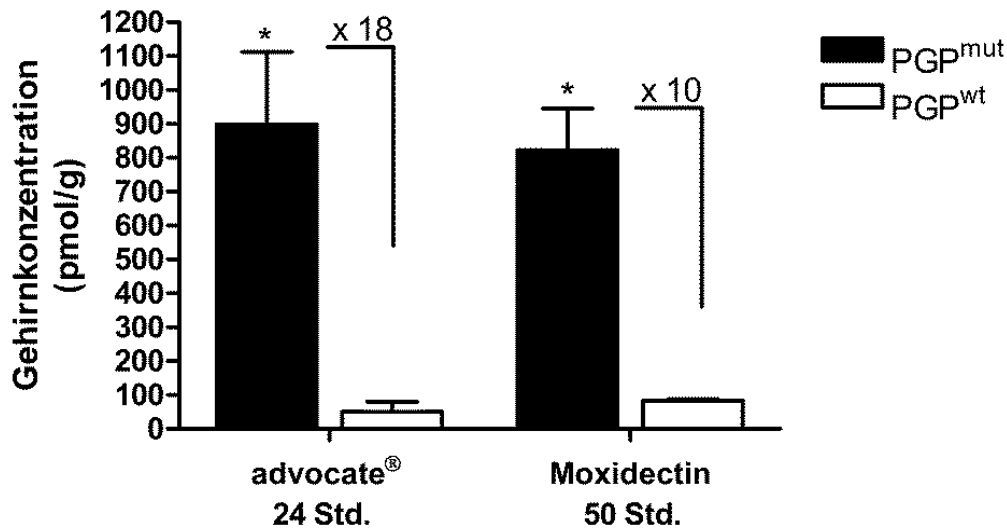


Abb. 5.2: Gehirnkonzentrationen von $[^3\text{H}]$ Moxidectin nach *spot-on* Applikation an PGP^{wt} - und PGP^{mut} -Mäusen

Gehirnkonzentrationen 24 und 50 Stunden nach der *spot-on* Applikation von 2,5 mg/kg (3,9 $\mu\text{mol/kg}$) Moxidectin+Imidacloprid (*Advocate*®, n=4) und Moxidectin als Reinsubstanz (Moxidectin, n=3) an *CF-1 PGP-mutant* (PGP^{mut}) und *CF-1 Wildtyp* (PGP^{wt}) Mäusen.

* Signifikant höhere Gehirnkonzentrationen in der PGP^{mut} -Maus im Vergleich zur PGP^{wt} -Maus ($p < 0,05$; ungepaarter *t-test*).

Man muss bei beiden *spot-on* Versuchsreihen davon ausgehen, dass die Mäuse einen Teil der Substanz oral aufgenommen haben. Alle Mäuse zeigten nach der Applikation ein sehr intensives Putzverhalten und waren dabei in der Lage, an fast alle Körperstellen zu gelangen. Die beste Applikationsstelle war zwischen den Schulterblättern. Trotz dieser Problematik zeigten die Gewebekonzentrationen auch hier, dass Moxidectin nach *spot-on* Applikation stärker in das Gehirn von *CF-1 PGP-mutant* Mäusen penetriert als bei *CF-1 Wildtyp* Mäusen. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass es keinen nennenswerten Unterschied zwischen der Reinsubstanz Moxidectin und der Mischung mit Imidacloprid gibt. Die Gehirnkonzentrationen der *CF-1 PGP-mutant* Mäuse liegen nach 24 bzw. 50 Stunden in etwa auf dem gleichen Level (898,9 pmol/g vs. 822,3 pmol/g). Bei den *CF-1 Wildtyp* Mäusen stieg die Konzentration im Gehirn dagegen noch einmal deutlich an (50,5 pmol/g vs. 83,6 pmol/g). Durch die auftretenden Vergiftungserscheinungen waren erste Hinweise auf die therapeutische Breite der Substanz Moxidectin bei Mäusen mit fehlendem P-Glycoprotein gegeben.

5.2.3. Gewebe- und Gehirnkonzentrationen von Milbemycinoxim

Als letzte Substanz in dem Arbeitsvorhaben wurde Milbemycinoxim verabreicht. Um eine Vergleichbarkeit zu den anderen beiden Substanzen herzustellen, wurde Milbemycinoxim zunächst in der Dosierung 0,2 mg/kg Körpergewicht (0,36 µmol/kg) verabreicht. In einer zweiten Versuchsreihe wurde es dann in der therapeutischen Dosierung von 2,5 mg/kg Körpergewicht (4,5 µmol/kg) appliziert. Für die beiden Versuchsreihen wurden *mdr1*-defiziente sowie Wildtyp Mäuse verwendet. Die Substanz wurde nur oral mit der Schlundsonde an je vier Mäuse pro Gruppe verabreicht und diese nach 24 Stunden getötet. Nach Applikation von 0,2 mg/kg (0,36 µmol/kg) Milbemycinoxim konnten lediglich in den Organen Gehirn, Dickdarm, Magen und Fettgewebe signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Knockout- und Wildtyp Maus festgestellt werden. Insgesamt zeigten die Wildtyp Mäuse in allen Organen höhere oder gleiche Substanzkonzentrationen, ausgenommen bei der Gehirnkonzentration. Hier wurden bei den *mdr1*-defizienten Tieren 1,7-fach mehr Milbemycinoxim als bei den Wildtyp Mäusen (15,7 ng/g bzw. 28,4 pmol/g vs. 9,3 ng/g bzw. 16,9 pmol/g) im Gehirn detektiert (Tab. 5.3).

Vergleicht man die Anreicherung der drei Substanzen Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim im Gehirn der Wildtyp Mäuse, so stellt man fest, dass Milbemycinoxim bei funktionsfähigem Pgp die höchste Permeation über die intakte BHS aufweist.

Nach der Applikation von 2,5 mg/kg MIL (4,5 µmol/kg) wurde lediglich bei den Gehirnkonzentrationen ein signifikanter Unterschied festgestellt. Auch hier lag die Konzentration mit 120,0 ng/g (216,9 pmol/g) bei den *mdr1*-defizienten Mäusen fast doppelt so hoch wie bei den Wildtyp Mäusen mit 64,7 ng/g (116,9 pmol/g) (Tab. 5.3). In den übrigen Organen verteilte sich die Substanz bei beiden Mauslinien relativ gleichmäßig. Auch bei dieser Applikation drang die Substanz vergleichsweise stark in das Gehirn der Maus mit intakter BHS ein. Beide Versuchsreihen deuten darauf hin, dass MIL ein vergleichsweise schlechtes Substrat von Pgp darstellt.

Tabelle 5.3: Gewebekonzentrationen von [³H]Milbemycinoxim in Wildtyp und *mdr1*-defizienten Mäusen

Gewebekonzentrationen 24 Stunden nach der oralen Applikation von 0,2 mg/kg (0,36 µmol/kg) und 2,5 mg/kg (4,5 µmol/kg) [³H]Milbemycinoxim an Wildtyp (*mdr1*^{+/+}) und *mdr1*-defizienten (*mdr1*^{-/-}) Mäuse. Pro Gruppe wurden je vier Mäuse eingesetzt und die Werte als Mittelwert ± SD angegeben.

* $p < 0,05$ *mdr1*^{-/-}-Maus vs. *mdr1*^{+/+}-Maus (ungepaarter *t*-test).

	Milbemycinoxim 0,2 mg/kg bzw. 0,36 µmol/kg			Milbemycinoxim 2,5 mg/kg bzw. 4,5 µmol/kg		
	<i>mdr1</i> ^{+/+} (pmol/g o. pmol/ml)	<i>mdr1</i> ^{-/-} (pmol/g o. pmol/ml)	Ratio (mut/wt)	<i>mdr1</i> ^{+/+} (pmol/g o. pmol/ml)	<i>mdr1</i> ^{-/-} (pmol/g o. pmol/ml)	Ratio (mut/wt)
Gehirn	16,9±2,5	28,4±6,9	1,7*	116,9±27,3	216,9±26,8	1,9*
Leber	196,8±44,3	144,8±41,4	0,7	1123,9±173,7	1438,8±406,5	1,3
Dünndarm	152,7±65,6	73,7±26,6	0,5	466,2±106,1	625,2±184,0	1,3
Dickdarm	181,1±48,1	89,1±21,9	0,5*	1298,2±437,1	2114,6±1095,0	1,6
Magen	618,5±323,0	147,0±56,0	0,2*	1376,4±490,0	986,6±234,6	0,7
Niere	65,8±17,0	41,2±10,8	0,6	381,0±57,1	356,8±76,8	0,9
Milz	44,3±7,6	32,0±4,9	0,7	308,7±43,9	295,4±35,1	1,0
Hoden	30,4±8,1	31,2±8,3	1,0	207,9±55,3	247,8±32,4	1,2
Fettgewebe	34,7±9,8	15,0±6,3	0,4*	166,7±72,8	167,0±138,6	1,0
Muskelgewb.	4,9±1,1	3,3±0,7	0,7	30,2±10,5	31,6±6,3	1,0
Herz	47,4±11,6	29,8±7,0	0,6	291,2±69,2	271,9±55,7	0,9
Lunge	49,9±12,3	32,9±8,5	0,7	327,2±137,0	282,7±49,3	0,9
Plasma	36,0±6,9	25,7±3,1	0,7	227,9±77,2	211,3±55,9	0,9

5.3. Etablierung der Rotarod-Methode

Das Hauptziel dieser Arbeit sollte sein, die Neurotoxizität verschiedener ML bei Pgp-defekten Mäusen methodisch darstellbar und messbar zu machen sowie einzelne ML in Hinblick auf ihre Toxizität miteinander zu vergleichen.

Das Rotarod-System stellt eine gute Möglichkeit dar, die allgemeinen motorischen Fähigkeiten als auch die eingeschränkte bzw. gestörte Motorik von Mäusen und Ratten zu überprüfen. Es war damit prädestiniert für das Versuchsvorhaben.

Zuerst musste das Rotarod als mögliches methodisches Instrument für die Messung der durch Makrozyklische Laktone ausgelösten Neurotoxizität etabliert werden. Hierzu wurde zunächst in der Werkstatt des MZI das Rotarod wie oben beschrieben erbaut. Vorbild für die Konstruktion stellten kommerziell erhältliche Geräte dar.

Der erste Trainingsversuch mit den verwendeten Mäusen stellte ein fest definiertes Laufprogramm dar. Die Mäuse mussten dabei insgesamt 20 Minuten auf dem Rotarod laufen. Die Geschwindigkeit stieg während dieses Trainings zunächst langsam auf 15 rpm an und sank zum Ende wieder auf die Ausgangsgeschwindigkeit von 9 rpm ab (Abb. 5.3).

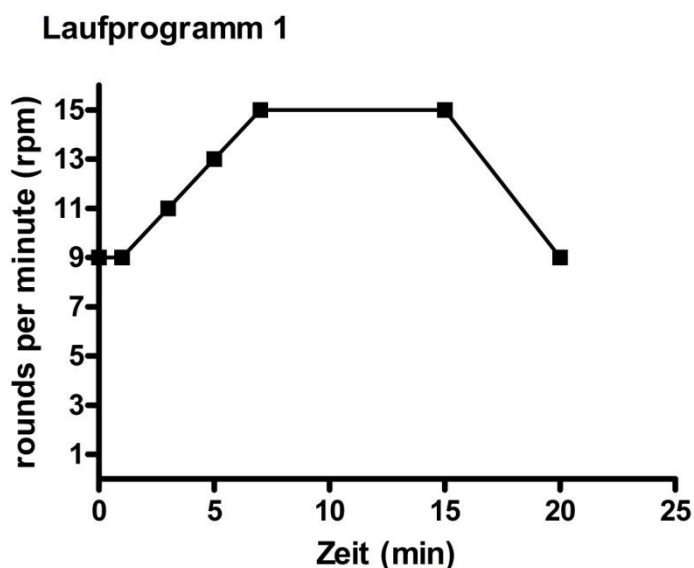


Abb. 5.3: Schematische Darstellung des ersten Trainingsprogramms auf dem Rotarod

Dieses Trainingsprogramm stellte sich jedoch bald als ungeeignet für die Praxis heraus. Zum einen verlangte es eine sehr lange Konzentrationsfähigkeit der Mäuse, zum anderen konnte letztlich die Laufleistung der Mäuse nur schlecht verglichen und bewertet werden.

Deshalb wurde ein neues Trainingsprogramm entwickelt, welches wie folgt aufgebaut war: Jede Maus wurde dreimal hintereinander für 2 Minuten auf das Rotarod gesetzt. Die Drehgeschwindigkeit lag anfänglich bei 6-10 rpm und wurde mit steigender Laufsicherheit bis auf die Zielgeschwindigkeit 16 rpm gesteigert. Für jeden Lauf wurden Punkte, wie in Tabelle 4.1 beschrieben, vergeben und als Performance-Wert der Mittelwert aus den drei Läufen gebildet. Durch die graphische Auswertung der Laufperformance (Abb. 4.2) konnte der Trainingsverlauf dargestellt werden und die Mäuse untereinander verglichen werden. Die Auswahl der Mäuse für einen Versuch wurde damit ebenfalls erleichtert. Um für einen Versuch ausgewählt zu werden, musste eine Maus eine konstante Laufleistung von mindestens 4 bis 5 Punkten aufweisen. Die Trainingsphase dauerte in der Regel 4 bis 6 Wochen.

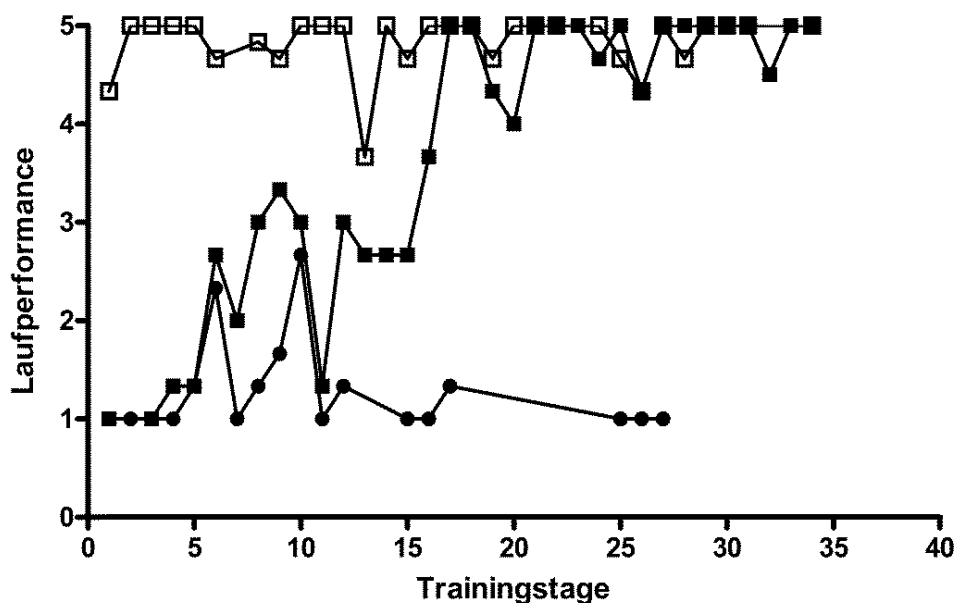


Abb. 5.4: Graphische Darstellung des Trainingsverlaufs auf dem Rotarod

Trainingsverlauf dreier verschiedener Mäuse mit unterschiedlichem Erfolg: einen sehr schnellen Trainingserfolg (weiße Kästchen), einen langsam ansteigenden Trainingserfolg (schwarze Kästchen) sowie einen ausbleibenden Trainingserfolg (schwarze Punkte).

Trotz einer sehr behutsamen und zeitintensiven Trainingszeit erreichten nicht alle Mäuse das erwünschte Trainingsziel. Es gab immer wieder Mäuse, die das Laufen auf dem Rotarod nicht erlernten und somit aus der Studie herausfielen (Abb. 5.4).

Mit der Zeit war festzustellen, dass die Erfolgsrate bei weiblichen Mäusen deutlich höher lag. Da sich auch die Haltung weiblicher Tiere als wesentlich einfacher (harmonischeres Gruppenverhalten, größere Gruppen möglich, keine Rangkämpfe) erwies, wurden für die Dosisfindungsstudien mit Hilfe des Rotarods ausschließlich weibliche Tiere verwendet.

5.4. Dosisfindungsstudien mit Hilfe des Rotarods

Ziel der Dosisfindungsstudien war herauszufinden, bei welcher Dosierung die Makrozyklischen Laktone Ivermectin, Moxidectin, Milbemycinoxim und Selamectin erste Anzeichen einer Vergiftung bei *mdr1a*-defizienten Mäusen auslösen, um die Substanzen im Hinblick auf ihr toxisches Potential miteinander vergleichen und Rückschlüsse auf die therapeutische Sicherheit bei *mdr1*-defekten Tieren ziehen zu können.

5.4.1. Applikation des Lösungsmittels

Um eine Beeinflussung der Laufleistung durch die Lösungsmittelsubstanzen ausschließen zu können, wurden jeweils 100 µl der in 3.1.3 beschriebenen Mischung aus 1,2-Propandiol und Glycerinformal an vier Mäuse *per oral* appliziert und diese über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet und regelmäßig auf dem Rotarod überprüft.

Ergebnis war, dass die Mäuse keinerlei Einschränkungen in der Laufleistung zeigten, die ermittelte AOC lag bei 0,47% $\pm$ 0,37 für t=120 Stunden (Abb. 5.5).

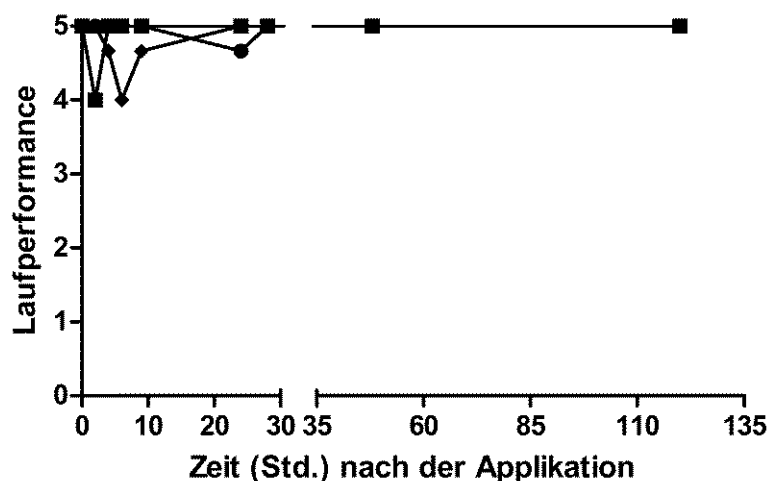


Abb. 5.5: Laufperformance nach Applikation des Lösungsmittels

Laufperformance von vier Mäusen nach der Applikation von je 100 µl 1,2-Propandiol und Glycerinformal im Verhältnis 56% : 44% . Bei zwei Mäusen sank die Laufperformance maximal auf 4 Punkte ab, bei einer Maus auf 4,5 Punkte und die vierte Maus erreichte immer die volle Punktzahl. Diese leichten Schwankungen waren auch während der Trainingszeiten zu beobachten und stellten somit keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Laufleistung durch das Lösungsmittel dar.

5.4.2. Ivermectin

Ivermectin (IVM) wurde in 1,2-Propandiol und Glycerinformal gelöst. Zunächst wurden aufsteigende Dosierungen an je eine Maus *per os* appliziert. Ausgangsdosis war die therapeutische Dosierung von 0,2 mg/kg, welche in 0,05 mg/kg-Schritten bis zu einer Enddosis von 0,45 mg/kg erhöht wurde (Abb. 5.6 B).

Bis zu einer Dosierung von 0,3 mg/kg zeigten die Mäuse nur minimalste Einschränkungen in ihrer Laufleistung auf dem Rotarod, welche vor allem als Folge der Applikation bzw. des zweistündigen Kontrollierens auf dem Rotarod erklärt werden können. Die Mäuse zeigten ansonsten ein völlig ungestörtes Allgemeinbefinden mit normaler Futter- und Wasseraufnahme, normalem Schlaf und Nestbau.

Eine erste Beeinträchtigung in der Laufleistung zeigte die Maus mit der Dosis von 0,35 mg/kg. Ein erster Abfall der Laufleistung auf nur noch 0,5 Punkte war bereits 6 Stunden nach der Applikation feststellbar. In dem Zeitraum von 8 bis 22 Stunden nach Applikation war ein Laufen auf dem Rotarod überhaupt nicht mehr möglich (Abb. 5.6 A). Die Laufleistung stieg anschließend wieder stetig an. Bereits zum Zeitpunkt t=30 Stunden nach Applikation konnte

die Maus wieder 2 Minuten auf dem Rotarod laufen, allerdings noch mit leichten Einschränkungen (3 Punkte). Die volle Laufleistung war wieder nach 58 Stunden erreicht. Diese Maus zeigte während der gesamten Versuchsdauer ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

Die Laufleistung der beiden Mäuse mit den applizierten Dosen 0,4 mg/kg und 0,45 mg/kg sank 8 Stunden nach Versuchsbeginn ebenfalls auf 0 Punkte. Dieser Zustand hielt dann zwischen 46 und 58 Stunden an. Danach stieg die Laufleistung nur sehr langsam an und war erst 120 Stunden nach Applikation wieder vollständig hergestellt (Abb. 5.6 A). Wider Erwarten waren beide Mäuse bereits bei dieser geringen Dosissteigerung hochgradig im Allgemeinbefinden gestört und zeigten klassische Symptome einer Vergiftung mit Makrozyklischen Laktonen. Dies zeigte sich zunächst an einem leicht taumelnden Gang und einem vermehrten Liegen im Käfig. Schließlich lagen die Tiere nur noch stupös bis komatös in einer Ecke des Käfigs, vergruben Nase und Gesicht in der Einstreu und zeigten ein Kopfzittern bis hin zu einem Krampfen des ganzen Körpers. Die Tiere wirkten orientierungslos. Des Weiteren war in diesem Zeitraum keine Futter- und Wasseraufnahme festzustellen, somit auch kein Kot- und Urinabsatz. Durch Hochnehmen der Tiere auf die Hand konnten sie zwar aus diesem Zustand „erweckt“ werden, allerdings reagierten sie sehr empfindlich und teilweise auch mit Lautäußerungen auf Berührungen. In diesem kurzen Wachzustand konnten die Tiere auch zum Fressen animiert werden. Diese offensichtlich stark vergifteten Mäuse wurden durch eine *subkutane* Injektion mit 0,9% Natrium-Chlorid-Lösung (ca. 0,5 ml/Maus) im Zeitraum von 8 bis 58 Stunden nach der Applikation unterstützt.

Die Dosierung von 0,35 mg/kg IVM stellte somit genau die Konzentration dar, bei welcher erste Anzeichen einer Vergiftung auf dem Rotarod zu sehen waren, ohne dass die Maus schwere Beeinträchtigungen im Allgemeinbefinden zeigte (Abb. 5.6 A).

5.4.3. Moxidectin

Als zweite Substanz wurde Moxidectin (MOX) verabreicht. Nach Erstellen der Stammlösung wurde die Substanz wieder in aufsteigenden Dosierungen an je eine Maus appliziert, beginnend mit der Dosis 0,2 mg/kg und aufsteigend in 0,05 mg/kg-Schritten. Die höchste applizierte Dosis lag bei 0,85 mg/kg (Abb. 5.6 B).

Bis zu einer Dosierung von 0,6 mg/kg zeigten die Mäuse zum Teil eine Minderung in der Leistung auf dem Rotarod, welche aber nie bis auf 0 Punkte herabsank und bereits nach 24 Stunden vollständig überwunden war.

Der Grenzbereich einer beginnenden Vergiftung stellte sich im Dosisbereich 0,65 mg/kg bis 0,7 mg/kg dar. Die Maus mit der Dosierung von 0,65 mg/kg zeigte eine deutlichere Einschränkung der Laufleistung, welche sich erst 32 Stunden nach der Applikation wieder besserte. Des Weiteren war ein gering- bis mittelgradig eingeschränktes Allgemeinbefinden festzustellen: 6 Stunden nach der Applikation zeigte diese Maus im Käfig einen wackelnden bis schwankenden Gang, schlief vermehrt und war nach der Laufphase auf dem Rotarod deutlich erschöpft. Im Käfig war die Maus aber weder orientierungslos, noch zitterte oder krampfte sie. Sie konnte die ganze Zeit selbstständig Wasser und Futter aufnehmen. Das Verhalten konnte insgesamt noch nicht als Ausdruck einer Vergiftung eingeordnet werden.

Die Maus mit einer Dosierung von 0,7 mg/kg zeigte über eine Zeitspanne von 48 Stunden eine eingeschränkte Laufleistung. Bereits vier Stunden nach der Applikation sank diese auf einen Wert von 0 Punkten und hielt knapp 20 Stunden an (Abb. 5.6 A). Danach konnte eine stetige Verbesserung festgestellt werden. Auch diese Maus zeigte im Käfig einen taumelnden bis schwankenden Gang, tiefe Schlafphasen und große Erschöpfung nach der Messung auf dem Rotarod. Ebenso wie die Maus mit der applizierten Dosis von 0,65 mg/kg konnte sich die Maus im Käfig orientieren, ein Zittern oder Krampfen konnte nicht festgestellt werden und eine selbstständige Futter- und Wasseraufnahme war die ganze Zeit möglich. Ebenso setzte sie regelmäßig Kot und Urin ab.

Die beiden Mäuse mit einer Dosierung von 0,8 mg/kg und 0,85 mg/kg zeigten eine schwere Ataxie über einen Zeitraum von 52 bzw. 76 Stunden und fielen zudem in einen stupösen bis komatösen Zustand. Dieser Zustand war vergleichbar mit dem der Ivermectin-Intoxikation nach Applikation von mehr als 0,4 mg/kg (Abb. 5.6 A).

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass die Dosierung von 0,7 mg/kg MOX die Grenzdosis zur Intoxikation darstellt.

5.4.4. Milbemycinoxim

In einer 3. Versuchsreihe wurde eine Dosisfindung für die Substanz Milbemycinoxim (MIL) durchgeführt. Da für die Substanz bekannt ist, dass die therapeutische Dosierung für den Hund zwischen 0,5 und 2,5 mg/kg liegt, wurden bei dieser Reihe größere Dosierungsspannen gewählt. Begonnen wurde mit 0,5 mg/kg, die zweite Dosisstufe lag bei 2,5 mg/kg. Dann wurde immer um 2,5 mg/kg bis auf 15 mg/kg erhöht. Da bis zu dieser Dosierung in den Versuchen keinerlei Auffälligkeiten zu verzeichnen waren, wurde die Dosis danach jeweils um 5 mg/kg erhöht und bis zu einer maximalen Dosis von 40 mg/kg appliziert (Abb. 5.6 B).

Erste Einschränkungen in der Laufleistung zeigte die Maus mit einer Dosierung von 35,0 mg/kg. Im Zeitraum zwischen zwei und zehn Stunden nach der Applikation war sie zwar unsicher auf dem Rotarod, allerdings stets in der Lage, wenn auch zum Teil nur kurz, auf dem Rotarod zu laufen. 12 Stunden nach der Applikation konnte wieder die volle Laufleistung auf dem Rotarod festgestellt werden. Während der gesamten Zeit zeigte die Maus ein vollkommen ungestörtes Allgemeinbefinden. Sie war stets munter, konnte sich im Käfig orientieren, reagierte auf äußere Reize und konnte normal Futter und Wasser aufnehmen sowie Kot und Urin absetzen (Abb. 5.6 A).

Dagegen waren die Auswirkungen der Applikation von 40,0 mg/kg sowohl auf dem Rotarod als auch im Allgemeinbefinden deutlich erkennbar. Die beobachteten Einschränkungen hielten insgesamt über einen Zeitraum von 28 Stunden an. Bereits zwei Stunden nach der Applikation zeigte die Maus nur noch wenig Körperspannung und konnte sich nur maximal 2 Sekunden auf dem Rotarod halten. In den nächsten 8 Stunden war ein Laufen auf dem Rotarod überhaupt nicht möglich. Im Käfig zeigte sie ebenfalls eine eingeschränkte Bewegung, schlief sehr viel und lag in den Ecken des Käfigs. Es konnte ein leichtes Kopfzittern festgestellt werden. Nach 12 Stunden war dieses Tier dann wieder wesentlich agiler, lief im Käfig herum, zeigte eine normale Körperspannung und konnte wieder Futter und Wasser aufnehmen. Auch die Laufleistung auf dem Rotarod steigerte sich ab diesem Zeitpunkt und war nach 28 Stunden wieder voll erreicht (Abb. 5.6 A).

Als Ergebnis dieser Versuchsreihe können 40,0 mg/kg Milbemycinoxim als neurotoxische Grenzdosis festgesetzt werden.

5.4.5. Selamectin

Als letzte Versuchsreihe wurde eine Dosisfindung mit Selamectin (SEL) durchgeführt. Die therapeutische Dosierung beim Hund liegt für diese Substanz bei minimal 6 mg/kg und maximal 12 mg/kg. Deshalb wurde als Ausgangsdosis 10 mg/kg gewählt und die applizierte Dosis dann jeweils um 5 mg/kg gesteigert.

Als Ausgangslösung wurde das *spot-on* Präparat *Stronghold 15mg*[®] verwendet und wie bereits beschrieben mit der Schlundsonde *per os* an die Mäuse appliziert.

Bis zu einer Dosierung von 40 mg/kg Selamectin konnte weder eine Einschränkung der Laufleistung auf dem Rotarod noch eine Wesensänderung der Tiere beobachtet werden (Abb. 5.6 A). Die Studie wurde danach beendet, da die therapeutische Dosis um mehr als das Dreifache überschritten war und keinerlei negative Auswirkungen der Substanz erkennbar waren. Aus diesem Grund wurde auch darauf verzichtet, Auswirkungen des im Präparat verwendeten Lösungsmittels auf Laufleistung und Allgemeinbefinden zu untersuchen. Die höchste AOC von 3,12 bei t=120 Stunden wurde bei der Maus mit der applizierten Dosis von 10 mg/kg ermittelt (Abb. 5.6 B).

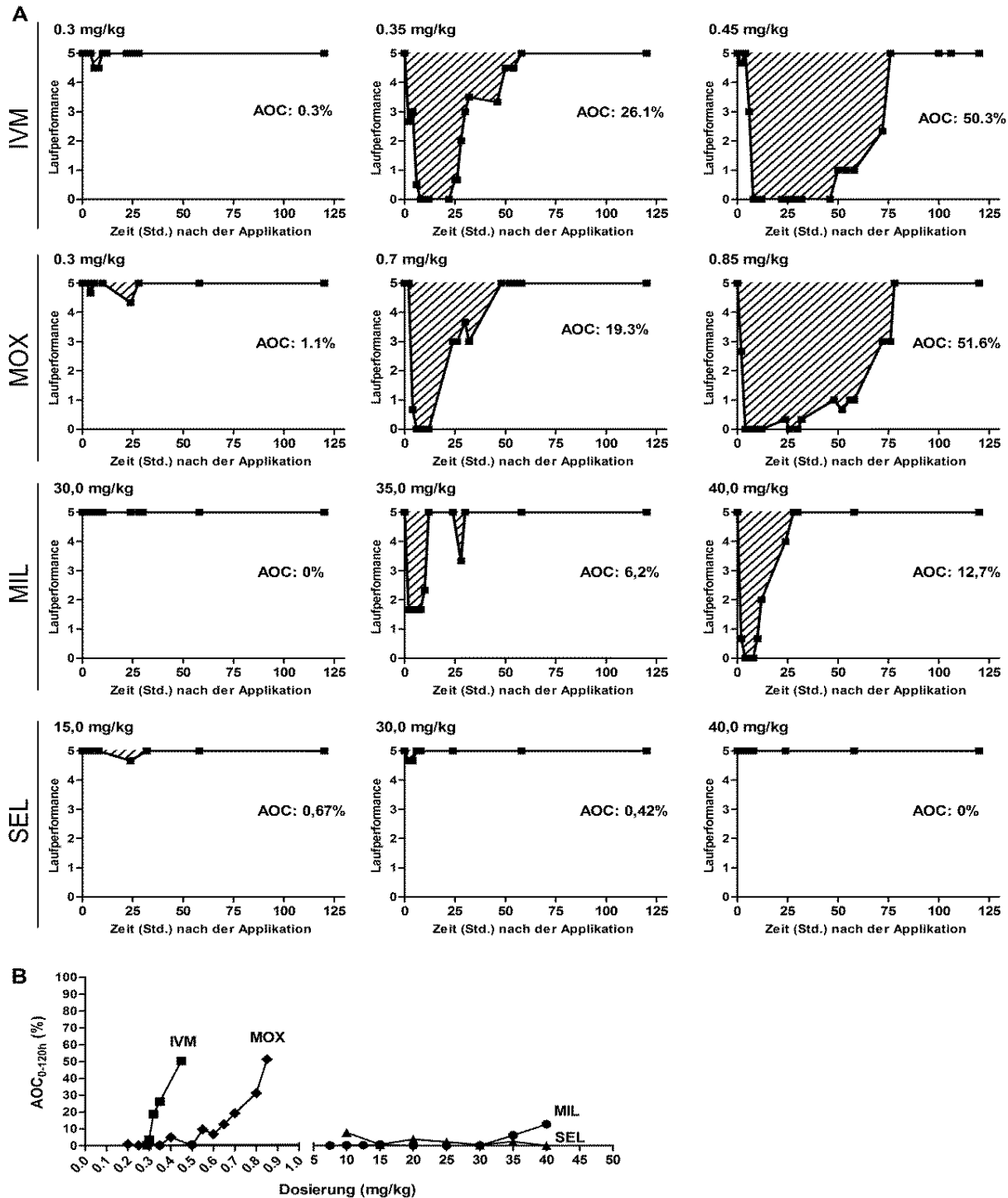


Abb. 5.6: Graphische Darstellung des neurotoxischen Potenzials von Makrozyklischen Laktone

Darstellung des neurotoxischen Potentials von Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX), Milbemycinoxim (MIL) und Selamectin (SEL) bei Pgp-defizienten CF-1 Mäusen auf dem Rotarod. Die Laufleistungen der Mäuse wurden mit Hilfe des Punktesystems von Tabelle 4.1 ausgewertet und als Laufkurven dargestellt. Die Versuchsdauer betrug jeweils 5 Tage.

(A) Es wurden jeweils drei Kurven von jeder Dosisfindungsstudie dargestellt, die repräsentativ den Intoxikationsverlauf für jede einzelne Substanz darstellen. Folgende Dosierungen wurden appliziert: IVM: 0,34 $\mu\text{mol/kg}$ (0,3 mg/kg), 0,4 $\mu\text{mol/kg}$ (0,35 mg/kg) und 0,51 $\mu\text{mol/kg}$ (0,45 mg/kg); MOX: 0,47

$\mu\text{mol/kg}$ (0,3 mg/kg), 1,09 $\mu\text{mol/kg}$ (0,7 mg/kg) und 1,33 μmol (0,85 mg/kg); MIL: 54,23 $\mu\text{mol/kg}$ (30,0 mg/kg), 63,26 $\mu\text{mol/kg}$ (35 mg/kg) und 72,30 $\mu\text{mol/kg}$ (40 mg/kg); SEL: 20,24 $\mu\text{mol/kg}$ (15,0 mg/kg), 40,49 $\mu\text{mol/kg}$ (30 mg/kg), 53,98 $\mu\text{mol/kg}$ (40 mg/kg). Die schraffierte Fläche stellt die *area over the curve* (AOC) für den Zeitraum 0-120 Stunden dar und ist prozentual zur Gesamtfläche angegeben. Für IVM und MOX liegen die neurotoxischen Grenzdosen bei 0,35 mg/kg bzw. 0,7 mg/kg (mittlere Laufkurven), für MIL bei 40 mg/kg (rechte Laufkurve). Für SEL konnte bis zu einer Dosierung von 40 mg/kg keine Beeinträchtigung der Laufleistung festgestellt werden.

(B) Darstellung der AOC-Werte für einen Dosisbereich von 0,2-0,45 mg/kg (IVM), 0,2-0,85 mg/kg (MOX), 0,5-40 mg/kg (MIL) und 10,0-40,0 mg/kg (SEL).

5.4.6. Vergleich des neurotoxischen Potenzials von Ivermectin, Moxidectin und

Milbemycinoxim

Um das neurotoxische Potenzial der einzelnen Substanzen untereinander zu vergleichen, wurden die jeweils ermittelten neurotoxischen Grenzdosen aus den Dosisfindungsstudien an größere Gruppen von Mäusen appliziert. An sechs Mäuse wurden 0,35 mg/kg Ivermectin appliziert, an vier Mäuse 0,7 mg/kg Moxidectin und schließlich an vier Mäuse 40,0 mg/kg Milbemycinoxim. Über einen Gesamtzeitraum von 120 Stunden wurden jeweils das Verhalten der Mäuse auf dem Rotarod und ihr Allgemeinbefinden beobachtet.

Nach Erstellen der Laufkurven wurde die AOC für jede Gruppe ermittelt. Wie in Abb. 5.7 zu sehen ist, zeigen alle drei Gruppen vergleichbare, nicht signifikant unterschiedliche Werte. Diese liegen für den Zeitraum 0-120 Stunden bei $13,07\% \pm 5,69\%$ (IVM), $14,92\% \pm 5,26\%$ (MOX) und $11,24\% \pm 0,75\%$ (MIL). Um ebenfalls den zeitlichen Verlauf der induzierten Neurotoxizität bewerten zu können, wurde die AOC zusätzlich für die Zeitpunkte 24 Stunden und 58 Stunden nach Applikation errechnet. Auch hier gab es zwischen den einzelnen Substanzen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 5.7).

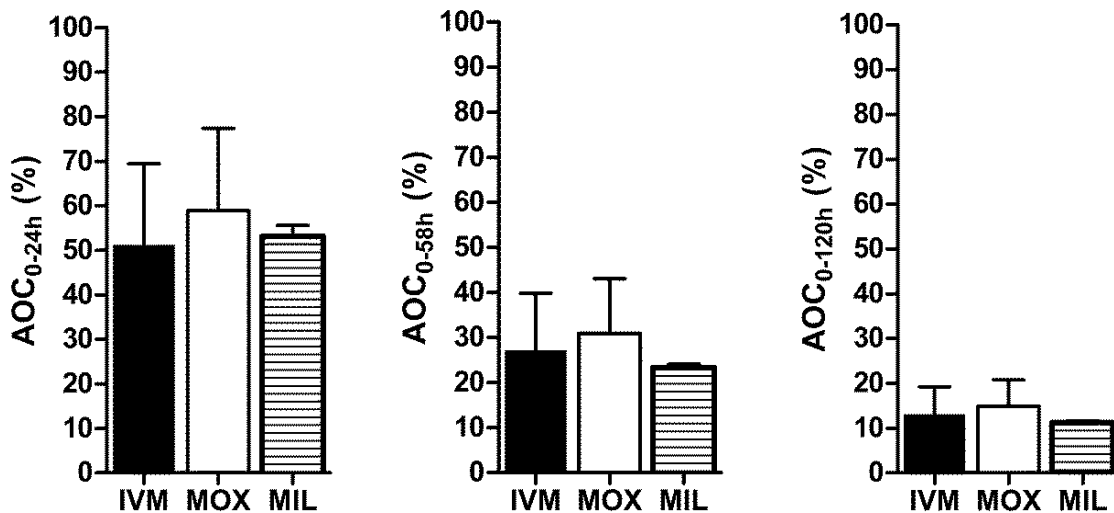


Abb. 5.7: Darstellung der neurotoxischen Dosisäquivalenzen

Bestimmung der äquivalenten neurotoxischen Dosierungen von Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX) und Milbemycinoxim (MIL) bei PGP^{mut} -Mäusen mit Hilfe des Rotarod. IVM, MOX und MIL wurden in einer Dosierung von 0,35 mg/kg, 0,7 mg/kg und 40 mg/kg an eine Gruppe von 4 bis 6 PGP^{mut} -Mäusen appliziert und die Laufperformance über 5 Tage überprüft. Die AOC wurde aus den Laufkurven ermittelt und zum Zeitpunkt $t = 24h$, $t = 58h$ und $t = 120h$ (AOC_{0-24h} , AOC_{0-58h} und AOC_{0-120h}) nach Applikation dargestellt.

Ivermectin stellte sich nach diesen Studien als Substanz mit dem stärksten neurotoxischen Potenzial heraus. Um diesen Unterschied zu den anderen beiden Substanzen Moxidectin und Milbemycinoxim darzustellen, wurden an zwei Gruppen von jeweils vier Mäusen MOX und MIL in der neurotoxischen Grenzdosis für IVM, also 0,35 mg/kg, appliziert und wiederum über einen Zeitraum von 120 Stunden beobachtet. Die Laufperformance sank dabei bei beiden Gruppen maximal auf 4 Punkten ab. Wie zu erwarten war, zeigten die Mäuse weder eine Ataxie auf dem Rotarod noch Verhaltensänderungen im Stall während der Versuchsdauer. Die AOC in diesem Versuch lagen für MOX zum Zeitpunkt $t = 24 h$ bei $6,02\% \pm 4,99\%$, für $t = 58 h$ bei $2,6\% \pm 2,23\%$ und für $t = 120 h$ bei $1,26\% \pm 1,08\%$. Für MIL lagen die AOC-Werte zum Zeitpunkt $t = 24 h$ bei $0,96\% \pm 1,12\%$, für $t = 58 h$ bei $0,4\% \pm 0,47\%$ und für $t = 120 h$ bei $0,19\% \pm 0,23\%$ (Abb. 5.8).

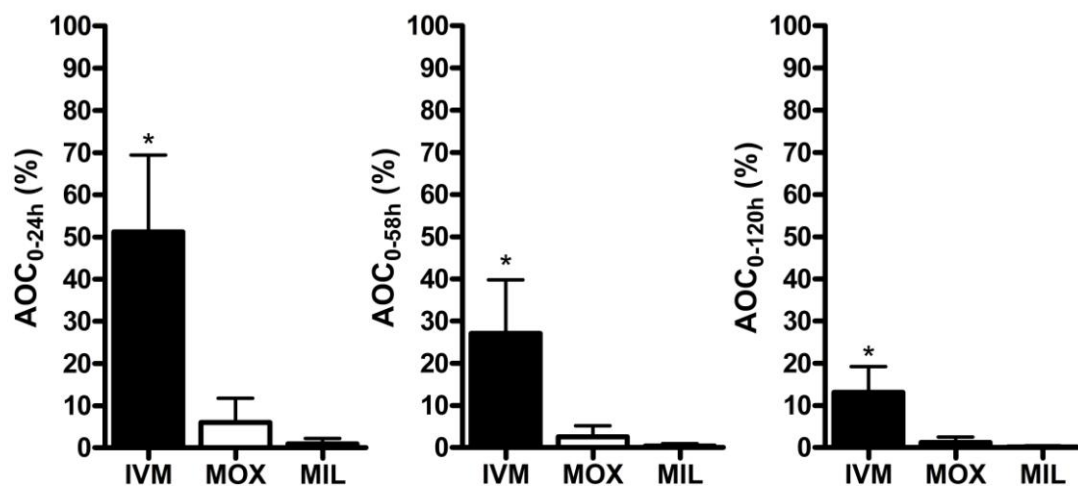


Abb. 5.8: Darstellung der AOC nach Applikation von 0,35 mg/kg IVM, MOX und MIL an PGP^{mut} -Mäuse

Es sind keine Vergiftungsanzeichen bei der Mausgruppe mit MOX und MIL zu verzeichnen. Dagegen ist die AOC von IVM zu allen drei Messzeitpunkten signifikant erhöht (* $p < 0,05$; ungepaarter t -test).

5.5. Versuch der Antagonisierung der Neurotoxizität von Ivermectin durch Selamectin

Zum jetzigen Zeitpunkt geht man davon aus, dass alle Makrozyklischen Laktone (ML) im Gehirn an den GABA_A-Rezeptor binden (Huang & Casida, 1997; Dawson et al., 2000). Allerdings unterscheiden sich die einzelnen Substanzen zum Teil sehr deutlich in ihrer therapeutischen Dosierung. Bestes Beispiel hierfür sind Ivermectin (IVM) und Selamectin (SEL). Während die therapeutische Dosierung für IVM bei 0,2 mg/kg liegt und in dieser Dosierung schon dramatische neurotoxische Nebenwirkungen bei *MDR1*-defekten Hunden auslösen kann, wird SEL in einer Dosierung von 6-12 mg/kg auch von *MDR1*-defekten Hunden gut vertragen (Paul et al., 1987; Pulliam et al., 1985; Bishop et al., 2000; Novotny et al., 2000). Bei dieser Arbeit vorangegangenen Applikationsversuchen wurden IVM und SEL an *mdr1a,b*-Doppelknockout und Wildtyp Mäuse in der jeweiligen therapeutischen Dosierung appliziert (Geyer et al., 2009). Zum einen konnte gezeigt werden, dass die höhere Dosierung von SEL natürlich zu höheren Gehirnkonzentrationen führte, allerdings ohne Auftreten von neurotoxischen Nebenwirkungen. Zum anderen konnte festgestellt werden, dass auch bei

den Wildtyp Mäusen wesentlich mehr SEL als IVM in das Gehirn penetrierte, woraus eine viel geringere Ratio zwischen Knockout- und Wildtyp Mäusen entstand. Beide Substanzen sind demnach *mdr1*-Substrate, allerdings ist die Efflux-Rate am *MDR1*-Transporter für SEL deutlich niedriger (Geyer et al. 2009). Durch die hier beschriebenen Dosisfindungsstudien konnte ebenfalls die gute Verträglichkeit von SEL im Vergleich zu IVM dargestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass bei vermuteter gleicher Bindung an den GABA_A-Rezeptor Selamectin eine geringere intrinsische Aktivität, also eine geringere Wirkstärke als IVM aufweisen müsste. Demnach sollte es möglich sein, IVM mit Hilfe eines Überschusses an SEL vom Rezeptor zu verdrängen und somit eine IVM-Intoxikation mit SEL zu antagonisieren. Diese Hypothese wurde zum Abschluss dieser Versuchsreihen mit dem folgenden Experiment überprüft.

Es wurden 6 Mäuse zum Zeitpunkt t= 0 Stunden mit 0,35 mg/kg Ivermectin *per os* appliziert, um eine leichte Ataxie auf dem Rotarod zu erreichen. Zwei Stunden später wurde dann an drei dieser Mäuse zusätzlich SEL in der Dosierung von 3,5 mg/kg *per os* appliziert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 120 Stunden beobachtet (Abb. 5.9 A).

Nach Aufzeichnung der Laufkurven und der statistischen Auswertung zeigte sich jedoch keine signifikante Verbesserung der Laufperformance bei den Mäusen mit der Doppelapplikation IVM und SEL. Tendenziell lässt sich aus diesen Daten sogar eher eine Verschlechterung ablesen (Abb. 5.9 B).

Der Versuch der Antagonisierung war damit zunächst gescheitert, die formulierte Hypothese konnte nicht bestätigt werden. Für zukünftige Untersuchungen bleibt die Frage, ob SEL eine wesentlich geringere Affinität zum GABA_A-Rezeptor aufweist als IVM oder eventuell an einen anderen Rezeptor im zentralen Nervensystem bindet.

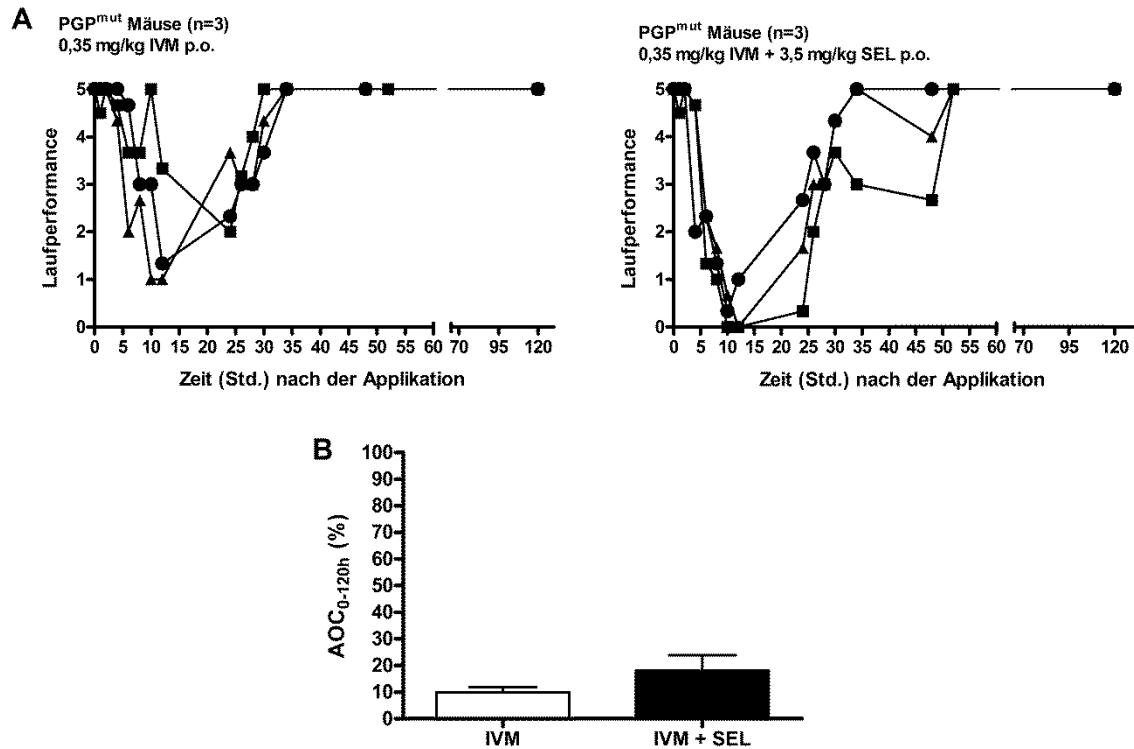


Abb. 5.9: Versuch der Antagonisierung einer IVM-Vergiftung mit SEL

(A) Laufkurven der PGP^{mut}-Mäuse nach Applikation von 0,35 mg/kg IVM (A, links) und 0,35 mg/kg IVM + 3,5 mg/kg SEL (A, rechts). Pro Gruppe wurden drei Mäuse verwendet. IVM wurde zum Zeitpunkt t=0 h appliziert, SEL zwei Stunden später (t=2 h).

(B) Darstellung der AOC beider Gruppen. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen darstellbar.

6. Diskussion

6.1. Die *mdr1*-Knockout Maus im Tierversuch

Schinkel und Mitarbeiter waren die ersten, die im Jahre 1994 eine *mdr1a*-Knockout Maus (*mdr1*^{-/-}) generierten und an dieser eine 50- bis 100-fach höhere Sensitivität gegenüber Ivermectin im Vergleich zur *mdr1a*-Wildtyp Maus (*mdr1*^{+/+}) zeigten. Dabei war eine 87-fach höhere Gehirnkonzentration nach oraler Applikation von 0,2 mg/kg IVM in der *mdr1*^{-/-} Maus besonders auffällig. Bei der *mdr1a,b*-Doppelknockout Maus zeigte sich ebenfalls eine 59-fach höhere Konzentration an IVM im Vergleich zur Wildtyp Maus (Geyer et al., 2009). Es konnte somit gezeigt werden, dass *mdr1b*, welches insbesondere in der Nebenniere, in den Eierstöcken, in der Plazenta und im trächtigen Uterus der Maus und nicht im Gehirn (Schinkel et al., 1995b) zu finden ist, keinen Einfluss auf den Transport von IVM an der Blut-Hirn-Schranke hat. Neben IVM wurden auch andere ML bereits an der *mdr1a,b*-Doppelknockout Maus analysiert und auch hier wurden stets signifikant höhere Gehirnkonzentrationen gemessen. Im Einzelnen handelte es sich um Selamectin (5- bis 10-fach, Geyer et al. 2009), Eprinomectin (16-fach) und Moxidectin (4- bis 11-fach) (Kiki-Mvouaka et al., 2010).

Die *mdr1a*- und *mdr1a,b*-Knockout Mäuse stellen somit die idealen Mausmodelle dar, um das Verhalten von ML an der Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen. Neben den ML gibt es noch viele weitere Stoffgruppen, bei denen Pgp an der BHS eine Rolle spielt. Hier werden ebenfalls diese Mausmodelle eingesetzt, um die BHS-Gängigkeit oder auch die Wechselwirkungen und Arzneistoffinteraktionen zu untersuchen. Daneben wurde in der CF-1 Mauslinie eine Subpopulation entdeckt, in dieser Arbeit als *CF-1 PGP-mutant* (PGP^{mut}) Maus bezeichnet, welche im Vergleich zur *CF-1 Wildtyp* (PGP^{wt}) Maus ebenfalls eine Überempfindlichkeit gegenüber Avermectinen zeigte (Lankas et al., 1997). Diese Subpopulation exprimiert kein funktionales Pgp an der Blut-Hirn-Schranke, basierend auf einer Insertion eines murinen Leukämievirus im *mdr1a*-Gen (Lankas et al., 1997; Umbenhauer et al., 1997; Jun et al., 2000; Pippert & Umbenhauer, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde eine ausführliche Kontrolle des Genotyps der PGP^{mut}-Mäuse durchgeführt (Abb. 5.1), welche diese Insertion belegt.

Die neu entwickelte Genotypisierungs-PCR stellt eine schnelle und leicht durchführbare Methode zur Überprüfung der eigenen Zuchtlinie dar. In Applikationsstudien mit IVM (0,2 mg/kg, *per os*) zeigte die PGP^{mut}-Maus 70-fach höhere Gehirnkonzentrationen im Vergleich zur PGP^{wt}-Maus (Kwei et al., 1999). Alle genannten Ergebnisse belegen, dass zur Analyse der Verträglichkeit und des neurotoxischen Potentials von ML der Einsatz von PGP^{mut}-Mäusen und *mdr1a,b*-Doppelknockout Mäusen als gleichwertig angesehen werden kann.

6.2. Vergleichende Neurotoxizität von Makrozyklischen Laktonen im *mdr1*-Knockout Mausmodell

6.2.1. Unterschiedliche Neurotoxizität der Makrozyklischen Laktone bei *MDR1*-defekten Hunden

Makrozyklischen Laktone (ML) sind in der Veterinärmedizin weitverbreitete Medikamente zur Behandlung von parasitären Erkrankungen (Shoop et al., 1995; Plumb, 2005). Ihr Wirkmechanismus in Invertebraten ist für alle ML gleich und basiert auf der Bindung an Glutamat- und GABA- gesteuerte Chlorid-Kanäle (Turner & Schaeffer, 1989; Wolstenholme & Rogers, 2005). Durch die Bindung an diese Kanäle kommt es zur schlaffen Lähmung der Muskulatur, welche zum Tod des Parasiten führt. Den verwandten GABA_A-Rezeptor findet man bei Vertebraten nur im zentralen Nervensystem. Die Erreichbarkeit dieses Rezeptors für ML wird aber durch die Blut-Hirn-Schranke und deren Transportsysteme verhindert. So werden die ML mit Hilfe des *MDR1*-Transporters aus dem ZNS in das Blutkompartiment zurückgepumpt bzw. deren Passage über das Gefäßendothel blockiert.

Bei Hunden werden die ML neben der Bekämpfung von Magen-Darm-Nematoden insbesondere zur Behandlung der Demodikose und zur Herzwurmprophylaxe angewendet. In Deutschland steht dazu Moxidectin in Form eines *spot-on*-Präparates (*Advocate*®) und Milbemycinoxim in Form einer Tabletten-Formulierung (*Milbemax*®, *Program Plus*®) zur Verfügung. Ivermectin dagegen ist für den Hund in Deutschland nicht zugelassen und kommt im Ausland lediglich zur Herzwurmprophylaxe (*Heartgard*®) zur Anwendung (Geyer & Janko, 2012).

Während Hunde mit intakter BHS neurotoxische Symptome nur nach massiver Überdosierung von ML zeigten und sich auch schnell wieder erholten (Hopkins et al., 1990; Ristic et al., 1995; Snowden et al., 2006; Linek et al., 2007; Gallagher et al., 2008; Merola et al., 2009; See et al., 2009), gestaltet sich die Behandlung bei Hunden mit einer 4-Basenpaar (4bp) Deletion im *MDR1*-Gen sehr viel schwieriger, da sie kein funktionales *MDR1*-Protein mehr an der Blut-Hirn-Schranke exprimieren und die ML so ungehindert in das ZNS eindringen und eine neurotoxische Vergiftung hervorrufen können.

Bei den *MDR1*-defizienten Hunden bestehen allerdings große Unterschiede in den Dosis-Toleranzen zwischen den einzelnen ML (Geyer & Janko, 2012). Während IVM in einer oralen Dosis von >0,1 mg/kg bei *MDR1*(-/-)-Hunden bereits neurotoxische Nebenwirkungen hervorruft (Pulliam et al., 1985), werden MOX und MIL in diesem Dosisbereich gut vertragen (Paul et al., 2000; Sherman et al., 2010).

Die Dosierungsunterschiede werden auch bei der Herzwurmprophylaxe sehr deutlich. IVM wird hierfür in einer oralen Dosierung von 6-12 µg/kg Körpergewicht einmal monatlich angewendet (McCall et al., 2008) und auch von *MDR1*(-/-)-Hunden bis zu einer 10-fachen Überdosierung von 60 µg/kg gut vertragen (Fassler et al., 1991). Moxidectin als *spot-on* Formulierung in Kombination mit Imidacloprid wird ebenfalls einmal im Monat zur Herzwurmprophylaxe aufgetragen, allerdings in der Dosierung von 2,5 mg/kg (Arther et al., 2005). Bei dieser Dosis zeigt ein IVM-sensitiver Collie keinerlei toxische Nebenwirkungen (Paul et al., 2004b). Andere Formulierungen, welche in Deutschland nicht auf dem Markt sind, werden in der Dosierung von 3 µg/kg jeden Monat (*ProHeart*®) oral verabreicht (Genchi et al., 2001) oder alle 6 Monate *subkutan* in einer Dosierung von 170 µg/kg (*ProHeart6*®) injiziert. In einer Studie wurde die 30-fache Überdosis der oralen Formulierung (90 µg/kg) an IVM-sensitive Collies verabreicht, ohne dass die Tiere neurotoxische Beeinträchtigungen zeigten (Paul et al., 2000).

Auch Milbemycinoxim kann monatlich zur Prophylaxe gegen Herzwürmer angewendet werden (*Milbemax*®, *Interceptor*®). Es werden 0,5 mg/kg oral verabreicht (McCall et al., 1996). Die Gabe von bis zu 2,5 mg/kg an *MDR1*-defekte Collies führte zu keinen klinischen Anzeichen einer Intoxikation (Sasaki et al., 1990). Bei höheren Dosierungen von 5-10 mg/kg *per oral*, welche von Hunden normalerweise gut vertragen werden, zeigten *MDR1*(-/-)-

Hunde erste Anzeichen einer Vergiftung, wie vermehrtes Speicheln, Ataxien und Depression (Tranquilli et al., 1991).

Bei der Behandlung der Demodikose wurde die Verträglichkeit der ML bei *MDR1*-defizienten Hunden ebenfalls sehr genau untersucht. Bei dieser Erkrankung, insbesondere bei der generalisierten Form, werden in der Regel Protokolle angewendet, bei denen die ML täglich oral verabreicht werden.

Für IVM liegt der Dosisbereich zwischen 400-600 µg/kg (Ristic et al., 1995). Wie bereits erwähnt, tolerieren *MDR1*-defekte Hunde die Substanz nur bis zu einer Dosierung von maximal 100 µg/kg. Bereits bei Dosierungen zwischen 100 und 120 µg/kg konnten erste Symptome einer Vergiftung festgestellt werden (Paul et al., 1987; Paul et al., 2000), welche mit steigender Dosis (125-170 µg/kg) immer stärker wurden (Houston et al., 1987; Fassler et al., 1991; Hadrick et al., 1995) und schließlich im Dosisbereich von 200-600 µg/kg mit Koma und auch Tod endeten (Pulliam et al., 1985; Paul et al., 1987; Hopper et al., 2002; Nelson et al., 2003).

Moxidectin wird bei der Demodikose-Behandlung dagegen als *spot-on* Präparat eingesetzt. Diese Art der Formulierung ist in mehreren Feldstudien auf therapeutische Sicherheit untersucht worden (Heine et al., 2005; Krieger et al., 2005) und wurde ebenfalls an Ivermectin-sensitiven Collies getestet. Auch diese Hunde tolerierten eine fünffache Überdosierung (32,5 mg/kg) der *spot-on* Lösung. Es wurden keine Vergiftungsanzeichen beobachtet (Paul et al., 2004b). Allerdings reicht diese Applikationsform bei einer generalisierten Demodikose meist nicht aus. Daher wird Moxidectin in diesen Fällen ebenfalls täglich oral in einer Dosierung von 200-400 µg/kg verabreicht. In der Regel wird mit einer Dosierung von 100 µg/kg am ersten Tag begonnen und die Dosis täglich um 100 µg gesteigert (Wagner & Wendlberger, 2000). Bei Beagle Hunden wurde sogar eine Dosis von 1 mg/kg ohne Auftreten von Vergiftungssymptomen *per oral* verabreicht (Vanapalli et al., 2002). Bei Ivermectin-sensitiven Collies dagegen konnten nur maximal 90 µg/kg appliziert werden (Paul et al., 2000).

Milbemycinoxim wird bei einer generalisierten Demodikose in einer täglichen oralen Dosierung von 0,5 mg/kg bis maximal 1,8 mg/kg verabreicht (Holm, 2003). Über die Verträglichkeit dieses Behandlungsprotokolls führten im Jahre 1991 *Tranquilli und*

Mitarbeiter eine Studie an IVM-sensitiven Collies durch. Dabei verabreichten sie 5 mg/kg und 10 mg/kg an je fünf Hunde und konnten bei einzelnen Tieren in der niedrigen Dosierung leichte Vergiftungsanzeichen feststellen. Alle Hunde, denen 10 mg/kg verabreicht wurden, zeigten Vergiftungssymptome über einen Zeitraum von 24 Stunden, erholten sich aber vollständig nach 48 Stunden (Tranquilli et al., 1991). Andere Wissenschaftler konnten aber auch schon eine Ataxie in IVM-sensitiven Collies nach oraler Gabe von 2,5 mg/kg feststellen (Bishop et al., 2000). Bei beiden Studien konnte zum damaligen Zeitpunkt der Genstatus der Hunde noch nicht ermittelt werden, so dass nicht eindeutig geklärt ist, ob es sich tatsächlich um homozygot *MDR1*-defekte Hunde handelt. Diese unterschiedliche Toleranz von Milbemycinoxim zeigt sich ebenfalls bei Barbet et al., 2009, welche Milbemycinoxim in einer Dosierung von 1 mg/kg bis 2,2 mg/kg an 22 Collies verabreichten. Lediglich zwei Hunde wiesen einen homozygoten *MDR1*-Defekt auf und reagierten mit Apathie und Ataxie bei einer Dosis von 1,5-1,6 mg/kg. Nach Absenken der Dosis auf 0,6 mg/kg tolerierten beide Tiere die Behandlung mit Milbemycinoxim gut und erholten sich vollständig. Ein Hund mit heterozygotem Defekt (*MDR1 (+/-)*) zeigte wie die restlichen *MDR1(+/+)*-Hunde keine nachteiligen Reaktionen auf die Behandlung. Die Feststellung des *MDR1*-Genstatus ist daher vor einer Behandlung dringend anzuraten.

Auf Basis dieser Daten stellt sich die Frage, welche Ursache für die unterschiedliche Neurotoxizität der ML verantwortlich ist.

Zum einen könnte eine unterschiedliche Gehirngängigkeit der ML verantwortlich sein. Dies würde bedeuten, dass MOX und MIL eine geringere Permeation als IVM aufweisen müssten, welche in geringeren Gehirnkonzentrationen resultieren würde. Daher wurden in dieser Arbeit Applikationsstudien mit den Makrozyklischen Laktonen IVM, MOX und MIL durchgeführt, um die Gehirnkonzentrationen und somit die Gehirngängigkeit zu ermitteln.

Zum anderen könnte die Neurotoxizität der einzelnen Substanzen mit einer unterschiedlichen Affinität oder intrinsischen Aktivität am GABA_A-Rezeptor zusammenhängen. Um diese Hypothese genauer zu beleuchten, wurden Studien zur Messung des neurotoxischen Potenzials der Makrozyklischen Laktone IVM, MOX, MIL und SEL durchgeführt.

Wie in 6.1 beschrieben, stellen die *mdr1a,b*-Doppelknockout und ebenso die *CF-1 PGP-mutant* Mäuse ideale Tiermodelle dar, um die Gehirngängigkeit und die toxische Wirkung der ML zu untersuchen.

In einer Arbeit von Geyer *et al.* konnten bereits große Konzentrationsunterschiede im Gehirn für IVM und SEL bei *mdr1*-defizienten Mäusen gezeigt werden (Geyer *et al.*, 2009). In der Studie wurden IVM in der Dosierung von 0,2 mg/kg und SEL in der Dosierung von 12,0 mg/kg an *mdr1a,b*^{-/-}-Doppelknockout Mäuse und an FVB Mäuse appliziert. Dabei konnten keine Vergiftungserscheinungen bei den transgenen Tieren festgestellt werden. Für die anderen ML MOX und MIL lagen für *mdr1*-defiziente Mäuse aber zu Beginn dieser Arbeit noch keine Daten vor.

6.2.2. Gehirnerpermeation von ML in Pgp-defizienten und Wildtyp Mäusen

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass IVM bei Wildtyp Mäusen nur sehr gering in das ZNS eindringt (Schinkel *et al.*, 1994). Dagegen steigt die Gehirnkonzentration bei *mdr1*-defizienten Mäusen massiv an. Diese Daten konnten hier bestätigt werden. IVM wurde an Pgp-defiziente und Wildtyp Mäuse appliziert. Die absoluten Gehirnkonzentrationen für IVM nach oraler Applikation von 0,2 mg/kg lagen bei der PGP^{mut}-Maus mit 88,2 ng/g im gleichen Bereich wie in vorangegangenen Studien, bei denen IVM an *mdr1a*^{-/-} (Schinkel *et al.*, 1994: 131 ng/g), *mdr1a,b*^{-/-} (Geyer *et al.*, 2009: 127,2 ng/g; Ménez *et al.*, 2012: 87,7 ng/g) oder ebenfalls an PGP^{mut}-Mäuse (Kwei *et al.*, 1999: 141 ng/g) appliziert wurde. Geringe Unterschiede lassen sich durch die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel für die Kaltsubstanz (Sesamöl, Methylcellulose, Propandiol/Glycerinformal) und die unterschiedlichen Analyseverfahren zur Bestimmung der absoluten Gewebekonzentrationen (Massenspektrometrie, Szintillatorkounter) erklären.

Bei der PGP^{wt}-Maus lag die absolute Gehirnkonzentration in der vorliegenden Arbeit bei 1,3 ng/g und stimmt so mit Daten anderer Studien überein (Schinkel *et al.*, 1994: 1,5 ng/g; Geyer *et al.*, 2009: 2,0 ng/g; Kwei *et al.*, 1999: 2,0 ng/g).

Alle diese Ergebnisse zeigen, dass IVM bei Wildtyp Mäusen eine hohe Effluxrate an der BHS aufweist. Da bei *mdr1*-defizienten Mäusen dieser Efflux nicht mehr funktioniert, ist daraus zu schließen, dass IVM ein Substrat für Pgp darstellt, darüber hinaus aber auch eine sehr hohe

Affinität zu diesem Transporter aufweist (Schinkel et al., 1994; Kwei et al., 1999; Geyer et al., 2009; Kiki-Mvouaka et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde MOX bei gleicher Dosierung an PGP^{mut}- und PGP^{wt}-Mäuse appliziert. Bei der Wildtyp Maus lagen die Werte überraschend höher als nach der IVM-Applikation und zwar bei 5,8 ng/g (Reinsubstanz) bzw. bei 4,1 ng/g (*Advocate*®). Diese Daten bestätigen die Werte einer späteren Studie von *Kiki-Mvouaka et al.* aus dem Jahre 2010 (absolute Gehirnkonzentrationen: MOX 6 ng/g; IVM 2,4 ng/g). Die Gehirnpermeation von MOX scheint also größer zu sein als die von IVM. Um diese Feststellung noch weiter zu untermauern, wurden die Gehirn-Plasma-Koeffizienten (GPK) bestimmt; je höher dieser Koeffizient ist, desto mehr hat die Substanz das Blutkompartiment verlassen und sich im ZNS angelagert. Der Koeffizient lag für IVM bei lediglich 0,15, während er für MOX bei 0,52 (*Reinsubstanz*) bzw. 0,62 (*Advocate*®) lag (Tab. 6.1). Auch hier werden die Daten einer vorhergehenden Studie qualitativ bestätigt (Kiki-Mvouaka et al., 2010: GPK für IVM bei 0,08; GPK für MOX bei 0,21).

Bei den PGP^{mut}-Mäusen stiegen die Gehirnkonzentrationen dagegen stark an. Die absoluten Werte für MOX im Gehirn von 89,9 ng/g (*Reinsubstanz*) bzw. 104,0 ng/g (*Advocate*®) sind zum einen auf dem gleichen Niveau wie bei IVM (88,2 ng/g), zum anderen sind die Werte vergleichbar mit denen aus vorangegangenen Studien (Kiki-Mvouaka et al., 2010: 64,7 ng/g für IVM und 65,7 ng/g für MOX; Ménez et al., 2012: 87,1 ng/g für IVM und 60,7 ng/g für MOX). Etwaige Unterschiede sind hier durch die unterschiedlichen Applikationsarten (*per os* vs. *subkutan*) zu erklären.

Vergleicht man nun die Gehirnpermeation beider Substanzen bei beiden Mausstämmen und errechnet die Ratios für die Gehirnkonzentrationen, so zeigt sich, dass IVM 67-fach mehr, MOX dagegen nur 16-mal stärker in das Gehirn der *mdr1*-defizienten Mäuse penetriert als bei Wildtyp Mäusen. Ältere Studien kommen zu vergleichbaren Ergebnissen: bei der *mdr1a*-Knockout Maus lag die Gehirnkonzentration für IVM 87-fach höher (Schinkel et al., 1994), bei der *mdr1a,b*-Doppelknockout Maus 59-fach höher (Geyer et al., 2009) und bei der PGP^{mut}-Maus 70-fach höher. Für MOX wurde bis jetzt nur eine Ratio nach *subkutaner* Applikation publiziert, welche beim 11-fachen Wert lag (Kiki-Mvouaka et al., 2010).

Diese Daten lassen folgende Schlussfolgerungen zu: MOX penetriert bei Mäusen mit intakter BHS stärker in das ZNS als IVM, wird demnach weniger stark aus dem ZNS in das

Blutkompartiment zurückgepumpt und weist damit eine geringere Affinität zum *MDR1*-Transporter auf als IVM.

Diese Erkenntnisse decken sich mit früheren *in vitro* Transportstudien, in denen die ML sowohl als Substrate als auch als Inhibitoren des *MDR1*-Transporters untersucht wurden. In beiden Fällen zeigte sich MOX stets als das schwächere Substrat im Vergleich zu IVM (Griffin et al., 2005; Dupuy et al., 2001; Lespine et al., 2003, 2007; Brayden & Griffin, 2008).

		PGP ^{wt}	PGP ^{mut}	<i>mdr1</i> ^{+/+}	<i>mdr1</i> ^{-/-}
IVM	GPK 0,2 mg/kg	0,15±0,02	3,8±1,5		
MOX	GPK <i>Advocate</i> ® 0,2 mg/kg	0,62±0,17	10,9±5,2		
	GPK Reinsubstanz 0,2 mg/kg	0,52±0,07	7,2±2,2		
MIL	GPK 0,2 mg/kg			0,48±0,07	1,1±0,25
	GPK 2,5 mg/kg			0,59±0,26	1,1±0,26

Tabelle 6.1: Vergleich der Gehirn-Plasma-Koeffizienten

Vergleich der Gehirn-Plasma-Koeffizienten (GPK) 24 h nach *per oraler* Applikation von 0,2 mg/kg IVM, MOX und MIL bzw. 2,5 mg/kg MIL an *mdr1*-defiziente und Wildtyp Mäuse (modifiziert nach Janko&Geyer 2013)

Als letzte Substanz wurde MIL untersucht. Es wurden ebenfalls 0,2 mg/kg *per oral* appliziert und die Gehirnkonzentrationen gemessen. Hier zeigte sich schon bei den Wildtyp Mäusen eine wesentlich höhere Gehirnkonzentration als bei IVM und MOX; sie lag bei 9,3 ng/g. Dagegen war die Zunahme bei *mdr1*-defizienten Mäusen nur sehr gering und lag mit 15,67 ng/g deutlich unter den Werten von IVM und MOX. Augenscheinlich hat MIL die geringste Affinität zum *MDR1*-Transporter und wird bei Tieren mit intakter BHS am geringsten aus dem ZNS herausgepumpt. Bei fehlendem Transporter dagegen dringt es auch nur annähernd zweimal so stark in das Gehirn ein, was schlussendlich für ein sehr niedriges Eindringvermögen der Substanz spricht. Die Gehirnkonzentrationen nach Applikation von 2,5 mg/kg MIL (therapeutische Dosierung) liegen bei 119,9 ng/g und somit in vergleichbarer

Größenordnung von IVM und MOX nach Applikation von nur 0,2 mg/kg. Unabhängig von der Dosierung liegen die GPKs bei den *mdr1*-intakten und den *mdr1*-defizienten Mäusen jeweils auf gleichem Niveau (*mdr1*^{+/+}: 0,48 vs. 0,59; *mdr1*^{-/-}: 1,1 vs. 1,1). Die Ratio liegt bei ca. 2, ebenso wie bei den absoluten Gehirnkonzentrationen (Tab. 6.1). Diese GPKs unterstreichen die hohe therapeutische Breite und Sicherheit von MIL und die geringe Affinität zum *MDR1*-Transporter. Vergleichsdaten für MIL aus der experimentellen Literatur liegen nicht vor.

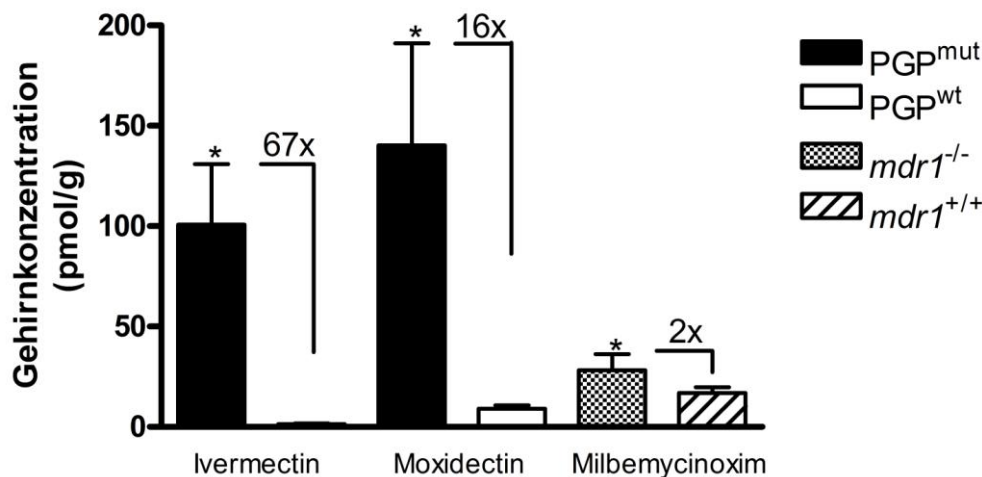


Abb. 6.1: Gehirnkonzentrationen von Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim in Wildtyp und *mdr1*-defizienten Mäusen

Gehirnkonzentrationen von *CF-1 PGP-mutant* (PGP^{mut}) und *CF-1 Wildtyp* (PGP^{wt}) Mäusen bzw. *mdr1*-defizienten (*mdr1*^{-/-}) und Wildtyp (*mdr1*^{+/+}) Mäusen nach der *per oralen* Applikation von 0,2 mg/kg Ivermectin (0,23 µmol/g), Moxidectin (0,31 µmol/g) und Milbemycinoxim (0,36 µmol/kg).

* Signifikant höhere Gehirnkonzentrationen in der *mdr1*-defizienten Maus im Vergleich zur Wildtyp Maus ($p < 0,05$; ungepaarter *t*-test)

Abschließend ist für die drei untersuchten ML festzuhalten (Abb. 6.2): Bei Mäusen mit intakter Blut-Hirn-Schranke penetriert Ivermectin kaum, Moxidectin etwas mehr und Milbemycinoxim am stärksten in das Gehirn. Dies lässt den Schluss zu, dass Ivermectin die höchste Affinität zu Pgp aufweist, während Milbemycinoxim am schwächsten vom Efflux-Transporter zurück in das Blutkompartiment gepumpt wird.

Bei Mäusen mit defektem P-Glycoprotein penetrieren Ivermectin und Moxidectin in etwa gleichstark in das ZNS. Dagegen weisen die absoluten Gehirnkonzentrationen von Milbemycinoxim weniger als ein Fünftel der Werte auf. Vergleichbare Gehirnkonzentra-

6.2.3. Messung des neurotoxischen Potenzials der ML

Während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit wurde von einer anderen Arbeitsgruppe eine Studie publiziert, in welcher zumindest für IVM und MOX das neurotoxische Potenzial gemessen und Dosisäquivalenzen ermittelt wurden (Ménez et al., 2012). In einem ersten Versuch wurden zunächst IVM und MOX in aufsteigenden Dosierungen an *mdr1a,b*^{-/-}-Mäuse *subcutan* appliziert, nach zwei und 24 Stunden die Tiere getötet und Gehirn- und Plasmaproben entnommen. Es konnte ein linearer Anstieg der Gehirnkonzentrationen in Abhängigkeit zur ansteigenden Dosis gezeigt werden. Außerdem konnte abgeleitet werden, dass man eine dreifach höhere Konzentration an MOX benötigt, um die gleiche Substanzakkumulation im Gehirn zu erreichen wie bei IVM. In einem weiteren Versuch wurden wieder beide Substanzen an *mdr1*-defiziente Mäuse in aufsteigender Dosierung appliziert, um die LD₅₀-Werte und die induzierte Neurotoxizität zu ermitteln. IVM wurde in Dosen von 0,1 bis 1,75 mg/kg ($\approx$ 0,11-2,0 μ mol/kg) und MOX von 0,2 bis 8,2 mg/kg ($\approx$ 0,31-12,9 μ mol/kg) appliziert und die Mäuse in den ersten 12 Stunden jede Stunde einmal, danach mindestens zweimal am Tag beobachtet. Wurden Ataxie oder starker Tremor festgestellt, wurden die Tiere euthanasiert und die LD₅₀-Werte bestimmt. Diese lagen für IVM bei 0,4 mg/kg ($\approx$ 0,46 μ mol/kg) und für MOX bei 1,47 mg/kg ($\approx$ 2,3 μ mol/kg). Mit dieser Studie konnte zwar gezeigt werden, dass die LD₅₀-Werte für MOX fünfmal höher lagen als für IVM, allerdings ist der Versuchsansatz insgesamt eher kritisch zu sehen.

Zu Beginn einer ML-Vergiftung steht immer eine Ataxie, die bei einer rein visuellen Käfigbeobachtung eher ungenau und nicht rechtzeitig festgestellt werden kann. Darüber hinaus wurde eine Vergiftung erst dann registriert, wenn die Mäuse schon stark in ihrem Allgemeinbefinden gestört waren und ganz eindeutige Anzeichen einer Vergiftung zeigten. Reine Beobachtungsstudien können nicht in ein neutrales, objektives Bewertungssystem eingeordnet werden, die Methodik zur LD₅₀-Bestimmung ist im Hinblick auf den Tierschutzgedanken sehr kritisch zu sehen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es dagegen, eine Messmethode zu finden und zu etablieren, mit der man in der Lage ist, die Neurotoxizität der ML vergleichend zu bestimmen, diese jedoch frühzeitig und nur mit minimaler Belastung für die Versuchstiere zu erfassen und möglichst objektiv zu bewerten.

Das initiale Symptom einer ML-Vergiftung ist die Ataxie in den Hintergliedmaßen (Geyer & Janko, 2012). In diesem Stadium ist die Belastung der Tiere noch relativ gering. Eine Beeinträchtigung des Magen-Darm-Traktes, der Futter- und Wasseraufnahme oder der Atmung ist hier noch nicht feststellbar, sehr geringe Ataxien lassen sich bei der Adspektion manchmal noch gar nicht feststellen, da sich die Tiere im Käfig natürlich bewegen und orientieren sowie ihre Umwelt normal wahrnehmen.

Bei der Suche nach einer adäquaten Messmethode für das neurotoxische Potenzial bot sich das Rotarod-Setup an, stellt es doch eine gute Möglichkeit dar, die motorische Koordination, die Balance und somit auch mögliche Ataxien bei den Versuchstieren frühzeitig festzustellen und zu messen (Davis et al., 1999; Dawson et al., 2000; Pallier et al., 2009). Das Rotarod wird hier erstmalig verwendet, um die Neurotoxizität der ML bzw. den Vergiftungsgrad vergleichend zu messen, den Vergiftungsverlauf aufzuzeichnen und anschließend auch graphisch darzustellen. Für diese Fragestellung konnte kein bekanntes Standard-Protokoll für das Rotarod verwendet werden, sondern es bedurfte der Etablierung eines neuen Messprotokolls.

Es bestehen grundsätzlich mehrere Möglichkeiten, die Performance einer Maus auf dem Rotarod zu beurteilen. Grundsätzlich kann man die Maus bei einer gleichbleibenden Drehgeschwindigkeit auf die Walze setzen und beurteilen, ob sie überhaupt laufen kann oder nicht. Mit dieser Art der Messung lässt sich in der Tat eine ML-Vergiftung nachweisen, da die Mäuse ab einem bestimmten Vergiftungsgrad nicht mehr in der Lage sind sich auszubalancieren. Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich aber, dass leicht vergiftete Mäuse zwar noch auf dem Rotarod laufen konnten, aber nicht mehr so lange wie nicht vergiftete Tiere. Der Verlauf einer Vergiftung mit Verschlechterungs- und Verbesserungsphasen kann deshalb mit dieser Vorgehensweise nur sehr ungenau dargestellt werden. Folglich wurde daher zunächst eine feste Laufzeit von 2 Minuten bestimmt, auf welche die Mäuse auch im Vorfeld trainiert wurden.

Eine weitere, zu bedenkende Möglichkeit ist eine Messung mit einem kontinuierlichen Anstieg der Drehgeschwindigkeit. Bei Versuchen zur Messung der Neurotoxizität hätte dies aber keine größere Aussagekraft zum Vergiftungsverlauf gehabt und die Vergleichbarkeit zwischen den Tieren und somit die Versuchsauswertung wären erschwert gewesen. Die

Geschwindigkeit wurde daher auf 16 rpm festgesetzt, eine Geschwindigkeit, welche den Mäusen ein zügiges Gehen abverlangt.

Es handelt sich hierbei um ein Protokoll, welches in seiner grundsätzlichen Idee bereits bei *Dawson et al.* (2000) verwendet und für die vorliegende Arbeit modifiziert wurde. Damals wurden die Mäuse nach Applikation der Testsubstanz zweimal für 120 Sekunden auf das Rotarod gesetzt und die Zeit bestimmt, wie lange sie laufen konnten. Um bei diesem Versuchsprotokoll aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, musste die Zahl der Tiere einer Versuchsgruppe wegen der fehlenden Adaption an das Rotarod entsprechend groß gewählt werden. Außerdem konnte der Vergiftungsgrad nicht beurteilt oder dargestellt werden, da lediglich die Laufperformance in Sekunden in Abhängigkeit der gewählten Dosis gemessen wurde.

Im Unterschied dazu ist in der vorliegenden Arbeit eine Trainingsphase vor den Versuchen eingeplant, und die Laufperformance wird in ein Punktesystem übertragen sowie graphisch dargestellt (Tab. 4.1). Mit dem so festgelegten Laufprotokoll von 2 Minuten bei 16 rpm mit jeweils 3 Wiederholungen kann insgesamt eine qualitative und quantitative Aussage über die Laufleistung der Versuchstiere getroffen werden.

Es muss betont werden, dass mit Hilfe dieses Protokolls schon sehr feine Unterschiede in der Laufleistung festzustellen sind, die Mäuse nur minimalst belastet werden und selbst bei einer leichten Ataxie, welche ganz eindeutig eine Vergiftung anzeigt, die Mäuse gar nicht oder nur sehr gering im Allgemeinbefinden gestört sind. Somit ist dieses Protokoll im Rahmen der Fragestellung der Arbeit als sensitive, praxistaugliche Methode auch am besten mit dem Tierschutzgedanken vereinbar.

Ein Nachteil dieses Protokolls ist sicherlich die lange Trainingszeit, um eine sicher laufende Maus für den Versuch einsetzen zu können und somit gut auswertbare Ergebnisse zu erhalten. Allerdings konnte damit aber die Zahl der Tiere geringer gehalten werden. Kritisch zu beurteilen ist ebenfalls die Tatsache, dass nur ein Beobachter die Laufleistung und den Vergiftungsgrad beurteilt hat. Für zukünftige Studien sollten mehrere Personen oder Videoaufzeichnungen in Erwägung gezogen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Neurotoxizität der ML IVM, MOX und MIL vergleichend dargestellt werden.

Bei einer Dosierung von 0,3 mg/kg IVM zeigten sich erste, ganz geringe Einschränkungen in der Laufleistung auf dem Rotarod bei ansonsten ungestörtem Allgemeinbefinden. Die minimale Erhöhung um 0,05 mg/kg führte zu Laufeinschränkungen, die ganz eindeutig einer ML-Vergiftung zugeordnet werden konnten, und der weitere Anstieg auf 0,45 mg/kg führte zu einer sehr gravierenden Vergiftung mit Stupor, Krämpfen und dem Einstellen der Futter- und Wasseraufnahme. Die hohe Sensibilität der Mäuse auf IVM wurde somit eindeutig bestätigt. Die Vergiftung zeigte sich bereits bei Dosierungen, welche deutlich unter denen der bekannten LD₅₀-Werte (Schinkel et al., 1994: 0,7-0,8 mg/kg) lagen. Höhere Konzentrationsgaben waren in dieser Studie nicht mehr notwendig und damit konnten Leiden, Schmerzen und Tierverluste verhindert werden.

Auch eine nur sehr geringe Steigerung in der MOX-Dosierung führte auf dem Rotarod von einer leichten Imbalance (0,6 mg/kg) zu einer starken Einschränkung der Laufleistung (0,7 mg/kg).

MIL dagegen konnte in der Dosierung jeweils um 5 mg/kg bis zu einer Dosierung von 40 mg/kg gesteigert werden, um ähnliche Auswirkungen wie bei IVM oder MOX zu erreichen.

Die Dosisescalation hat gezeigt, dass eine höhere Dosierung von MOX und MIL als von IVM benötigt wird, um eine vergleichbare Beeinträchtigung der Laufperformance auf dem Rotarod zu erreichen. Man erreicht gleichgroße AOC-Werte bei der Verabreichung von 0,35 mg/kg IVM, 0,7 mg/kg MOX und 40 mg/kg MIL. In diesen Dosierungen zeigen die Mäuse eine milde Ataxie bei unverändertem Allgemeinbefinden. Dies bedeutet schlussendlich, dass im Vergleich zu IVM eine doppelte Dosierung von MOX und eine 114-fache Dosierung bezogen auf mg/kg von MIL den äquivalenten Vergiftungsgrad auslösen.

Da bei steigender Dosierung von ML die Gehirnkonzentration linear ansteigt (Ménez et al., 2012), kann also davon ausgegangen werden, dass die neurotoxischen Äquivalenz-Dosierungen zu einer unterschiedlich hohen Akkumulation der Substanzen im Gehirn führt, somit IVM die geringste, MIL die höchste und MOX eine mittlere Konzentration aufweist.

Die durchgeführten Versuche am Rotarod lassen darauf schließen, dass die einzelnen ML unterschiedlich mit dem GABA_A-Rezeptor oder anderen zentralen ML-sensitiven Rezeptoren

interagieren. Es kann mit diesem Versuchsaufbau jedoch nicht geklärt werden, ob dafür eine unterschiedliche Affinität, also die Bindungsstärke der einzelnen Substanzen am Rezeptor, oder aber die intrinsische Aktivität, also die Fähigkeit den Rezeptor zu aktivieren, verantwortlich ist. Die spezifische Affinität müsste hierfür mit Hilfe von Rezeptorbindungsstudien weiter untersucht werden und die intrinsische Aktivität könnte mittels elektrophysiologischen Messungen ermittelt werden.

Affinität und intrinsische Aktivität am Rezeptor werden beide von der Molekülstruktur des Liganden beeinflusst und es bedarf daher einer genaueren Betrachtung des Molekülaufbaus und der strukturellen Unterschiede der ML.

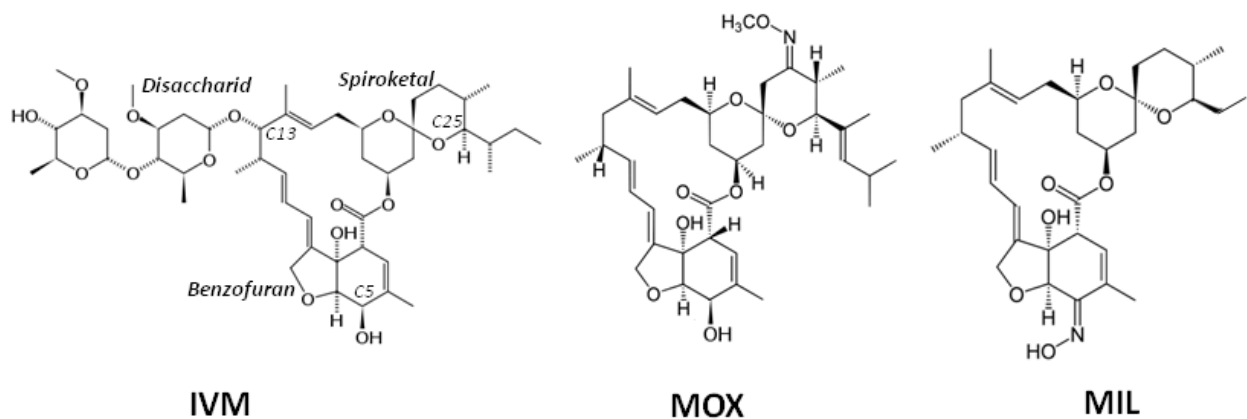


Abb. 6.3: Strukturformeln von Ivermectin, Moxidectin und Milbemycin oxim

Strukturformeln der drei Makrozyklischen Laktone Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX) und Milbemycin oxim (MIL). In die Strukturformel von IVM wurden die drei wichtigen C-Atome C5, C13 und C25 markiert, an denen sich die beschriebenen ML unterscheiden.

Alle ML bestehen grundsätzlich aus einem Laktone-Ring mit 16 C-Atomen, der auch für ihren Namen verantwortlich ist. Außerdem besitzen alle ML einen Benzofuranring und eine Spiroketal-Gruppe (Abb. 6.3). Grundsätzlich gibt es 4 Stellen, an denen sich die einzelnen Substanzen grundlegend unterscheiden. Der Vollständigkeit halber werden bei der vergleichenden Betrachtung auch Doramectin (DOR) und Selamectin (SEL) mit einbezogen.

Der erste Unterschied befindet sich an Position C13. Die Avermectine IVM, DOR und SEL weisen dort im Gegensatz zu den Milbemycinen MOX und MIL einen Saccharidrest auf. IVM

und DOR besitzen einen Disaccharidrest, SEL dagegen nur einen Monosaccharidrest. Bei den Milbemycinen Moxidectin und Milbemycinoxim ist an Position C13 nur ein Wasserstoff-Atom gebunden, so dass man auch von einem Aglycon spricht.

Den nächsten Unterschied findet man im Bereich des Spiroketals an C-Atom 25. Da es sich bei IVM um eine Mischung aus den Avermectinen B1a und B1b handelt, weist es dort zu 80% einen *sec*-Butyl-Rest und zu 20% einen Isopropyl-Rest auf. Auch MIL liegt als Mischung vor, im Verhältnis 70% zu 30% sind hier Ethyl- und Methylreste gebunden. MOX weist an dieser Stelle einen Dimethyl-butenyl-Rest auf und SEL und DOR jeweils einen Cyclohexyl-Ring.

In der Abb. 6.3 nicht besonders hervorgehoben, befinden sich auch an den Positionen C22 und C23 unterschiedliche Reste. IVM, MIL und SEL zeigen dort eine gesättigte C-C-Bindung, während bei MOX eine Imin-Gruppe gebunden ist ($C=N-OCH_3$) und DOR an dieser Stelle eine Doppelbindung aufweist ($CH=CH$).

Den letzten, wichtigen Unterschied findet man im Bereich des Benzofuranrings an Position C5. Bei IVM, MOX und DOR ist dort eine Hydroxygruppe (OH-Gruppe), bei MIL und SEL dagegen eine Ketoximgruppe ($C=N-OH$ -Gruppe) angehängt. Genau dieser Strukturunterschied scheint nach neuesten Erkenntnissen eine wichtige Rolle für die intrinsische Aktivität von ML am $GABA_A$ -Rezeptor zu spielen (Hibbs & Gouaux, 2011). *Hibbs und Gouaux* beschreiben eine 3D-Kristallstruktur des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals (GluCl-Kanal) von *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*), in der IVM als allosterischer Agonist eingesetzt und mitkristallisiert wurde. Es konnte gezeigt werden, in welcher Domäne IVM an den Rezeptor bindet und dort vermutlich eine Konformationsänderung bewirkt. Der GluCl-Kanal gehört wie der $GABA_A$ -Rezeptor zur Familie der Cys-Loop-Rezeptoren. Beide bestehen aus 5 Untereinheiten (UE), welche eine Pore umschließen. Bei dem GluCl-Kanal bindet IVM an die Transmembrandomänen in der Peripherie, schiebt sich zwischen das M1- und M3-Segment zweier Untereinheiten und zieht sie regelrecht auseinander. Dadurch dringt es tiefer ein und es kommt schließlich zum Kontakt mit dem M2-Segment und dem M2/M3-Loop (Abb. 6.4).

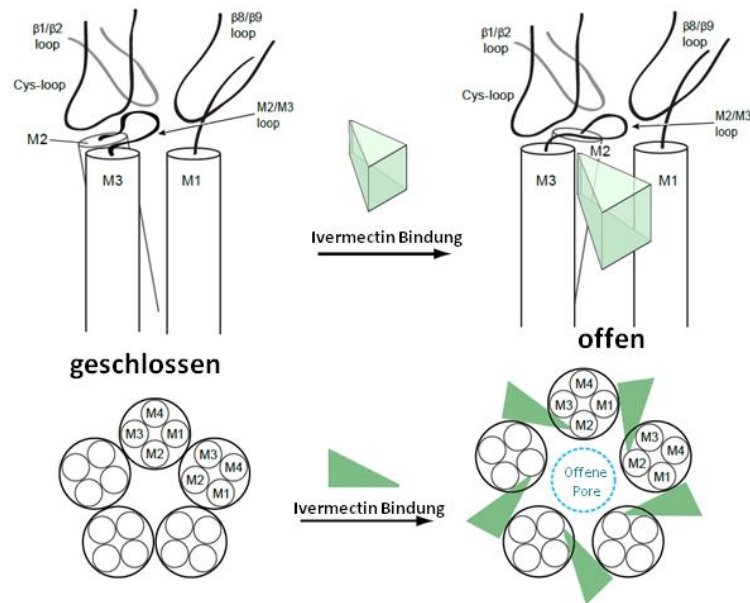


Abb. 6.4: Die Wirkung von Ivermectin am Glutamat-gesteuerten Chlorid Kanal von *C.elegans*

Schematische Darstellung der allosterischen Aktivierung und Modulation des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals von *C.elegans* durch Ivermectin (grünes Dreieck) (modifiziert nach Hibbs & Gouaux, 2011).

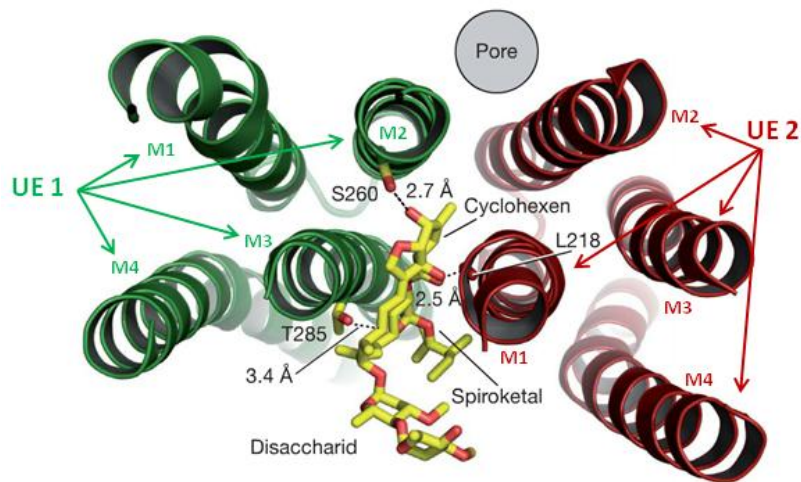


Abb. 6.5: Atomare Interaktion zwischen Ivermectin und dem Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanal

Sicht von der extrazellulären Seite auf die Pore und 2 Untereinheiten UE 1 (grün) und UE 2 (rot) des GluCl-Kanals. Jede Untereinheit besteht aus 4 Transmembransegmenten (M1-M4). Darstellung von IVM (gelb) und seiner Bindung und atomaren Interaktion mit den Transmembransegmenten. Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar (modifiziert nach Hibbs & Gouaux, 2011).

In diesem Modell wird der apikale Teil des M2-Segmentes durch die IVM-Bindung nach außen von der Porenachse weg in die Peripherie gezogen. Das Resultat ist die Öffnung der Pore und der Einstrom von Chlorid-Ionen. Diese Konformationsänderung wird dann durch die Interaktion des apikalen Endes des M2-Segmentes mit IVM stabilisiert. *Hibbs und Gouaux* gehen davon aus, dass es hierbei zu einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Serin 260 des M2-Segmentes und der Hydroxygruppe an Position C5 von IVM kommt (Abb. 6.5). Eventuell wird der offene Status der Pore noch zusätzlich durch eine Bindung des Disaccharidrestes mit Isoleucin 273 des M2/M3-Loops stabilisiert (Hibbs & Gouaux, 2011).

Auch wenn man diese Ergebnisse nicht unmittelbar auf den GABA_A-Rezeptor im ZNS von Vertebraten übertragen kann, gibt es doch einige Übereinstimmungen zwischen dem GluCl-Kanal und dem GABA_A-Rezeptor, die vergleichbare Interaktionen mit ML nahelegen. Wie bereits erwähnt, gehören beide Rezeptoren zur Familie der Cys-Loop-Rezeptoren und auch für den GABA_A-Rezeptor konnte bereits nachgewiesen werden, dass IVM als allosterischer Agonist fungiert. Es wurden dazu Bindungs-Assays an Rattenneuronen mit GABA und Avermectin-Analoga durchgeführt (Dawson et al., 2000). Mit Hilfe der Dissoziationskonstanten wurde die Affinität von Avermectinen an GABA_A-Rezeptoren ermittelt, die für IVM mit einem Wert von 8,2 nM am höchsten war. Außerdem wurden elektrophysiologische Messungen mit GABA und IVM an Rattenneuronen und an murinen Fibroblasten, welche GABA_A-Rezeptoren mit den am häufigsten vorkommenden Untereinheiten exprimieren, durchgeführt. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Methode konnte an nativen Rattenneuronen und an stabilen Ltk-Zellen eine eindeutige Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren und sogar eine Potenzierung der GABA-Wirkung durch IVM gezeigt werden. Darüber hinaus wurden humane GABA_A-Rezeptoren mit unterschiedlichen β -UE in Oozyten transfiziert. Auch hier konnte eine Potenzierung der GABA-Wirkung gemessen werden (Dawson et al., 2000).

Mittlerweile wurde auch Moxidectin als Agonist getestet und bestätigt. Auch hier wurden elektrophysiologische Messungen an Oozyten durchgeführt, welche einen GABA_A-Rezeptor der Ratte exprimieren ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$). Durch Zugabe von GABA und IVM oder MOX konnte eine Potenzierung der GABA-Wirkung gezeigt werden. Die Dosierung der maximalen Potenzierung lag für IVM bei 0,5 μ M, für MOX dagegen bei 0,66 μ M. MOX konnte somit eine

Potenzierung von ca. 260% erreichen, IVM dagegen von über 400%. Dies zeigt, dass MOX offensichtlich ein schwächerer Aktivator ist als IVM (Ménez et al., 2012).

Ein ganz entscheidender Unterschied zwischen GluCl-Kanal und dem GABA_A-Rezeptor ist die Zusammensetzung der Untereinheiten. In der vorliegenden Untersuchung von *Hibbs & Gouaux* war der GluCl-Kanal aus 5 identischen Untereinheiten aufgebaut. Der GABA_A-Rezeptor ist dagegen deutlich komplexer strukturiert. Bei diesem gibt es 19 verschiedene Untereinheiten, die in vielfältigen Kombinationen vorkommen. Welchen Einfluss diese unterschiedliche Komplexität im Molekülaufbau auf Reaktionsmechanismen hat, ist noch ungeklärt und zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

Überträgt man die Erkenntnisse der Studie von *Hibbs und Gouaux* (2011) auf den GABA_A-Rezeptor im ZNS von Vertebraten, dann ließe sich folgende Hypothese formulieren: Zunächst sollten die unterschiedlichen Restgruppen an Position C25 kaum eine Rolle für die Bindung und intrinsische Aktivität der ML spielen. Die Disaccharide an C13 stabilisieren die offene Pore, sollten aber an der Öffnung nicht aktiv beteiligt sein. Die entscheidende Rolle könnte die Hydroxygruppe (IVM, MOX) an Position C5 spielen, da sie die Pore über eine Interaktion mit M2 aktiv zu öffnen scheint. MIL besitzt an Position C5 interessanterweise keine Hydroxygruppe, sondern eine sterisch wesentlich komplexere Ketoximgruppe. Dadurch wäre es gut möglich, dass es entweder auf Grund der unterschiedlichen Kettenlängen oder der nicht stabilen Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu keiner stabilen und festen Bindung mit dem Serin 260 der Transmembrandomäne M2 kommt. Dies würde die höhere intrinsische Aktivität von IVM und MOX im Vergleich zu MIL erklären. Der Unterschied zwischen IVM und MOX lässt sich eventuell durch die stabilisierende Wirkung auf den Offenzustand durch den Zuckerrest von IVM erklären. Nur weitere elektrophysiologische Messungen, insbesondere mit MOX und MIL, aber auch die Entwicklung einer 3D-Kristallstruktur eines GABA_A-Rezeptors könnten hier weiteren Aufschluss geben.

6.3. Antagonisierung und Therapie einer ML Intoxikation

Bis zum heutigen Zeitpunkt werden in der veterinärmedizinischen Praxis immer wieder Hunde vorgestellt, welche mit ML behandelt wurden und Vergiftungssymptome zeigen. Ein spezifisches Antidot bei solchen Intoxikationen konnte noch nicht gefunden werden, und auch der Versuch in dieser Arbeit, IVM mit Hilfe von SEL am GABA_A-Rezeptor zu verdrängen, schlug leider fehl. Dies bedingt, dass man auch weiterhin eine symptomatische und den Patienten stabilisierende Therapie durchführen muss.

Im Laufe der Jahre wurden unterschiedlichste Substanzen und Methoden zur Antagonisierung von Vergiftungen mit ML erprobt. Ausgehend von der Annahme, dass eine IVM-Bindung an den GABA_A-Rezeptor vorliegt, stellte Picrotoxin ein adäquates Antidot dar. Es handelt sich dabei um einen nichtkompetitiven GABA_A-Rezeptor-Antagonisten, welcher den Cl⁻-Kanal blockiert und somit eine Hyperpolarisation der neuronalen Zellen verhindert. *Sivine und Mitarbeiter* berichteten im Jahre 1985 von einem 18 Monate alten Collie, welcher mit 0,4 mg/kg IVM subcutan behandelt wurde. Der Hund zeigte die typischen Symptome einer ML-Vergiftung und fiel schließlich 90 Stunden nach der Applikation in einen komatösen Zustand. Das Tier wurde zunächst symptomatisch mit Infusionen, B-Vitaminen, Ampicillin und Dexamethason behandelt. Am neunten Tag setzte man Picrotoxin in der Dosierung 1 mg/min als Infusionslösung ein. Bereits nach 8 Minuten wurde diese gestoppt, da sich erste Anzeichen einer Verbesserung des Zustands zeigten. Nach einer Viertelstunde versuchte der Hund sogar aufzustehen, bekam dann aber heftigere Krämpfe. Mittels Thiopental konnten diese gut kontrolliert werden. Schlussendlich erreichte der Hund 10 Stunden nach der Picrotoxin-Gabe eine Brust-Bauch-Lage, die Puls- und Atemfrequenz normalisierten sich und 24 Stunden nach der Applikation begann er wieder zu laufen und zu trinken. Eine vollständige Erholung war am siebten Tag nach der Picrotoxin-Gabe erreicht. Weitere Studien mit Picrotoxin sind nicht bekannt.

Des Weiteren wurden Antagonisierungsversuche mit Physostigmin unternommen. Als reversibler Cholinesteraseinhibitor gehört Physostigmin zur Gruppe der indirekt wirkenden Parasympathomimetika und wird z.B. als Gegenmittel bei Vergiftungen oder Überdosierungen von Benzodiazepinen verwendet (*Tranquilli et al., 1987*). Da Benzodiazepine ebenso wie ML die GABA-Wirkung verstärken, erhoffte man sich eine

positive Wirkung bei der Behandlung von ML-Vergiftungen (Tranquilli et al., 1987). An eine Gruppe von 14 Collies wurden zunächst 100 µg/kg und nach einem Monat 200 µg/kg IVM oral verabreicht. Traten starke Anzeichen einer Vergiftung auf, wurden die Tiere mit 1 mg Physostigmin intravenös alle 12 Stunden und mit Ringer-Infusionslösung versorgt. Sobald die Tiere wieder auf äußere Reize reagierten und selbstständig fressen und trinken konnten, wurde die Behandlung mit Physostigmin beendet. Sieben der 14 Hunde reagierten mit unterschiedlich heftigen Vergiftungserscheinungen nach der Gabe von IVM und wurden wie beschrieben mit Physostigmin behandelt. Alle Tiere reagierten ca. zwei Minuten nach der Gabe mit selbständigem Halten des Kopfes, Zittern der Gliedmaße und gesteigertem Interesse an der Umgebung. Die Wirkung hielt allerdings nur ca. 30 bis 90 Minuten an. Die Ergebnisse dieser Studie müssen als sehr kritisch bewertet werden. Die Gabe von Physostigmin führte bei Hunden mit sehr starken Anzeichen einer Vergiftung zwar zu einer Verbesserung des Allgemeinzustandes, allerdings nur für ein kurzes Zeitintervall. Dagegen zeigte ein Hund mit nur leichten Symptomen eine regelrechte Vergiftung nach Gabe von Physostigmin mit Tremor und ausgeprägter Ataxie und somit eher eine Verschlechterung seines Zustandes. Der Verlauf einer ML-Vergiftung hängt nach heutigem Wissenstand natürlich auch maßgeblich von dem Genstatus des Hundes ab, so dass ein heterozygoter Hund eine Gabe von 0,2 mg/kg auch ohne die Therapie mit Physostigmin überstanden hätte. Schlussendlich sollte Physostigmin nicht als Antidot bzw. als Standardtherapie bei IVM-Vergiftungen eingesetzt werden (Roder & Stair, 1998).

Ein relativ neuer Therapieansatz einer IVM-Vergiftung stellt die intravenöse Gabe von Lipidinfusionen da. Es handelt sich dabei um eine Öl-in-Wasser Emulsion aus Sojaöl, welche in der Humanmedizin zur parenteralen Ernährung genutzt wird, aber auch zur Behandlung von Intoxikationen mit lipophilen Arzneistoffen, wie z.B. Bupivacain, Verapamil, Propanolol oder Clomipramin (Rothschild et al., 2010; Fernandez et al., 2011). Die genaue Wirkweise der Lipidinfusion ist noch nicht bekannt. Im Rahmen einer ML-Intoxikation geht man davon aus, dass es zu einer Verschiebung im Konzentrationsgefälle zwischen ZNS und Blutkompartiment kommt und die lipophilen ML passiv aus dem Gehirn eliminiert werden (Held et al., 2012).

In den letzten Jahren wurde mehrfach über den erfolgreichen Einsatz der Lipidinfusion im Zusammenhang mit ML-Vergiftungen berichtet. Allerdings handelte es sich in fast allen

Fällen um Tiere, bei denen von einem intakten *MDR1*-Transporter an der BHS auszugehen ist. In zwei Berichten wurden Jack Russell Terrier vorgestellt (Crandell & Weinberg, 2009; Epstein & Hollingsworth, 2013), welche nicht zu den betroffenen Rassen mit *MDR1*-Defekt gezählt werden (Gramer et al., 2011). In einem weiteren Fall wurde ein Border Collie behandelt, welcher den *MDR1*(+/+) Status aufwies (Clarke et al., 2011). In einer dritten Studie über sechs Fälle einer IVM-Vergiftung handelt es sich in vier Fällen um Hunderassen, welche nicht vom *MDR1*-Defekt betroffen sind (Labrador Retriever, Staffordshire Bull Terrier, Border Terrier), und nur in zwei Fällen um einen Collie-Mischling und um einen Border Collie, bei denen der Genstatus nicht überprüft wurde (Bates et al., 2013).

Bei Tieren mit intaktem *MDR1*-Protein in der BHS, in der Leber und im Darm kommt es auch ohne Therapie innerhalb der ersten 24 Stunden zu einer deutlichen Verbesserung der Intoxikationssymptome (Linek et al., 2007). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Lipidinfusion durch die Veränderung im Konzentrationsgleichgewicht zwischen ZNS und Plasma zu einer schnelleren Elimination der ML aus dem ZNS führt (Held et al., 2012).

Anders ist die Therapie mit Lipid-Infusionen bei Hunden mit homozygotem *MDR1*-Defekt zu bewerten.

Held und Mitarbeiter berichten von zwei *MDR1*(-/-)-Hunden, welche erfolgreich mit einer Lipidinfusion behandelt wurden und sich vollständig erholten. Ein männlicher Kurzhaar-Collie wurde *subkutan* mit 1 mg/kg Doramectin behandelt und eine Australian Shepard Hündin nahm ca. 0,4 mg/kg Ivermectin einer Entwurmungspaste für Pferde oral auf. Beide Tiere wurden über 3 bis 5 Tage mit einer Lipidinfusion behandelt, zunächst als Bolus (4 ml/kg über 60 min), anschließend als Infusion (1,5 ml/kg/h über 4 h). In zwei vergleichbaren Fällen, über die zuvor berichtet wurde und in denen keine Lipidinfusion erfolgte, hatten zwei *MDR1*-defekte Hunde (Collie und Australian Shepard) die Dosierung von *subkutan* 1 mg/kg Doramectin nicht überlebt (Geyer & Janko, 2012). Es wurde aber auch von drei vergifteten *MDR1*(-/-)-Hunden berichtet, die zum Teil sogar künstlich beatmet werden mussten, und bei denen auf die Lipidinfusion keinerlei Verbesserung eintrat (Wright et al., 2011).

Zusammenfassend ist nach den vorliegenden Befunden die positive Wirkung der Lipidinfusion nicht auszuschließen und sollte auf Grund der geringen Nebenwirkungen immer unterstützend bei ML-Intoxikationen eingesetzt werden (Held et al., 2012).

7. Zusammenfassung

Die Makrozyklischen Laktone (ML), zu unterscheiden in Avermectine (z.B. Ivermectin (IVM), Selamectin und Doramectin) und Milbemycine (z.B. Moxidectin (MOX), Milbemycinoxim (MIL)), stellen in der Veterinärmedizin häufig gebrauchte Antiparasitika dar. Im Parasiten führen sie durch die Öffnung von Glutamat- und GABA-gesteuerten Chloridkanälen zu einer schlaffen Paralyse. Die Anwendung ist beim Säuger dagegen durch die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke (BHS), an der P-Glycoprotein (Pgp) als Efflux-Transporter die ML unter ATP-Verbrauch aus dem ZNS zurück in das Blutkompartiment pumpt, sehr sicher. Allerdings zeigen insbesondere Hunde der Rasse Collie häufig Vergiftungssymptome nach der Gabe von IVM. Ursache dafür ist eine 4 Basenpaar-Deletion im *MDR1*-Gen des Hundes (nt230(del4)), welche zu einer unvollständigen Translation des Proteins führt. In gezielt durchgeführten Studien zeigte sich, dass die neurotoxische Wirkung je nach eingesetzter Substanz sehr differierte. So wurde die Gabe von 1 mg/kg MOX von *MDR1*-defekten Collies gut toleriert, während IVM in der gleichen Dosierung schon Vergiftungsanzeichen hervorrief.

Ziel dieser Arbeit war es, die Gehirnkonzentrationen bei fehlendem Pgp für IVM, MOX und MIL zu ermitteln und deren Neurotoxizität zu messen, um eine Aussage über das unterschiedliche neurotoxische Potenzial der einzelnen ML treffen zu können. Als Tiermodell standen Mäuse der CF-1-Linie, die eine natürliche Mutation im *mdr1a*-Gen aufweisen, sowie *mdr1a,b*-Doppelknockout Mäuse zur Verfügung. Bei fehlendem Pgp penetrieren IVM und MOX nach Applikation von 0,2 mg/kg vergleichbar in das ZNS, MIL dagegen nur zu 20%. Vergleichbare Werte erreichte man für MIL erst nach Applikation der therapeutischen Dosierung von 2,5 mg/kg. Bei den Applikationsstudien an Wildtyp Mäusen mit intakter BHS stellte sich heraus, dass IVM die geringsten, MOX mittlere und MIL die höchsten Gehirnkonzentrationen aufweist. Somit hat IVM die höchste und MIL die geringste Affinität zu Pgp. Die Neurotoxizität wurde mit Hilfe eines neuen Rotarod-Setups gemessen und verglichen. Es zeigte sich, dass eine höhere Dosierung von MOX (0,7 mg/kg) und MIL (40 mg/kg) als von IVM (0,35 mg/kg) benötigt wird, um eine vergleichbare Beeinträchtigung der Laufperformance auf dem Rotarod zu erreichen. Verantwortlich dafür ist vermutlich die unterschiedliche Interaktion der einzelnen ML mit dem GABA_A-Rezeptor. In weiteren Untersuchungen muss geklärt werden, ob dafür eine unterschiedliche Affinität oder die intrinsische Aktivität an dem Rezeptor verantwortlich ist.

8. Summary

In veterinary medicine macrocyclic lactones (ML), to be differentiated in avermectines (eg ivermectin (IVM), selamectin and doramectin) and milbemycines (eg moxidectin (MOX), milbemycin oxime (MIL)), are commonly used anti-parasitic drugs. In parasites they lead to a flaccid paralysis due to the opening of glutamate- and GABA-gated chloride ion channels. In contrast, the ML have a wide margin of safety in mammals at therapeutic dosage. At the blood-brain barrier (BBB) P-glycoprotein (Pgp), an ATP-driven efflux pump, is highly expressed and therefore restricts the ML-entry into the central nervous system (CNS). However, in many dog breeds such as the Collie signs of neurotoxicosis appeared after application of IVM. Responsible for this intolerance is a 4 base pair deletion in the *MDR1* gene of the dog (nt230(del4)), which results in an incomplete translation and the expression of a non-functional Pgp. Studies showed that the neurotoxic effect varied depending on the substance applied. The administration of 1 mg / kg MOX was well tolerated, whereas IVM had caused poisoning signs at the same dose.

The aim of this work was to determine the brain concentrations in the absence of Pgp for IVM, MOX and MIL and to measure their neurotoxicity in order to make a conclusion about the different neurotoxic potential of each ML. Mice of the CF-1 line, which have a natural mutation in the *mdr1a* gene, as well as *mdr1a,b*-double knockout mice were used. In the absence of Pgp, IVM and MOX comparably penetrate into the CNS after administration of 0.2 mg/kg, MIL only to 20%. Comparable penetration values for MIL are reached after application of the therapeutic dose of 2.5 mg/kg. In the wildtype mice with an intact BBB, application studies showed that IVM has the lowest, MOX some more and MIL the highest brain concentrations. Thus, it seems that IVM has the highest and MIL the lowest affinity for Pgp. Neurotoxicity was measured and compared using a newly designed rotarod setup. It was found that higher doses of MOX (0.7 mg/kg) and MIL (40 mg/kg) are required as of IVM (0.35 mg/kg) to reach a similar impairment of the running performance on the rotarod. This seems to be due to the different interaction of each ML with the GABA_A receptor.

Further studies are needed to find out whether a different affinity or the intrinsic activity to the receptor are responsible for this difference.

9. Literaturverzeichnis

Advocate: *Scientific discussion*, EMEA 2009: CVMP/0297/03

Arther, R.G.; Bowman, D.D.; Slone, R.L.; Travis, L.E. Imidacloprid plus moxidectin topical solution for the prevention of heartworm disease (*Dirofiloria immitis*) in dogs. *Parasitol. Res.*, **2005**, *97 Suppl 1*, S76-S80.

Banks, B.J.; Bishop, B.F.; Evans, N.A.; Gibson, S.P.; Goudie, A.C.; Gration, K.A.; Pacey, M.S.; Perry, D.A.; Witty, M.J. Avermectins and flea control: structure-activity relationships and the selection of selamectin for development as an endectocide for companion animals. *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*(8), 2017-2025.

Barbet, J.L.; Snook, T.; Gay, J.M.; Mealey, K.L. ABCB1-1 Delta (*MDR1*-1 Delta) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis. *Vet. Dermatol.*, **2009**, *20*(2), 111-114.

Bates, N.; Chatterton, J.; Robbins, C.; Wells, K.; Hughes, J.; Stone, M.; Campbell, A. Lipid infusion in the management of poisoning: a report of 6 canine cases. *Vet. Rec.*, **2013**, *172*(13), 339.

Beal, M.W.; Poppenga, R.H.; Birdsall, W.J.; Hughes, D. Respiratory failure attributable to moxidectin intoxication in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1999**, *215*(12), 1813-1817.

Bishop, B.F.; Bruce, C.I.; Evans, N.A.; Goudie, A.C.; Gration, K.A.; Gibson, S.P.; Pacey, M.S.; Perry, D.A.; Walshe, N.D.; Witty, M.J. Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Vet. Parasitol.*, **2000**, *91*(3-4), 163-176.

Bissonnette, S.; Paradis, M.; Daneau, I.; Silversides, D.W. The ABCB1-1Delta mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non-collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis. *Vet. Dermatol.*, **2009**, *20*(1), 60-66.

Bloch, O.; Manley, G.T. The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema. *Neurosurg Focus.*, **2007**, *22*(5), E3.

Brayden, D.J.; Griffin, J. Avermectin transepithelial transport in *MDR1*- and MRP-transfected canine kidney monolayers. *Vet. Res. Commun.*, **2008**, *32*(1), 93-106.

Bundgaard, M.; Abbott, N.J. All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4-500 million years ago. *Glia*, **2008**, *56*(7), 699-708.

Campbell, A.; Chapman, M. *Handbook of poisoning in dogs and cats*, 1st ed.; Blackwell Science Ltd.: London, **2000**.

- Campbell, W.C.; Benz, G.W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **1984**, 7(1), 1-16.
- Campbell, W.C.; Fisher, M.H.; Stapley, E.O.; Albers-Schonberg, G.; Jacob, T.A. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, **1983**, 221(4613), 823-828.
- Chaudhary, P.M.; Mechetner, E.B.; Roninson, I.B. Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood*, **1992**, 80(11), 2735-2739.
- Chaudhary, P.M.; Roninson, I.B. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell*, **1991**, 66(1), 85-94.
- Chen, C.J.; Chin, J.E.; Ueda, K.; Clark, D.P.; Pastan, I.; Gottesman, M.M.; Roninson, I.B. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, **1986**, 47(3), 381-389.
- Cisternino, S.; Rousselle, C.; Dagenais, C.; Scherrmann, J.M. Screening of multidrug-resistance sensitive drugs by in situ brain perfusion in P-glycoprotein-deficient mice., *Pharm Res.*, **2001**, 18(2), 183-190.
- Clarke, D.L.; Lee, J.A.; Murphy, L.A.; Reineke, E.L. Use of intravenous lipid emulsion to treat ivermectin toxicosis in a Border Collie., *J Am Vet Med Assoc.*, **2011**, 239(10), 1328-1333.
- Cordon-Cardo, C.; O'Brien, J.P.; Boccia, J.; Casals, D.; Bertino, J.R.; Melamed, M.R. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **1990**, 38(9), 1277-1287.
- Cordon-Cardo, C.; O'Brien, J.P.; Casals, D.; Rittman-Grauer, L.; Biedler, J.L.; Melamed, M.R.; Bertino, J.R. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1989**, 86(2), 695-698.
- Crandell, D.E.; Weinberg, G.L. Moxidectin toxicosis in a puppy successfully treated with intravenous lipids. *J. Vet. Emerg. Crit Care (San. Antonio.)*, **2009**, 19(2), 181-186.
- Croop, J.M.; Raymond, M.; Haber, D.; Devault, A.; Arceci, R.J.; Gros, P.; Housman, D.E. The three mouse multidrug resistance (*mdr*) genes are expressed in a tissue-specific manner in normal mouse tissues. *Mol Cell Biol.*, **1989**, 9(3), 1346-1350.
- Curtis, C.F. Current trends in the treatment of *Sarcoptes*, *Cheyletiella* and *Otodectes* mite infestations in dogs and cats. *Vet. Dermatol.*, **2004**, 15(2), 108-114.
- Davis, J.A.; Paylor, R.; McDonald, M.P.; Libbey, M.; Ligler, A.; Bryant, K.; Crawley, J.N. Behavioral effects of ivermectin in mice. *Lab Anim Sci.*, **1999**, 49(3), 288-96.

- Dawson, G.R.; Wafford, K.A.; Smith, A.; Marshall, G.R.; Bayley, P.J.; Schaeffer, J.M.; Meinke, P.T.; McKernan, R.M. Anticonvulsant and adverse effects of avermectin analogs in mice are mediated through the gamma-aminobutyric acid(A) receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2000**, 295(3), 1051-1060.
- Dean, M.; Annilo, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **2005**, 6, 123-142.
- Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.*, **2001**, 42(7), 1007-1017.
- Doran, A.; Obach, R.S.; Smith, B.J.; Hosea, N.A.; Becker, S.; Callegari, E.; Chen, C.; Chen, X.; Choo, E.; Cianfroga, J.; et al.. The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the *MDR1A/1B* knockout mouse model. *Drug Metab Dispos.*, **2005**, 33(1), 165-174.
- Dupuy, J.; Larrieu, G.; Sutra, J.F.; Eeckhoutte, C.; Alvinerie, M. Influence of verapamil on the efflux and metabolism of ¹⁴C moxidectin in cultured rat hepatocytes. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2001**, 24(3), 171-177.
- Easby, S.M. Ivermectin in the dog. *Vet Rec.*, **1984**, 115(2), 45.
- Egleton, R.D.; Davis, T.P. Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier. *NeuroRx.*, **2005**, 2(1), 44-53.
- Epstein, S.E.; Hollingsworth, S.R. Ivermectin-induced blindness treated with intravenous lipid therapy in a dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).*, **2013**, 23(1), 58-62.
- Farrell, C.L.; Pardridge, W.M. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **1991**, 88(13), 5779-5783.
- Fassler, P.E.; Tranquilli, W.J.; Paul, A.J.; Soll, M.D.; DiPietro, J.A.; Todd, K.S. Evaluation of the safety of ivermectin administered in a beef-based formulation to ivermectin-sensitive Collies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1991**, 199(4), 457-460.
- Fernandez, A.L.; Lee, J.A.; Rahilly, L.; Hovda, L.; Brutlag, A.G.; Engebretsen, K. The use of intravenous lipid emulsion as an antidote in veterinary toxicology. *J Vet Emerg Crit Care*, **2011**, 21(4), 309-320.
- Fisher, M.A.; Shanks, D.J. A review of the off-label use of selamectin (Stronghold/Revolution) in dogs and cats. *Acta Vet. Scand.*, **2008**, 50, 46.
- Fondati, A. Efficacy of daily oral ivermectin in the treatment of 10 cases of generalized demodicosis in adult dogs. *Veterinary Dermatology*, **1996**, 7(2), 99-104.

- Fromm, M. Transport in Membranen und Epithelien. In: *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*; Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg.), 31. Auflage, Springer Medizin, Heidelberg, **2010**, pp. 36-48 and 895-897; Repetitorium pp. 3-4.
- Fromm, M.F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2004**, 25(8), 423-429.
- Fromm, M.F. P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **2000**, 38(2), 69-74.
- Gallagher, A.E.; Grant, D.C.; Noftsinger, M.N. Coma and respiratory failure due to moxidectin intoxication in a dog. *J Vet Emerg Crit Care.*, **2008**, 18(1), 81-85.
- Genchi, C.; Poglayen, G.; Kramer, L.H.; Venco, L.; Agostini, A. Efficacy of moxidectin for the prevention of adult heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Parassitologia*, **2001**, 43(3), 139-141.
- Gerloff, T. Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **2004**, 369(1), 69-77.
- Geyer, J.; Döring, B.; Godoy, J.R.; Moritz, A.; Petzinger, E. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2005a**, 28(1), 95-99.
- Geyer, J.; Döring, B.; Godoy, J. R.; Leidolf, R.; Moritz, A.; Petzinger, E. Frequency of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2005b**, 28(6), 545-551.
- Geyer, J.; Klintzsch, S.; Meerkamp, K.; Wohlke, A.; Distl, O.; Moritz, A.; Petzinger, E. Detection of the nt230(del4) *MDR1* mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2007**, 30(5), 482-485.
- Geyer, J.; Gavrilova, O.; Petzinger, E. Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a,b* P-glycoprotein- and *bcrp*- deficient knockout mice. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2009**, 32(1), 87-96.
- Geyer, J.; Janko, C. Treatment of *MDR1* mutant dogs with macrocyclic lactones. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2012**, 13(6), 969-86.
- Ginn, P.E. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. *Vet. Pathol.*, **1996**, 33 (5), 533-541.
- Gramer, I.; Leidolf, R.; Döring, B.; Klintzsch, S.; Krämer, E.M.; Yalcin, E.; Petzinger, E.; Geyer, J. Breed distribution of the nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs. *Vet. J.*, **2011**, 189(1), 67-71.

- Granacher, R.P.; Baldessarini, R.J. Physostigmine. Its use in acute anticholinergic syndrome with antidepressant and antiparkinson drugs. *Arch Gen Psychiatry.*, **1975**, 32(3), 375-80.
- Griffin, J.; Fletcher, N.; Clemence, R.; Blanchflower, S.; Brayden, D.J. Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2005**, 28(3), 257-265.
- Hadrick, M.K.; Bunch, S.E.; Kornegay, J.N. Ivermectin toxicosis in two Australian shepherds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1995**, 206(8), 1147-1150.
- Heine, J.; Krieger, K.; Dumont, P.; Hellmann, K. Evaluation of the efficacy and safety of imidacloprid 10% plus moxidectin 2.5% *spot-on* in the treatment of generalized demodicosis in dogs: results of a European field study. *Parasitol. Res.*, **2005**, 97 Suppl 1, S89-S96.
- Held, S.; Gramer, I.; Haßdenteufel, E.; Neiger, R.; Geyer, J. Therapie einer Avermectin-Intoxikation bei zwei Hunden mit homozygotem nt230(del4)-MDR1-Gendefekt durch Lipidinfusion. *Kleintierpraxis*, **2012**, 57(6), 313-319.
- Hellinger, E.; Veszelka, S.; Tóth, A.E.; Walter, F.; Kittel, A.; Bakk, M.L.; Tihanyi, K.; Háda, V.; Nakagawa, S.; Duy, T.D.; Niwa, M.; Deli, M.A.; Vastag, M. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm.*, **2012**, 82(2), 340-51.
- Hendrikse, N.H.; Schinkel, A.H.; de Vries, E.G.; Fluks, E.; Van der Graaf, W.T.; Willemsen, A.T.; Vaalburg, W.; Franssen, E.J. Complete *in vivo* reversal of P-glycoprotein pump function in the blood-brain barrier visualized with positron emission tomography. *Br. J. Pharmacol.*, **1998**, 124(7), 1413-1418.
- Henik, R.A.; Kellum, H.B.; Bentjen, S.A.; Mealey, K.L. Digoxin and mexiletine sensitivity in a Collie with the MDR1 mutation. *J. Vet. Intern. Med.*, **2006**, 20(2), 415-417.
- Hibbs, R.E.; Gouaux, E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, **2011**, 474(7349), 54-60.
- Hollins, J.D.; Marlow, B.P.; Hatherell, P.J. Ingestion of equine moxidectin by dogs. *Vet. Rec.*, **2000**, 147(8), 227-228.
- Holm, B.R. Efficacy of milbemycin oxime in the treatment of canine generalized demodicosis: a retrospective study of 99 dogs (1995-2000). *Vet. Dermatol.*, **2003**, 14(4), 189-195.
- Hopkins, K.D.; Marcella, K.L.; Strecker, A.E. Ivermectin toxicosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1990**, 197(1), 93-94.
- Hopper, K.; Aldrich, J.; Haskins, S.C. Ivermectin toxicity in 17 collies. *J. Vet. Intern. Med.*, **2002**, 16(1), 89-94.

- Houston, D.M.; Parent, J.; Matushek, K.J. Ivermectin toxicosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1987**, *191*(1), 78-80.
- Huang, J.; Casida, J.E. Avermectin B1a binds to high- and low-affinity sites with dual effects on the gamma-aminobutyric acid-gated chloride channel of cultured cerebellar granule neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, *281*(1), 261-266.
- Hugnet, C.; Cadore, J.L.; Buronfosse, F.; Pineau, X.; Mathet, T.; Berny, P.J. Loperamide poisoning in the dog. *Vet. Hum. Toxicol.*, **1996**, *38*(1), 31-33.
- Janko, C.; Geyer, J. Moxidectin has a lower neurotoxic potential but comparable brain penetration in P-glycoprotein-deficient CF-1 mice compared to ivermectin. *J Vet Pharmacol Ther.*, **2013**, *36*(3), 275-84.
- Jonker, J.W.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Gottschlich, R.; Bender, H.M.; Dasenbrock, J.; Schinkel, A.H. Role of blood-brain barrier P-glycoprotein in limiting brain accumulation and sedative side-effects of asimadoline, a peripherally acting analgaesic drug. *Br. J. Pharmacol.*, **1999**, *127*(1), 43-50.
- Juliano, R.L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *455*(1), 152-162.
- Jun, K.; Lee, S.B.; Shin, H.S. Insertion of a retroviral solo long terminal repeat in *mdr-3* locus disrupts mRNA splicing in mice. *Mamm. Genome*, **2000**, *11*(10), 843-848.
- Kane, N.S.; Hirschberg, B.; Qian, S.; Hunt, D.; Thomas, B.; Brochu, R.; Ludmerer, S.W.; Zheng, Y.; Smith, M.; Arena, J.P.; Cohen, C.J.; Schmatz, D.; Warmke, J.; Cully, D.F. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**, *97*(25), 13949-13954.
- Kawabata, A.; Momoi, Y.; Inoue-Murayama, M.; Iwasaki, T. Canine *mdr1* gene mutation in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **2005**, *67*(11), 1103-1107.
- Kemper, E.M.; Cleypool, C.; Boogerd, W.; Beijnen, J.H.; van Tellingen, O. The influence of the P-glycoprotein inhibitor zosuquidar trihydrochloride (LY335979) on the brain penetration of paclitaxel in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2004**, *53*(2), 173-178.
- Kemper, E.M.; Verheij, M.; Boogerd, W.; Beijnen, J.H.; van Tellingen, O. Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. *Eur. J. Cancer*, **2004**, *40*(8), 1269-1274.
- Kiki-Mvouaka, S.; Ménez, C.; Borin, C.; Lyazrhi, F.; Foucaud-Vignault, M.; Dupuy, J.; Collet, X.; Alvinerie, M.; Lespine, A. Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin and moxidectin in mice. *Drug Metab Dispos.*, **2010**, *38*(4), 573-580.

- Kim, R.B.; Fromm, M.F.; Wandel, C.; Leake, B.; Wood, A.J.; Roden, D.M.; Wilkinson, G.R. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J. Clin. Invest.*, **1998**, *101*(2), 289-294.
- Klitzsch, S.; Meerkamp, K.; Döring, B.; Geyer, J. Detection of the nt230[del4] *MDR1* mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *Vet. J.*, **2009**, *185*(3), 272-277.
- Krieger, K.; Heine, J.; Dumont, P.; Hellmann, K. Efficacy and safety of imidacloprid 10% plus moxidectin 2.5% *spot-on* in the treatment of sarcoptic mange and otocariasis in dogs: results of a European field study. *Parasitol. Res.*, **2005**, *97* Suppl 1, S81-S88.
- Kusuhara, H.; Sugiyama, Y. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 2). *Drug Discov. Today*, **2001**, *6*(4), 206-212.
- Kusuhara, H.; Suzuki, H.; Terasaki, T.; Kakee, A.; Lemaire, M.; Sugiyama, Y. P-Glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, *283*(2), 574-580.
- Kwei, G.Y.; Alvaro, R.F.; Chen, Q.; Jenkins, H.J.; Hop, C.E.; Keohane, C.A.; Ly, V.T.; Strauss, J.R.; Wang, R.W.; Wang, Z.; Pippert, T.R.; Umbenhauer, D.R. Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in *mdr1a* P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos.*, **1999**, *27*(5), 581-587.
- Lankas, G.R.; Cartwright, M.E.; Umbenhauer, D. P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1997**, *143*(2), 357-365.
- Lankas, G.R.; Gordon, L.R. In: *Ivermectin and Abamectin*; Campbell, Ed.; Springer-Verlag V: New York, **1989**, pp. 89-112.
- Lehnert, M. Multidrug resistance in human cancer. *J. Neurooncol.*, **1994**, *22*(3), 239-43.
- Lespine, A.; Martin, S.; Dupuy, J.; Roulet, A.; Pineau, T.; Orlowski, S.; Alvinerie, M. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure-affinity relationship. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2007**, *30*(1), 84-94.
- Lespine, A.; Roulet, A.; Dupuy, J.; Pineau, T.; Alvinerie, M. Role of the P-glycoprotein in the cellular efflux of macrocyclic lactones: influence of interfering agents. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **2003**, *26*(Suppl. 1), 161-162.
- Linek, J.; Spiess, C.; Dallmeyer, J.; Geyer, J. Ivermectin-Intoxikation bei drei Hunden mit und ohne *MDR1*-Gen-Defekt durch ein für Pferde zugelassenes orales Antiparasitikum. *Tierärztl. Prax.*, **2007**, *35*(K), 272-276.
- Lovell, R. A. Ivermectin and piperazine toxicoses in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.*, **1990**, *20*(2), 453-468.

- Martinez, M.; Modric, S.; Sharkey, M.; Troutman, L.; Walker, L.; Mealey, K. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2008**, 31(4), 285-300.
- Marzolini, C.; Paus, E.; Buclin, T.; Kim, R.B. Polymorphisms in human *MDR1* (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2004**, 75(1), 13-33.
- McCall, J.W. The safety-net story about macrocyclic lactone heartworm preventives: a review, an update, and recommendations. *Vet. Parasitol.*, **2005**, 133(2-3), 197-206.
- McCall, J.W.; Genchi, C.; Kramer, L.; Guerrero, J.; Dzimianski, M.T.; Supakorndej, P.; Mansour, A.M.; McCall, S.D.; Supakorndej, N.; Grandi, G.; Carson, B. Heartworm and Wolbachia: therapeutic implications. *Vet. Parasitol.*, **2008**, 158(3), 204-214.
- McCall, J.W.; McTier, T.L.; Ryan, W.G.; Gross, S.J.; Soll, M.D. Evaluation of ivermectin and milbemycin oxime efficacy against *Dirofilaria immitis* infections of three and four months' duration in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **1996**, 57(8), 1189-1192.
- Mealey, K.L. Adverse drug reactions in herding-breed dogs: the role of P-glycoprotein. *Compendium of continuing education for the practicing Veterinarian*, **2006**, 28, 23-33
- Mealey, K.L. Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: heartworm prevention and pharmacogenetics. *Vet. Parasitol.*, **2008**, 158(3), 215-222.
- Mealey, K.L. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2004**, 27(5), 257-264.
- Mealey, K.L.; Bentjen, S.A.; Gay, J.M.; Cantor, G.H. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*, **2001**, 11(8), 727-733.
- Mealey, K.L.; Bentjen, S.A.; Waiting, D.K. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of collies from the northwestern United States. *Am. J. Vet. Res.*, **2002**, 63(4), 479-481.
- Mealey, K.L.; Fidel, J.; Gay, J.M.; Impellizeri, J.A.; Clifford, C.A.; Bergman, P.J. ABCB1-1Delta polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine. *J. Vet. Intern. Med.*, **2008**, 22(4), 996-1000.
- Mealey, K.L.; Meurs, K.M. Breed distribution of the ABCB1-1Delta (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **2008**, 233(6), 921-924.
- Mealey, K.L.; Munyard, K.A.; Bentjen, S.A. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Vet. Parasitol.*, **2005**, 131(3-4), 193-196.

- Medleau, L.; Ristic, Z.; McElveen, D.R. Daily ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dogs. *Veterinary Dermatology*, **1996**, 7(4), 209-212.
- Ménez, C.; Sutra, J.F.; Prichard, R.; Lespine, A. Relative neurotoxicity of ivermectin and moxidectin in *Mdr1ab* (-/-) mice and effects on mammalian GABA(A) channel activity. *PLoS Negl Trop Dis.*, **2012**; 6(11), e1883. Epub 2012 Nov 1.
- Merola, V.; Khan, S.; Gwaltney-Brant, S. Ivermectin toxicosis in dogs: a retrospective study. *J. Am. Anim Hosp. Assoc.*, **2009**, 45(3), 106-111.
- Michael, B.; Meinke, P.T.; Shoop, W. Comparison of ivermectin, doramectin, selamectin, and eleven intermediates in a nematode larval development assay. *J. Parasitol.*, **2001**, 87(3), 692-696.
- Müller, R.S. Treatment protocols for demodicosis: an evidence-based review. *Vet. Dermatol.*, **2004**, 15(2), 75-89.
- Müller, R.S.; Bettenay, S.V. A proposed new therapeutic protocol for the treatment of canine mange with ivermectin. *J. Am. Anim Hosp. Assoc.*, **1999**, 35(1), 77-80.
- Neff, M.W.; Robertson, K.R.; Wong, A.K.; Safra, N.; Broman, K.W.; Slatkin, M.; Mealey, K.L.; Pedersen, N.C. Breed distribution and history of canine *mdr1*-1{Delta}, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, 101(32), 11725-11730.
- Nelson, O.L.; Carsten, E.; Bentjen, S.A.; Mealey, K.L. Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the *MDR1* mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies. *J. Vet. Intern. Med.*, **2003**, 17(3), 354-356.
- Novotny, M.J.; Krautmann, M.J.; Ehrhart, J.C.; Godin, C.S.; Evans, E.I.; McCall, J.W.; Sun, F.; Rowan, T.G.; Jernigan, A.D. Safety of selamectin in dogs. *Vet. Parasitol.*, **2000**, 91(3-4), 377-391.
- Ohtsuki, S. New aspects of the blood-brain barrier transporters; its physiological roles in the central nervous system. *Biol Pharm Bull.*, **2004**, 27(10), 1489-1496.
- Ohtsuki, S.; Terasaki, T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.*, **2007**, 24(9), 1745-1758.
- Pallier, P.N.; Drew, C.J.; Morton, A.J. The detection and measurement of locomotor deficits in a transgenic mouse model of Huntington's disease are task- and protocol-dependent: influence of non-motor factors on locomotor function. *Brain Res Bull.*, **2009**, 78(6), 347-55.
- Panwalla, C.M.; Jones, J.C.; Viney, J.L. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol.*, **1998**, 161, 5733-5744.

- Paradis, M. Ivermectin in small animal dermatology. Part I. Pharmacology and toxicology. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, **1998**, *20*, 193-200.
- Pardridge, W.M. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol.*, **2005**, *30*(1), 57-70.
- Pastan, I.; Gottesman, M.M. Multidrug resistance. *Annu. Rev. Med.*, **1991**, *42*, 277-286.
- Paul, A.J.; Tranquilli, W.J.; Seward, R.L.; Todd, K.S. Jr.; DiPietro, J.A. Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am. J. Vet. Res.*, **1987**, *48*(4), 684-685.
- Paul, A.J.; Tranquilli, W.J.; Hutchens, D.E. Safety of moxidectin in ivermectin-sensitive collies. *Am. J. Vet. Res.*, **2000**, *61*(5), 482-483.
- Paul, A.J.; Hutchens, D.E.; Firkins, L.D.; Keehan, C.M. Effects of dermal application of 10.0% imidacloprid-0.08% ivermectin in ivermectin-sensitive Collies. *Am. J. Vet. Res.*, **2004a**, *65*(3), 277-278.
- Paul, A.J.; Hutchens, D.E.; Firkins, L.D.; Borgstrom, M. Dermal safety study with imidacloprid/moxidectin topical solution in the ivermectin-sensitive collie. *Vet. Parasitol.*, **2004b**, *121*(3-4), 285-291.
- Pippert, T.R.; Umbenhauer, D.R. The subpopulation of CF-1 mice deficient in P-glycoprotein contains a murine retroviral insertion in the *mdr1a* gene. *J Biochem Mol Toxicol.*, **2001**, *15*(2), 83-9.
- Plumb, C.D. *Veterinary Drug Handbook*, 5th ed.; Blackwell Publishing Professional: Iowa, **2005**.
- Price, K.L.; Millen, K.S.; Lummis, S.C. Transducing agonist binding to channel gating involves different interactions in 5-HT₃ and GABAC receptors. *J Biol Chem.*, **2007**, *282*, 25623-25630.
- Pulliam, J.D.; Preston, J.M. In: *Ivermectin and Abamectin*; Campbell, Ed.; Springer-Verlag V: New York, **1989**, pp. 149-161.
- Pulliam, J.D.; Seward, R.L.; Henry, R.T.; Steinberg, S.A. Investigating ivermectin toxicity in collies. *Veterinary Medicine*, **1985**, *80*, 33-40.
- Raviv, Y.; Pollard, H.B.; Bruggemann, E.P.; Pastan, I.; Gottesman, M.M. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*(7), 3975-3980.
- Reinemeyer, C.R.; Courtney, C.H. Antinematodal drugs. In: *Veterinary pharmacology and therapeutics*: Adams H.R., 8th Ed.: Iowa State University Press, Ames, **2001**, 947-979.
- Risau, W.; Engelhardt, B.; Wekerle, H. Immune function of the blood-brain barrier: incomplete presentation of protein (auto-)antigens by rat brain microvascular endothelium *in vitro*. *J Cell Biol.*, **1990**, *110*(5), 1757-1766.

- Ristic, Z.; Medleau, L.; Paradis, M.; White-Weithers, N.E. Ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1995**, *207*(10), 1308-1310.
- Roder, J.D.; Stair, E.L. An overview of ivermectin toxicosis. *Vet. Hum. Toxicol.*, **1998**, *40*(6), 369-370.
- Rothschild, L.; Bern, S.; Oswald, S.; Weinberg, G. Intravenous lipid emulsion in clinical toxicology. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.*, **2010**, *18*, 51-59.
- Roulet, A.; Puel, O.; Gesta, S.; Lepage, J.F.; Drag, M.; Soll, M.; Alvinerie, M.; Pineau, T. *MDR1*-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, *460*(2-3), 85-91.
- Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Varadi, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev.*, **2006**, *86*(4), 1179-1236.
- Sartor, L.L.; Bentjen, S.A.; Trepanier, L.; Mealey, K.L. Loperamide toxicity in a collie with the *MDR1* mutation associated with ivermectin sensitivity. *J. Vet. Intern. Med.*, **2004**, *18*(1), 117-118.
- Sasaki, Y.; Kitagawa, H.; Kajita, Y.; Okachi, H.; Ishihara, K. Clinical application of milbemycin D as a prophylactic agent against *Dirofilaria immitis* infection in dogs: sensitivity for the drug in rough-coated collies. *Nihon Juigaku Zasshi*, **1986**, *48*(6), 1253-1256.
- Sasaki, Y.; Kitagawa, H.; Ishihara, K.; Mori, M. Clinical application of milbemycin D as a prophylactic agent against *Dirofilaria immitis* infection in dogs: pathological findings following administration. *Nihon Juigaku Zasshi*, **1988a**, *50*(5), 977-984.
- Sasaki, Y.; Kitagawa, H.; Ishihara, K.; Ishizako, K. Milbemycin D concentrations in tissues after oral administration in collies, shelties and Japanese mongrel dogs. *Nihon Juigaku Zasshi*, **1988b**, *50*(6), 1177-1183.
- Sasaki, Y.; Kitagawa, H.; Murase, S.; Ishihara, K. Susceptibility of rough-coated collies to milbemycin oxime. *Nihon Juigaku Zasshi*, **1990**, *52*(6), 1269-1271.
- Schinkel, A.H.; Smit, J.J.; van Tellingen, O.; Beijnen, J.H.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.A.; van der Valk, M.A.; Robanus-Maandag, E.C.; te Riele, H.P. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, **1994**, *77*(4), 491-502.
- Schinkel, A.H.; Mol, C.A.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Smit, J.J.; Borst, P. Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *Eur. J. Cancer*, **1995a**, *31A*(7-8), 1295-1298.
- Schinkel, A.H.; Wagenaar, E.; van Deemter, L.; Mol, C.A.; Borst, P. Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J. Clin. Invest.*, **1995b**, *96*(4), 1698-1705.

- Schinkel, A.H.; Wagenaar, E.; Mol, C.A.; van Deemter, L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.*, **1996**, 97(11), 2517-2524.
- Schinkel, A.H.; Mayer, U.; Wagenaar, E.; Mol, C.A.; van Deemter, L.; Smit, J.J.; van der Valk, M.A.; Voordouw, A.C.; Spits, H.; van Tellingen, O.; Zijlmans, J.M.; Fibbe, W.E.; Borst, P. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1997a**, 94(8), 4028-4033.
- Schinkel, A.H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.*, **1997b**, 8(3), 161-170.
- Schneider, E.; Hunke, S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.*, **1998**, 22(1), 1-20.
- See, A.M.; McGill, S.E.; Raisis, A.L.; Swindells, K.L. Toxicity in three dogs from accidental oral administration of a topical endectocide containing moxidectin and imidacloprid. *Aust. Vet. J.*, **2009**, 87(8), 334-337.
- Seward, R.L. Reactions in dogs given ivermectin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1983**, 183(5), 493.
- Sharom, F.J.; Lugo, M.R.; Eckford, P.D. New insights into the drug binding, transport and lipid flippase activities of the p-glycoprotein multidrug transporter. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **2005**, 37(6), 481-487.
- Sherman, J.G.; Paul, A.J.; Firkins, L.D. Evaluation of the safety of spinosad and milbemycin 5-oxime orally administered to Collies with the *MDR1* gene mutation. *Am J Vet Res*, **2010**, 71(1), 115-119.
- Shoop, W.L.; Mrozik, H.; Fisher, M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet. Parasitol.*, **1995**, 59(2), 139-156.
- Sigel, E.; Baur, R. Effect of avermectin B1a on chick neuronal gamma-aminobutyrate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.*, **1987**, 32(6), 749-752.
- Sine, S.; Engel, A. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*, **2006**, 440(7083), 448-455.
- Sivine, F.; Plume, C.; Ansay, M. Picrotoxin, the antidote to ivermectin in dogs? *Vet. Rec.*, **1985**, 116(7), 195-196.
- Smith, G.B.; Olsen, R.W. Functional domains of GABA_A receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **1995**, 16, 162-168.
- Smith, R.A.; Stronski, E.J.; Beck, B.E.; Wolper, G.G. Alberta. Death of a Rough Collie exposed to an ivermectin-based paste. *Can. Vet. J.*, **1990**, 31(3), 221.

- Snowden, N.J.; Helyar, C.V.; Platt, S.R.; Penderis, J. Clinical presentation and management of moxidectin toxicity in two dogs. *J. Small Anim Pract.*, **2006**, 47(10), 620-624.
- Sugawara, I.; Kataoka, I.; Morishita, Y.; Hamada, H.; Tsuruo, T.; Itoyama, S.; Mori, S. Tissue distribution of P-glycoprotein encoded by a multidrug-resistant gene as revealed by a monoclonal antibody, MRK 16. *Cancer Res.*, **1988**, 48(7), 1926-9.
- Tamai, I.; Tsuji, A. Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.*, **2000**, 89(11), 1371-1388.
- Tamai, I.; Yamashita, J.; Kido, Y.; Ohnari, A.; Sai, Y.; Shima, Y.; Naruhashi, K.; Koizumi, S.; Tsuji, A. Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain caused by multiple efflux transporters at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2000**, 295(1), 146-152.
- Tappin, S.W.; Goodfellow, M.R.; Peters, I.R.; Day, M.J.; Hall, E.J.; Bentjen, S.A.; Mealey, K.L. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in dogs in the United Kingdom. *BSAVA Congress, Scientific Proceedings*, **2008**, 83/49.
- Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Willingham, M.C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1987**, 84(21), 7735-7738.
- Thiebaut, F.; Tsuruo, T.; Hamada, H.; Gottesman, M.M.; Pastan, I.; Willingham, M.C. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J. Histochem. Cytochem.*, **1989**, 37(2), 159-164.
- Tranquilli, W.J.; Paul, A.J.; Seward, R.L.; Todd, K.S.; DiPietro, J.A. Response to physostigmine administration in collie dogs exhibiting ivermectin toxicosis. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **1987**, 10(1), 96-100.
- Tranquilli, W.J.; Paul, A.J.; Seward, R.L. Ivermectin plasma concentrations in collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis. *Am. J. Vet. Res.*, **1989**, 50(5), 769-770.
- Tranquilli, W.J.; Paul, A.J.; Todd, K.S. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *Am. J. Vet. Res.*, **1991**, 52(7), 1170-1172.
- Turner, M.J.; Schaeffer, J.M. In: *Ivermectin and Abamectin*; Campbell, Ed.; Springer-Verlag V: New York, **1989**, pp. 73-88.
- Ueda, K.; Clark, D.P.; Chen, C.J.; Roninson, I.B.; Gottesman, M.M.; Pastan, I. The human multidrug resistance (*mdr1*) gene. cDNA cloning and transcription initiation. *J. Biol. Chem.*, **1987**, 262(2), 505-508.

- Ueda, K.; Okamura, N.; Hirai, M.; Tanigawara, Y.; Saeki, T.; Kioka, N.; Komano, T.; Hori, R. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem.*, **1992**, 267(34), 24248-24252.
- Uhr, M.; Holsboer, F.; Muller, M.B. Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both *mdr1a* and *mdr1b* P-glycoproteins. *J. Neuroendocrinol.*, **2002**, 14(9), 753-759.
- Umbenhauer, D.R.; Lankas, G.R.; Pippert, T.R.; Wise, L.D.; Cartwright, M.E.; Hall, S.J.; Beare, C.M. Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1997**, 146(1), 88-94.
- Van der Sandt, I.C.; Smolders, R.; Nabulsi, L.; Zuideveld, K.P.; de Boer, A.G.; Breimer, D.D. Active efflux of the 5-HT(1A) receptor agonist flesinoxan via P-glycoprotein at the blood-brain barrier. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2001**, 14(1), 81-86.
- Vanapalli, S.R.; Hung, Y.P.; Fleckenstein, L.; Dzimianski, M.T.; McCall, J.W. Pharmacokinetics and dose proportionality of oral moxidectin in beagle dogs. *Biopharm. Drug Dispos.*, **2002**, 23(7), 263-272.
- Vaughn, D.M.; Simpson, S.T.; Blagburn, B.L.; Whitmer, W.L.; Heddens-Mysinger, R.; Hendrix, C.M. Determination of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and pressure in the cerebrospinal fluid of collie dogs following administration of ivermectin. *Vet. Res. Commun.*, **1989**, 13(1), 47-55.
- Wagner, R.; Wendlberger, U. Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes* spp., *Demodex* spp. and *Psoroptes* spp. mites. *Vet. Parasitol.*, **2000**, 93(2), 149-158.
- Wolf, S; Seehaus, B; Minol, K; Gassen, H.G. Die Blut-Hirn-Schranke: Eine Besonderheit des cerebralen Mikrozykulationssystems. *Naturwissenschaften*, **1996**, 83(7), 302-311.
- Wolstenholme, A.J.; Rogers, A.T. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, **2005**, 131 Suppl, S85-S95.
- Wright, H.M.; Chen, A.V.; Talcott, P.A.; Poppenga, R.H.; Mealey, K.L. Intravenous fat emulsion as treatment for ivermectin toxicosis in three dogs homozygous for the ABCB1-1Δ gene mutation. *J Vet Emerg Crit Care*, **2011**, 21(6), 666-672.
- Yas-Natan, E.; Shamir, M.; Kleinbart, S.; Aroch, I. Doramectin toxicity in a collie. *Vet. Rec.*, **2003**, 153(23), 718-720.
- Yokogawa, K.; Takahashi, M.; Tamai, I.; Konishi, H.; Nomura, M.; Moritani, S.; Miyamoto, K.; Tsuji, A. P-glycoprotein-dependent disposition kinetics of tacrolimus: studies in *mdr1a* knockout mice. *Pharm. Res.*, **1999**, 16(8), 1213-1218.

Zhang, Z.J.; Saito, T.; Kimura, Y.; Sugimoto, C.; Ohtsubo, T.; Saito, H. Disruption of *mdr1a* p-glycoprotein gene results in dysfunction of blood-inner ear barrier in mice. *Brain Res.*, **2000**, *852*(1), 116-126.

10. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. Joachim Geyer für die Bereitstellung meines Dissertationsthemas. Er hat es von Anfang an geschafft, mich für diese Arbeit zu begeistern. Dank zahlreicher Ideen, Diskussionen, Anregungen und Hilfestellungen habe ich nie den Mut verloren. Vielen Dank für das Vertrauen in mich und meine Arbeit, insbesondere bei der Etablierung der Rotarod-Methode!

Vielen Dank an Herrn Prof. Petzinger für die Aufnahme am Institut. Sie haben meine Arbeit stets mit großem Interesse begleitet, kritisch hinterfragt und mich mit ihrem fachlichen Wissen stets unterstützt.

Ich danke Herrn Dr. Zahner und dem ganzen Team vom Zentralen Tierlabor für die gute Pflege und Versorgung meiner Mäuse und für die Bereitstellung der Räumlichkeiten. Einen herzlichen Dank an Frau Manuela Binz, die meine Mäuse in der SPF-Haltung versorgt hat und immer ein Auge auf meine Verpaarungen geworfen hat.

Ich danke Herrn Christoph Zimmermann, der mir in mühevoller Arbeit "mein" Rotarod gebaut hat. Ohne dieses Unikat wäre meine Doktorarbeit nie zustande gekommen. Außerdem stand er für Fragen rund um Technik und Informatik stets zur Verfügung.

Ich danke den Firmen Bayer Animal Health und Novartis für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die Bereitstellung des [^3H]Moxidectins und [^3H]Milbemycinoxims.

Ich möchte mich bei allen Kollegen des Instituts für die gute Zusammenarbeit bedanken!

Ein ganz großes Dankeschön geht dabei an Jasmin Kranz. Liebe Jasmin, ich danke Dir, dass Du mir immer mit Rat und Tat in allen Lebenslagen zur Seite standest und immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hattest. Für Deinen weiteren Weg wünsche ich Dir alles Liebe und Gute.

Ein weiterer Dank auch an Stephanie Schmidt. Liebe Stephie, vielen Dank für Deine gute Laune, für Deine stetige Hilfe und Deinen schwäbischen Dialekt, der mich immer wieder zum Lachen gebracht hat. Ich wünsche Dir alles Gute auf Deinem weiteren Lebensweg.

Ich danke Barbara Döring für ihre enorme Hilfsbereitschaft und dass sie sich stets mit allen meinen Problemen rund um die Doktorarbeit auseinandergesetzt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kollegen für die kollegiale Zusammenarbeit, für die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung und für die lustigen Mittagspausen, Kongressfahrten, Weihnachtsfeiern und Betriebsausflüge bedanken!

Ein großer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben, die nie an mir, meinen Ideen oder Plänen gezweifelt haben und immer hinter mir standen und mir den Rücken freigehalten haben!

Zuletzt danke ich Matthias für seine Liebe, seinen Glauben an mich, seine Geduld und seine Unterstützung während dieser nicht immer ganz leichten Zeit. Ein Leben ohne Dich ist für mich nicht mehr vorstellbar und ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft!

11. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

„Messung des neurotoxischen Potentials und der Organverteilung Makrozyklischer Laktone in *mdr1*-defizienten Mäusen“

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

Christina Elisabeth Ohl



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6305-4



9 783835 196305 4