

Zur Bedeutung der Pharmakogenetik in  
der Veterinärmedizin am Beispiel des  
MDR1-Gendefektes beim Hund

---

**Joachim Geyer**



**Habilitationsschrift** zur Erlangung der **venia legendi**  
für das Fach Pharmakologie und Toxikologie  
im 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 dem Autor dieses Werkes.**

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

1. Auflage 2014

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

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFBENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Justus-Liebig-Universität Gießen**  
**Fachbereich Veterinärmedizin**  
**Institut für Pharmakologie und Toxikologie**

**Zur Bedeutung der Pharmakogenetik in der  
Veterinärmedizin am Beispiel des MDR1-Gendefektes  
beim Hund**

**Habilitationsschrift**

zur Erlangung der *venia legendi*

für das Fach **Pharmakologie und Toxikologie**

im Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Prof. Dr. oec. troph. Joachim Geyer

aus Bayreuth

Gießen 2012

Für meine Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis und Glossar .....</b>	<b>II</b>
1.1 Abkürzungsverzeichnis .....	II
1.2 Glossar .....	III
<b>2. Auflistung der Publikationen als Bestandteil der Habilitationsschrift .....</b>	<b>V</b>
<b>3. Einleitung I: Bedeutung der Pharmakogenetik in der Veterinärmedizin.....</b>	<b>1</b>
3.1 Pharmakogenetik und Pharmakogenomik in der Humanmedizin .....	1
3.2 Bedeutung der Pharmakogenetik bei der Katze .....	9
3.3 Bedeutung der Pharmakogenetik beim Hund.....	13
3.4 Literaturverzeichnis zu Einleitung I .....	21
<b>4. Einleitung II: Der MDR1-Transporter .....</b>	<b>29</b>
4.1 Die Familie der ATP-binding cassette Transporter (ABC).....	29
4.2 MDR1 und <i>Multidrug Resistance</i> .....	31
4.3 Der Ivermectin-sensitive Collie und der Defekt im MDR1-Gen des Hundes.....	33
4.4 Sicherheit der Arzneitherapie bei Hunden mit MDR1-Gendefekt .....	35
4.4.1 Makrozyklische Laktone .....	36
4.4.2 Zytostatika .....	37
4.4.3 Opioide .....	38
4.4.4 Emodepsid.....	39
<b>5. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>41</b>
5.1 Arzneistofftransporter und Pharmakokinetik .....	41
5.2 Nachweis der nt230(del4) MDR1-Mutation und Rasseprädisposition .....	41
5.3 Pharmakokinetik und neurotoxisches Potenzial von Makrozyklischen Laktonen .....	49
5.4 Klinische Relevanz des MDR1-Gendefektes .....	59
<b>6. Nachbemerkenungen und Ausblicke .....</b>	<b>67</b>
6.1 Weitere Polymorphismen im MDR1-Gen des Hundes .....	68
6.2 Polymorphismen im MDR1-Gen der Katze und Ivermectin-Sensitivität.....	68
6.3 Ivermectin-Sensitivität und MDR1-Expression bei Vögeln und Reptilien .....	70
6.4 Ontogenese der MDR1-Expression beim Fohlen .....	71
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>9. Danksagung .....</b>	<b>87</b>
<b>10. Anhang - Publikationen.....</b>	<b>89</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis und Glossar

### 1.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transconductance Regulator</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CYP	Cytochrom P450 Enzym
Da	Molekulargewicht in Dalton
ISC	Ivermectin-sensitiver Collie
IVM	Ivermectin
MDR1	<i>Multi Drug Resistance</i>
MIL	Milbemycinoxim
ML	Makrozyklische Laktone
MOX	Moxidectin
MRP	<i>Multidrug Resistance-Related Protein</i>
MX	Methylxanthin
NAT	N-Acetyltransferase
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NHGRI	<i>National Human Genome Research Institute</i>
OATP	<i>Organic Anion Transporting Polypeptide</i>
OCT	<i>Organic Cation Transporter</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPF	Spezifiziert Pathogen-Frei
TPMT	Thiopurinmethyltransferase
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
VKORC1	Vitamin K Epoxid Reduktase Komplex
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1.2 Glossar

Allele	Varianten eines Gens
Alloenzyme	Enzyme, welche durch unterschiedliche Allele eines Gens kodiert werden
<i>Extensive Metabolizer (EM)</i>	Patient, welcher einen Arzneistoff vergleichsweise schnell metabolisiert
<i>Frameshift</i>	Verschiebung des proteincodierenden Leserahmens
Genotyp	Gesamtheit aller Erbanlagen eines Organismus
Genotypisierung	Bestimmung der Polymorphismus-Allele eines Individuums an einem bestimmten Locus
Haplotyp	Kombination verschiedener Allele auf einem Chromosom (oder Gen)
Heterozygot	Mischerbig
Homozygot	Reinerbig
<i>Mikroarray</i>	Molekularbiologisches Analysesystem, bei welchem meist mehrere 1000 Einzelsequenzen parallel in ihrer Expression untersucht werden können
Mutation	Veränderung im Erbgut, welche eine Funktionsbeeinträchtigung oder einen Funktionsverlust des codierten Proteins zur Folge hat
Phänotyp	Gesamtheit äußerer Merkmale eines Organismus, welche auf Grundlage der Erbanlagen unter dem Einfluss der Umwelt entstehen
Pleiotrop	Eigenschaft eines Gens verschiedene phänotypische Merkmale auszuprägen
Polymorphismus	Genetische Variation an einem Locus mit mindestens zwei allelen Formen und einer Häufigkeit von mehr als 1% in der untersuchten Population
<i>Poor Metabolizer (PM)</i>	Patient, welcher einen Arzneistoff vergleichsweise langsam metabolisiert
Seltene genetische Variation	Variation an einem genetischen Locus mit einer Häufigkeit von weniger als 1% in der untersuchten Population

## Abkürzungsverzeichnis und Glossar

<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	Ein Polymorphismus, bei welchem eine einzige Nukleotidbase ausgetauscht ist
Spleißen	Prozessieren der proteincodierenden mRNA unter Entfernung der Intronsequenzen
Wildtyp	Normalform eines Gens

## 2. Auflistung der Publikationen als Bestandteil der Habilitationsschrift

Die Arbeiten sind nach Themenbereichen und nicht nach Chronologie aufgeführt.

### Bedeutung von Arzneistofftransportern für die Pharmakokinetik

- 1) PETZINGER E & GEYER J (2006) Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 372(6):465-475.

### Der nt230(del4) MDR1-Gendefekt: Rasseverteilung und Nachweismethoden

- 2) GEYER J, DÖRING B, GODOY JR, MORITZ A & PETZINGER E (2005) Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28(1):95-99.
- 3) GEYER J, DÖRING B, GODOY JR, LEIDOLF R, MORITZ A & PETZINGER E (2005) Frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28(6):545-551.
- 4) GEYER J, KLINTZSCH S, MEERKAMP K, WÖHLKE A, DISTL O, MORITZ A & PETZINGER E (2007) Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(5):482-485.
- 5) KLINTZSCH S, MEERKAMP K, DÖRING B & GEYER J (2009) Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *The Veterinary Journal*, 185(3):272-277.
- 6) GRAMER I, LEIDOLF R, DÖRING B, KLINTZSCH S, KRÄMER EM, YALCIN E, PETZINGER E & GEYER J (2011) Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *The Veterinary Journal*, 189(1):67-71.

### **Pharmakokinetik und Gehirnpenetration von Makrozyklischen Laktonen im Mausmodell**

- 7) GEYER J, GAVRILOVA O & PETZINGER E (2009) Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a,b* P-glycoprotein and *bcrp* deficient knockout mice. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32(1):87-96.
- 8) JANKO C & GEYER J (2012) Moxidectin has a lower neurotoxic potential but comparable brain penetration in P-glycoprotein-deficient CF-1 mice compared to ivermectin. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36:275-284.

### **MDR1-Defekt: Therapeutische Sicherheit von Makrozyklischen Laktonen und Zytostatika**

- 9) LINEK J, SPIESS B, DALLMEYER C & GEYER J (2007) Ivermectin intoxication in three dogs with and without MDR1 gene mutation caused by vermicide paste licensed for use in horse. *Tierärztliche Praxis*, 35(4):272-278.
- 10) HELD S, GAMER I, HASSDENTEUFEL E, NEIGER R & GEYER J (2012) Therapie einer Avermectin-Intoxikation bei zwei Hunden mit homozygotem nt230(del4) MDR1-Gendefekt durch Lipidinfusion. *Kleintierpraxis*, 57(6):313-319.
- 11) GEYER J & JANKO C (2012) Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13:969-986.
- 12) GRAMER I, KESSLER M & GEYER J (2013) Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma. *Veterinary and Comparative Oncology*, in press, doi: 10.1111/vco.12051.

## Publikationen

Zu Beginn der Forschungsarbeiten über den MDR1-Gendefekt beim Hund war ich als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Pharmakologie und Toxikologie tätig. In dieser Zeit war ich für die konzeptionelle Planung der hier beschriebenen Projekte und deren Umsetzung im Labor verantwortlich. Die Kontakte zu anderen Wissenschaftlern (Prof. Dr. O. Distl, Hannover, Publikation #4; Dr. E. Yalcin, Publikation #6), zu Kollegen am Fachbereich (Prof. Dr. A. Moritz, Prof. Dr. R. Neiger, Publikationen ##2-4,10), zu weiteren klinisch tätigen Tierärztinnen und Tierärzten (Dr. J. Linek, Prof. Dr. B. Spiess, Dr. C. Dallmeyer, Dr. M. Kessler, Publikationen ##9,12) sowie zu Fachleuten auf dem Gebiet der Hundezucht (E.M. Krämer, Publikation #6) kamen durch meine Initiative zustande.

Die experimentellen Arbeiten zu den Publikationen ##2-8 entstanden in den Laboren des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie. Die Publikationen ##9-10 dokumentieren klinische Fälle und kommen aus verschiedenen Tierarztpraxen (Publikation #9) sowie der Kleintierklinik am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Publikation #10). Für Publikation #12 entstand der klinische Teil in der Tierklinik Hofheim, der experimentelle Teil am Institut für Pharmakologie und Toxikologie.

Die Publikationen #6 und #12 sind Teil der durch mich betreuten Dissertation von Frau Tierärztin Dr. I. Gramer (Titel: Polymorphismen in den MDR1-, MRP1- und cKIT-Genen des Hundes und ihre Bedeutung für eine individualisierte und zielgerichtete Krebstherapie, 2013, ISBN 978-3-8359-6052-7). Publikation #8 bildet den Kernteil der von mir betreuten Dissertation von Frau Tierärztin C. Janko (Dissertationsschrift in Vorbereitung). Publikation #7 ist Teil der Dissertation von Frau Tierärztin Dr. O. Gavrilova (Titel: Nutzung transgener Tiermodelle mit Transporterdefekten zur Analyse der hepatobiliären Elimination und Organverteilung von Arzneistoffen und Toxinen, 2008, ISBN 3-8359-5313-3, betreut durch Prof. Dr. E. Petzinger).



### **3. Einleitung I: Bedeutung der Pharmakogenetik in der Veterinärmedizin**

#### **3.1 Pharmakogenetik und Pharmakogenomik in der Humanmedizin**

Für die Arzneitherapie sind sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin in vielen Bereichen Therapieschemata mit zumeist absoluten Standarddosierungen, zum Teil auch Dosierungen bezogen auf kg Körpergewicht, etabliert. Während in der Regel die Mehrzahl der Patienten von dieser Therapie profitiert, gibt es mitunter auch einzelne Patienten, bei denen die Arzneistoffwirkung ausbleibt; wieder andere Patienten können vermehrt unter dem Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAWs) leiden, welche von leicht bis schwerwiegend reichen können (Wijnen et al. 2007). Während schon seit Beginn der Arzneitherapie die Existenz einer gewissen interindividuellen Variabilität in der Arzneistoffantwort bekannt ist, stellt sich die Ursachenforschung vielfach als schwierig heraus (Sweeney 2005). Deswegen wird diesem Problem sowohl in der klinischen Forschung als auch in der Grundlagenforschung zunehmend Beachtung geschenkt. Darüber hinaus stellt diese Variabilität in der Arzneistoffantwort heute bereits ein wichtiges Kriterium in der Arzneistoffentwicklung und -zulassung dar (Ferraldeschi und Newman 2011, Ma und Lu 2011).

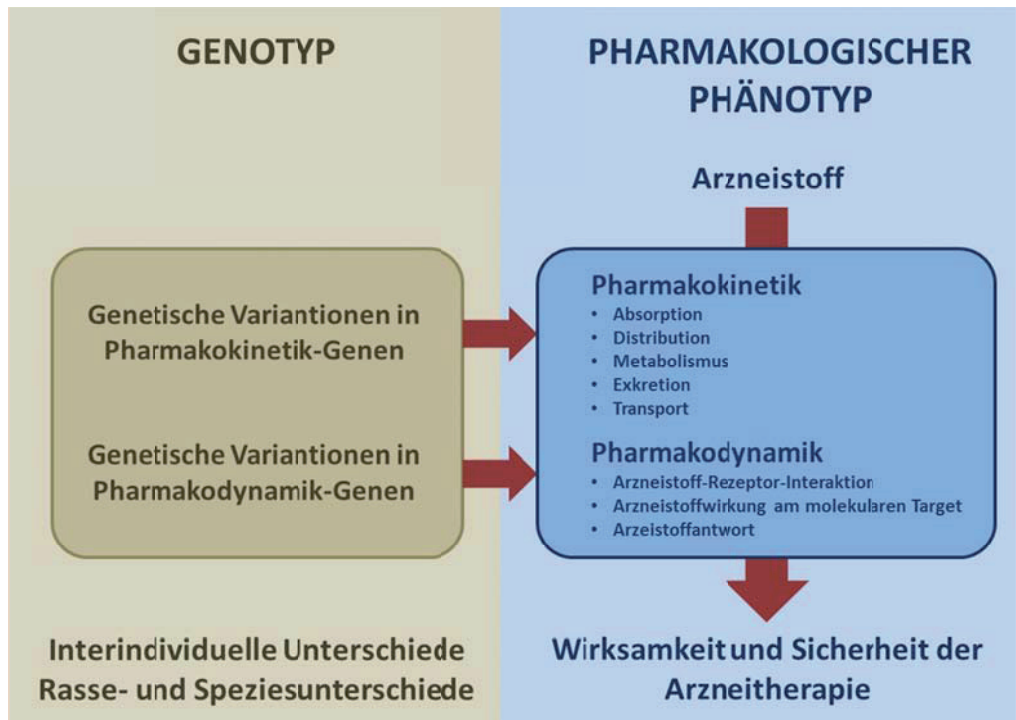
Faktoren, welche diese interindividuelle Variabilität determinieren, sind vielfältig und mitunter komplex. Hierzu zählen extrinsische Faktoren wie Ernährung, Alkohol- und Zigarettenkonsum, pflanzliche Supplemente oder Arzneistoffinteraktionen nach Polypharmazie, aber auch intrinsische Faktoren wie Alter, Geschlecht, ethnische Herkunft und der Gesundheitszustand (Wijnen et al. 2007). Häufig liegen diesem Phänomen aber auch bestimmte genetische Faktoren zugrunde, welche sich von Patient zu Patient erheblich unterscheiden können. Sind dabei therapeutische Targets betroffen, kann sich die Pharmakodynamik eines Arzneistoffes verändern. Meist handelt es sich aber um genetische Variationen im Arzneistoffmetabolismus oder Arzneistofftransport, welche die Pharmakokinetik von Arzneistoffen beeinflussen (siehe Abbildung 1) (Ma und Lu 2011). Genetische Variationen können sich in Form von Einzelnukleotidaustauschen (single nucleotide polymorphisms, SNPs), Insertionen, Deletionen oder Multiplikationen von Einzelbasen, Sequenzabschnitten oder ganzen Genen und schließlich durch alternatives Spleißen proteincodierender Transkripte äußern. SNPs stellen unter den genannten Möglichkeiten die häufigste Form genetischer Variationen dar. So enthalten mehr als 90%

aller humanen Gene mindestens einen SNP. Insgesamt sind im Humangenom bisher mehr als 14 Millionen SNPs bekannt, von denen mehr als 60.000 in proteincodierenden Regionen lokalisiert sind. In einzelnen Fällen können SNPs mit dramatischen Veränderungen in der Wirksamkeit und Sicherheit von Arzneistoffen einhergehen. Meist reicht ein einzelner SNP jedoch nicht aus, um die genetische Variation in der Arzneistoffantwort zwischen Patienten zu erklären (Ma und Lu 2011).

Sehr häufig betrifft diese interindividuelle Variation genetische Polymorphismen im Metabolismus von Arzneistoffen. Dieser wird durch enzymatisch katalysierte Biotransformationsreaktionen getragen, welche im menschlichen und tierischen Organismus in zwei Phasen, Phase I und Phase II, eingeteilt werden können. Phase I Reaktionen dienen dabei als Funktionalisierungsreaktionen für meist lipophile Arzneistoffe und führen funktionelle Gruppen (wie z.B. Hydroxylgruppen) in das unpolare Zielmolekül ein oder legen in diesem funktionelle Gruppen durch oxidative Spaltung frei. Der Phase I Metabolismus der Leber wird zu einem großen Teil durch die Cytochrom P450 Enzyme (CYPs) vermittelt. Phase II Reaktionen werden schließlich unter dem Begriff Kopplungsreaktionen subsummiert, bei welchen funktionelle Gruppen mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen gekoppelt werden. Wichtige Phase II Reaktionen sind die Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung und die Konjugation mit Glutathion (Martignoni et al. 2006, Fink-Gremmels 2008). In der Pharmakogenetik kommt im Bereich des Arzneistoffmetabolismus vor allem den CYPs eine große Bedeutung zu. Die Nomenklatur der CYPs sieht eine Einteilung basierend auf der Sequenzhomologie der einzelnen Isoenzyme vor. Dabei weisen Familien (wie z.B. CYP1, CYP2 oder CYP3) mehr als 40% Sequenzidentität auf Proteinebene und Subfamilien (wie z.B. CYP1A, CYP2C oder CYP2B) eine Sequenzidentität von 40-80% auf. Die angefügte arabische Nummer spezifiziert dann ein einzelnes Mitglied jeder Subfamilie (z.B. CYP2B11), wobei ein bestimmtes CYP speziesunabhängig in der Regel nur ein einziges Mal vorkommt (Martignoni et al. 2006). Dies erleichtert zwar die Nomenklatur, gestaltet den Vergleich strukturell und funktionell homologer CYPs zwischen verschiedenen Spezies aber als sehr schwierig (z.B. entspricht CYP2D6 des Menschen dem CYP2D15 beim Hund).

Aus der großen Gruppe der CYPs sind beim Menschen die Mitglieder aus den Subfamilien CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP2D und CYP3A für den Großteil aller Metabolisierungsreaktionen für Arzneistoffe verantwortlich. Sie werden vorwiegend in der Leber exprimiert (Zanger et al.

2008). Während CYP1A2, CYP2C8 und CYP3A4 beim Menschen keine funktionell bedeutenden Polymorphismen aufweisen, sind Metabolisierungswege über CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 signifikant durch genetische Polymorphismen beeinflusst (Martignoni et al. 2006).



**Abbildung 1:** Die Pharmakogenetik betrachtet, inwieweit die Wirksamkeit und die Sicherheit der Arzneitherapie durch genetische Variationen in relevanten Genen der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik beeinflusst werden. Genetische Varianten, welche den Genotyp eines Individuums ausmachen, existieren sowohl in Genen, welche für die Pharmakokinetik von Arzneistoffen von Bedeutung sind (z.B. Enzyme des Arzneistoffmetabolismus oder Arzneistofftransporter), als auch in Genen, welche für Arzneistofftargets codieren und damit für die Pharmakodynamik von Bedeutung sind. Bestimmte Genotypen können mit Hilfe molekulargenetischer Methoden bestimmt werden, während für Untersuchungen zur funktionellen Relevanz z.B. zellbasierte Assays erforderlich sind. Eine molekulargenetische Diagnostik bestimmter Genotypen ist nur sinnvoll, wenn die genetische Variation tatsächlich auch einen Einfluss auf die Funktion des codierten Proteins hat. Die Wirksamkeit und Sicherheit der Arzneitherapie hängt schließlich von der Summe aller Faktoren ab, welche sich auf Ebene der Pharmakokinetik und auf Ebene der Pharmakodynamik abspielen.

Erste klinische Beobachtungen, welche einen Zusammenhang zwischen vererbten genetischen Faktoren und der Wirksamkeit und Sicherheit der Arzneitherapie hergestellt haben, gehen bereits auf die späten 1950er Jahre zurück (Sweeney 2005). Hierbei wurde durch den Heidelberger Humangenetiker Friedrich Vogel erstmals der Begriff der Pharmakogenetik verwendet (Vogel 1959). Die Pharmakogenetik untersucht in diesem Sinne, inwieweit Variationen in Genen, welche die pharmakokinetischen und

pharmakodynamischen Prozesse eines Arzneistoffes kontrollieren, für die interindividuellen Unterschiede in der Arzneistoffwirkung oder dem vermehrten Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen verantwortlich sind (Schwab et al. 2002, Ferraldeschi und Newman 2011). Von dem Begriff Pharmakogenetik leitet sich schließlich der Terminus Pharmakogenomik ab, welcher die genomweite Assoziation aller relevanten Gene für eine bestimmte Variabilität in der Arzneistoffantwort beschreibt. Demnach unterscheiden sich Pharmakogenetik und Pharmakogenomik insbesondere in ihrem Fokus der Betrachtung und hinsichtlich der angewandten molekulargenetischen Methoden (Evans und Relling 2004). In der neueren Literatur verschwimmen beide Begrifflichkeiten jedoch zunehmend und werden nicht mehr scharf voneinander abgegrenzt. Ergänzend sei an dieser Stelle noch erwähnt, dass unter dem Begriff der Pharmakogenomik häufig auch Wirkungen von Arzneistoffen beschrieben werden, welche die Genomik beeinflussen und zum Beispiel zu einer Veränderung im Genexpressionsmuster führen. Darüber hinaus wird der Begriff Pharmakogenomik auch verwendet, um die Assoziation zwischen bestimmten somatischen oder erworbenen genetischen Veränderungen, insbesondere in Tumorgewebe und der Arzneistoffantwort zu beschreiben (Roses 2008, Chan und Ginsburg 2011, Ferraldeschi und Newman 2011, Ma und Lu 2011).

Durch den rapiden technologischen Fortschritt der letzten Jahre, insbesondere im Bereich der großformatigen DNA-Sequenzierung und der genomweiten Genotypisierung polymorpher Marker, hat die pharmakogenetische und pharmakogenomische Forschung erhebliche Fortschritte erzielt. In der Humanmedizin sind mittlerweile zahlreiche Genvarianten, vor allem im Bereich arzneistoffmetabolisierender Enzyme, bekannt, welche zu einem dramatischen Funktionsabfall oder einem kompletten Funktionsverlust einzelner Enzyme führen (Laing et al. 2011). Als Beispiele seien hier die Varianten CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, CYP2D6\*5 und CYP2D6\*6 sowie CYP2C19\*2 und CYP2C19\*3 genannt, welche durch Frameshift-Mutationen, Spleißdefekte oder Gendeletionen ihre Funktion im Arzneistoffmetabolismus komplett verloren haben (Wedlund 2000, Zanger et al. 2008, Pinto und Dolan 2011). Dies hat einen erheblichen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen, welche normalerweise durch diese Enzymsysteme metabolisiert werden, wie zum Beispiel Imipramin, Omeprazol oder Warfarin (Laing et al. 2011, Swen et al. 2011) (siehe Abbildung 2). Als Folge dieser Entwicklung wurden die Produktinformationen mehrerer

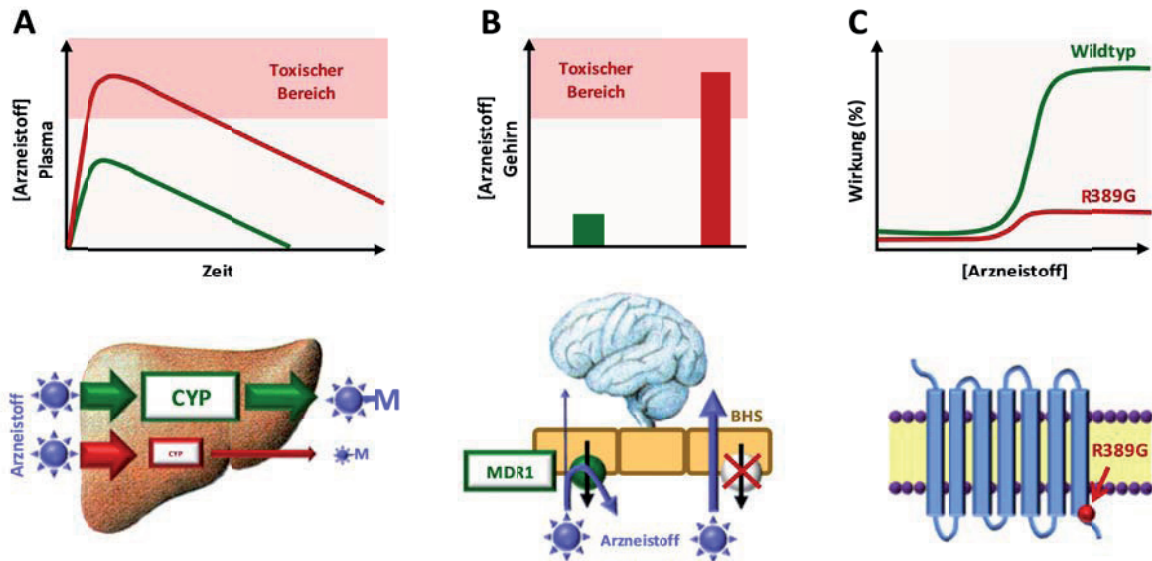
bereits zugelassener Arzneistoffe um Daten zu den relevanten pharmakogenetischen Markern ergänzt. Zudem wird diesem Problem im Bereich der Arzneimittelzulassung vermehrt Beachtung geschenkt. Trotz des teils erheblichen Effektes einzelner Polymorphismen, existieren bisher nur in wenigen Ausnahmefällen konkrete Empfehlungen für eine genotypbasierte Anwendung und Dosierung von Arzneistoffen. Dies bedeutet die Vorschaltung einer molekulargenetischen Untersuchung vor die eigentliche Arzneitherapie, was die klinische Umsetzung schwierig und teuer gestaltet (Altman et al. 2011, Pinto und Dolan 2011, Swen et al. 2011).

Als konkrete Beispiele aus der Humanmedizin seien hier die Bestimmung der Dosierung von Warfarin (s.u.) anhand der beiden genetischen Marker CYP2C9 und VKORC1 (Vitamin K Epoxid Reduktase Komplex 1) sowie die Genotypisierung des UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A1-Gens vor der Therapie mit Irinotecan erwähnt (Ferraldeschi und Newman 2011). In den meisten Fällen ist die Arzneistoffwirksamkeit und Arzneistoffsicherheit jedoch das Resultat aus vielen verschiedenen genetischen Faktoren, welche unter Umständen mit weiteren nicht-genetischen Faktoren kombiniert betrachtet werden müssen. Deren Diagnostik würde einen multifaktoriellen Ansatz erfordern, welcher klinisch nur schwer umzusetzen ist.

Der Arzneistoff Warfarin, welcher in die Gruppe der Cumarin-basierten oralen Antikoagulantien gehört, wird in der Humanmedizin weltweit für die Behandlung und Prävention thromboembolischer Erkrankungen eingesetzt. Diese Therapie ist durch eine sehr enge therapeutische Breite gekennzeichnet und zeigt eine erhebliche interindividuelle Variabilität in der Dosis-Wirkungs-Beziehung. So liegt die effektive tägliche Dosis bei Humanpatienten zwischen 0,5-30 mg. Bei unangepasster Dosierung kann es daher zu anhaltenden Thrombose-Komplikationen auf der einen Seite und erhöhter Blutungsneigung auf der anderen Seite kommen, was in beiden Fällen gleichermaßen gravierend ist. Dies macht ein wirksames und sicheres Dosierungsmanagement für die Warfarin-Therapie äußerst schwierig und erfordert eine therapiebegleitende regelmäßige Überprüfung der Blutkoagulation. Es wurde gezeigt, dass etwa die Hälfte dieser interindividuellen Variabilität auf bekannte genetische Variationen in zwei Genen zurückzuführen ist: CYP2C9, welches am Warfarin-Metabolismus beteiligt ist und dem Vitamin K Epoxid Reduktase Komplex VKORC1, welcher den pharmakologischen Angriffspunkt für Warfarin darstellt. So benötigen Patienten

mit dem VKORC1 1173T/T Allel nur ungefähr die halbe tägliche Dosis im Vergleich zu Patienten mit dem VKORC1 1173C/C Allel. Auf der anderen Seite haben Patienten mit den polymorphen Formen CYP2C9\*2 und CYP2C9\*3 eine reduzierte Metabolisierungsaktivität, verbunden mit höheren Warfarin-Plasmakonzentrationen (Ma und Lu 2011). Das *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) hat basierend auf diesen klinischen Daten eine genotypbasierte Dosierung für Warfarin erarbeitet (Johnson et al. 2011). Über [www.warfarindosing.org](http://www.warfarindosing.org) steht mittlerweile sogar ein online nutzbarer Algorithmus zur Dosisbestimmung zur Verfügung, welcher neben den genetischen Faktoren für CYP2C9 und VKORC1 auch weitere Faktoren wie z.B. Rauchen, Vorerkrankungen und Co-Medikation erfasst. Die dafür notwendige pharmakogenetische Genotypisierung kann z.B. über das kommerzielle *eQ-PCR<sup>TM</sup> Warfarin Genotyping Kit* (TrimGen Genetic Technology) erfolgen. In Zukunft müssen nun größere, randomisierte Multicenter-Studien, welche in den USA (*Clarification of Optimal Anticoagulant through Genetics* (COAG) trial) und Europa (*The European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy Trial* (EU-PACT)) bereits gestartet sind, belegen, ob diese genotypbasierte Dosierung tatsächlich einen Fortschritt für die Wirksamkeit und Sicherheit der Warfarin-Therapie mit sich bringt (Ferraldeschi und Newman 2011).

Neben dem eben erwähnten *Warfarin Genotyping Kit* existieren mittlerweile eine Reihe weiterer Mikroarrays unterschiedlicher Technologie, welche für die Genotypisierung von bekannten Polymorphismen in Metabolismus- und Transportgenen beim Menschen genutzt werden können, z.B. das *Affymetrix DMET<sup>TM</sup> (Drug Metabolizing Enzymes and Transporters) Plus Premier Pack*, welches 1936 polymorphe Marker in 225 Genen in einem Ansatz austesten kann (Burmester et al. 2010, [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) oder der *AmpliChip<sup>TM</sup> CYP450* (Heller et al. 2006, [www.specialtylabs.com](http://www.specialtylabs.com)), welcher die bekannten Polymorphismen in CYP2D6 und CYP2C19 erfasst.



**Abbildung 2:** Beispiele für pharmakogenetische Mechanismen, welche für die interindividuelle Variabilität in der Wirksamkeit und Sicherheit der Arzneitherapie verantwortlich sein können. **(A)** Arzneistoffmetabolisierende Enzyme können darüber bestimmen, wie schnell Arzneistoffe aus dem Körper eliminiert werden. Für viele dieser Enzyme sind genetische Polymorphismen beschrieben, welche zu einem vollständigen Funktionsverlust oder einer stark herabgesetzten Enzymfunktion führen. Erhalten Patienten mit solchen Metabolismusdefekten eine Standarddosis, kann es zu einer langsameren Ausscheidung über die Leber und einem Ansteigen der Plasmakonzentration kommen. Dadurch können unter Umständen vermehrt unerwünschte oder sogar toxische Arzneimittelwirkungen auftreten (Mosher und Court 2010). **(B)** Absorption, Elimination und Organverteilung sind für viele Arzneistoffe von der Interaktion mit Arzneistofftransportern abhängig. Ein Beispiel hierfür bildet MDR1 P-Glycoprotein, welches hoch in der Blut-Hirn-Schranke (BHS) exprimiert wird und hier durch einen ATP-getriebenen Efflux den Übertritt lipophiler Arzneistoffe in das Gehirn limitieren kann. Trotz gleicher Plasmakonzentration kann dabei die absolute Arzneistoffkonzentration im Gehirn erheblich ansteigen und sogar neurotoxische Effekte auslösen (Mealey 2006, Geyer und Janko 2012). **(C)** Auch die Interaktion von Arzneistoffen mit ihren Zielmolekülen kann unterschiedlich ablaufen. Zum Beispiel können Aminosäureaustausche wie R389G im  $\beta$ -Rezeptor dazu führen, dass ein Arzneistoff bei gegebener Konzentration den mutierten Rezeptor weniger gut aktivieren kann als den Wildtyp-Rezeptor (Liggett 2000). Aber auch Veränderungen in physiologischen Regulationsproteinen, welche nicht direkt durch Arzneistoffe angesprochen werden, können eine unterschiedliche Arzneistoffantwort auslösen (nicht dargestellt). So führen bestimmte Polymorphismen in dem Rhyadinrezeptor dazu, dass die Gabe bestimmter Arzneistoffe wie z.B. Succinylcholin, Halothan oder Neostigmin das Auftreten einer Malignen Hyperthermie provozieren kann (Aleman et al. 2009, Nieto und Aleman 2009). Nicht dargestellt sind weitere pharmakogenetisch relevante Veränderungen in anderen Molekülen wie z.B. Plasmaproteinen. Doch auch in diesem Fall kann es durch Unterschiede in der Proteinbindung von Arzneistoffen im Blut zu Veränderungen in der Pharmakokinetik von Arzneistoffen kommen (Ito et al. 2009).

Neben den erwähnten Polymorphismen im Arzneistoffmetabolismus existieren auch zahlreiche genetische Variationen in Genen, welche für Arzneistofftransporter codieren. Da Arzneistofftransporter ganz grundsätzlich an den Prozessen der Absorption, Distribution und Elimination beteiligt sind (Petzinger und Geyer 2006), können funktionell relevante Polymorphismen in Transportergenen zu Veränderungen in der Pharmakokinetik und Organverteilung betreffender Arzneistoffe führen. Beim Menschen wird verschiedenen Polymorphismen in den Genen für den *multidrug resistance carrier* MDR1 (ABCB1), das

*breast cancer resistance protein* (BCRP, ABCG2), das *organic anion transporting polypeptide* OATP1B1 (SLCO1B1) sowie die *organic cation transporter* OCT1 (SLC22A1) und OCT2 (SLC22A2) eine klinische Relevanz zugesprochen (Kerb 2006, Ma und Lu 2011). Während der Effluxtransporter MDR1 in Einleitung II dieser Arbeit ausführlicher besprochen wird, sind die anderen genannten Transporter in der Übersichtsarbeit "*Drug Transporters in Pharmacokinetics*" von Petzinger und Geyer (2006) näher beschrieben (**Publikation #1** im Anhang).

Trotz der großen Zunahme pharmakogenetischer Informationen für den Menschen, ist die Datenlage für die meisten Tierspezies noch sehr begrenzt und dies, obwohl die Sequenzinformationen gerade für Hund, Katze, Rind, Pferd, Schaf, Schwein und Huhn in den letzten Jahren stark zugenommen haben. Für bestimmte Tierarten wie Hund, Pferd, Schaf und Schwein stehen bereits genomweite *SNP Chips* (Illumina, Affymetrix) zur Verfügung (Mosher und Court 2010). Dabei ist der Grad der interindividuellen Variabilität in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneistoffen für Tierspezies genauso hoch zu bewerten wie für den Menschen (Martignoni et al. 2006, Fleischer et al. 2008). Darüber hinaus hat die Pharmakogenetik in der Veterinärmedizin, im Vergleich zur Humanmedizin, ein noch viel größeres Aufgabenfeld zu betrachten. So stehen im Bereich der Kleintiere mindestens zwei (Hund und Katze) sowie im Bereich der Nutztiere mindestens fünf (Pferd, Rind, Schwein, Schaf, Huhn) verschiedene Tierspezies in besonderem Maße im Fokus, welche alle durch eine große Vielfalt verschiedener genetisch separierter Rassen repräsentiert sind. Weiterhin müssen Unterschiede in der Anatomie (z.B. einhöhliger oder mehrhöhliger Magen), Physiologie (z.B. Verdauungsphysiologie der Wiederkäuer, Karnivoren und Herbivoren) und im Verhalten, aber auch Unterschiede im Arzneistoffmetabolismus (z.B. gute versus schlechte Galleausscheider) beachtet werden (Toutain et al. 2010). Entsprechend muss sich eine veterinärmedizinische Pharmakogenetik neben interindividuellen Unterschieden auch noch spezies- und rassespezifischen Unterschieden in der Wirksamkeit und Verträglichkeit der Arzneitherapie annehmen. Vor diesem Hintergrund steckt die veterinärmedizinische Pharmakogenetik heutzutage noch in den Kinderschuhen (Mosher und Court 2010). Nichtsdestotrotz sind in den letzten 10-15 Jahren für die Spezies Katze und Hund bereits einige wichtige Erkenntnisse im Bereich der Pharmakogenetik gewonnen worden, welche in den folgenden beiden Kapiteln dargestellt werden. Im

Hauptteil dieser Arbeit wird schwerpunktmäßig auf den MDR1-Gendefekt beim Hund eingegangen, wobei es sich hier in mehrfacher Hinsicht um ein besonderes Beispiel der veterinärmedizinischen Pharmakogenetik handelt: (I) Eine vergleichsweise kleine Deletion von nur vier Nukleotidbasen führt zu einem vorzeitigen Stopcodon und einem kompletten Funktionsverlust des MDR1-Transportproteins; (II) diese Mutation ist extrem auffällig z.B. bei Collies und (III) die klinische Ausprägung ist dramatisch. So erleiden homozygot MDR1-defekte Hunde lebensbedrohliche Intoxikationen nach Aufnahme oder Applikation von Ivermectin oder verwandten Arzneistoffen, bereits bei üblicher therapeutischer Dosierung. Aus diesen genannten Gründen wird mittlerweile in vielen Ländern eine molekulargenetische Diagnostik für diesen Gendefekt angeboten, welche nicht nur von Hundebesitzern und Züchtern, sondern in großem Maße auch von praktizierenden Tierärzten genutzt wird, um eine sichere Arzneitherapie zu gewährleisten (siehe [www.transmit.de/mdr1-defekt](http://www.transmit.de/mdr1-defekt)).

### **3.2 Bedeutung der Pharmakogenetik bei der Katze**

Katzen und ihre wild lebenden Vorfahren bevölkern unseren Planeten nach dokumentierten fossilen Funden seit etwa 35 Millionen Jahren. Die Hauskatze stammt von einem Vorläufer mittlerer Größe ab, welcher vor etwa 10 Millionen Jahren gelebt haben muss, wobei die Domestikation der Katze auf etwa -10.000 Jahre datiert wird (O'Brien et al. 2008). Heute existieren 37 verschiedene Spezies der Familie *Felidae* mit einer weltweit charakteristischen geografischen Verteilung.

Im Jahre 2005 wurde die Hauskatze (*Felis silvestris catus*) neben 25 weiteren Spezies durch das *National Human Genome Research Institute* (NHGRI, [www.genome.gov](http://www.genome.gov)) für eine komplette Sequenzierung ihres Genoms ausgewählt. Hierfür wurde eine weibliche Abessinierkatze namens Cinnamon herangezogen, deren Genomsequenz 2007 veröffentlicht wurde (Pontius et al. 2007). Bei einer ersten Analyse wurden dabei 20.285 putative Gene identifiziert, was auch im Bereich anderer Tierspezies liegt (Pontius und O'Brien 2007). Diese Genomsequenz der Katze wird nicht nur dazu beitragen, genetisch bedingte Erkrankungen der Katze weiter aufzuklären, sondern kann auch als Grundlage für eine systematische sequenzbasierte pharmakogenetische Forschung für die Spezies Katze herangezogen werden.

Genetische Mutationen, welche zu erblich bedingten Erkrankungen führen können, wurden bei der Katze aber bereits weit vor der Genomsequenzierung entdeckt und beschrieben (Yogalingam et al. 1996, O'Brien et al. 2002). Mittlerweile sind mehr als 50 Mutationen in mehr als 35 Genen im Genom der Katze bekannt, welche mit Erkrankungen oder dem äußeren Erscheinungsbild assoziiert sind. Für viele dieser Genvarianten sind bereits molekulargenetische Tests kommerziell verfügbar, welche von Veterinärmedizinern, Züchtern und Besitzern genutzt werden (für eine Übersicht siehe Lyons 2010).

Einige wenige Mutationen und Polymorphismen bei der Katze fallen auch in den Bereich der Pharmakogenetik. So etwa 31 SNPs im Enzym Thiopurinmethyltransferase (TPMT), welche mit der interindividuellen Variabilität in der therapeutischen Wirksamkeit und Verträglichkeit von Thiopurin-Arzneistoffen, wie z.B. dem Immunsuppressivum und Zytostatikum Azathioprin bei der Katze in Verbindung gebracht werden (Salavaggione et al. 2004). Ein weiteres Beispiel ist eine Besonderheit der Katze in der Expression des Gens für die N-Acetyltransferase (NAT), welche am Phase II Metabolismus von zahlreichen Arzneistoffen, wie z.B. Sulfonamiden, Isoniazid oder Hydralazin beteiligt ist. Während viele Spezies wie Mensch, Kaninchen, Maus, Hamster oder Ratte (ausgenommen dem Hund, siehe unten) zwei NAT Isoenzyme (NAT1 und NAT2) exprimieren, scheint die Katze, genauso wie andere *Felidae*, nur ein NAT-Enzym zu bilden, welches eher dem humanen NAT1 als NAT2 entspricht (Trepanier et al. 1998). Zudem ist CYP2E1 zu nennen, welches am Metabolismus von z.B. Paracetamol, Ethanol, Halothan, Isofluran, Sevofluran u.a. beteiligt ist. Während bei Spezies wie Mensch, Ratte, Maus, Affe, Schwein und Hund nur ein CYP2E1-Gen existiert, wurden für die Katze drei verschiedene CYP2E-Enzyme (CYP2E-a, CYP2E-b und CYP2E-c) beschrieben, welche sich in einigen Aminosäuren unterscheiden und vermutlich von unterschiedlichen CYP2E-Genen exprimiert werden. Diese Isoformen zeigen nicht nur ein unterschiedliches Expressionsmuster, sondern unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer enzymkinetischen Eigenschaften (Tanaka et al. 2005).

Die wohl bedeutendste und am besten erforschte pharmakogenetische Besonderheit der Katze betrifft die defiziente Glucuronidierung phenolischer Verbindungen, welche sich u.a. in einer erhöhten Empfindlichkeit der Katze gegenüber Arzneistoffen wie Paracetamol oder Acetylsalizylsäure äußert (Davis und Westfall 1972, Savides et al. 1984, Aronson und Drobatz 1996). Bereits in Studien aus den 80er Jahren wurde gezeigt, dass die Katze, im Gegensatz zu

anderen Spezies wie Mensch, Ratte, Maus, Schwein, Kaninchen, Hund, Rind oder Schaf, bestimmte phenolische Verbindungen, wie z.B. 1-Naphthol, nicht glucuronidieren kann (Watkins und Klaassen 1986). Bei Studien zur Pharmakokinetik und Metabolisierung von Paracetamol bei Hund und Katze zeigte sich, dass Hunde vorwiegend Paracetamolglucuronid mit dem Urin ausscheiden. Katzen haben in ihrer Leber jedoch nur eine sehr begrenzte Kapazität, um den Metaboliten Paracetamolglucuronid zu bilden. Daher wird Paracetamol bei dieser Spezies vorwiegend zu Paracetamolsulfat metabolisiert. Da diese Sulfatkonjugation bei hohen Dosierungen jedoch schnell gesättigt ist, hat die Katze bei höheren Dosierungen deutlich längere Plasmahalbwertszeiten als der Hund und eine entsprechend höhere Empfindlichkeit gegenüber toxischen Wirkungen des Paracetamols (Savides et al. 1984, Court und Greenblatt 1997).

Auf Grundlage dieser Daten wurde lange nach der molekularen Ursache für diesen defizienten Metabolisierungsweg gesucht. Court und Greenblatt (2000) haben schließlich nachgewiesen, dass die Katze ein intaktes Gen für die UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A1 besitzt, welches essentiell für die Glucuronidierung von Bilirubin ist. Das Gen für UGT1A6, welches für die Metabolisierung phenolischer Verbindungen von Bedeutung ist, liegt bei der Katze jedoch als Pseudogen vor (Court und Greenblatt 2000). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass UGT1A6 neben der Katze und anderen *Felidae* wie Leopard, Puma, Löwe, Tiger, Jaguar oder Luchs auch bei anderen hyperkarnivoren Spezies (>70% der Nahrung tierischen Ursprungs) wie der braunen Hyäne (Familie *Hyenidae*) und dem Nördlichen See-Elefanten (Familie *Phocidae*) als Pseudogen vorliegt, wenngleich hier jeweils andere Mutationen als bei den *Felidae* auftreten. Da bei mesokarnivoren Spezies (50-70% der Nahrung tierischen Ursprungs) wie dem Hund, Rotfuchs, Mähnenwolf oder Eisbär sowie bei hypokarnivoren Spezies (<50% der Nahrung tierischen Ursprungs) wie dem Waschbär, Kragenbär oder Katzenbär intakte UGT1A6 Gene gefunden wurden, scheint im Laufe der Evolution eine besonders pflanzenarme Nahrung ein wichtiger Faktor für die Ausbildung und Fixation des UGT1A6-Pseudogens gewesen zu sein. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da Pflanzennahrung eine große Vielzahl phenolischer Verbindungen enthält, welche zu einem erheblichen Teil über Glucuronidierung metabolisiert werden und Gene wie UGT1A6 hierbei von essentieller Bedeutung sind (Shrestha et al. 2011). Der UGT1A6-Verlust bei der Katze könnte sich somit durch einen ernährungsbedingten Gendrift etabliert haben.

**Tabelle 1:** Beispiele für pharmakogenetische Besonderheiten bei Hund und Katze.

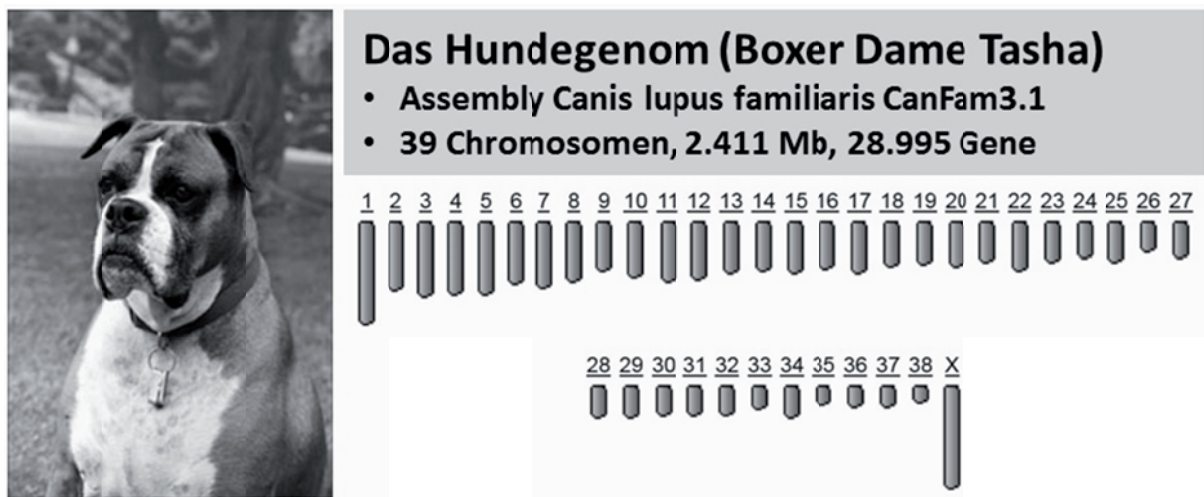
	Gen / Enzym	Pharmakogenetische Besonderheit	Literatur
<b>Katze</b>	TPMT	31 SNPs, 5 Aminosäureaustausche, 9 Alloenzyme mit unterschiedlicher Enzymaktivität	Salavaggione et al. 2004
	NAT	Nur ein Isoenzym, vergleichbar NAT1 des Menschen	Trepanier et al. 1998
	CYP2E1	Drei Isoenzyme mit unterschiedlicher Enzymaktivität	Tanaka et al. 2005
	UGT1A6	Liegt bei allen <i>Felidae</i> als Pseudogen vor; mehr als 10 verschiedene Mutationen unterbrechen oder zerstören den offenen Leserahmen.	Court und Greenblatt 2000, Shrestha et al. 2011
<b>Hund</b>	CYP1A2	1117C>T Polymorphismus führt zu einem vorzeitigen Stopcodon mit Zerstörung der Enzymaktivität. Homozygot betroffene Hunde sind schlechte Metabolisierer für CYP1A2-Substrate wie AC-3933, YM-64227 oder Theobromin.	Mise et al. 2004a, 2004b, Tenmizu et al. 2004, 2006, siehe Abbildung 5
	CYP2B11	Rassespezifische Unterschiede: Greyhounds haben eine 3-fach niedrigere Enzymaktivität als Beagle und verlängerte Aufwachzeiten nach Propofol-Injektion. Der Metabolismus von Propofol, Ketamin und Midazolam kann verändert sein.	Zoran et al. 1993, Court et al. 1999, Hay Kraus et al. 2000
	CYP2C41	Gendeletionspolymorphismus. Nur 2 von 10 (20%) Mischlingshunden und 2 von 18 Beagle Hunden (11%) tragen das CYP2C41-Gen. Das Substratspektrum ist noch unbekannt.	Blaisdell et al. 1998, siehe Abbildung 4
	CYP2D15	Ortholog zu dem humanen CYP2D6. Sechs Alloenzyme mit unterschiedlicher Enzymaktivität. Eine Spleißvariante mit <i>in frame</i> Deletion von Exon 3 (CYP2D15 $\delta$ /CYP2D15v2) und dadurch eingeschränkter Celecoxib-Hydroxylaseaktivität.	Roussel et al. 1998, Paulson et al. 1999
	NAT	Keine zytosolische NAT-Aktivität beim Hund und kein NAT-Gen nachweisbar. Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Arylamin- und Hydrazin-Arzneistoffen wie Hydralazin, Procainamid, Isoniazid und Sulfonamiden.	Trepanier et al. 1997

### 3.3 Bedeutung der Pharmakogenetik beim Hund

Basierend auf archäologischen Funden scheint der Hund seit mehr als 15.000 Jahren in enger Nachbarschaft mit dem Menschen zu leben (Ostrander und Wayne 2005). Basierend auf phylogenetischen Studien gilt der graue Wolf (*Canis lupus*) dabei als der Urahn des heutigen Haushundes (*Canis lupus familiaris*), wobei vermutlich Wölfe aus mehreren geografischen Regionen zu dieser Entwicklung beigetragen haben. Hierbei scheint es zu mehreren Rückkreuzungen und/oder mehrfachen Domestikationsereignissen gekommen zu sein (Parker et al. 2010). Aus diesem ursprünglich domestizierten Ursprungshund haben sich bereits vor mehr als 2.000 Jahren verschiedene Gebrauchshundtypen herausgebildet, welche als Wachhund, Hütehund und Jagdhund beschrieben werden. Allerdings kam es erst vor 200-300 Jahren zur Etablierung spezifischer Hunderassen, wie wir sie heute in weltweit mehr als 400 Ausprägungen kennen. Diese sind durch die Etablierung von Zuchtvereinen in Europa im 19. Jahrhundert und die damit verbundene Einführung des Registrierwesens von Rassehunden gut dokumentiert. Dabei wurden spezifische Rassestandards definiert, welche zu einer genetischen Separierung verschiedener Hunderassen mit äußerst unterschiedlichem Erscheinungsbild und Charakter geführt haben (Parker et al. 2010). Entsprechend repräsentiert jede Hunderasse heute eine isolierte Zuchtpopulation mit hoher genetischer Homogenität und einer charakteristischen Konstellation von Merkmalen, welche unter strenger Selektion durch die jeweiligen Rassestandards aufrechterhalten werden (Ostrander und Wayne 2005, Parker et al. 2007). Mikrosatellitenstudien haben belegt, dass jede Hunderasse tatsächlich eine charakteristische genetische Signatur aufweist, welche sogar die Zuweisung eines einzelnen Tieres zu einer bestimmten Rasse ermöglicht (Parker et al. 2004). Entsprechende Tests sind kommerziell verfügbar (z.B. über Mars Veterinary, [www.progressivepetcare.com](http://www.progressivepetcare.com)).

Als Konsequenz der strikten Selektion, dem hohen Grad an Inzucht und der extensiven Nutzung bestimmter Zuchttiere hat sich bei vielen Rassehunden eine hohe Prävalenz für spezifische genetisch determinierte Erkrankungen eingestellt (Cruz et al. 2008, Mellersh 2012). Interessanterweise existieren zahlreiche erbliche Erkrankungen des Hundes mit sehr ähnlicher klinischer Manifestation auch in der humanen Population. Dazu zählen viele kardiovaskuläre, neurologische, metabolische und inflammatorische Erkrankungen sowie Tumorerkrankungen wie Mammakarzinom, Melanom oder Lymphom (Lequarré et al. 2011).

Aus diesem Grund ist die Genetik des Hundes bzw. verschiedener Hunderassen auch von großem Interesse für die Erforschung von Erkrankungen mit genetischem Hintergrund beim Menschen (Derrien et al. 2012). So ist bei den mehr als 350 existierenden Hunderassen, mit ihrer im Vergleich zum Menschen extrem eingeschränkten genetischen Variabilität, die genetische Zuordnung bestimmter erblicher Erkrankungen erheblich leichter (Derrien et al. 2012). Auf der anderen Seite existieren über 360 genetisch bedingte Erkrankungen, welche primär beim Menschen identifiziert wurden, auch beim Hund, wobei jeweils analoge Gene des Hundes beteiligt sind. Somit profitiert die Veterinärmedizin erheblich von der intensiven Forschung zu Erkrankungen mit genetischem Hintergrund des Menschen (Patterson 2000).



**Abbildung 3:** Das voll sequenzierte Hundegenom der Boxer Dame Tasha mit insgesamt 2.411 Mb, verteilt auf 39 Chromosomen. Die Genomsequenz des Hundes ist heute über verschiedene Portale verfügbar (z.B. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Bildquelle: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

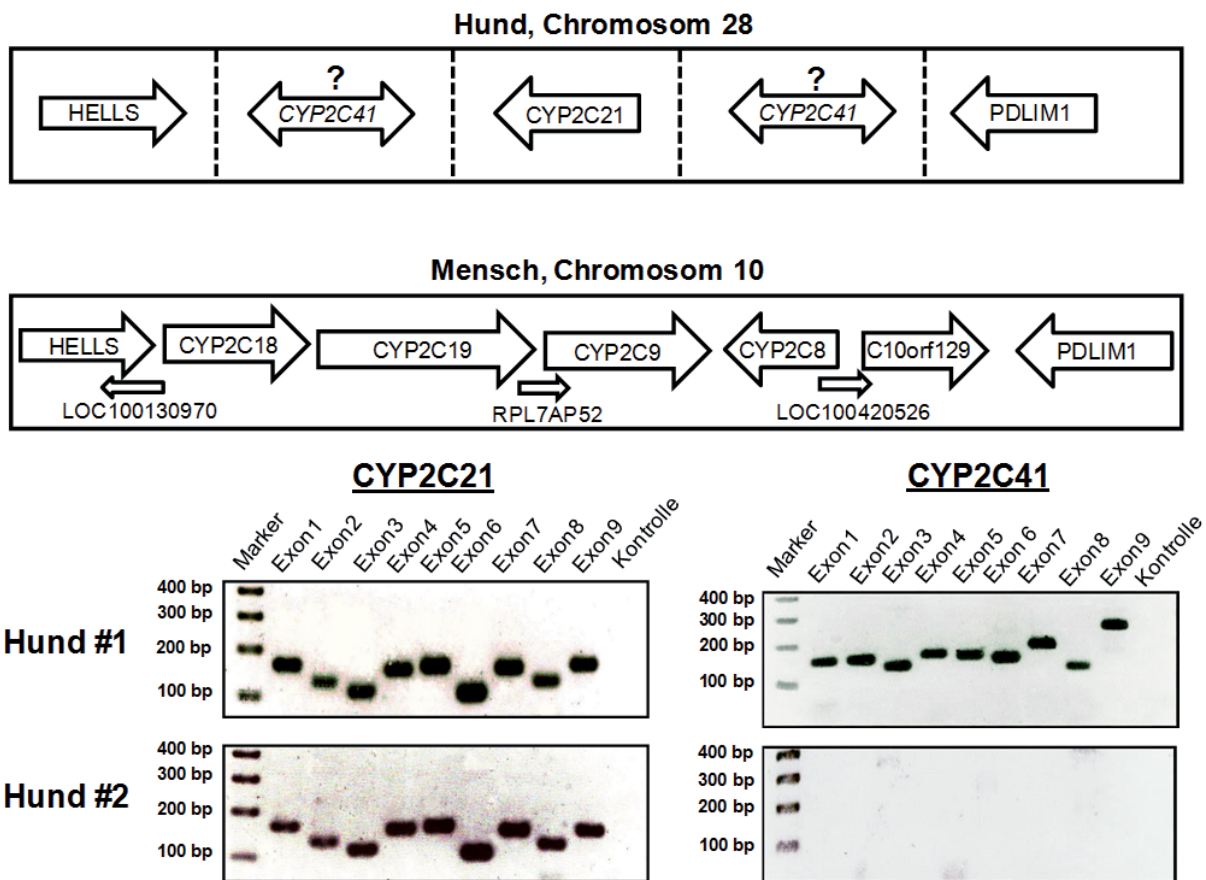
Die erste Genomsequenz des weiblichen Boxers *Tasha* wurde im Juli 2004 veröffentlicht und stand zunächst mit einer 7,5-fachen Überlagerung und 96-98% Abdeckung zur Verfügung (Lindblad-Toh et al. 2005, Assembly CanFam2.0) (siehe Abbildung 3). Bereits früher wurde mit einer geringeren Überlagerung von 1,5 die Genomsequenz des männlichen Pudels *Shadow* durch Celera Genomics ermittelt (Kirkness et al. 2003). Im Genom des Hundes wurden nach neusten Berechnungen 28.995 Gene identifiziert, etwas mehr als in den Genomen von Mensch (22.320) oder Maus (23.062) ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) (Starkey et al. 2005). Aus diesen Sequenzen und weiteren Sequenzierungen von Hunden verschiedener Rassen wurden bisher mehr als 2,5 Millionen SNPs identifiziert, welche heute für

genomweite Assoziationsstudien genutzt werden. Hierfür stehen bereits genomweite SNP-Chips für den Hund zur Verfügung, z.B. von Affymetrix (*canine SNP chips 27 K(v1)* und *50 K(v2)*, affymetrix.com) oder Illumina (*CanineSNP20* und *CanineHD Bead-Chips*, illumina.com) (Lindblad-Toh et al. 2005, Mellersh 2012).

Bereits vor der Etablierung der Genomsequenz des Hundes wurden Genmutationen für mehr als 25 erblich determinierte Erkrankungen beim Hund identifiziert (Starkey et al. 2005). Hierfür wurde zumeist ein Kandidatengen-Ansatz gewählt, wenn bei einer vergleichbaren humanen Erkrankung bereits das zugrundeliegende Gen bekannt war. Andere genetisch bedingte Erkrankungen sowie morphologische Merkmale des Hundes wurden mittels genomweiter Assoziationsstudien aufgeklärt (Parker et al. 2010). Mittlerweile sind mehr als 370 Erkrankungen mit genetischem Hintergrund bei Rassehunden bekannt (siehe *Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA)*, *Inherited Diseases in Dogs (IDID)*, *Canine Inherited Disorders Database (CIDD)* oder *Listing of Inherited Disorders in Animals (LIDA)* Datenbanken). Für über 80 von diesen Erkrankungen sind verschiedene molekulargenetische Tests kommerziell verfügbar (Mellersh 2012). Diese DNA-Tests werden von Veterinärmedizinern, Züchtern und Tierhaltern zunehmend in Anspruch genommen, sowohl zu diagnostischen Zwecken, als auch um die Gesundheit der Hunde über gezielte züchterische Maßnahmen zu verbessern. Die meisten derzeit verfügbaren Tests beziehen sich auf autosomal-rezessiv vererbte Einzelgenmerkmale. Genetisch komplexere Erkrankungen, welche durch Mutationen und Polymorphismen in mehreren Genen entstehen, sind bisher weniger gut untersucht und stellen bezüglich ihrer Diagnostik eine größere Herausforderung dar.

Bis heute wurden beim Hund insgesamt 9 Cytochrom P450 Isoenzyme identifiziert (Kamimura 2006, Fink-Gremmels 2008). Fünf davon werden als genetisch polymorph beschrieben, und zwar CYP1A2, CYP2C41, CYP2D15, CYP2E1 und CYP3A12 (Blaisdell et al. 1998, Roussel et al. 1998, Paulson et al. 1999, Lankford et al. 2000, Mise et al. 2004a, Kamimura et al. 2006) (siehe Abbildungen 4 und 5). Diese Polymorphismen können zu Unterschieden in der Pharmakokinetik führen und sind möglicherweise für einige der bekannten rassespezifischen und interindividuellen Unterschiede in der Wirksamkeit und Sicherheit vieler Arzneistoffe verantwortlich. An dieser Stelle soll aber auch erwähnt werden, dass hierfür natürlich nicht nur genetische Unterschiede verantwortlich sind, sondern dass

Umweltfaktoren wie Nahrung, Gesundheitszustand oder Exposition mit bestimmten Xenobiotika ebenfalls eine erhebliche Rolle spielen.



**Abbildung 4:** Beispiel für einen Gendeletionspolymorphismus beim Hund (Hund #2). Dieser betrifft das Gen für CYP2C41, welches nur bei 10-20% aller Hunde vorkommt (Blaisdell et al. 1998). Die Transkripte von CYP2C21 und CYP2C41 wurden ursprünglich aus verschiedenen cDNA-Bibliotheken der Hundeleber kloniert. Beide CYPs haben zueinander 70% Sequenzidentität auf Proteinebene sowie 67-76% Sequenzidentität zu den humanen CYP2C-Genen CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19. CYP2C41 ist dabei homologer zu den humanen CYP2Cs als zu CYP2C21. Funktionelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Diclofenac (ein Markersubstrat des humanen CYP2C9) effektiv über CYP2C21 metabolisiert wird (Shou et al. 2003). CYP2C41 war im Metabolismus von Diclofenac dagegen vergleichsweise wenig aktiv. Bisher wurde noch kein Markersubstrat für CYP2C41 identifiziert, so dass die funktionelle Bedeutung dieses Gendeletionspolymorphismus für den Arzneistoffmetabolismus beim Hund noch weitgehend unklar ist. Da in der genomischen Sequenz flankierend zu dem CYP2C21-Gen des Hundes noch Sequenzierlücken bestehen (Derrien et al. 2009) und die Sequenz des CYP2C41-Gen bisher noch nicht vollständig aufgeklärt ist, bleibt unbekannt, wie das CYP2C41-Gen zu dem CYP2C21-Gen und den flankierenden Genen HELLs und PDLIM1 auf Chromosom 28 des Hundes angeordnet ist. Des Weiteren wurde bisher noch nicht untersucht, ob es rassespezifische Unterschiede im Auftreten dieses Gendeletionspolymorphismus gibt. Bisherige Untersuchungen wurden lediglich bei einer geringen Zahl an Beagles (n=29) und Mischlingshunden (n=10) durchgeführt (Blaisdell et al. 1998, Graham et al. 2003). Beide Fragen werden aktuell in der Dissertation von Frau Tierärztin Clarissa Prinzing am Institut für Pharmakologie und Toxikologie untersucht. Dieser entstammen die hier gezeigten Abbildungen.

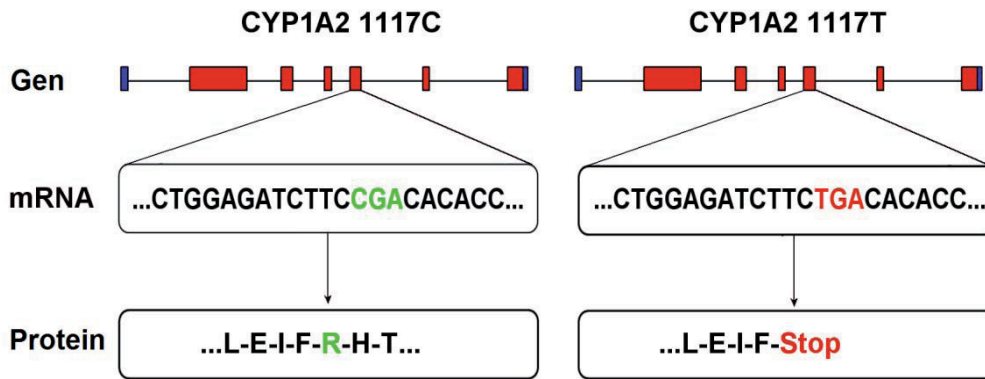
Ebenso sind rassespezifische morphologische Besonderheiten, wie z.B. die Körperzusammensetzung, Körperfettanteil oder Körpergröße von Bedeutung. Diese Faktoren

können einen erheblichen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen haben. Als Beispiel kann hier der Greyhound angeführt werden, welcher durch den äußerst geringen Körperfettanteil ein geringeres Verteilungsvolumen für lipophile Arzneistoffe, wie z.B. Propofol bietet. Dies kann schließlich zu höheren Arzneistoffkonzentrationen im Blut führen (Zoran et al. 1993). Daher haben Windhunde wie der Greyhound ein höheres Risiko für das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAWs) bei der Anwendung lipophiler Arzneistoffe (Mosher und Court 2010).

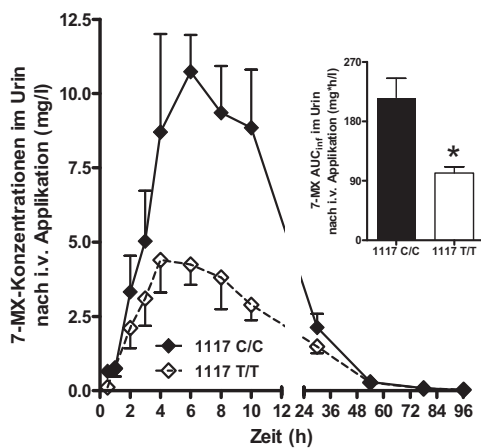
Im Folgenden werden einige Beispiele für pharmakogenetische Besonderheiten beim Hund aufgelistet, welche für die Arzneitherapie von Bedeutung sind.

Vor einigen Jahren wurde im Gen für das Cytochrom CYP1A2 des Beagles eine C>T Transition an Position 1117 des offenen Leserahmens identifiziert, welche zur Ausbildung eines vorzeitigen Stopcodons (TGA) führt. Bei homozygoter Ausprägung dieser 1117C>T Transition ist das codierte CYP1A2-Protein so stark trunkiert, dass es keine Funktion mehr ausübt (Mise et al. 2004a, Tenmizu et al. 2004) (siehe Abbildung 5). Homozygote CYP1A2 1117T/T Hunde wurden als schlechte Metabolisierer für verschiedene pharmazeutische Entwicklungssubstanzen, wie z.B. AC-3933 (einem neuen partiellen inversen Benzodiazepinrezeptor-Agonisten, Mise et al. 2004b) oder YM-64227 (einem neuen PDE4-Inhibitor), identifiziert, was die pharmakogenetische Bedeutung für diesen Polymorphismus belegt (Mise et al. 2004b, Tenmizu et al. 2006). Obwohl das Substratspektrum des caninen CYP1A2 noch nicht hinreichend untersucht wurde (Mise et al. 2008), seien hier einige CYP1A2-Substrate genannt, welche auch in der Veterinärmedizin eine Rolle spielen, wie z.B. Clomipramin, Lidocain, Naproxen, Ondansetron, Propafenon, Propranolol oder Verapamil (Gunes und Dahl 2008). Ob der CYP1A2-Genotyp beim Einsatz dieser Arzneistoffe aber tatsächlich von Bedeutung ist, muss in klinischen Studien ermittelt werden. Neben dem Beagle kommt der CYP1A2 1117C>T Polymorphismus auch bei vielen anderen Hunderassen vor, darunter Irish Wolfhound, Whippet, Weißer Schäferhund, Dalmatiner, Collie, Australian Shepherd, Shetland Sheepdog, Bearded Collie, Jack Russell Terrier, Deutscher Schäferhund u.a. (Aretz und Geyer 2011), so dass es sich hier nicht um ein rassespezifisches Phänomen des Beagles handelt.

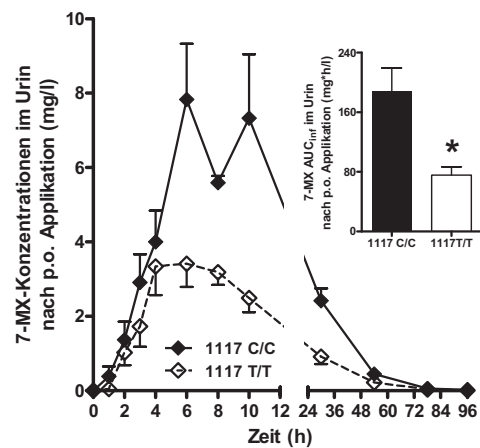
A



B



C



**Abbildung 5:** Der CYP1A2 1117C>T Polymorphismus beim Hund, als Beispiel für einen nichtsynonymen SNP, welcher zu einem vorzeitigen Stopcodon in der proteincodierenden Sequenz und damit zu einem kompletten Funktionsverlust des CYP1A2-Enzyms führt. (A) Das CYP1A2-Gen besteht beim Hund aus 7 Exonen. Die 1117C>T Transition ist in Exon 5 lokalisiert und betrifft eine Änderung des für Arginin codierenden Basentriplets CGA in ein Stopcodon (TGA). Der 1117C>T Polymorphismus kann beim Hund in homozygoter (T/T) oder heterozygoter (C/T) Ausprägung vorliegen. Der Nachweis kann über allelische Diskriminierung mittels real-time PCR oder über Sequenzierung erfolgen (Abbildungen A modifiziert nach Aretz & Geyer (2011) Detection of the CYP1A2 1117C>T polymorphism in 14 dog breed, *J Vet Pharmacol Therap* 34:98-100). Homozygote CYP1A2 1117T/T Hunde wurden bereits als schlechte Metabolisierer für die Arzneistoffe AC-3933 und YM-64227 identifiziert. (B, C) 1117T/T Hunde zeigen einen signifikant reduzierten Metabolismus von Theobromin, dem toxikologisch relevanten Inhaltsstoff der Schokolade, zu dem inaktiven Metaboliten 7-Methylxanthin (7-MX). Hier gezeigt ist die Plasmakonzentration von 7-MX nach intravenöser (Diagramm links) und oraler (Diagramm rechts) Applikation von Theobromin mit 10 mg/kg bei homozygoten 1117T/T und 1117C/C Beagle Hunden. Insgesamt ist bei 1117T/T Hunden im Vergleich zu 1117C/C Hunden die Plasmahalbwertszeit von Theobromin signifikant verlängert ( $16 \pm 4$  h versus  $9 \pm 1$  h) und die Plasmaclearance signifikant reduziert ( $0,5 \pm 0,2$  ml/min/kg versus  $0,8 \pm 0,0$  ml/min/kg), wodurch 1117T/T Hunde vermutlich empfindlicher auf Theobromin reagieren als 1117C/C Hunde. Die Abbildungen B und C stammen aus der Dissertation von Frau Dr. Sabrina Collica 2012 mit dem Titel: Der Polymorphismus 1117C>T im Cytochrom P450 CYP1A2 beeinträchtigt die Metabolisierung von Theobromin beim Hund.

Eine weiteres Beispiel für eine pharmakogenetische Besonderheit des Hundes bilden Spezies-, Rasse- und Geschlechtsunterschiede in der Expression und Aktivität von CYP2B11 in der Leber, was unter anderem zu signifikanten Unterschieden im Metabolismus des

kurzwirksamen Injektionsnarkotikums Propofol führt (Matthews et al. 2004, Pascoe et al. 2006). Beim Hund erfolgt die Metabolisierung von Propofol vorwiegend über CYP2B11, welches beim Greyhound eine 3-fach geringere Metabolisierungskapazität aufweist als bei anderen Hunderassen (Hay Kraus et al. 2000). Hierdurch kommt es beim Greyhound zu höheren Plasmaspiegeln und einer längeren Wirkung, welche sich in einer verlängerten Aufwachzeit äußert. So brauchen Greyhounds nach einer einmaligen Propofol-Injektion etwa 8 min länger als Hunde anderer Rassen, bis sie nach der Narkose wieder eigenständig gehen können (Zoran et al. 1993). Im Gegensatz zum Greyhound zeigt der Beagle unterdurchschnittliche Plasmaspiegel und eine besonders kurze Wirkdauer von Propofol (Court et al. 1999). Neben diesen rassespezifischen Unterschieden existieren auch ausgeprägte Geschlechtsunterschiede im Metabolismus von Propofol. So haben männliche Hunde eine signifikant höheren CYP2B11-Aktivität in der Leber als weibliche Tiere (Hay Kraus et al. 2000). Bisher ist jedoch noch unklar, ob diese Expressionsunterschiede auf einem genetischen Polymorphismus z.B. in der Promotorregion des CYP2B11-Gens beruhen oder auf rassespezifischen Unterschieden in der Steuerung der Genexpression.

Aus dem Bereich des Phase II Metabolismus ist schließlich die N-Acetyltransferase zu nennen, welche an der Metabolisierung von Arylamin- und Hydrazin-Arzneistoffen sowie von Arylamin-Karzinogenen beteiligt ist. Darunter fallen typischerweise Arzneistoffe wie Hydralazin, Procainamid, Isoniazid und Sulfonamide. Es ist bereits seit etwa 60 Jahren bekannt, dass Hunde, im Gegensatz zu den meisten anderen Tierspezies, nicht in der Lage sind, bestimmte Arzneistoffe und Toxine aus den genannten Stoffgruppen zu acetylieren (Marshall 1954, Poirier et al. 1963, Glinsukon et al. 1975). Dies trägt zu der erhöhten Empfindlichkeit von Hunden gegenüber Sulfonamiden bei, welche sich in unzähligen Fallberichten in der Literatur widerspiegelt (Cribb und Spielberg 1990). Die meisten Spezies, wie z.B. Menschen, Kaninchen und Ratte, haben charakteristischerweise 2 NAT-Gene in ihrem Genom, NAT1 und NAT2; die Maus zusätzlich NAT3. Diese Isoformen sind sehr homolog, unterscheiden sich aber in ihrem Expressionsmuster. Nähere biochemische und molekulargenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass der Hund keine NAT-Immunreaktivität in der Leber aufweist und mittels *Southern Blot* in dem Genom des Hundes auch kein NAT-Gen nachgewiesen werden kann (Trepanier et al. 1997). Dies wurde neben dem Hund auch für verschiedene Wolf- und Fuchsarten sowie für Schakal und Kojote

gezeigt. Die fehlende NAT-Aktivität des Hundes stellt in der Tat eine Spezies-Besonderheit dar, da alle bisher untersuchten Spezies, wie Mensch, Rhesusaffe, Wildkatze, Hauskatze, Pferd, Schwein, Wiederkäuer, Pinguin, Taube, Fische, Schnecken und sogar Bakterien eine N-Acetylierungskapazität aufweisen. NAT gilt daher als ein sehr hoch konserviertes Enzymsystem, welches im Laufe der Evolution offensichtlich durch einen entsprechenden Selektionsdruck in den genannten Tierspezies erhalten geblieben ist. Die einzige Spezies, bei welcher neben dem Hund ebenfalls keine zytosolische NAT-Aktivität nachgewiesen werden konnte, ist die Moschusspitzmaus, welche phylogenetisch zwischen Primaten und Nagern angesiedelt ist (Nakura et al. 1995).

### 3.4 Literaturverzeichnis zu Einleitung I

- Aleman M, Nieto JE, and Magdesian KG (2009) Malignant hyperthermia associated with ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. *J Vet Intern Med* 23 (2):329-334
- Altman RB, Kroemer HK, McCarty CA, Ratain MJ, and Roden D (2011) Pharmacogenomics: will the promise be fulfilled? *Nat Rev Genet* 12 (1):69-73
- Aretz JS and Geyer J (2011) Detection of the CYP1A2 1117C>T polymorphism in 14 dog breeds. *J Vet Pharmacol Ther* 34 (1):98-100
- Aronson LR and Drobatz K (1996) Acetaminophen toxicosis in 17 cats. *J Vet Emerg Crit Care* 6:65-69
- Blaisdell J, Goldstein JA, and Bai SA (1998) Isolation of a new canine cytochrome P450 cDNA from the cytochrome P450 2C subfamily (CYP2C41) and evidence for polymorphic differences in its expression. *Drug Metab Dispos* 26 (3):278-283
- Burmester JK, Sedova M, Shapero MH, and Mansfield E (2010) DMET microarray technology for pharmacogenomics-based personalized medicine. *Methods Mol Biol* 632:99-124
- Chan IS and Ginsburg GS (2011) Personalized medicine: progress and promise. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 12:217-244
- Court MH and Greenblatt DJ (1997) Molecular basis for deficient acetaminophen glucuronidation in cats. An interspecies comparison of enzyme kinetics in liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 53 (7):1041-1047
- Court MH, Hay-Kraus BL, Hill DW, Kind AJ, and Greenblatt DJ (1999) Propofol hydroxylation by dog liver microsomes: assay development and dog breed differences. *Drug Metab Dispos* 27 (11):1293-1299
- Court MH and Greenblatt DJ (2000) Molecular genetic basis for deficient acetaminophen glucuronidation by cats: UGT1A6 is a pseudogene, and evidence for reduced diversity of expressed hepatic UGT1A isoforms. *Pharmacogenetics* 10 (4):355-369
- Cribb AE and Spielberg SP (1990) An in vitro investigation of predisposition to sulphonamide idiosyncratic toxicity in dogs. *Vet Res Commun* 14 (3):241-252

- Cruz F, Vila C, and Webster MT (2008) The legacy of domestication: accumulation of deleterious mutations in the dog genome. *Mol Biol Evol* 25 (11):2331-2336
- Davis LE and Westfall BA (1972) Species differences in biotransformation and excretion of salicylate. *Am J Vet Res* 33 (6):1253-1262
- Derrien T, Theze J, Vaysse A, Andre C, Ostrander EA, Galibert F, and Hitte C (2009) Revisiting the missing protein-coding gene catalog of the domestic dog. *BMC Genomics* 10:62
- Derrien T, Vaysse A, Andre C, and Hitte C (2012) Annotation of the domestic dog genome sequence: finding the missing genes. *Mamm Genome* 23 (1-2):124-131
- Evans WE and Relling MV (2004) Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 429 (6990):464-468
- Ferraldeschi R and Newman WG (2011) Pharmacogenetics and pharmacogenomics: a clinical reality. *Ann Clin Biochem* 48 (Pt 5):410-417
- Fink-Gremmels J (2008) Implications of hepatic cytochrome P450-related biotransformation processes in veterinary sciences. *Eur J Pharmacol* 585 (2-3):502-509
- Fleischer S, Sharkey M, Mealey K, Ostrander EA, and Martinez M (2008) Pharmacogenetic and metabolic differences between dog breeds: their impact on canine medicine and the use of the dog as a preclinical animal model. *AAPS J* 10 (1):110-119
- Geyer J and Janko C (2012) Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Curr Pharm Biotechnol*, 13:969-986
- Glinsukon T, Benjamin T, Grantham PH, Weisburger EK, and Roller PP (1975) Enzymic N-acetylation of 2,4-toluenediamine by liver cytosols from various species. *Xenobiotica* 5 (8):475-483
- Graham MJ, Bell AR, Crewe HK, Moorcraft CL, Walker L, Whittaker EF, and Lennard MS (2003) mRNA and protein expression of dog liver cytochromes P450 in relation to the metabolism of human CYP2C substrates. *Xenobiotica* 33 (3):225-237
- Gunes A and Dahl ML (2008) Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics* 9 (5):625-637

- Hay Kraus BL, Greenblatt DJ, Venkatakrishnan K, and Court MH (2000) Evidence for propofol hydroxylation by cytochrome P4502B11 in canine liver microsomes: breed and gender differences. *Xenobiotica* 30 (6):575-588
- Heller T, Kirchheiner J, Armstrong VW, Luthe H, Tzvetkov M, Brockmoller J, and Oellerich M (2006) AmpliChip CYP450 GeneChip: a new gene chip that allows rapid and accurate CYP2D6 genotyping. *Ther Drug Monit* 28 (5):673-677
- Ito T, Takahashi M, Sudo K, and Sugiyama Y (2009) Interindividual pharmacokinetics variability of the alpha(4)beta(1) integrin antagonist, 4-[1-[3-chloro-4-[N'-(2-methylphenyl)ureido]phenylacetyl]-(4S)-fluoro-(2S)-pyrrolidine-2-yl]methoxybenzoic acid (D01-4582), in beagles is associated with albumin genetic polymorphisms. *J Pharm Sci* 98 (4):1545-1555
- Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, Anderson JL, Kimmel SE, Lee MT, Pirmohamed M, Wadelius M, Klein TE, and Altman RB (2011) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther* 90 (4):625-629
- Kamimura H (2006) Genetic polymorphism of cytochrome P450s in beagles: possible influence of CYP1A2 deficiency on toxicological evaluations. *Arch Toxicol* 80 (11):732-738
- Kerb R (2006) Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Letters* 234 (1):4-33
- Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM, and Venter JC (2003) The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* 301 (5641):1898-1903
- Laing RE, Hess P, Shen Y, Wang J, and Hu SX (2011) The role and impact of SNPs in pharmacogenomics and personalized medicine. *Curr Drug Metab* 12 (5):460-486
- Lankford SM, Bai SA, and Goldstein JA (2000) Cloning of canine cytochrome P450 2E1 cDNA: identification and characterization of two variant alleles. *Drug Metab Dispos* 28 (8):981-986
- Lequarré AS, Andersson L, Andre C, Fredholm M, Hitte C, Leeb T, Lohi H, Lindblad-Toh K, and Georges M (2011) LUPA: a European initiative taking advantage of the canine genome architecture for unravelling complex disorders in both human and dogs. *Vet J* 189 (2):155-159

- Liggett SB (2000) Pharmacogenetics of beta-1- and beta-2-adrenergic receptors. *Pharmacology* 61 (3):167-173
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, et al. (2005) Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438 (7069):803-819
- Lyons LA (2010) Feline genetics: clinical applications and genetic testing. *Top Companion Anim Med* 25 (4):203-212
- Ma Q and Lu AY (2011) Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. *Pharmacol Rev* 63 (2):437-459
- Marshall EK, Jr (1954) Acetylation of sulfonamides in the dog. *J Biol Chem* 211 (1):499-503
- Martignoni M, Groothuis GM, and de Kanter R (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2 (6):875-894
- Matthews NS, Brown RM, Barling KS, Lovering SL, Herring BW (2004) Repetitive propofol administration in dogs and cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 40:255-260
- Mealey KL (2006) Pharmacogenetics. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 36 (5):961-973
- Mellersh C (2012) DNA testing and domestic dogs. *Mamm Genome* 23 (1-2):109-123
- Mise M, Hashizume T, Matsumoto S, Terauchi Y, Fujii T (2004a) Identification of non-functional allelic variant of CYP1A2 in dogs. *Pharmacogenetics* 14 (11):769-773
- Mise M, Yadera S, Matsuda M, Hashizume T, Matsumoto S, Terauchi Y, Fujii T (2004b) Polymorphic expression of CYP1A2 leading to interindividual variability in metabolism of a novel benzodiazepine receptor partial inverse agonist in dogs. *Drug Metab Dispos* 32 (2):240-245
- Mise M, Hashizume T, Komuro S (2008) Characterization of substrate specificity of dog CYP1A2 using CYP1A2-deficient and wild-type dog liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 36 (9):1903-1908
- Mosher CM and Court MH (2010) Comparative and veterinary pharmacogenomics. *Handb Exp Pharmacol* (199):49-77

- Nakura H, Itoh S, Kusano H, Ishizone H, Deguchi T, and Kamataki T (1995) Evidence for the lack of hepatic N-acetyltransferase in suncus (*Suncus murinus*). *Biochem Pharmacol* 50 (8):1165-1170
- Nieto JE and Aleman M (2009) A rapid detection method for the ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. *J Vet Intern Med* 23 (3):619-622
- O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, and Yuhki N (2002) The Feline Genome Project. *Annu Rev Genet* 36:657-686
- O'Brien SJ, Johnson W, Driscoll C, Pontius J, Pecon-Slattery J, and Menotti-Raymond M (2008) State of cat genomics. *Trends Genet* 24 (6):268-279
- Ostrander EA and Wayne RK (2005) The canine genome. *Genome Res* 15 (12):1706-1716
- Parker HG, Kim LV, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB, Johnson GS, DeFrance HB, Ostrander EA, and Kruglyak L (2004) Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science* 304 (5674):1160-1164
- Parker HG, Kukekova AV, Akey DT, Goldstein O, Kirkness EF, Baysac KC, Mosher DS, Aguirre GD, Acland GM, and Ostrander EA (2007) Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Res* 17 (11):1562-1571
- Parker HG, Shearin AL, and Ostrander EA (2010) Man's best friend becomes biology's best in show: genome analyses in the domestic dog. *Annu Rev Genet* 44:309-336
- Pascoe PJ, Ilkiw JE, Frischmeyer KJ (2006) The effect of the duration of propofol administration on recovery from anesthesia in cats. *Vet Anaesth Anal* 33 (1):2-7
- Patterson DF (2000) Companion animal medicine in the age of medical genetics. *J Vet Intern Med* 14 (1):1-9
- Paulson SK, Engel L, Reitz B, Bolten S, Burton EG, Maziasz TJ, Yan B, and Schoenhard GL (1999) Evidence for polymorphism in the canine metabolism of the cyclooxygenase 2 inhibitor, celecoxib. *Drug Metab Dispos* 27 (10):1133-1142
- Petzinger E and Geyer J (2006) Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 372 (6):465-475

- Pinto N and Dolan ME (2011) Clinically relevant genetic variations in drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 12 (5):487-497
- Poirier LA, Miller JA, and Miller EC (1963) The N- and ring-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene and the failure to detect N-acetylation of 2-aminofluorene in the dog. *Cancer Res* 23:790-800
- Pontius JU, Mullikin JC, Smith DR, Lindblad-Toh K, Gnerre S, Clamp M, Chang J, Stephens R, Neelam B, Volfovsky N, Schaffer AA, Agarwala R, Narfstrom K, Murphy WJ, Giger U, Roca AL, Antunes A, Menotti-Raymond M, Yuhki N, Pecon-Slattery J, Johnson WE, Bourque G, Tesler G, and O'Brien SJ (2007) Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res* 17 (11):1675-1689
- Pontius JU and O'Brien SJ (2007) Genome Annotation Resource Fields--GARFIELD: a genome browser for *Felis catus*. *J Hered* 98 (5):386-389
- Roses AD (2008) Pharmacogenetics in drug discovery and development: a translational perspective. *Nat Rev Drug Discov* 7 (10):807-817
- Roussel F, Duignan DB, Lawton MP, Obach RS, Strick CA, and Tweedie DJ (1998) Expression and characterization of canine cytochrome P450 2D15. *Arch Biochem Biophys* 357 (1):27-36
- Salavaggione OE, Yang C, Kidd LB, Thomae BA, Pankratz VS, Trepanier LA, and Weinshilboum RM (2004) Cat red blood cell thiopurine S-methyltransferase: companion animal pharmacogenetics. *J Pharmacol Exp Ther* 308 (2):617-626
- Savides MC, Oehme FW, Nash SL, and Leipold HW (1984) The toxicity and biotransformation of single doses of acetaminophen in dogs and cats. *Toxicol Appl Pharmacol* 74 (1):26-34
- Schwab M, Marx C, Zanger UM, and Eichelbaum M (2002) Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme. *Deutsches Ärzteblatt* 99 (8):497-504
- Shou M, Norcross R, Sandig G, Lu P, Li Y, Lin Y, Mei Q, Rodrigues AD, and Rushmore TH (2003) Substrate specificity and kinetic properties of seven heterologously expressed dog cytochromes p450. *Drug Metab Dispos* 31 (9):1161-1169
- Shrestha B, Reed JM, Starks PT, Kaufman GE, Goldstone JV, Roelke ME, O'Brien SJ, Koepfli KP, Frank LG, and Court MH (2011) Evolution of a major drug metabolizing enzyme defect in the domestic cat and other felidae: phylogenetic timing and the role of hypercarnivory. *PLoS One* 6 (3):e18046

- Starkey MP, Scase TJ, Mellersh CS, and Murphy S (2005) Dogs really are man's best friend-- canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Brief Funct Genomic Proteomic* 4 (2):112-128
- Sweeney BP (2005) Pharmacogenomics: the genetic basis for variability in drug response. In: Cashman JN and Grounds RM, eds. *Recent Advances in Anaesthesia and Intensive Care*. Cambridge University Press.
- Swen JJ, Nijenhuis M, de BA, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, Rongen GA, van Schaik RH, Schalekamp T, Touw DJ, van der Weide J, Wilffert B, Deneer VH, and Guchelaar HJ (2011) Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther* 89 (5):662-673
- Tanaka N, Shinkyō R, Sakaki T, Kasamatsu M, Imaoka S, Funae Y, and Yokota H (2005) Cytochrome P450 2E polymorphism in feline liver. *Biochim Biophys Acta* 1726 (2):194-205
- Tenmizu D, Endo Y, Noguchi K, Kamimura H (2004) Identification of the novel canine CYP1A2 1117C>T SNP causing protein deletion. *Xenobiotica* 34 (9):835-846
- Tenmizu D, Noguchi K, Kamimura H, Ohtani H, Sawada Y (2006) The canine CYP1A2 deficiency polymorphism dramatically affects the pharmacokinetics of 4-cyclohexyl-1-ethyl-7-methylpyrido[2,3-D]-pyrimidine-2-(1H)-one (YM-64227), a phosphodiesterase type 4 inhibitor. *Drug Metab Dispos* 34 (5):800-806
- Toutain PL, Ferran A, and Bousquet-Melou A (2010) Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Handb Exp Pharmacol* (199):19-48
- Trepanier LA, Ray K, Winand NJ, Spielberg SP, and Cribb AE (1997) Cytosolic arylamine N-acetyltransferase (NAT) deficiency in the dog and other canids due to an absence of NAT genes. *Biochem Pharmacol* 54 (1):73-80
- Trepanier LA, Cribb AE, Spielberg SP, and Ray K (1998) Deficiency of cytosolic arylamine N-acetylation in the domestic cat and wild felids caused by the presence of a single NAT1-like gene. *Pharmacogenetics* 8 (2):169-179
- Vogel F (1959) Moderne Probleme der Humangenetik. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd* 12:52-125
- Watkins JB, III and Klaassen CD (1986) Xenobiotic biotransformation in livestock: comparison to other species commonly used in toxicity testing. *J Anim Sci* 63 (3):933-942

Wedlund PJ (2000) The CYP2C19 enzyme polymorphism. *Pharmacology* 61 (3):174-183

Wijnen PA, Op den Buijsch RA, Drent M, Kuijpers PM, Neef C, Bast A, Bekers O, and Koek GH (2007) Review article: The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment Pharmacol Ther* 26 Suppl 2:211-219

Yogalingam G, Litjens T, Bielicki J, Crawley AC, Muller V, Anson DS, and Hopwood JJ (1996) Feline mucopolysaccharidosis type VI. Characterization of recombinant N-acetylgalactosamine 4-sulfatase and identification of a mutation causing the disease. *J Biol Chem* 271 (44):27259-27265

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, and Schwab M (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 392 (6):1093-1108

Zoran DL, Riedesel DH, and Dyer DC (1993) Pharmacokinetics of propofol in mixed-breed dogs and greyhounds. *Am J Vet Res* 54 (5):755-760

## 4. Einleitung II: Der MDR1-Transporter

### 4.1 Die Familie der ATP-binding cassette Transporter (ABC)

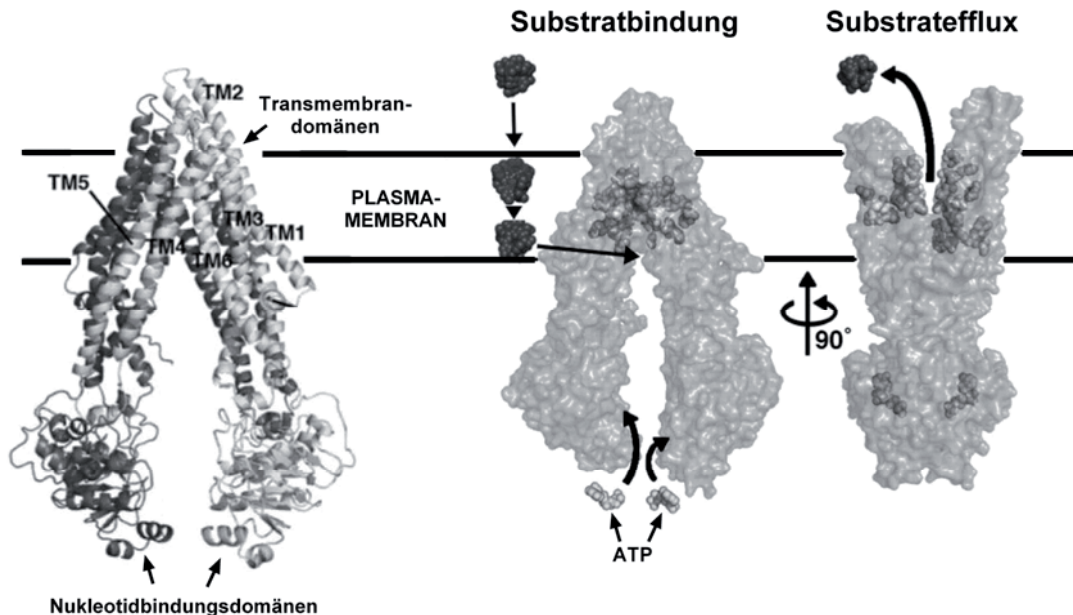
Die Gruppe der sogenannten *ATP-Binding-Cassette*-Transporter (ABC-Transporter) bildet eine funktionell sehr heterogene Gruppe von Membrantransportern, welche die Hydrolyse von ATP energetisch an den Transport von Substanzen durch die biologische Membran koppeln (Higgins 1992). ABC-Transporter existieren sowohl in Bakterien und Hefen als auch bei allen Wirbeltieren und bilden daher phylogenetisch eine sehr alte Genfamilie (Decottignies und Goffeau 1997, Putman et al. 2000, Dean et al. 2001). Die ABC-Gene der Vertebraten wurden vor einigen Jahren nach einer standardisierten Nomenklatur klassifiziert, welche von dem *HUGO Nomenclature Committee* anerkannt wird (siehe [www.genenames.org](http://www.genenames.org)). Dieser Nomenklatur liegt eine phylogenetische Zuordnung in verschiedene Subfamilien (ABCA bis ABCG) zugrunde, ergänzt um eine Zahl für ein individuelles Mitglied (z.B. ABCA1, ABCB1, etc.) (Dean und Annilo 2005). Allerdings findet man in der Literatur auch immer noch die herkömmlichen Gen-Bezeichnungen wie z.B. CFTR für ABCC7, MDR1 für ABCB1, oder MRP1 für ABCC1.

Die Funktionen einzelner ABC-Transporter reichen von der Nährstoffaufnahme, über die Resistenz gegen Pharmaka und Antibiotika, bis hin zur Präsentation von Antigenen (Gottesman et al. 2002). Strukturell zeigen die meisten ABC-Transporter große Ähnlichkeiten und bestehen aus zwei Bündeln mit jeweils sechs transmembranären Helices und zwei zytosolischen ATP-hydrolysierenden Domänen, welche als *ATP-binding cassette* (ABC)-Domänen oder Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD) bezeichnet werden (Schneider und Hunke 1998) (Abbildung 6).

Ein Mitglied aus der Familie der ABC-Transporter steht im Zentrum der vorliegenden Arbeit. Hierbei handelt es sich um den Arzneistofftransporter P-Glycoprotein, welcher häufig auch als MDR1, oder der systematischen Nomenklatur folgend als ABCB1 bezeichnet wird. In der vorliegenden Arbeit wird die Bezeichnung MDR1 gewählt, da sich diese zumindest im deutschsprachigen Raum in der öffentlichen Wahrnehmung etabliert hat. Die Bezeichnungen P-Glycoprotein und ABCB1 bleiben dagegen weitgehend wissenschaftlichen Fachkreisen vorbehalten.

Wie bereits erwähnt, existiert bei Hunden bestimmter Rassen ein genetischer Defekt in dem MDR1-Gen, welcher eine multiple Arzneistoffsensitivität auslöst. Diese ist historisch gesehen

in der Veterinärmedizin seit mehr als 20 Jahren bekannt und ist mit der vielfach beschriebenen „Ivermectin-Sensitivität des Collies“ gleichzusetzen (Pulliam et al. 1985, Paul et al. 1987, Tranquilli et al. 1987), wenngleich die molekulare Ursache dieser Ivermectin-Sensitivität erst im Jahre 2001 aufgeklärt wurde (Mealey et al. 2001).



**Abbildung 6:** Membrantopologie und Transportmechanismus von MDR1. Abbildung modifiziert nach Aller et al. (2009) *Structure of P-Glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*, Science 323:1718-1722. **Diagramm links:** Für die Membrantopologie charakteristisch sind zwei Bündel aus jeweils sechs Transmembrandomänen (TM1-TM6), an welche die beiden intrazellulär lokalisierten Nukleotidbindungsdomänen angehängt sind. Die horizontalen Linien repräsentieren die Position der zellulären Phospholipidmembran. **Diagramm rechts:** Hier ist schematisch der Transportmechanismus von MDR1 für ein beliebiges Substrat dargestellt. Die meist lipophilen oder amphipathischen Substrate können von extrazellulärer Seite (hier in Pfeilrichtung dargestellt) oder auch von intrazellulärer Seite (hier nicht dargestellt) in die Phospholipidmembran eindringen. Dort werden sie von der Substratbindungsdomäne, welche auf Ebene der Plasmamembran lokalisiert ist erkannt. Die Substratbindung stimuliert die Rekrutierung von zwei ATP-Molekülen an die intrazellulären Nukleotidbindungsdomänen. Dies löst eine Konformationsänderung im Protein aus, bei welcher die Nukleotidbindungsdomänen dimerisieren und sich die Substratbindungsdomäne nach außen orientiert. Dadurch wird das Substrat in das extrazelluläre Milieu abgegeben. Die Spaltung von ATP in ADP+P<sub>i</sub> löst schließlich die dimerisierten Nukleotidbindungsdomänen und setzt den Transporter in seine Grundkonformation zurück. Diesem Transportmechanismus folgend hat MDR1 eine doppelte Funktion, je nachdem von welcher Seite das Substrat ursprünglich in die Plasmamembran eingedrungen ist. Liegt die Arzneistoffkonzentration intrazellulär höher, handelt es sich um einen Substratefflux, wie er für MDR1 in Leber und Niere von Bedeutung ist. Ist die Substratkonzentration dagegen im extrazellulären Milieu höher, wird das Eindringen in die Zelle verhindert. Damit übernimmt MDR1 einen Refluxtransport oder besser gesagt eine Barrierefunktion, wie sie in der Blut-Hirn-Schranke von besonderer Bedeutung ist. Hier wird MDR1 in der apikalen blutzugewandten Membrandomäne der Gefäßendothelzellen exprimiert und verhindert so das Eindringen eines lipophilen Arzneistoffs wie Ivermectin in das Gehirn. Fehlt jedoch der MDR1-vermittelte Effluxtransport in der Blut-Hirn-Schranke, wie dies bei der *mdr1* Knockout-Maus oder bei MDR1-defekten Hunden der Fall ist, kann Ivermectin aufgrund seiner hohen Lipophilie ungehindert in das Gehirn eindringen und erreicht hier Arzneistoffkonzentrationen im neurotoxischen Konzentrationsbereich. Diese können bei betroffenen Hunden selbst bei niedriger, therapeutischer Dosierung lebensbedrohliche Intoxikationen auslösen.

#### 4.2 MDR1 und *Multidrug Resistance*

Die Erstbeschreibung von MDR1 geht auf Experimente aus den 1970er Jahren zurück, bei welchen Juliano und Ling 1976 mit auf Colchizin-Resistenz selektierten CHO (*Chinese Hamster Ovary*) Zellen experimentierten, welche eine pleiotrope Cross-Resistenz gegenüber zahlreichen zytotoxischen amphiphilen Substanzen entwickelt hatten. Dieses Phänomen wurde trefflicher Weise als *mutidrug resistance* (MDR) bezeichnet. Juliano und Ling entdeckten dabei, dass in diesen resistenten Zellen ein Glycoprotein von etwa 170 kDa in der Membran massiv hochreguliert wurde. Dieses Protein bezeichneten sie als P-Glycoprotein (P-gp, permeability glycoprotein), da es offensichtlich in der Lage war, die Permeabilität von zytotoxischen Substanzen über die Plasmamembran zu blockieren. Erst viele Jahre später wurde das P-gp codierende mRNA-Transkript identifiziert und sequenziert (Chen et al. 1986, Fojo et al. 1987, Ueda et al. 1987). In der Folge hat sich der Begriff *MDR1* für das P-gp codierende Gen, aber auch für das Transportprotein etabliert. Die offizielle Nomenklatur und Einordnung in die ABC-Transporterfamilie als Mitglied ABCB1 erfolgte erst viel später und basierte auf der Sequenzhomologie zu anderen ABC-Proteinen aus dieser Familie (Dean et al. 2001). Heute wissen wir, dass das MDR1-Gen bei allen bisher sequenzierten Säugetieren vorhanden ist. Eine Besonderheit bilden jedoch die Nager Maus und Ratte, bei welchen durch eine Genduplikation zwei MDR1-Gene vorhanden sind, welche als *mdr1a* und *mdr1b* bezeichnet werden (Schinkel et al. 1997).

Die ersten Jahre der MDR1-Forschung waren auf die durch MDR1-vermittelte Chemotherapie-Resistenz fokussiert, welche in der Onkologie, insbesondere bei metastasierenden Tumoren, von großer klinischer Bedeutung ist. So wurde gezeigt, dass MDR1 nicht nur in Zellkulturen, sondern auch in Tumoren massiv hochreguliert sein kann, was als eine häufige Ursache der Chemotherapie-Resistenz identifiziert wurde (Gottesman et al. 2002, Rochat 2009). Entsprechend waren die ersten identifizierten MDR1-Transportsubstrate vor allem Zytostatika (Pastan und Gottesman 1991, Sarkadi et al. 2006). Dazu zählen u.a. Taxane (Paclitaxel, Docetaxel), Vincaalkaloide (Vincristin, Vinblastin), Anthracycline (Doxorubicin, Daunorubicin), Podophylloxin-Derivate (Etoposid, Teniposid), Actinomycine (Dactinomycin), Camptothecin-Derivate (Irinotecan, Topotecan), Mitomycin C und Mitoxantron (Ambudkar et al. 1999). Heute wissen wir, dass von MDR1 weit mehr als 100 strukturell sehr verschiedene Arzneistoffe mit Molekulargewichten von 330-4.000 Da

transportiert werden können (Aller et al. 2009). Zu diesen zählen neben den genannten Zytostatika auch Herz-Kreislauf wirksame Arzneistoffe (z.B. Amiodaron, Carvedilol, Celiprolol, Chinidin, Digoxin, Digitoxin, Losartan, Propafenon, Talinolol, Verapamil), ZNS wirksame Arzneistoffe (z.B. Acepromazin, Chlorpromazin, Perphenazin, Phenytoin), Opioide (z.B. Fentanyl, Loperamid, Methadon, Morphin), Immunsuppressiva (z.B. Cyclosporin A, Tacrolimus), Antiemetika (z.B. Domperidon, Ondansetron), H<sub>2</sub>-Rezeptorblocker (z.B. Cimetidin, Ranitidin), antimikrobielle Arzneistoffe (z.B. Cefazolin, Cefoperazon, Erythromycin, Itraconazol, Ketoconazol, Levofloxacin, Rifampicin, Sparfloxacin, Tetrazyklin), Steroide (z.B. Aldosteron, Cortisol, Dexamethason, Hydrocortison, Methylprednisolon) und viele andere Substanzen (z.B. Aprenavir, Atorvastatin, Fexofenadin, Indinavir, Lovastatin, Metoclopramid, Nelfinavir, Ritonavir, Simvastatin) (Fromm 2004, Gerloff 2004, Marzolini et al. 2004, Doran et al. 2005, Löscher und Potschka 2005, Szakács et al. 2006, Ohtsuki und Terasaki 2007, Martinez et al. 2008). Die meisten MDR1-Substrate sind hydrophobe Moleküle mit einem hohen Eindringvermögen in die Plasmamembran (Aller et al. 2009). Dort werden sie von MDR1 erkannt und unter ATP-Verbrauch aus der Zelle ausgeschleust (siehe Abbildung 6). Damit kann MDR1 sehr effektiv den Eintritt toxischer Substanzen in die Zelle verhindern (Raviv et al. 1990, Sharom et al. 2005).

Außer in Tumorzellen wird MDR1 auch physiologisch in vielen Organen des Körpers exprimiert und zeigt hier jeweils ganz charakteristische Lokalisationen. MDR1 kommt in der apikalen (luminalen) Domäne der Epithelzellen des unteren Gastrointestinaltraktes vor, in der Bürstensaummembran der Epithelzellen des proximalen Tubulus der Niere, in der kanalikulären Membran der Hepatozyten in der Leber und in der apikalen Domäne der Gefäßendothelzellen im Gehirn (Blut-Hirn-Schranke) und dem Hoden. Darüber hinaus wird MDR1 in der Plazenta, dem Nebennierencortex, CD34+ hämatopoetischen Stammzellen und in CD8+ T-Zellen exprimiert (Thiebaut et al. 1987, 1989, Cordon-Cardo 1989, 1990, Chaudhary und Roninson 1991, Chaudhary et al. 1992, Ginn 1996). Entsprechend seiner Transportrichtung erfüllt MDR1 in diesen Organen ganz unterschiedliche Aufgaben: Im Darm vermindert MDR1 durch den ins Darmlumen gerichteten Efflux die enterale Absorption von Arzneistoffen, in Leber und Niere verstärkt MDR1 die Arzneistoffausscheidung über Galle und Urin. Darüber hinaus vermindert MDR1 den Übertritt von Arzneistoffen über Blut-Gewebe-Schranken, insbesondere über die Blut-Hirn-Schranke (Fromm 2000, Schinkel 2001, Cascorbi 2011). Insgesamt kommt MDR1 damit eine protektive Rolle für den Organismus zu,

indem es für Fremdstoffe das Eindringen in den Organismus, insbesondere in das Gehirn, verhindert und die aktive Ausscheidung fördert (Schinkel 1997, Martinez et al. 2008).

#### 4.3 Der Ivermectin-sensitive Collie und der Defekt im MDR1-Gen des Hundes

Neben der eben geschilderten Bedeutung von MDR1 für den Transport von Fremdstoffen stellt sich jedoch die Frage, ob MDR1 auch physiologische Funktionen im Körper erfüllt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde in den frühen 1990er Jahren eine Knockout-Maus generiert, bei welcher zunächst nur das *mdr1a*-Gen der Maus und später beide *mdr1*-Gene, *mdr1a* und *mdr1b*, ausgeschaltet wurden (*mdr1a,b* Doppel-Knockout-Maus) (Schinkel et al. 1994, 1997). Trotz der bekanntermaßen breiten Gewebeverteilung von MDR1 führte dieser Knockout jedoch nicht zu einem Phänotyp hinsichtlich möglicher anatomischer, histologischer oder physiologischer Störungen. Die *mdr1* Knockout-Mäuse sind lebensfähig und fertil. Sie zeigen eine normale Lebensspanne. Einige der *mdr1a*(-/-) Knockout-Mäuse entwickelten jedoch unter *Spezifiziert Pathogen-Freien* (SPF) Haltungsbedingungen spontan entzündliche Veränderungen im Darmtrakt (Schinkel et al. 1997, Panwala et al. 1998). Dies wurde damit erklärt, dass bei Fehlen von MDR1 im Darmepithel eine verstärkte immunologische Antwort auf die normale bakterielle Darmflora entsteht (Panwala et al. 1998, Annese et al. 2006). Nach Infektion mit *Helicobacter bilis* wird die Entwicklung der Kolitis dabei noch beschleunigt und kann sich nach Koinfektion mit *Helicobacter hepaticus* und *Helicobacter bilis* sogar zu einer Dysplasie der Krypten entwickeln, was bei den *mdr1a*-intakten Mäusen nicht zu beobachten war (Maggio-Price et al. 2002, 2005).

Zu einem für die Veterinärmedizin ganz entscheidenden Befund kam es schließlich durch einen Zufall. Nach einer Milbeninfektion in der Tierhaltung der *mdr1a* Knockout-Mäuse wurde der Bestand routinemäßig mit einer Ivermectin-Lösung behandelt. Obwohl diese Behandlung von Mäusen normalerweise sehr gut vertragen wird, kam es zu einer gravierenden Vergiftung der homozygoten *mdr1a*(-/-) Knockout-Mäuse. Diese äußerte sich in paralytischen Symptomen wie Immobilität, Unfähigkeit sich aufzurichten, Abnahme der Atemfrequenz, Koma und schließlich Tod. In genaueren toxikologischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die homozygoten *mdr1a*(-/-) Knockout-Mäuse gegenüber Ivermectin 50- bis 100-fach empfindlicher sind als die *mdr1a*(+/+) Wildtyp-Mäuse ( $LD_{50} = 0,7-0,8$  mg/kg *versus* 50-60 mg/kg). Diese zunehmende Empfindlichkeit wurde begleitet von einer 87-fach

höheren Anreicherung von Ivermectin im Gehirn der Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ( $131 \pm 16$  ng/g versus  $1,5 \pm 1,2$  ng/g) (Schinkel et al. 1994, 1997). Durch diese Untersuchungen wurde eindeutig klar, dass die therapeutische Sicherheit von Ivermectin ganz entscheidend und kritisch von der funktionellen Expression von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke abhängig ist (Geyer und Janko 2012).

Diese Befunde rückten schließlich bereits zuvor in der Veterinärmedizin gemachte Beobachtungen in ein ganz neues Licht. So gab es bereits kurz nach der Einführung von Ivermectin als neues Antiparasitikum in der Veterinärmedizin verschiedene Berichte über eine dramatische Empfindlichkeit bestimmter Hunde, insbesondere Collies, auf diesen neuen Arzneistoff (Pulliam et al. 1985). Zu dieser Zeit war jedoch weder bekannt, dass MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke exprimiert wird, noch dass Ivermectin über diesen Arzneistofftransporter transportiert wird. Daher hat sich für dieses Phänomen die phänotypische Bezeichnung *Ivermectin-sensitiver Collie* (ISC) eingebürgert (Paul et al. 1987, Tranquilli et al. 1987). Auf Grundlage der von Schinkel et al. (1994) publizierten Befunde für die *mdr1* Knockout-Maus, lag nun aber die Vermutung nahe, dass diese *Ivermectin-sensitiven Collies* einen genetischen Defekt im MDR1-Gen haben könnten, welcher die funktionelle Expression von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke dramatisch beeinträchtigt.

Damit begann in der Veterinärmedizin die Suche nach einer möglichen Mutation im MDR1-Gen des Hundes. Eben diese wurde schließlich erstmals von Katrina Mealey am *College of Veterinary Medicine der Washington State University* identifiziert (Mealey et al. 2001) und später in weiteren Studien bestätigt (Roulet et al. 2003, Geyer et al. 2005a). Wenngleich es zu dieser Zeit bereits schon Hinweise darauf gab, dass neben dem Collie wahrscheinlich auch weitere Hunderassen von diesem Phänomen der Ivermectin-Sensitivität betroffen sind, war die Verbreitung in der Hundepopulation zunächst völlig unklar. Darüber hinaus bestand neben der bekannten Sensitivität gegenüber Ivermectin noch keine Vorstellung darüber, welche klinische Relevanz der entdeckte Gendefekt für den Hund hat. Diesen beiden Fragestellungen bin ich mit meinen Kolleginnen und Kollegen und später mit meiner eigenen Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie und Toxikologie seit dem Jahr 2003 nachgegangen. Die daraus in den letzten 8 Jahren entstandenen Ergebnisse und Daten sind in dieser Habilitationsschrift zusammengestellt.

#### 4.4 Sicherheit der Arzneitherapie bei Hunden mit MDR1-Gendefekt

Der MDR1-Gendefekt beim Hund betrifft eine 4-Basenpaardeletion (del4) an Nukleotid-Position nt230 des proteincodierenden Leserahmens (Mealey et al. 2001). Diese Deletion führt zu einem frühzeitigen Stopcodon, sodass von einem MDR1 nt230(del4) mutierten Allel kein funktioneller MDR1-Transporter mehr exprimiert werden kann. Entsprechend wird bei homozygoter Ausprägung ( $MDR1^{-/-}$ ) gar kein MDR1-Protein mehr gebildet und bei heterozygot betroffenen Hunden ( $MDR1^{+/-}$ ) ist die Expression entsprechend vermindert. Dadurch kann es im Vergleich zu MDR1-intakten Hunden ( $MDR1^{+/+}$ ) zu gravierenden Veränderungen in der Aufnahme, Ausscheidung und Gewebeverteilung von Arzneistoffen kommen. Die Aufnahme von Arzneistoffen aus dem Darm kann erhöht sein, die Ausscheidung über Leber und Niere dagegen eingeschränkt. Dies führt insgesamt dazu, dass  $MDR1^{-/-}$  Hunde bei einer verordneten Standarddosis eines Arzneistoffes unter Umständen unbewusst eine Überdosis erhalten (Geyer und Janko 2012). Darüber hinaus fehlt die wichtige Schutzfunktion von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke und den Vorläuferzellen des blutbildenden Systems. Daher muss bei  $MDR1^{-/-}$  Hunden unter der Therapie mit bestimmten Arzneistoffen mit einem vermehrten Auftreten toxischer Wirkungen auf Gehirn, Leber, Niere und das blutbildende System gerechnet werden (Mealey 2004, Petzinger und Moritz 2006, Martinez et al. 2008).

Dies trifft jedoch nicht zwangsläufig auf alle Arzneistoffe zu, welche durch MDR1 transportiert werden (hier als MDR1-Arzneistoffe bezeichnet). Vielmehr bedarf es für jeden Arzneistoff einer gesonderten Abwägung, welche das Ausmaß der Interaktion mit MDR1, die ggf. gewebespezifische Toxizität des Arzneistoffes und insbesondere dessen therapeutische Breite mit einbezieht. Diese Bewertung kann jedoch nur von wissenschaftlich und klinisch erfahrenen Fachleuten vorgenommen werden, was den Umgang mit dem MDR1-Gendefekt in der tierärztlichen Praxis häufig schwierig gestaltet. Hinzu kommt die unbefriedigende Situation, dass viele der MDR1-Arzneistoffe für die Anwendung am Hund bereits seit längerer Zeit zugelassen sind, ohne dass im Rahmen der Sicherheitsprüfung der MDR1-Gendefekt eine besondere Beachtung gefunden hätte.

Im Folgenden wird vor diesem Hintergrund die therapeutische Sicherheit bei Hunden mit MDR1-Defekt anhand von ausgewählten Arzneistoffgruppen besprochen (siehe 4.4.1-4.4.4). Es sei jedoch auch erwähnt, dass zwei weitere Besonderheiten bei Hunden mit MDR1-

Gendefekt auftreten, deren klinische Bedeutung allerdings noch nicht eindeutig geklärt ist. Dies betrifft zum einen Befunde, welche zeigen, dass *mdr1* Knockout-Mäuse altersabhängig prädisponiert für die Ausbildung entzündlicher Veränderungen im Darmtrakt sind (Panwala et al. 1998, Maggio-Price et al. 2002). Inwieweit Hunde mit homozygotem MDR1-Defekt ebenfalls vermehrt entzündliche Darmerkrankungen entwickeln, muss jedoch erst in klinischen Studien untersucht werden.

Ein weiterer Punkt betrifft die bekannte Interaktion verschiedener Steroide mit dem MDR1-Transporter. So wurden Cortisol, Aldosteron und Dexamethason bereits in den frühen 1990er Jahren mittels *in vitro* Studien als Substrate des MDR1-Transporters identifiziert (Ueda et al. 1992, Schinkel et al. 1995). Später haben Applikationsstudien an *mdr1* Knockout-Mäusen gezeigt, dass [<sup>3</sup>H]Cortisol, [<sup>3</sup>H]Kortikosteron, [<sup>3</sup>H]Aldosteron und auch [<sup>3</sup>H]Dexamethason im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine signifikant höhere Anreicherung im ZNS aufweisen (Schinkel et al. 1995, Uhr et al. 2002). Dies hat im Zuge der physiologischen Gegenregulation zur Folge, dass die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bei diesen *mdr1* Knockout-Mäusen herunterreguliert ist. So zeigen die *mdr1* Knockout-Mäuse signifikant niedrigere Plasmawerte für das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) und niedrigere morgendliche Plasmawerte für Kortikosteron im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Müller et al. 2003). Interessanterweise wurden an einer kleinen Gruppe von 7 Hunden (3 MDR1<sup>+/+</sup> und 4 MDR1<sup>-/-</sup>) ähnliche Befunde erhoben. Hierbei zeigten die MDR1<sup>-/-</sup> Hunde im Vergleich zu den MDR1<sup>+/+</sup> Hunden signifikant niedrigere Cortisol-Plasmawerte, sowohl basal als auch nach ACTH-Stimulation. Darüber hinaus waren nach Dexamethason-Gabe die Plasma-ACTH-Werte bei den MDR1<sup>-/-</sup> Hunden signifikant niedriger (Mealey et al. 2007). Auf Grundlage dieser Daten wird von den Autoren diskutiert, dass Hunde mit MDR1-Gendefekt eine eingeschränkte Möglichkeit haben, auf Stress adäquat zu reagieren. Diese Daten müssen jedoch zunächst an einem größeren Probandenkollektiv bestätigt werden, um eventuell eine Supplementation von Glucocorticoiden unter Stressbedingungen bei MDR1-defekten Hunden empfehlen zu können.

#### **4.4.1 Makrozyklische Laktone**

Arzneistoffe aus dieser Gruppe (Ivermectin, Doramectin, Selamectin, Moxidectin, Milbemycinoxim) werden beim Hund zur Therapie verschiedener parasitärer Erkrankungen

eingesetzt. Zu einer Aufnahme kann es aber auch im Rahmen der Entwurmung von Pferden mit hoch dosierten Präparaten kommen, welche bei Unachtsamkeit von Hunden aufgenommen werden. In beiden Fällen kommt es bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden zu gravierenden und zum Teil lebensbedrohlichen Vergiftungen (siehe **Publikationen ##9-10** im Anhang). Diesem Problembereich wurde ein separater Review-Artikel mit dem Titel *Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones* gewidmet, welcher im Anhang angefügt ist und auf welchen an dieser Stelle verwiesen wird (Geyer und Janko 2012, **Publikation #11**).

#### 4.4.2 Zytostatika

Wie oben bereits erwähnt, gehören viele Zytostatika zu den Substraten des MDR1-Transporters. Fehlt dieses Transportsystem, kommt es zu einer Veränderung in der Pharmakokinetik dieser Substanzen, insbesondere aber zu einer höheren Anreicherung im Darmepithel, den hämatopoetischen Stammzellen und dem Gehirn (Johnson et al. 2001). Bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden ist dies klinisch vor allem für Vincristin und Doxorubicin relevant, da beide Arzneistoffe in vielen Chemotherapie-Protokollen, z.B. zur Therapie des malignen Lymphoms enthalten sind (siehe Gramer et al. 2013, **Publikation #12** im Anhang). Zur Sicherheit der therapeutischen Anwendung von Vincristin und Doxorubicin bei Hunden mit MDR1-Gendefekt gibt es bisher nur begrenzte klinische Erfahrung. Generell muss mit einer Zunahme der Myelosuppression und gastrointestinalen Toxizität, bei Vincristin zusätzlich auch mit zentraler Neurotoxizität gerechnet werden. Daher steht die therapeutische Sicherheit etablierter Standardprotokolle mit Vincristin und Doxorubicin bei MDR1<sup>+/-</sup> und MDR1<sup>-/-</sup> Hunden in Frage (Mealey et al. 2003, 2008a, Krugman et al. 2012). Inwieweit eine Dosisreduktion für Vincristin und Doxorubicin bei diesen Hunden sinnvoll ist, wurde bisher nicht in klinischen Studien untersucht. Möglicherweise stellt Lomustin, welches nicht zu den MDR1-Arzneistoffen zählt, eine geeignete Alternative dar. In jedem Fall muss diesem Problem aber in der Veterinär-onkologie insoweit Rechnung getragen werden, dass für jeden Patienten aus einer für den MDR1-Defekt prädisponierten Rasse vor Chemotherapiebeginn der MDR1-Genotyp bestimmt wird.

#### 4.4.3 Opioide

Mit Hilfe von *in vitro* und *in vivo* Versuchen wurde gezeigt, dass auch die Opioide Morphin, Methadon, Fentanyl und Loperamid zu den MDR1-Arzneistoffen zählen (Schinkel et al. 1996, Henthorn et al. 1999, Thompson et al. 2000, Zong und Pollack 2000, Wandel et al. 2002). Dies hat zur Folge, dass die Gehirnpenetration von Opioiden durch die Effluxleistung von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke limitiert werden kann. Die Bedeutung dieses Effektes ist *in vivo* jedoch für die einzelnen Substanzen sehr unterschiedlich. Am deutlichsten ist dies im Falle des Loperamids zu sehen, welches aufgrund seiner peripheren Wirkung als wirkungsvolles Antidiarrhoikum eingesetzt wird (Immodium®) und in therapeutischer Dosierung eigentlich keine zentral-opioiden Effekte auslöst (Ericsson und Johnson 1990). Der Grund hierfür ist ein sehr effektiver MDR1-vermittelter Transport von Loperamid an der Blut-Hirn-Schranke. Dies zeigt sich durch einen etwa 6-fach höheren Gehirn/Plasma-Verteilungsquotienten für die *mdr1a*(-/-) Knockout-Maus im Vergleich zu ihrer Wildtyp-Kontrolle (Schinkel et al. 1996). Dabei zeigen Knockout-Mäuse typische Zeichen einer Opioid-Intoxikation wie Unbeweglichkeit oder kreisende Bewegungen, was bei den Wildtyp-Mäusen nicht zu beobachten ist. Entsprechendes wurde auch für MDR1<sup>-/-</sup> Hunde gezeigt, welche nach Gabe von Loperamid neurologische Haltungs- und Gangstörungen, ZNS-Depression, Hypersalivation, Desorientiertheit, Übererregbarkeit und Überempfindlichkeit gegenüber Geräuschen zeigten (Sartor et al. 2004, Mealey et al. 2008b). Diese Loperamid-Intoxikation bei Hunden mit MDR1-Defekt lässt sich durch Naloxon antagonisieren. Dies belegt, dass es sich tatsächlich um eine Intoxikation mit zentral-opioider Ursache handelt (eigene unveröffentlichte Daten, Hugnet et al. 1996).

Im Vergleich zu Loperamid hat MDR1 dagegen einen geringeren Einfluss auch die Gehirnpenetration von Morphin. So wurden nach intravenöser Applikation von [<sup>3</sup>H]Morphin im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nur etwa 1,7-fach höhere Konzentrationen im Gehirn von *mdr1a*(-/-) Knockout-Mäusen detektiert (Schinkel et al. 1995). Trotzdem hat MDR1 auf die durch Morphin ausgelöste Analgesie einen erheblichen Einfluss: Bei Versuchen an *mdr1* Knockout-Mäusen wurde gezeigt, dass Morphin bei Fehlen von MDR1 eine 4,6-fach stärkere und längere Analgesie auslöst als bei MDR1-intakten Kontrollmäusen (Thompson et al. 2000). Entsprechendes wurde auch für Methadon und Fentanyl gezeigt, welche bei den Knockout-Mäusen zu einer 3,6-fach bzw. 1,8-fach stärkeren Analgesie geführt haben.

Auf Grundlage dieser Arbeiten muss auch bei Hunden mit homozygotem MDR1-Defekt mit einer Zunahme der Gehirnpenetration und einer Zunahme der pharmakologischen Wirkungen der genannten Opiode gerechnet werden. Bisher existieren für diese Frage beim Hund jedoch keine klinischen Studien. Auch ist die Interaktion der in der Veterinärmedizin häufig eingesetzten Substanzen Butorphanol und Buprenorphin mit dem MDR1-Transporter bisher nicht ausreichend untersucht. Obwohl es für die in der Anästhesie verwendeten Opiode in therapeutischer Dosierung bisher keine eindeutigen Hinweise auf schwere Nebenwirkungen bei MDR1-defekten Hunden gegeben hat, bedarf deren Einsatz auf Grundlage der oben geschilderten Befunde bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden dennoch besonderer Sorgfalt und Überwachung. Klinisch ist in diesem Zusammenhang besonders die atemdepressive Wirkung der Opiode als kritisch zu bewerten.

#### 4.4.4 Emodepsid

Bei dem in dem Präparat Profender® enthaltenen Wirkstoff Emodepsid handelt es sich um ein halbsynthetisches Derivat des Pilzmetaboliten PF1022A. Die Ausgangssubstanz wurde erstmals 1990 aus dem Pilz *Mycelia sterilia* isoliert, welcher auf der in Japan beheimateten Pflanze *Camellia japonica* vorkommt. Emodepsid gehört zur Stoffgruppe der zyklischen Octadepsipeptide und besteht aus vier N-Methyl-L-Leucinen, zwei D-Laktat-Molekülen und zwei D-Phenyl-Laktat-Molekülen, an welche zwei zusätzliche Morpholinringe gekoppelt sind (Harder und von Samson-Himmelstjerna, 2002). Emodepsid hat als neues Anthelminthikum erst vor wenigen Jahren Einzug in die Veterinärmedizin genommen und ist gegen eine Vielzahl von Nematoden wirksam. In den Parasiten kommt es dabei zur Paralyse des Pharynx und der somatischen Muskulatur, zum Sistieren der Eiablage und zu verzögerter Entwicklung (Bull et al. 2007). Der exakte antiparasitäre Wirkungsmechanismus ist jedoch bis heute nicht eindeutig aufgeklärt (Harder et al. 2005, Dornetshuber et al. 2009, Mühlfeld et al. 2009, Verma et al. 2009).

Wie die Antiparasitika aus der Gruppe der Makrozyklischen Laktone, so gehört auch Emodepsid zu den Substraten des MDR1-Transporters (European Medicines Agency 2008). Dadurch kann die Substanz bei MDR1-intakten Hunden unter therapeutischen Bedingungen nur begrenzt in das ZNS eindringen; die therapeutische Breite ist entsprechend hoch. Allerdings verändert sich die Pharmakokinetik und Organverteilung von Emodepsid bei

Fehlen des MDR1-Transporters, wodurch die therapeutische Sicherheit bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden eingeschränkt ist.

Obwohl im Rahmen der Zulassung von Profender® an einer kleinen Versuchsgruppe MDR1-defekter Collies gezeigt wurde, dass die Anwendung bei empfohlener Applikation (in nüchternem Zustand) und Standarddosis sicher ist (European Medicines Agency 2008), kommt es bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden verschiedener Rassen in der tierärztlichen Praxis immer wieder zum Auftreten neurotoxischer Wirkungen nach Gabe von Profender® im Bereich der empfohlenen Dosierung (eigene unpublizierte Daten). Hierbei ist zu beachten, dass das Präparat als Retardformulierung hergestellt wird, aus welcher der Wirkstoff Emodepsid über mehrere Stunden langsam freigesetzt und resorbiert wird. Dies erfordert jedoch eine längere Fastenzeit (zum Beispiel über Nacht) vor der Eingabe der Tablette sowie einen weiteren Zeitraum von mindestens 4 Stunden nach der Eingabe, in welcher der Hund nicht gefüttert werden darf. Wird von diesem Schema abgewichen, kommt es zu einer schnelleren Freisetzung des Wirkstoffes und zu einem stärkeren Anfluten der Substanz im ZNS.

Es existieren aber auch schon Meldungen von neurotoxischen Nebenwirkungen bei der Anwendung an nüchternen MDR1<sup>-/-</sup> Hunden. Daher spielen für die therapeutische Sicherheit von Profender® vermutlich noch weitere Faktoren eine Rolle, wie z.B. die Konstitution des Hundes, der Körperfettanteil oder die Geschwindigkeit der Darmpassage. Die neurotoxische Wirkung von Profender® bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden wird in der tierärztlichen Praxis unterschiedlich beschrieben und reicht von Koordinationsstörungen, Muskelzittern und Krampfanfällen bis hin zu Verhaltensänderungen. Da der exakte Angriffspunkt von Emodepsid im ZNS des Hundes und damit der Mechanismus der Neurotoxizität nicht genau bekannt ist, steht kein spezifisches Antidot zur Verfügung. Die Therapie einer entsprechenden Intoxikation erfolgt daher rein Symptom-basiert.

## 5. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Arzneistofftransporter und Pharmakokinetik

In der Übersichtsarbeit *Drug transporters in pharmacokinetics* (Petzinger und Geyer 2006, **Publikation #1**) wird die Bedeutung von Arzneistofftransportern für die Organverteilung und Pharmakokinetik von Arzneistoffen beschrieben. Das bisher mit Phase I und Phase II etablierte Modell zum Arzneistoffmetabolismus wird dabei um eine Phase 0 und eine Phase IV für den Arzneistofftransport in eine Zelle und aus einer Zelle heraus ergänzt. Eine Phase III beschreibt dabei den gerichteten intrazellulären Transport von Arzneistoffen und deren Metaboliten in polarisierten Zellen. Der Artikel beleuchtet in einem historischen Abriss die Forschung zu Arzneistofftransportprozessen in der prä- und postgenomischen Ära. Die wichtigsten Arzneistofftransporterklassen des Phase 0 und Phase IV Transportes werden beschrieben sowie deren klinische Bedeutung für einen organselektiven Transport beleuchtet. Weiterhin wird auf die große Bedeutung von Mutationen und Polymorphismen in Arzneistofftransportern hingewiesen, wie sie in der vorliegenden Habilitationsschrift im Falle des MDR1-Transporters beim Hund beschrieben wird.

### 5.2 Nachweis der nt230(del4) MDR1-Mutation und Rasseprädisposition

Darstellung und Diskussion der Ergebnisse aus den Publikationen ##2-6

Wie in der Einleitung unter 4.3 dargestellt, bildeten die Beschreibung der Ivermectin-Sensitivität der *mdr1a(-/-)* Knockout-Maus durch Schinkel et al. (1994) und deren Korrelation mit der in der Veterinärmedizin schon länger bekannten Ivermectin-Sensitivität des Collies (Pulliam et al. 1985) die Grundlage für die Entdeckung des MDR1-Gendefektes beim Hund. Dieser wurde 2001 erstmals beschrieben und publiziert durch Katrina Mealey et al. vom *College of Veterinary Medicine der Washington State University*. Mealey und Kollegen nutzten hierfür eine bereits zuvor etablierte Population von Ivermectin-sensitiven Collies und nicht-sensitiven Collies (Fassler et al. 1991). Als Ivermectin-Sensitivität wurde bezeichnet, wenn Symptome wie Mydriasis, Ataxie, vermehrter Speichelfluss und

Depression nach Verabreichung von 120 µg/kg Ivermectin aufgetreten waren (Paul et al. 2000). Von diesen Collies wurden Blutproben gewonnen und zur RNA-Isolation genutzt.

Für die RT-PCR Amplifikation des kompletten MDR1-Leserahmens dieser Collies machten sich Mealey et al. den Umstand zu Nutze, dass die Autoren *Puel O, Lepage JF, Alvinerie M, Galtier P und Pineau T* bereits im Januar 1998 die Sequenz des kompletten MDR1-Transkripts eines Beagle Hundes aufgeklärt und in der *GenBank*-Datenbank unter der *Accession No.* AF045016 veröffentlicht hatten (Roulet et al. 2003). Diese MDR1-Sequenz nutzten Mealey et al. für die Ableitung von Primersequenzen, mit deren Hilfe sie in einer RT-PCR den MDR1-codierenden Leserahmen in vier überlappenden Fragmenten amplifizieren konnten. In dem ersten Fragment wurde dabei für alle untersuchten Ivermectin-sensitiven Collies an Nukleotidposition 294 eine 4-Basendeletion in homozygoter Ausprägung detektiert. Diese Deletion führt zu einem Verschieben des Leserahmens und resultiert schließlich in einem frühzeitigen Stopcodon. Dadurch bleiben von dem ursprünglich aus 1280 Aminosäuren bestehenden MDR1-Protein nur die 75 N-terminalen Aminosäuren erhalten, wobei bis zum Erreichen des Stopcodons noch 16 „Falschaminosäuren“ angehängt werden. Das MDR1-Protein ist damit erheblich trunziert und kann seine Transportfunktion nicht mehr erfüllen. Obwohl in dieser Studie nicht explizit überprüft, kann man auf Grundlage der Daten aus der *mdr1a(-/-)* Knockout-Maus (Schinkel et al. 1994) davon ausgehen, dass durch das Fehlen von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke der Hunde die Gehirnerpermeation von Ivermectin selbst bei niedriger Dosierung von 120 µg/kg zunimmt und die betroffenen Hunde hierdurch Ivermectin-sensitiv wurden (Mealey et al. 2001).

Obwohl von K. Mealey die offizielle Erstbeschreibung der 4-Basendeletion im MDR1-Gen stammt, wurde bereits 3 Jahre vorher von einer französischen Gruppe um Thierry Pineau die Sequenz des gesamten MDR1-Transkriptes eines Beagle Hundes aufgeklärt (GenBank Accession Nos. AF045016, 1998). Hierfür wurden Gewebeproben aus dem Colon verwendet, aus welchen in einer RT-PCR in vier überlappenden Fragmenten der komplette MDR1-Leserahmen amplifiziert und sequenziert wurde. Neben dem Beagle wurden auch Organproben zweier Ivermectin-sensitiver Collies untersucht. Auch für diese wurde die Sequenz des kompletten MDR1-Transkripts ermittelt. Die Ivermectin-Sensitivität wurde nach Verabreichung einer oralen Dosis von 150 µg/kg Körpergewicht festgestellt, wobei die Hunde die typischen Zeichen einer Ivermectin-Intoxikation (Ataxie, Depression, vermehrter

Speichelfluss, Mydriasis) zeigten (Roulet et al. 2003). Auch in dieser Studie wurde bei den Ivermectin-sensitiven Collies eine Deletion von vier Nukleotidbasen in Exon 4 des MDR1-Gens entdeckt. Die gesamte MDR1-Sequenz dieses Hundes wurde in der GenBank Datenbank unter der Accession No. AJ419568 veröffentlicht. Damit wurde in einer zweiten unabhängigen Untersuchung bestätigt, dass eine 4-Basendeletion im MDR1-Gen des Collies zu dem Phänotyp der Ivermectin-Sensitivität führt.

Jedoch blieben mit diesen Untersuchungen immer noch Fragen offen, welche im Folgenden skizziert werden sollen und welche im Rahmen der in dieser Habilitationsschrift enthaltenen Publikationen bearbeitet wurden. Wenngleich es zur Zeit der Entdeckung des MDR1-Gendefektes beim Collie bereits Hinweise darauf gab, dass weitere Hunderassen wie Border Collie, Shetland Sheepdog, Old English Sheepdog oder Australian Shepherd auch von dem Phänomen der Ivermectin-Sensitivität betroffen sind (Campbell und Benz 1984, Hadrick et al. 1995), war zunächst unbekannt, wieweit der MDR1-Gendefekt in der Hundepopulation verbreitet ist. Daher haben wir es uns seinerzeit zum Ziel gesetzt, verschiedene Hunderassen, welche eine genetische oder züchterische Verwandtschaft zum Collie aufweisen, systematisch auf das Vorkommen und die Häufigkeit des beschriebenen MDR1-Gendefektes zu untersuchen. Die Ergebnisse dazu sind in den **Publikationen #3 und #6** zusammengefasst.

Eine Grundlage für diese Untersuchungen bildete aber zunächst die Etablierung einer geeigneten Methode, mit welcher die 4-Basendeletion im MDR1-Gen eindeutig und zuverlässig nachgewiesen werden konnte und bei welcher zwischen den Genotypen *homozygot intakt* ( $MDR1^{+/+}$ ), *heterozygot defekt* ( $MDR1^{+/-}$ ) und *homozygot defekt* ( $MDR1^{-/-}$ ) unterschieden werden konnte. Wenngleich Roulet et al. (2003) im Zuge ihrer Untersuchungen bereits ein PCR-Primerpaar für die Genotypisierung vorgeschlagen haben, welches die Mutationsstelle umspannt und zur PCR-Amplifikation genomischer DNA geeignet sein sollte, stimmen die in dieser Arbeit angegebenen Größen der PCR-Amplifikate nicht mit den angegebenen Primersequenzen überein. Daher wurde im Rahmen von **Publikation #2** ein neues PCR-Protokoll etabliert, welches folgende Voraussetzungen erfüllen sollte: (I) Ausgehend von genomischer DNA sollten PCR-Fragmente unterschiedlicher Größe amplifiziert werden, welche in einem Polyacrylamidgel eindeutig aufgetrennt werden können; (II) es sollte die Bestimmung aller drei MDR1-Genotypen möglich sein und (III) das

Protokoll sollte auf alle zu untersuchenden Hunderassen anwendbar sein. Mit diesen Vorgaben wurde schließlich ein Primerpaar ausgewählt, welches die Mutationsstelle flankiert und in der PCR zur Amplifikation eines 138 bp Fragments von dem intakten MDR1-Allel und eines 134 bp Fragments von dem mutierten MDR1-Allel führt. In der nachfolgenden hochauflösende Elektrophorese in einem 6,5%-igen Polyacrylamidgel wurden beide PCR-Produkte sauber aufgetrennt und erlaubten die eindeutige Zuordnung der drei möglichen Genotypen  $MDR1^{+/+}$ ,  $MDR1^{+/-}$  und  $MDR1^{-/-}$  (Geyer et al. 2005a). Als Probenmaterial genügte eine EDTA-Vollblutprobe, von welcher 200  $\mu$ l zur Gewinnung genomischer DNA eingesetzt wurden. Die ersten Blutproben zur Methodenetablierung wurden aus der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen (Prof. Dr. Andreas Moritz) zur Verfügung gestellt. Später wurden über öffentliche Aufrufe in der Tagespresse und in verschiedenen Hundezeitschriften sowie durch die Präsenz auf Hundeausstellungen Hundebesitzer zur Einsendung von Blutproben aufgerufen. Der Fokus lag dabei neben dem Collie zunächst auf den Hunderassen Australian Shepherd, Shetland Sheepdog, Old English Sheepdog, Border Collie und Bearded Collie. Insgesamt wurden 1500 Hunde aus ganz Deutschland in diese erste Studie zur Rasseprädisposition aufgenommen. Die Ergebnisse zeigten, dass neben dem Collie auch die Rassen Australian Shepherd, Shetland Sheedog, Border Collie, Wäller und Old English Sheepdog, nicht jedoch der Bearded Collie, von dem MDR1-Gendefekt betroffen sind (Geyer et al. 2005b). Der Stand der Ergebnisse wurde auf der Homepage unseres Institutes, in verschiedenen Hunde- und Verbandszeitschriften (siehe 10. Anhang - Publikationen) sowie in **Publikation #3** veröffentlicht.

Zeitgleich zu unserer Studie wurde auch in den USA (Neff et al. 2004), Frankreich (Hugnet et al. 2004), Australien (Mealey et al. 2005) und Japan (Kawabata et al. 2005) die Rasseverteilung und Häufigkeit des MDR1-Gendefektes in der Hundepopulation untersucht. Dabei zeigte sich eine große Übereinstimmung in der Allelfrequenz für das mutierte MDR1-Allel beim Collie zwischen Deutschland (55%, n=578), USA (51%, n=161), Australien (56%, n=33), Frankreich (64%, n=25) und Japan (58%, n=12), was auf eine weltweit ähnliche Häufigkeit hindeutet. In einer groß angelegten Studie von Neff et al. (2004) wurden insgesamt mehr als 4.000 Hunde verschiedener Rassen untersucht und der MDR1-Gendefekt dabei neben den oben genannten Rassen auch bei dem English Shepherd, Longhaired Whippet, McNab und Silken Windhound identifiziert.

Die Nomenklatur der 4-Basendeletion im MDR1-Gen des Hundes ist in ihrer Entwicklung und Darstellung sehr uneinheitlich sowie von verschiedenen Sichtweisen und Interpretationen geprägt. Bei der Erstbeschreibung in den Publikationen von Mealey et al. (2001) und Roulet et al. (2003) wurde lediglich von einem *MDR1-defizienten Genotyp* und einer *4-Basendeletion* gesprochen, welche zu einem Verschieben des Leserahmens und einem vorzeitigen Abbrechen der Proteinsynthese bei Aminosäure 91 führt. Spätere Publikationen sprechen von einem *mutierten MDR1-Allel*, ohne dieses in der Namensgebung näher zu spezifizieren (Mealey et al. 2002; Hugnet et al. 2004). Dies hat für die MDR1-Genotypisierung in unserem Labor und für die Publikation unserer Daten schließlich folgende Fragen aufgeworfen: (I) Im MDR1-Gen des Menschen sind zahlreiche Polymorphismen beschrieben, welche sich in ihrer Nomenklatur an der Nukleotidposition im MDR1-Transkript orientieren; für viele von diesen wurde eine Korrelation mit klinischen Daten ermittelt (Kerb 2006). Wie wir heute wissen, existieren auch im MDR1-Gen des Hundes zahlreiche Polymorphismen, für welche die funktionelle Bedeutung teilweise noch unklar ist (Geyer und Janko 2012). Vor diesem Hintergrund schien es sinnvoll, nicht von einem mutierten MDR1-Allel im Allgemeinen zu sprechen, sondern die Lokalisation und Art der Mutation exakt zu benennen. (II) Bereits zu Beginn unserer Untersuchungen zum MDR1-Gendefekt haben wir eingesandte Blutproben genotypisiert und den Einsendern das Testergebnis in Form eines Befundes mitgeteilt. Um hierbei den durchgeführten Test bzw. die untersuchte Mutation genau spezifizieren zu können, war ebenfalls eine eindeutige Bezeichnung erforderlich. Diese Überlegungen haben uns schließlich dazu veranlasst, für die MDR1-Diagnostik in unserem Labor und die Publikation unserer Daten die Bezeichnung *nt230(del4) MDR1-Gendefekt* zu verwenden, wobei Nukleotid nt230 die Position der Mutation im MDR1-proteincodierenden Leserahmen anzeigt und (del4) die Deletion von 4-Basenpaaren an dieser Stelle. Diese Nomenklatur wurde dann bei allen **Publikationen ##2-6 und ##9-12** konsequent fortgeführt. Im Gegensatz dazu wurde die Nomenklatur von anderen Autoren mehrfach geändert. Diese reicht von *mutant MDR1 allele* (Mealey et al. 2002, 2005) über die Bezeichnungen *mdr1-1Δ/mdr1-1Δ* für den homozygot defekten Genotyp, *mdr1-1Δ/MDR1* für den heterozygoten Genotyp und *MDR1/MDR1* für den homozygot intakten Genotyp (Neff et al. 2004), bis hin zu der Bezeichnung ABCB1-1Δ mit einer Denomination der Genotypen als *ABCB1 wt/wt*, *ABCB1 mut/wt* und *ABCB1 mut/mut* (Mealey and Meurs 2008).

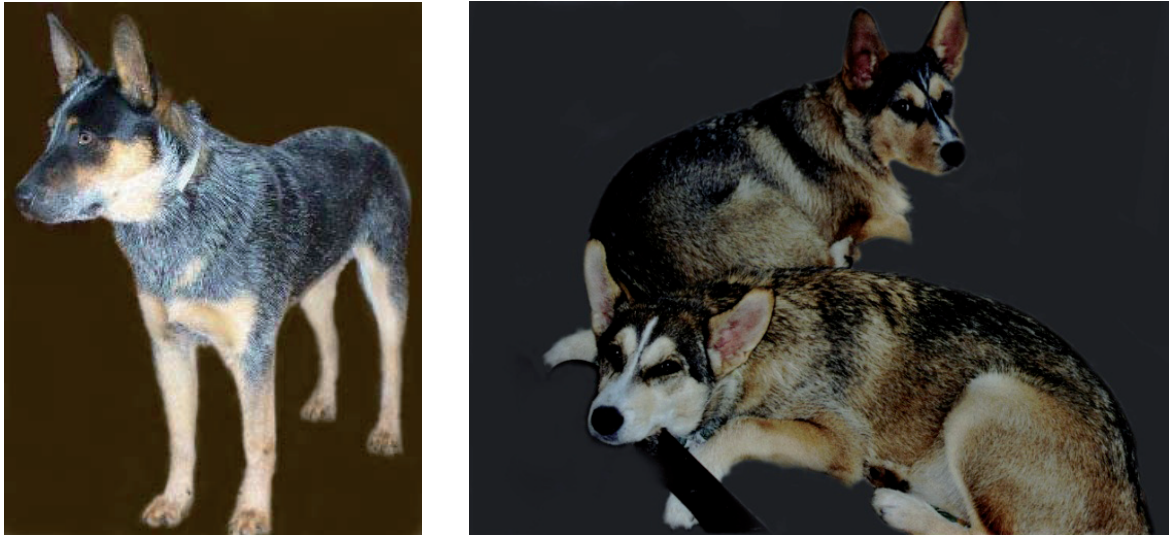
In der Zwischenzeit hatte sich aus der zunächst allein wissenschaftlich orientierten MDR1-Genotypisierung in unserem Labor eine kommerzielle diagnostische Leistung entwickelt. Diese wird seit 2007 für die Länder Deutschland, Österreich und Schweiz durch die TransMIT GmbH, Projektbereiche für pharmakogenetische Diagnostik PGvet, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie organisiert und angeboten (siehe [www.transmit.de/mdr1-defekt](http://www.transmit.de/mdr1-defekt)). Um im Rahmen der MDR1-Diagnostik eine Kontinuität in den ausgestellten Befunden zu gewährleisten, wurde unsere ursprüngliche Nomenklatur beibehalten.

Obwohl mit den oben genannten Publikationen der MDR1-Gendefekt schließlich bei zehn Hunderassen nachgewiesen wurde (Neff et al. 2004, Geyer et al. 2005b), traten und treten Ivermectin-Sensitivitäten vereinzelt auch bei Hunden anderer Rassen auf. Dies war zum Beispiel der Fall bei zwei Weißen (Schweizer) Schäferhunden (Berger Blanc Suisse), welche nach subkutaner Applikationen von Doramectin typische neurotoxische Vergiftungszeichen entwickelt haben. Die Hunde zeigten zunächst Bewegungs- und Koordinationsstörungen, Schluckbeschwerden und verändertes Verhalten und fielen nach einigen Stunden in einen komatösen Zustand. Erst nach mehreren Tagen intensivmedizinischer Therapie in einer Tierklinik verbesserte sich ihr Zustand wieder. Von beiden Hunden wurden Blutproben auf das Vorliegen des nt230(del4) MDR1-Gendefektes untersucht und beide Hunde zeigten den homozygot defekten MDR1<sup>-/-</sup> Genotyp. Da das Auftreten des MDR1-Gendefektes bis dato nicht beim Weißen Schäferhund bekannt war, wurden über Kontakte zu den einschlägigen Zuchtvereinen über 200 weitere Hunde dieser Rasse auf den MDR1-Gendefekt untersucht. Diese Untersuchungen, welche in **Publikation #4** beschrieben sind, ergaben eine relativ hohe Allelfrequenz für das mutierte MDR1(-) Allel von etwa 13%. Mit Hilfe von Mikrosatellitenanalysen konnte dann in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. O. Distl (Hannover) gezeigt werden, dass der beim Weißen Schäferhund auf dem MDR1(-) Allel zu findende Haplotyp dem beim Longhaired Whippet und Silken Windhound vorherrschenden Haplotyp am ähnlichsten ist, nicht jedoch dem des Collies. Dies lässt vermuten, dass der MDR1-Gendefekt des Weißen Schäferhundes ursprünglich von einem Windhund vererbt wurde und nicht von einem Hund mit direkter Collie-Abstammung (Geyer et al. 2007).

Nachdem sich gezeigt hatte, dass auch Hunderassen, welche äußerlich keine Verwandtschaft zum Collie erkennen lassen, von dem MDR1-Gendefekt betroffen sind, haben wir auch Hunderassen mit einer nachgewiesenen genetischen Verwandtschaft zum Collie

systematisch auf den MDR1-Gendefekt untersucht (**Publikation #6**). Die Grundlage hierfür bildeten u.a. Mikrosatellitenanalysen, welche 2004 von Parker et al. veröffentlicht wurden und für die Rassen Australian Kelpie, Australian Cattle Dog, Barsoi, Belgischer Schäferhund, Greyhound und Irish Wolfhound eine genetische Verwandtschaft zum Collie belegt haben. Für die Untersuchung dieser Rassen wurden einige der unter dem Dachverband des VDH züchtenden Rassehunde-Zuchtvereine kontaktiert und über die geplante Studie informiert. Jedem Rassehunde-Zuchtverein wurde dabei im Rahmen eines Kontingents die kostenlose Teilnahme an der Studie ermöglicht. Zusammen mit einer EDTA-Vollblutprobe musste dabei eine Kopie der Ahnentafel eingesandt werden. Bei den untersuchten Hunderassen Australian Kelpie (n=20), Greyhound (n=74), Barsoi (n=22), Irischer Wolfshund (n=36) und Belgischer Schäferhund (Groenendael und Tervueren, n=58) wurde der MDR1-Gendefekt allerdings nicht nachgewiesen (Gramer et al. 2011). Diese Daten wurden zusammen mit mehr als 7.000 weiteren MDR1-Genotypisierungsdaten in **Publikation #6** berichtet.

Eine besondere Situation ergab sich in dieser Studie für den Australian Cattle Dog. Für diese Rasse wurden 50 Rassehunde untersucht und der MDR1-Gendefekt bei keinem dieser Hunde nachgewiesen. Allerdings erreichte uns auch die Blutprobe eines Australian Cattle Dogs, welcher durch Bildmaterial eindeutig als solcher zu erkennen war (siehe Abbildung 7), allerdings keine Zuchtpapiere aufzuweisen hatte. Bei diesem Hund wurde das Vorliegen des nt230(del4) MDR1-Gendefektes auf einem Allel (MDR1<sup>+/-</sup>) nachgewiesen. Da aber für die tierärztliche Behandlung das äußere Erscheinungsbild eines Hundes entscheidend ist, um an eine Rasseprädisposition für den MDR1-Gendefekt zu denken, sollte der Australian Cattle Dog als eine möglicherweise betroffene Rasse behandelt werden.



**Abbildung 7: Links:** Australian Cattle Dog mit dem nt230(del4) Genotyp  $MDR1^{+/-}$ . Dieser Hund konnte seine Rassezugehörigkeit nicht mit Zuchtpapieren belegen, ist aber äußerlich als Australian Cattle Dog zu erkennen. **Rechts:** Huskies mit dem heterozygoten  $MDR1^{+/-}$  Genotyp, welche eine Ivermectin-Intoxikation überlebt haben. Drei weitere verwandte Tiere verstarben nach Ivermectin-Behandlung und hatten möglicherweise den homozygoten  $MDR1^{-/-}$  Genotyp.

Wie schon zuvor für den Weißen Schäferhund berichtet, wurde uns auch eine Reihenvergiftung von Huskies nach der Applikation von Ivermectin berichtet. Bei den betroffenen Tieren handelte es sich um Hunde aus einem aufgelösten Rennstall; Identitätsnachweise lagen allerdings nicht vor. Laut Besitzer wurden fünf untereinander verwandte Tiere mit einer unbekanntem Menge Ivermectin behandelt und zeigten daraufhin deutliche Symptome einer Neurotoxizität wie Apathie, Ataxie, vermehrter Speichelfluss und Koordinationsstörungen. Drei der Tiere verstarben trotz intensiver Therapie. Zwei der überlebenden Tiere wurden auf den  $MDR1$ -Gendefekt untersucht und zeigten den heterozygoten  $MDR1^{+/-}$  Genotyp. Bildmaterial, welches uns von diesen Hunden zur Verfügung steht, belegt eindeutig, dass es sich bei den untersuchten Hunden tatsächlich um Huskies handelt (siehe Abbildung 7). Damit muss auch bei Hunden dieser Rasse mit dem Auftreten des  $MDR1$ -Gendefektes gerechnet werden.

Als sich die  $MDR1$ -Diagnostik in den Folgejahren als diagnostische Routineleistung unseres Institutes etabliert hatte und das Probenaufkommen entsprechend gestiegen war, haben sich damit auch die Anforderungen an die molekulargenetische Diagnostik des  $MDR1$ -Gendefektes geändert. Dabei sollte die Diagnostik weitestgehend automatisiert werden und auf einen höheren Probenumsatz eingestellt werden. Erreicht wurde dies durch eine Umstellung des klassischen PCR-Verfahrens mit nachfolgender Gelelektrophorese hin zu

einem *real-time* PCR Verfahren, welches durch die Nutzung allelspezifischer fluoreszenzmarkierter Sonden eine *online* Detektion des MDR1-Genotyps bereits während des PCR-Laufes ermöglicht und eine höhere Sequenzspezifität gewährleistet (Klitzsch et al. 2009). Damit konnte nicht nur die zeit- und kostenintensive Analyse der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese eingespart werden, sondern die Diagnostik auch effizienter gestaltet werden. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotidprimer nicht in polymorphen Sequenzbereichen binden. So wurde der Polymorphismus A265G, welcher von den Genotypisierungsprimern früherer Studien erfasst wurde (Neff et al. 2004, Mealey et al. 2005, Geyer et al. 2005a) bewusst für die Primerhybridisierung ausgespart. Darüber hinaus wurde der gesamte Bereich der Primer- und Sondenhybridisierung bei mehr als 60 Hunden aus 25 verschiedenen Rassen sequenziert, um eine rassespezifische Sequenzvariation im Bereich der nt230(del4) MDR1-Mutation ausschließen zu können. Diese neue Methode, welche in **Publikation #5** beschrieben ist, wird in unserem Labor bereits seit über 4 Jahren zur Routinediagnostik mit hohem Probendurchsatz eingesetzt und hat sich bei der Genotypisierung von bisher mehr als 10.000 Proben sehr gut bewährt.

### 5.3 Pharmakokinetik und neurotoxisches Potenzial von Makrozyklischen Laktonen

Darstellung und Diskussion der Ergebnisse aus den Publikationen ##7-8

Wie in Einleitung II dieser Arbeit sowie in der Übersichtsarbeit Geyer und Janko (2012) (**Publikation #11** im Anhang) ausführlich beschrieben, hat der MDR1-Transporter in der Blut-Hirn-Schranke einen erheblichen Einfluss auf die Gehirnpermeation und damit die therapeutische Sicherheit von Ivermectin. Ein funktionelles MDR1 bildet sogar die zwingende Voraussetzung dafür, um Ivermectin mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg beim Hund überhaupt therapeutisch einsetzen zu können. So kommt es bei homozygot MDR1-defekten Hunden bereits bei dieser Dosierung zu lebensbedrohlichen Intoxikationen, welche von den betroffenen Hunden häufig nicht überlebt werden. Bei MDR1-intakten Hunden wird Ivermectin jedoch bei einem Vielfachen dieser Dosierung problemlos vertragen (Pulliam et al. 1985).

Zu Beginn unserer Untersuchungen zur Pharmakokinetik und dem neurotoxischen Potenzial Makrozyklischer Laktone (ML) war die Interaktion von Ivermectin mit dem MDR1-Transporter bereits gut dokumentiert. Insbesondere war bekannt, dass Ivermectin bei *mdr1a(-/-)* Knockout-Mäusen eine 87-fach höhere Anreicherung im Gehirn zeigte als bei *mdr1a(+/+)* Wildtyp-Mäusen (Schinkel et al. 1994). Dennoch blieben folgende Fragen offen:

1. Verändert sich die Plasmakinetik von Ivermectin bei Fehlen von MDR1?
2. Interagiert Ivermectin neben MDR1 auch mit anderen ABC-Transportern?
3. Kommt es bei Fehlen von MDR1 auch für andere ML wie Moxidectin, Milbemycinoxim oder Selamectin zu einer ähnlich hohen Anreicherung im Gehirn?
4. Wie lässt sich die unterschiedliche therapeutische Sicherheit verschiedener ML bei MDR1-defekten Hunden erklären und wie ist das neurotoxische Potenzial der verschiedenen Substanzen zu bewerten?

Diese Fragen wurden im Rahmen der Dissertationen von Frau Tierärztin Dr. Olga Gavrilova (Titel: Nutzung transgener Tiermodelle mit Transporterdefekten zur Analyse der hepatobiliären Elimination und Organverteilung von Arzneistoffen und Toxinen, 2008) und von Frau Tierärztin Christina Janko aufgegriffen und experimentell bearbeitet. Die erhaltenen Daten und Ergebnisse sind in den **Publikationen ##7-8** beschrieben. Weitere noch nicht veröffentlichte Daten werden im Text aufgeführt.

Makrozyklische Laktone bilden eine eigene pharmakologische Substanzklasse, deren Grundgerüst aus einem 16-gliedrigen Makrolidring besteht. Diese Substanzklasse beinhaltet unterschiedliche Stoffgruppen, welche antibakterielle (Makrolid-Antibiotika), antimykotische (fungistatische makrozyklische Polyene) oder antiparasitäre Wirkung (Endectocide) haben. Unter den veterinärmedizinisch bedeutsamen antiparasitären ML-Substanzen unterscheidet man zwei Gruppe: (I) Avermectine wie Ivermectin, Abamectin, Doramectin, Eprinomectin und Selamectin mit einem Zuckerrest an Position C<sub>13</sub> des Laktonrings sowie (II) Milbemycine wie Moxidectin, Milbemycin D und Milbemycinoxim, welche als Aglycone keinen Zuckerrest an Position C<sub>13</sub> des Laktonrings tragen. Während Avermectine erstmals aus dem in Japan vorkommenden Bodenorganismus *Streptomyces avermitilis* isoliert wurden, stammen die Milbemycine aus *Streptomyces hygroscopicus* und *Streptomyces cyanogriseus* (Campbell et al. 1983).

Obwohl der antiparasitäre Wirkungsmechanismus der Avermectine und Milbemycine intensiv untersucht wurde, ist dieser bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist aber, dass ML zelleinwärts gerichtete Chlorid-Ströme stimulieren, was im Parasiten zu einer Hyperpolarisation und funktioneller Paralyse führt (Turner und Schaeffer 1989). Eines der pharmakologischen Targets scheint ein Glutamat-gesteuerter Chloridkanal zu sein, welcher nur bei Invertebraten vorkommt (Cully et al. 1996, Jagannathan et al. 1999, Kane et al. 2000). Daneben können ML auch GABA-regulierte Chlorid-Kanäle aktivieren, welche nicht nur bei Parasiten, sondern auch im ZNS von Vertebraten verbreitet sind (Campbell 1981, Wang und Pong 1982, Sutherland und Campbell 1990). Diese GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind beim Vertebraten allerdings erheblich unempfindlicher als die entsprechenden Rezeptoren der Invertebraten (Shoop et al. 1995). Darüber hinaus gelangen ML im therapeutischen Dosisbereich kaum ins ZNS von Vertebraten, weil sie in der Blut-Hirn-Schranke von dem MDR1-Transporter erfasst und zurück ins Blut transportiert werden (Geyer und Janko 2012). Beide Faktoren tragen schließlich dazu bei, dass ML bei Vertebraten generell eine hohe therapeutische Breite und gute Verträglichkeit aufweisen (Pulliam und Preston 1989).

Die oben aufgeworfenen Fragen zur Organverteilung und dem neurotoxischen Potenzial einzelner ML-Substanzen lassen sich in der Spezies Hund nicht zufriedenstellend untersuchen. Daher haben wir für unsere Experimente auf verschiedene Mausmodelle zurückgegriffen, welche keinen funktionellen MDR1-Transporter in der Blut-Hirn-Schranke exprimieren. Hierbei muss darauf hingewiesen werden, dass bei der Maus, im Gegensatz zum Hund, zwei *mdr1*-Gene existieren, welche als *mdr1a* und *mdr1b* bezeichnet werden. Während bei der Maus das *mdr1b* vorwiegend in Nebenniere, Plazenta, Ovar und Uterus exprimiert wird, erfolgt die *mdr1a*-Expression im Gehirn (Schinkel et al. 1995, Schinkel 1997).

In **Publikation #7** wurden *mdr1a,b*(-/-) Doppel-Knockout-Mäuse verwendet, bei welchen über homologe Rekombination in Stammzellen zunächst das *mdr1a*-Gen und dann auch das *mdr1b*-Gen ausgeschaltet wurden (Schinkel et al. 1994, 1997). Als Vergleichsgruppe für diese Experimente dienten FVB-Wildtyp-Mäuse, welche den genetischen Hintergrund der *mdr1a,b* Knockout-Mäuse darstellen. An der *mdr1a*(-/-) Knockout-Maus wurde bereits 1994 durch Schinkel et al. die Gehirnpermeation von Ivermectin untersucht (siehe 4.3), während die *mdr1a,b* Doppel-Knockout-Maus damals nicht zur Verfügung stand und zuvor nicht für

Untersuchungen zur Pharmakokinetik und Organverteilung von ML herangezogen werden konnte.

In **Publikation #8** kam dagegen eine andere *mdr1a* defiziente CF1-Mauslinie zum Einsatz. Bei dieser Mauslinie ist es in der Vergangenheit spontan zu einer Retrovirus-Insertion im *mdr1a*-Gen gekommen, wodurch dieses nicht mehr funktionell exprimiert wird. Frühere Arbeiten an diesen Mäusen haben bereits eine Zunahme der Gehirnpermeation für Ivermectin und Avermectin gezeigt, verbunden mit einer dramatischen Zunahme der Neurotoxizität dieser Substanzen (Lankas et al. 1997, Umbenhauer et al. 1997, Kwei et al. 1999, Jun et al. 2000). Da für die Gehirnpermeation von ML und deren Neurotoxizität nur das *mdr1a*-Gen, nicht aber das *mdr1b*-Gen entscheidend ist, war es für diese Experimente nicht erforderlich mit der *mdr1a,b* Doppel-Knockout-Maus zu arbeiten.

Aus der klinischen Anwendung der ML Ivermectin, Moxidectin, Milbemycinoxim und Selamectin ist bereits bekannt, dass diese eine ganz unterschiedliche therapeutische Sicherheit bei MDR1-defekten Hunden haben. Eine Ursache hierfür wurde bisher noch nicht gefunden, jedoch soll der Mechanismus der Neurotoxizität beim Vertebraten für alle ML-Verbindungen identisch sein (Sigel und Baur 1987, Huang und Casida 1997, Dawson et al. 2000). Im direkten Vergleich der genannten Substanzen können bei MDR<sup>-/-</sup> Hunden mit folgenden oralen Dosierungen neurotoxische Symptome ausgelöst werden: mit  $\geq 0,1$  mg/kg Ivermectin (Paul et al. 1987, Tranquilli et al. 1987, Fassler et al. 1991),  $\geq 0,4$  mg/kg Moxidectin (Geyer et al. 2005a, Paul et al. 2000),  $\geq 5$  mg/kg Milbemycinoxim (Tranquilli et al. 1991) oder  $> 15$  mg/kg Selamectin (Bishop et al. 2000, Novotny et al. 2000). Diese großen substanzspezifischen Unterschiede in der therapeutischen Sicherheit bei MDR1-defekten Hunden könnten grundsätzlich zwei verschiedene Ursachen haben:

1. Die Substanzen könnten eine unterschiedliche Permeation über die Blut-Hirn-Schranke in Abwesenheit des MDR1-Transporters zeigen und damit unterschiedliche absolute Arzneistoffkonzentrationen im ZNS erreichen.
2. Die Substanzen könnten eine unterschiedliche Bindungsaffinität und/oder Aktivierbarkeit von Rezeptoren im ZNS von Vertebraten haben.

Um diese beiden Fragen zu beantworten, wurden im Rahmen der **Publikationen ##7-8** folgende Experimente durchgeführt:

1. Untersuchung der absoluten Arzneistoffkonzentration im ZNS bei *mdr1*-defekten und *mdr1*-intakten Mäusen nach Applikation von [<sup>3</sup>H]Ivermectin, [<sup>3</sup>H]Moxidectin, [<sup>3</sup>H]Milbemycinoxim und [<sup>3</sup>H]Selamectin. Die drei letztgenannten Verbindungen wurden uns von den Firmen BAYER, NOVARTIS und PFIZER zur Verfügung gestellt.
2. Vergleichende Quantifizierung des neurotoxischen Potenzials und Bestimmung von Toxizitätsäquivalenten Dosierungen.
3. Bestimmung der absoluten Arzneistoffkonzentrationen im Gehirn (toxische Schwellenkonzentration), bei welchen neurotoxische Symptome bei der *mdr1*-defekten Maus beobachtet werden können.

Diese Untersuchungen waren nicht nur von grundlagenwissenschaftlichem Interesse, sondern sind auch von großer klinischer Relevanz, da es bei der Verabreichung von Ivermectin und Doramectin zu gravierenden Vergiftungen bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden kommt (**Publikationen ##4,9-11** im Anhang). Betroffene Hunde müssen dabei über viele Tage intensivmedizinisch betreut werden und überleben diese Vergiftungen in vielen Fällen nicht. Darüber hinaus sind Hochdosis-Protokolle mit ML, welche bei der Therapie einer generalisierten Demodikose sehr wirkungsvoll sind, bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden kontraindiziert. Die hierfür verwendeten täglichen oralen Dosierungen von 0,3-0,6 mg/kg Ivermectin, 0,4 mg/kg Moxidectin oder 2 mg/kg Milbemycinoxim würden unweigerlich zu schweren Intoxikationen bei diesen Hunden führen (Müller und Bettenay 1999, Paul et al. 2004a, Heine et al. 2005).

In **Publikation #7** wurde untersucht, ob und in wie weit sich die Gehirnpermeation von Selamectin bei der *mdr1a,b(-/-)* Doppel-Knockout-Maus verändert. Da Selamectin in Form des Präparates Stronghold® für die spot-on Applikation beim Hund zugelassen ist, wurden Ivermectin und Selamectin vergleichend intravenös, peroral und spot-on appliziert. Dabei ergaben sich mehrere interessante Befunde. Unabhängig von der Applikationsart zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Plasmakinetik von Ivermectin und Selamectin zwischen den *mdr1*-defekten und *mdr1*-intakten Mäusen. Für beide Substanzen kam es aber bei Fehlen von MDR1 zu einer dramatischen Zunahme der Gehirnpermeation. So lagen bei den *mdr1a,b(-/-)* Mäusen die Arzneistoffkonzentrationen im Gehirn um den Faktor 36-60 für Ivermectin und 5-10 für Selamectin höher als bei den Kontrolltieren. Die absoluten Gehirnkonzentrationen waren aber nach spot-on Applikation deutlich niedriger als nach oraler Applikation, was die größere therapeutische Sicherheit der topischen Applikation für

ML erklärt (Paul et al. 2004a, 2004b, See et al. 2009). Da die Gehirnpermeation von Selamectin im Vergleich zu Ivermectin jedoch deutlich weniger von der MDR1-Expression beeinflusst wurde, kam die Hypothese auf, dass in der Blut-Hirn-Schranke noch weitere Effluxcarrier am Transport von Selamectin beteiligt sind. Einer der möglichen Kandidaten ist das *Breast Cancer Resistance Protein* BCRP, welches in den Gefäßendothelzellen im Gehirn stark exprimiert wird (Cooray et al. 2002, Hori et al. 2004, Soontornmalai et al. 2006). Da sich jedoch weder für Ivermectin, noch für Selamectin ein Unterschied in der Plasmakinetik und Organverteilung zwischen den *bcrp*(-/-) Knockout-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen gezeigt hat, scheint BCRP *in vivo* keine Bedeutung für den Transport beider ML-Substanzen zu haben.

Eine weitere interessante Beobachtung in dieser Studie war, dass Selamectin bei einer therapeutischen Applikationsdosis von 12 mg/kg im Gehirn der *mdr1*-defekten Mäuse Konzentrationen von > 3.000 ng/g erreicht. Bei MDR1-defekten Hunde ist bekannt, dass bei dieser Dosierung keine neurotoxischen Symptome zu erwarten sind (Bishop et al. 2000, Novotny et al. 2000). Im Gegensatz dazu erreichte Ivermectin in einer für MDR1-defekte Hunde toxischen Dosierung von 0,2 mg/kg gerade einmal Konzentrationen von etwa 100 ng/g im Gehirn. Dies lässt darauf schließen, dass Selamectin, im Vergleich zu Ivermectin, die für die Neurotoxizität relevanten ZNS-Rezeptoren weniger stark aktiviert oder an diese weniger affin bindet. Aus dieser Beobachtung ist schließlich die Hypothese erwachsen, dass eine durch Ivermectin ausgelöste Intoxikation möglicherweise durch einen Überschuss an Selamectin antagonisiert werden könnte. Dieser Hypothese lag die Annahme zu Grunde, dass beide Substanzen mit gleicher Affinität an die für die Neurotoxizität relevanten Rezeptoren im ZNS binden, Selamectin diese Rezeptoren aber weniger stark aktiviert, also eine geringere *intrinsic activity* aufweist als Ivermectin. Jedoch haben Studien auf dem Rotarod (siehe unten) gezeigt, dass Selamectin mit 3,5 mg/kg nicht in der Lage war, die durch 0,35 mg/kg Ivermectin ausgelöste Neurotoxizität zu antagonisieren. Damit hat sich die aufgestellte Hypothese als falsch bzw. nicht praktikabel herausgestellt.

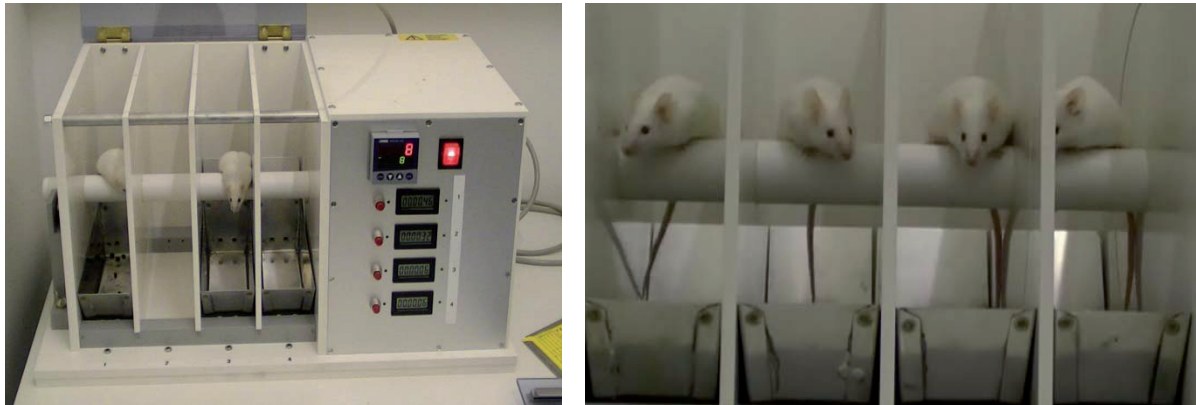
Eine systematischere Analyse des neurotoxischen Potenzials wurde für die Substanzen Moxidectin und Milbemycinoxim im Vergleich zu Ivermectin durchgeführt. Die Daten sind für alle drei Verbindungen in Abbildung 10 zusammengefasst. Die Daten für Ivermectin und Moxidectin sind auch in **Publikation #8** enthalten. Für diese Versuche wurde ein Rotarod-

Aufbau gewählt, in welchem die Mäuse über eine definierte Zeit auf einer rotierenden Walze laufen müssen (Abbildung 8). Dies erfordert von den Tieren ein hohes Maß an Koordinationsfähigkeit, welches durch ZNS-aktive Arzneistoffe leicht gestört werden kann (Dawson et al. 2000). Da zu den charakteristischen Initialsymptomen einer ML-Vergiftung die Ataxie gehört, wurde erwartet, dass unter dem toxischen Einfluss einer ML-Substanz die Laufperformance der Mäuse auf dem Rotarod signifikant beeinträchtigt ist. In der Tat ist es mit diesem Versuchsaufbau gelungen, die durch Ivermectin, Moxidectin und Milbemycinoxim ausgelöste Neurotoxizität zu quantifizieren, ohne dass die Mäuse bei den verwendeten Dosierungen in ihrem Allgemeinbefinden beeinträchtigt waren.

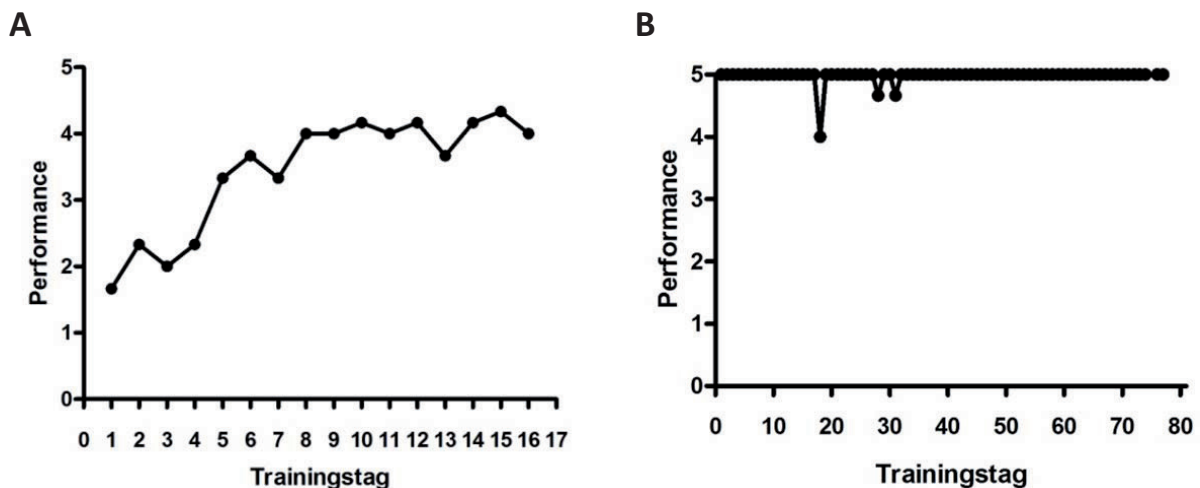
Bei dem Rotarod handelt es sich um eine Apparatur bei welcher 4 Mäuse gleichzeitig auf einer rotierenden Walze laufen können. Die 4 Laufplätze sind jeweils mit Trennwänden voneinander abgegrenzt, sodass die Mäuse sich nicht sehen und gegenseitig ablenken können (Abbildung 8). Die Walze wird elektrisch betrieben und kann in ihrer Geschwindigkeit gesteuert werden. In der Regel finden sowohl das Training als auch die Versuche bei einer Geschwindigkeit von 16 Umdrehungen pro Minute (rpm) statt. Die Laufdauer beträgt dabei maximal 3 x 2 Minuten. Fällt eine Maus von der Walze, wird sie in einer Schale unter dem Rotarod aufgefangen und die Zeit bis zum Herunterfallen wird über eine Lichtschranke automatisch quantifiziert. Der Abstand zur Schale ist so groß gewählt, dass die Mäuse weder herunter klettern können, noch sich beim Sturz verletzen.

Als Modelltiere für den MDR1-defekten Hund wurden für diese Versuche *mdr1a*-defiziente CF1-Mäuse verwendet, welche keine MDR1-Expression in der Blut-Hirn-Schranke aufweisen. Alle Mäuse mussten zunächst an den Versuchsablauf gewöhnt werden und langsam lernen, über eine definierte Zeit auf der Walze zu laufen. Die Dauer dieser ersten Anpassungsphase war von Maus zu Maus sehr unterschiedlich. Die CF1-Mäuse konnten erst für die Applikationsversuche verwendet werden, wenn sie über mindestens 10 Tage in der Lage waren, den geforderten Rotarod-Lauf von 2 Minuten bei 16 rpm ruhig und routiniert zu absolvieren. Mäuse, welche das Laufen auf dem Rotarod innerhalb von 8 Wochen nicht erlernt hatten, konnten nicht für die Applikationsversuche eingesetzt werden. Die Auswertung der Laufperformance erfolgte grafisch in Form einer Laufkurve (siehe Abbildung 9). Dabei entsprechen die Werte auf der x-Achse der Anzahl der Trainingstage und die Werte auf der y-Achse der erreichten Punktzahl (5: Laufen ohne Einschränkungen bis 0: Kein Laufen

möglich; weitere Details in **Publikation #8**).



**Abbildung 8:** Rotarod-Versuchsapparatur (Eigenbau) zur Messung des neurotoxischen Potenzials der Makrozyklischen Laktone Ivermectin, Moxidectin, Milbemycinoxim und Selamectin im Mausmodell.



**Abbildung 9:** Repräsentativer Kurvenverlauf der Laufperformance auf dem Rotarod für eine noch nicht auf der Apparatur antrainierte Maus (A) und für eine Maus nach erfolgreich absolvierter Trainingsphase (B). Nur Mäuse, welche über mindestens 10 Tage hinweg eine konstante Laufperformance gezeigt hatten, konnten für die Applikationsversuche genutzt werden. Daten aus der Dissertation von Frau Tierärztin Christina Janko.

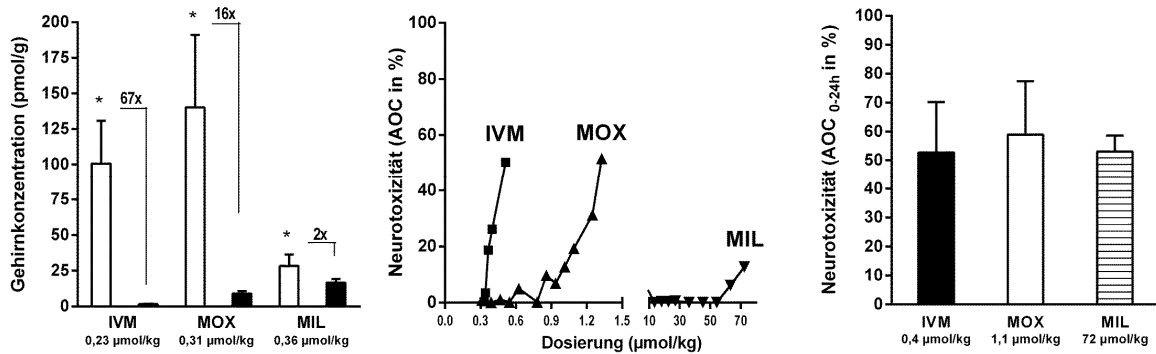
Die Versuche liefen in zwei Phasen ab. Zunächst sollte in Applikationsstudien mit [<sup>3</sup>H]Ivermectin, [<sup>3</sup>H]Moxidectin und [<sup>3</sup>H]Milbemycinoxim geklärt werden, ob die Unterschiede in der therapeutischen Sicherheit in einem unterschiedlichen Eindringvermögen in das ZNS begründet liegen. Hierfür wurden alle drei Substanzen mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg an *mdr1*-defekte und *mdr1*-intakte CF1-Mäuse appliziert und die absoluten Gehirnkonzentrationen nach 12 Stunden bestimmt. Aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes erfolgte diese Applikation nicht äquimolar, sondern

mit 0,23  $\mu\text{mol/kg}$  für Ivermectin, 0,31  $\mu\text{mol/kg}$  für Moxidectin und 0,36  $\mu\text{mol/kg}$  für Milbemycinoxim. Für Ivermectin und Moxidectin konnten bei den *mdr1*-defekten Mäusen vergleichbare Arzneistoffkonzentrationen im Gehirn gemessen werden. Milbemycinoxim zeigte bei Fehlen von MDR1 dagegen ein wesentlich geringeres Eindringvermögen in das ZNS, was wahrscheinlich zu der höheren therapeutischen Sicherheit bei MDR1-defekten Hunden beiträgt.

Bei den Neurotoxizitätsmessungen zeigte sich, dass Applikationen mit 0,4  $\mu\text{mol/kg}$  (0,35 mg/kg) Ivermectin, 1,1  $\mu\text{mol/kg}$  (0,7 mg/kg) Moxidectin und 72  $\mu\text{mol/kg}$  (40 mg/kg) Milbemycinoxim als toxizitätsäquivalent betrachtet werden können, zumindest in Hinblick auf die auf dem Rotarod quantifizierte Ataxie. Die toxische Schwelle für die Arzneistoffkonzentration im Gehirn, bei welcher die Neurotoxizität auf dem Rotarod quantifizierbar war, lag für die drei Substanzen bei  $< 0,1 \text{ nmol/g}$  für Ivermectin,  $\approx 0,35 \text{ nmol/g}$  für Moxidectin und  $\approx 30 \text{ nmol/g}$  für Milbemycinoxim.

Schlussfolgernd kann damit gesagt werden, dass Moxidectin in dem verwendeten Mausmodell bei ähnlichem Eindringvermögen in das ZNS etwa 2,8-fach weniger neurotoxisch wirkt als Ivermectin. Dies könnte an einer geringeren Affinität oder Aktivierung der für die Neurotoxizität relevanten ZNS-Rezeptoren liegen. Im Vergleich zu Ivermectin hat Milbemycinoxim bei Fehlen von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke ein wesentlich geringeres Eindringvermögen in das Gehirn. Die neurotoxische Wirkung für Milbemycinoxim ist erst bei etwa 200-fach höheren Dosierungen messbar und wird auch erst bei 300-fach höheren Arzneistoffkonzentrationen im ZNS erreicht. Vermutlich tragen beide Faktoren zu der höheren therapeutischen Sicherheit von Milbemycinoxim bei MDR1-defekten Hunden im Vergleich zu Ivermectin bei (Tranquilli et al. 1991, Bishop et al. 2000, Barbet et al. 2009). Aufgrund dieser Befunde muss die von vielen Autoren vertretene Auffassung, dass der Mechanismus der Neurotoxizität bei Vertebraten für alle ML identisch sei und alle ML eine gleiche Affinität an den ZNS-Rezeptoren haben in Frage gestellt werden (Shoop et al. 1995, Banks et al. 2000, Michael et al. 2001). Dies sollte in Rezeptorbindungsstudien weiter untersucht werden.

## Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 10:** Gehirnpermeation und neurotoxisches Potenzial der Makrozyklischen Laktone Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX) und Milbemycinoxim (MIL) bei *mdr1a*-defizienten CF1-Mäusen. Die Daten für IVM und MOX stammen aus **Publikation #8**, die Daten zu MIL aus der Dissertation von Frau Tierärztin Christina Janko. **(A)** IVM, MOX und MIL wurden mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg (entsprechend 0,23 µmol/kg für IVM, 0,31 µmol/kg für MOX und 0,36 µmol/kg für MIL) an *mdr1a*-defiziente CF1-Mäuse (weiße Balken) und *mdr1a*-intakte CF1-Mäuse (schwarze Balken) per oral appliziert. Die Arzneistoffkonzentrationen im Gehirn wurden nach 12 Stunden bestimmt. Bei Fehlen von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke bei den *mdr1a*-defizienten CF1-Mäusen kommt es für alle drei Substanzen zu einer signifikanten Zunahme der Gehirnpermeation im Vergleich zu den *mdr1a*-intakten Mäusen. Diese Zunahme fällt für IVM am deutlichsten aus (67-fach), gefolgt von MOX (16-fach) und MIL (2-fach). Während bei den *mdr1a*-defizienten Mäusen IVM und MOX vergleichbare Arzneistoffkonzentrationen im Gehirn erreichen, liegt die Gehirnpermeation für MIL deutlich niedriger. **(B)** Quantifizierung der Neurotoxizität von IVM, MOX und MIL bei *mdr1a*-defizienten CF1-Mäusen durch Messung der Laufperformance in einem Rotarod-Aufbau. Steigende Werte für die *area over the curve* (AOC) der Laufperformancekurve stehen dabei für eine Zunahme der neurotoxischen Wirkung (nähere Erläuterungen in **Publikation #8**). Die Toxizitätskurven für IVM und MOX verlaufen sehr steil. Die IVM-induzierte Neurotoxizität ist auf dem Rotarod ab Dosierungen von > 0,34 µmol/kg (> 0,3 mg/kg) quantifizierbar, für MOX ab > 0,78 µmol/kg (> 0,5 mg/kg). MIL erzeugt erst bei Dosierungen von > 54 µmol/kg (> 30 mg/kg) auf dem Rotarod quantifizierbare neurotoxische Symptome. **(C)** Applikationen an *mdr1a*-defiziente Mäuse mit 0,4 µmol/kg (0,35 mg/kg) IVM, 1,1 µmol/kg (0,7 mg/kg) MOX und 72 µmol/kg (40 mg/kg) zeigen eine vergleichbare Beeinträchtigung der Laufperformance auf dem Rotarod (AOC<sub>0-24h</sub> ≈ 50%) und können daher als neurotoxizitätsäquivalente Dosierungen angesehen werden.

## 5.4 Klinische Relevanz des MDR1-Gendefektes

Darstellung und Diskussion der Ergebnisse aus den Publikationen ##9-12

Obwohl bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden die sichere Anwendung einer ganzen Reihe von Arzneistoffen in Frage steht (siehe Kapitel 4.4), kommt es in der Praxis vor allem bei der Therapie parasitärer Erkrankungen mit **ML** sowie bei der Therapie von Tumorerkrankungen mit **Zytostatika** zu Problemen. Daher soll auf beide Bereiche in diesem Kapitel gesondert eingegangen werden, wobei eine Reihe von klinischen Fällen in den **Publikationen ##2,4,9-12** beschrieben sind.

In den zurückliegenden 8 Jahren wurden uns aus tierärztlichen Praxen und Kliniken sowie von Hundebesitzern zahlreiche Fälle von Vergiftungen mit Ivermectin, Doramectin oder Moxidectin bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden berichtet. Einige dieser Fälle wurden auch in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt und behandelt (siehe **Publikation #10**). Zu diesen iatrogenen Vergiftungsfällen kam es, meist unter unklarer Indikationsstellung, durch subkutane Applikationen von Doramectin mit 0,6-1,0 mg/kg (**Publikationen ##4,10-11**) oder Ivermectin (0,4 mg/kg) (**Publikation #11**) sowie nach oraler Applikation von 0,4 mg/kg Moxidectin (**Publikation #2**). Allerdings muss an dieser Stelle betont werden, dass keiner dieser Wirkstoffe in den genannten Dosierungen für die Anwendung am Hund zugelassen ist. Die Anwendung erfolgte im Zuge einer nicht fachgerechten Umwidmung von Präparaten aus dem Nutztierbereich (Dectomax<sup>®</sup>, Ivomec<sup>®</sup>, Cydectin<sup>®</sup>), unter grober Missachtung der bekannten ML-Sensitivität bei Hunden mit MDR1-Gendefekt. In allen genannten Fällen kam es zu gravierend verlaufenden Vergiftungen mit ausgeprägten neurotoxischen Symptomen, welche nicht in allen Fällen von den betroffenen Hunden überlebt wurden.

In **Publikation #2** wird über einen Australian Shepherd mit dem MDR1<sup>-/-</sup> Genotyp berichtet, welcher zur Therapie einer generalisierten Demodikose Moxidectin (Cydectin<sup>®</sup>) in steigender Dosierung erhalten hatte. Während eine orale Dosis von 0,1 mg/kg gut vertragen wurde, kam es bei der Zieldosis zur Therapie der Demodikose von 0,4 mg/kg (Wagner und Wendlberger 2000) zu Ataxie, kriechendem Gang und Übererregbarkeit. Innerhalb von 2 Tagen hatte sich der Zustand dieses Hundes jedoch wieder verbessert (Geyer et al. 2005a). Dieser Fall deckt sich mit früheren Untersuchungen, bei welchen Moxidectin mit einer

Dosierung von 3 µg/kg, eingesetzt zur Prophylaxe gegen eine *Dirofilaria-immitis*-Infektion (Herzwurmerkrankung) von MDR1<sup>-/-</sup> Hunden problemlos vertragen wurde und auch bei 30-facher Überdosierung (90 µg/kg) keine Vergiftung ausgelöst wurde (Paul et al. 2000). Ebenfalls sicher in der Anwendung bei MDR1-defekten Hunden ist Moxidectin in einer Formulierung aus 2,5% Moxidectin w/v und 10% Imidacloprid w/v (Advocate®, Advantage multi®) für die monatliche topische Anwendung (Paul et al. 2004a). Allerdings enthalten diese Präparate Warnhinweise, dass die orale Einnahme von nur 40% der für die topische Applikation vorgesehenen Menge (entsprechend 1 mg/kg) neurotoxische Symptome bei Hunden mit MDR1-Gendefekt hervorrufen kann (EMA 2009: Advocate, Scientific Discussion, CVMP/0297/03). Aus diesem Grund müssen für die Anwendung von Advocate® oder Advantage multi® bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden die Dosierungs- und Applikationsvorschriften exakt eingehalten werden, um Vergiftungen zu vermeiden. Für die orale Applikation darf Moxidectin nur zur Herzwurmprophylaxe mit 3 µg/kg (ProHeart®) verwendet werden, nicht jedoch in höherer Dosierung von 400 µg/kg, wie sie bei der Therapie der generalisierten Demodikose eingesetzt wird (Wagner und Wendlberger 2000).

In einigen weiteren Fällen wurde Doramectin (Dectomax®), welches lediglich für Rind, Schaf und Schwein therapeutisch zugelassen ist, bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden mit Dosierungen von 0,6-1,0 mg/kg angewendet (**Publikationen ##4,10,11**). Bei zwei Weißen Schäferhunden kam es dabei nach subkutaner Applikation von 0,7 mg/kg zu Visusverlust, Ataxie, Schläfrigkeit und übermäßigem Speicheln. Die Hunde waren über mehrere Tage nicht in der Lage zu stehen und eigenständig Nahrung und Flüssigkeit aufzunehmen. Erst 14 Tage nach Doramectin-Applikation waren beide Hunde wieder symptomfrei und konnten aus der Tierklinik entlassen werden (**Publikation #4**). In zwei weiteren Fällen erhielten ein Collie und ein Australian Shepherd, beide mit dem homozygot defekten MDR1<sup>-/-</sup> Genotyp, jeweils 1 mg/kg Doramectin subkutan. Beide Hunde entwickelten Ataxie, Tremor, Stupor und wurden komatös; sie verstarben schließlich trotz intensivmedizinischer Betreuung innerhalb von 5-6 Tagen. Eine pathologische Untersuchung ergab extrem hohe Doramectin-Konzentrationen im Gehirn von > 100 ng/g (**Publikation #11**).

Ein weiterer Fall einer Doramectin-Vergiftung wird in **Publikation #10** beschrieben. Ein Collie mit dem homozygoten MDR1<sup>-/-</sup> Genotyp erhielt 1 mg/kg Doramectin subkutan und entwickelte daraufhin Ataxie, Inkontinenz und Erbrechen. Nachdem sich der Zustand des

Hundes weiter verschlechtert hatte, wurde auf Grundlage der oben beschriebenen Fälle zunächst eine schlechte Prognose gestellt. Dann wurde jedoch über mehrere Tage eine Lipidinfusion durchgeführt (nähere Erläuterungen siehe unten), woraufhin sich der Zustand kontinuierlich verbesserte und der Hund schließlich nach 11 Tagen mit ungestörtem Allgemeinbefinden und nur geringgradiger Ataxie aus der Klinik entlassen werden konnte.

Doramectin wird in der tierärztlichen Praxis offensichtlich gerne als eine "billige" Alternative zu den für den Hund zugelassenen antiparasitären Präparaten verwendet. Dabei kommt es in dem üblichen Dosierungsbereich von 0,6-1,0 mg/kg bei MDR1<sup>-/-</sup> zwangsläufig zu schweren Intoxikation, welche auch lebensbedrohlich verlaufen können. Die Anwendung von Doramectin bei Hunden mit MDR1-Gendefekt ist daher streng kontraindiziert.

Neben diesen iatrogenen Intoxikationen von MDR1<sup>-/-</sup> Hunden mit ML, kommt es auch immer wieder zu gravierenden Vergiftungen bei der unbewussten und unbeabsichtigten Aufnahme entsprechender Präparate im Rahmen der Entwurmung von Pferden. Einige dieser Fälle sind in den **Publikationen ##9-11** dokumentiert.

Im Herbst, wenn die Weidesaison zu Ende geht und die Pferde aufgestallt werden, wird üblicherweise eine Wurmkur gegen Magendassel-Larven mit Ivermectin oder Moxidectin durchgeführt. Dabei kommen hochdosierte Präparate zum Einsatz, welche den Pferden in Pasten- oder Tablettenform verabreicht werden (siehe Tabelle 2). Bei unsachgemäßer Anwendung, unverschlossenen Verpackungen oder Präparateresten, welche in der Box zurückbleiben, kann es leicht zu einer Aufnahme durch Hunde kommen. Ob sich daraus eine Vergiftung mit neurotoxischer Symptomatik entwickelt, ist entscheidend von dem MDR1-Genotyp des Hundes und der absolut aufgenommenen Wirkstoffmenge abhängig (Linek et al. 2007). Aus einer großen Fülle von Fallberichten und Studien über Vergiftungen mit Ivermectin beim Hund (**siehe Publikation #11**) lassen sich Dosierungen ableiten, bei welchen in Abhängigkeit von dem MDR1-Genotyp mit dem Auftreten von Vergiftungserscheinungen nach Aufnahme von Ivermectin gerechnet werden muss (siehe Tabelle 3).

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 2:** Ivermectin- und Moxidectin-haltige Präparate für die Entwurmung von Pferden.

Präparatename*	Inhaltsstoff(e)	Darreichungsform	Dosierung (mg/g Paste bzw. mg/Tablette)*	Gesamtmenge/ Handelsform*
Animec Paste	Ivermectin	Paste	18,7 mg IVM	120 mg IVM/Applikator
Diapec P Gel	Ivermectin	Paste	18,7 mg IVM	120 mg IVM/Applikator
Equimax Gel	Ivermectin + Praziquantel	Paste	18,7 mg IVM + 140,3 mg PQT	120 mg IVM/Applikator 900 mg PQT/Applikator
Equimax Tabs	Ivermectin + Praziquantel	Tabletten	20 mg IVM + 150 mg PQT	160 mg IVM/8 Stück 1200 mg PQT/8 Stück
Eqvalan duo	Ivermectin + Praziquantel	Paste	15,5 mg IVM + 77,5 mg PQT	120 mg IVM/Applikator 600 mg PQT/Applikator
Eraquell	Ivermectin	Paste	18,7 mg IVM	120 mg IVM/Applikator
Eraquell Tabs	Ivermectin	Tabletten	20 mg IVM	160 mg IVM/8 Stück
Furexel	Ivermectin	Paste	18,7 mg IVM	120 mg IVM/Applikator
Furexel Combi	Ivermectin + Praziquantel	Paste	15,5 mg IVM + 77,5 mg PQT	120 mg IVM/Applikator 600 mg PQT/Applikator
Hippomectin	Ivermectin	Paste	12 mg IVM	120 mg IVM/Applikator
Ivomec P	Ivermectin	Paste	18,7 mg IVM	120 mg IVM/Applikator
Paramectin Pferd	Ivermectin	Paste	18,7 mg IVM	120 mg IVM/Applikator
Vectin	Ivermectin	Tabletten	22,75 mg IVM	160 mg IVM/7 Stück
Equest Orales Gel	Moxidectin	Paste	18,92 mg MOX	218 mg MOX/Applikator
Equest Pramox	Moxidectin + Praziquantel	Paste	19,5 mg MOX + 121,7 mg PQT	230 mg MOX/Applikator 1437 mg PQT/Applikator

IVM=Ivermectin, PQT=Praziquantel, MOX=Moxidectin. \*Alle Angaben ohne Gewähr.

**Tabelle 3:** Aufgenommene Mengen an Ivermectin in mg/kg Körpergewicht, welche in Abhängigkeit von dem MDR1-Genotyp zu leichten oder schweren Vergiftungssymptomen führen. Die Angaben wurden aus dem Übersichtsartikel Geyer und Janko 2012 (**Publikation #11**) abgeleitet.

MDR1-Genotyp	Leichte Vergiftungssymptome (Mydriasis, Ataxie)	Schwere Vergiftungssymptome (Krämpfe, Koma, Tod)
MDR1 <sup>+/+</sup>	≥ 2,5 mg/kg	≥ 40 mg/kg (LD <sub>50</sub> ≈ 80 mg/kg)
MDR1 <sup>+/-</sup>	≥ 1 mg/kg	≥ 5 mg/kg
MDR1 <sup>-/-</sup>	≥ 0,1 mg/kg	≥ 0,15 mg/kg (LD <sub>50</sub> ≈ 0,25 mg/kg)

Kommt es bei einem Hund in zeitlichem Zusammenhang zu der Entwurmung eines Pferdes mit Ivermectin- oder Moxidectin-haltigen Präparaten zum Auftreten von Ataxie, Sehstörungen oder Mydriasis, muss differenzialdiagnostisch an eine ML-Vergiftung gedacht werden. Dies gilt unabhängig von der Rasse des Hundes und unabhängig vom MDR1-

Genstatus (siehe **Publikation #9**). Für die Therapie und Prognose der Vergiftung ist es aber von großer Bedeutung, den MDR1-Genotyp des Hundes bestimmen zu lassen und die aufgenommene Substanzmenge so genau wie möglich zu ermitteln. Letzteres ist in der Praxis jedoch häufig schwierig. Für Hunde mit MDR1-Gendefekt stellen insbesondere die neueren Präparate in Tablettenform wie Equimax Tabs®, Eraquell Tabs® oder Vectin® eine besondere Gefährdung dar. So kann bereits die Aufnahme einer einzigen Tablette mit 20 mg bei MDR1<sup>+/-</sup> Hunden leichte Vergiftungssymptome hervorrufen bzw. ist für MDR1<sup>-/-</sup> Hunde sogar tödlich.

Um die geschilderten Probleme zu umgehen, sollten Hunde grundsätzlich von der Pferde-Entwurmung ferngehalten werden. Bei Hunden, welche aufgrund ihrer Rasse für den MDR1-Gendefekt prädisponiert sind, empfiehlt sich sogar eine vorsorgliche Bestimmung des MDR1-Genotyps, wenn sich der Hund häufiger in der Nähe eines Pferdestalls aufhält. MDR1<sup>-/-</sup> Hunde sind in diesem Fall unter besonderer Beobachtung zu halten.

ML-Vergiftungen bei MDR1-defekten Hunden sind durch eine massive zentrale Depression gekennzeichnet. Diese liegt pharmakologisch in der agonistischen Wirkung der ML an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im ZNS begründet, wie dies auch für viele Narkotika bekannt ist. Besonders kritisch sind in dieser Situation die lang anhaltende ZNS-Depression und die Beeinträchtigung der Magendarmmotorik bei zeitweise aussetzendem Schluckreflex zu bewerten, welche zu Sekundärkomplikationen führen können. Da kein spezifisches Antidot für eine ML-Vergiftung bekannt ist, bleibt die Behandlung auf symptomatische, intensivmedizinische Maßnahmen beschränkt (Geyer und Janko 2012). Nach oraler Aufnahme oder Verabreichung der Substanz zielt diese Therapie zunächst auf eine Verminderung der intestinalen Absorption z.B. durch die Eingabe von Aktivkohle ab. Um eine Verminderung der Magensäuresekretion und somit einen gewissen Schutz des Magens zu erreichen, ist die Gabe eines Protonenpumpenblockers wie z.B. Omeprazol oder Pantoprazol angezeigt. Darüber hinaus hat sich die Gabe von Physostigmin bewährt, wobei es, trotz der dokumentierten kurzfristigen klinischen Besserung, weder zu einer schnelleren Rekonvaleszenz noch zu einer Verbesserung der Prognose kommt (Tranquilli et al. 1987, Nelson et al. 2003).

Stimuliert durch vielversprechende Berichte aus der Humanmedizin, in welchen die Infusion einer Sojabohnenöl-in-Wasser-Emulsion (Intralipid®, Lipofundin®, 10-20%) genutzt wurde um Intoxikationen mit lipophilen Arzneistoffen zu therapieren (Weinberg 2006), kam es auch in der Veterinärmedizin vereinzelt zum Einsatz einer Lipidinfusion zur Therapie von ML-Vergiftungen (Clarke et al. 2011, Crandell und Weinberg 2009, Pritchard 2010). Allerdings wurden die bisherigen Therapieversuche an MDR1-intakten Tieren durchgeführt, bei welchen auch ohne Therapie mit einer raschen Verbesserung der Symptomatik gerechnet werden muss (Geyer und Janko 2012). In **Publikation #10** wird dagegen der Einsatz einer Lipidinfusion bei zwei homozygot MDR1-defekten Hunden beschrieben, welche jeweils mit gravierenden Intoxikationen durch Ivermectin bzw. Doramectin in der Kleintierklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt wurden. In beiden Fällen wurde ein langfristig angelegtes Infusionsprotokoll angewendet, welches aus einer Bolusinjektion mit 4 ml/kg einer 10%-igen Lipidemulsion, gefolgt von einer Infusion mit 1,5-2 ml/kg/h über vier Stunden bestand. Dieses Schema wurde über drei bis fünf Tage wiederholt. Mit dieser Maßnahme konnte, unter Berücksichtigung der bisherigen klinischen Erfahrung in derartigen Vergiftungsfällen, eine positive Wirkung auf den Schweregrad und den Verlauf der ML-Intoxikation erzielt werden. Daher kann der Einsatz einer Lipidinfusion zur Therapie einer ML-Vergiftung empfohlen werden.

Neben der Therapie mit ML hat der MDR1-Genstatus auch bei der Therapie von Tumorerkrankungen mit **Zytostatika** eine erhebliche Bedeutung. So zählen Vincristin und Doxorubicin, welche beim Hund vorwiegend zur Therapie des malignen Lymphoms eingesetzt werden, zu den klassischen MDR1-Substraten (Ambudkar et al. 1999, Sarkadi et al. 2006). Da der MDR1-Transporter im Darmepithel und den hämatopoetischen Stammzellen die Aufgabe hat, zytotoxische Substanzen am Eindringen in diese empfindlichen Gewebe zu hindern, dürfen Zytostatika nicht unkritisch bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden angewendet werden. In kleineren Studien wurde bereits dokumentiert, dass gerade beim Einsatz von Vincristin und Doxorubicin mit einer Zunahme der Myelosuppression und gastrointestinalen Toxizität, bei Vincristin zusätzlich auch mit zentraler Neurotoxizität gerechnet werden muss (Mealey et al. 2003, 2008a, Krugman et al. 2012).

Auf der anderen Seite ist MDR1 ein wichtiger bekannter Faktor, welcher zur Ausbildung einer *multidrug resistance* (MDR) von Tumoren führen kann (Gottesman et al. 2002). Hierzu

kann es kommen, wenn die Expression von MDR1 in den Tumorzellen hochreguliert wird und so der Zugang der Zytostatika in die Tumorzellen vermindert wird (Cordon-Cardo et al. 1990).

In der Dissertation von Frau Tierärztin Dr. Irina Gramer wurden diese beiden Problembereiche aufgegriffen und an einem Patientenkollektiv von insgesamt 27 Lymphompatienten die Expression von MDR1 vor Beginn und während der Chemotherapie untersucht sowie das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und der klinische Verlauf dokumentiert (siehe **Publikation #12**). Der klinische Teil dieser Arbeit wurde in der Tierklinik Hofheim in Kooperation mit Dr. Martin Kessler durchgeführt, während der experimentelle Teil am Institut für Pharmakologie und Toxikologie erfolgte. Aufgrund der geringen Patientenzahl ist diese Studie als eine Pilotstudie zu werten, sodass alle Ergebnisse noch an einem größeren Patientenkollektiv überprüft bzw. bestätigt werden müssen. Nichtsdestotrotz wurde eine Reihe interessanter Befunde erhoben, welche hier stichpunktartig wiedergegeben werden sollen:

1. Das basale MDR1-Expressionsniveau scheint mit der Verträglichkeit der Chemotherapie zu korrelieren. So zeigten in dieser Studie alle Hunde, bei welchen nach Zytostatikagabe toxische Effekte auf das blutbildende System und den Gastrointestinaltrakt aufgetreten waren, zu Beginn der Chemotherapie signifikant niedrigere MDR1-Expressionswerte als Hunde, welche die Therapie gut vertragen haben. Dieser Befund lässt sich dadurch erklären, dass der MDR1-Effluxtransporter gerade in den hämatopoetischen Stammzellen und dem Darmepithel das Eindringen der zytotoxischen Arzneistoffe verhindert (Gottesman et al. 2002).

2. Eine weitere mögliche Ursache für das vermehrte Auftreten von toxischen Wirkungen wäre die Expression eines polymorphen MDR1-Transporters, welcher keine volle oder gar keine Transportfunktion aufweist (Kerb 2006). In der vorliegenden Studie wurde bei einer Gruppe von 18 Hunden die Gesamtsequenz von MDR1 bestimmt und dabei verschiedene Polymorphismen identifiziert, welche zu einem Aminosäureaustausch führen. Da jedoch keiner dieser Polymorphismen bei den Hunden mit toxischen Arzneimittelwirkungen dominierte, wurden diese Polymorphismen nicht weiter funktionell untersucht.

3. Begleitend zur Chemotherapie wurde bei 15 Hunden auch die MDR1-Expression über das gesamte Chemotherapieprotokoll verfolgt. Hierbei entwickelten Hunde mit einem mindestens doppelten Anstieg der MDR1-Expression über den Therapieverlauf eine klinisch manifeste Arzneistoffresistenz, während die Therapie bei Hunden mit unveränderten MDR1-Expressionswerten in den meisten Fällen angesprochen hat.

Damit lässt sich schlussfolgern, dass sowohl die Untersuchung der basalen MDR1-Expression als auch die Untersuchung des MDR1-Expressionsverlaufs unter einem Chemotherapieprotokoll sinnvoll sein können, um das Auftreten von toxischen Arzneimittelwirkungen oder das Auftreten einer Therapieresistenz frühzeitig voraussagen zu können.

## 6. Nachbemerkungen und Ausblicke

Die internationale Forschung zum MDR1-Gendefekt beim Hund hat sich in den letzten Jahren schwerpunktmäßig mit Fragen der molekulargenetischen Diagnostik und Rasseverteilung und nur in begrenztem Umfang mit Fragen der klinischen Relevanz und der Sicherheit von Arzneistoffen bei MDR1-defekten Hunden beschäftigt. Hier gibt es aber insbesondere in zwei Bereichen noch erheblichen Forschungsbedarf. So ist zum einen für viele Arzneistoffe, welche beim Hund therapeutisch angewendet werden, noch gar nicht geklärt, ob diese mit dem MDR1-Transporter interagieren oder nicht. Darüber hinaus wurde für die allermeisten MDR1-Substrate bisher lediglich ein Transport über MDR1 von Maus, Ratte oder Mensch gezeigt, nicht jedoch für das MDR1-Transportsystem des Hundes. Zum anderen fehlen für eine ganze Reihe kritischer MDR1-Arzneistoffe, welche zum Teil sogar für die Anwendung am Hund zugelassen sind, Daten über die Verträglichkeit bei MDR1-defekten Hunden. Entsprechende Daten können nur in kontrollierten klinischen Studien erhoben werden, was nicht zuletzt wegen der großen Anzahl zu testender Arzneistoffe erhebliche Aufwendungen erfordern würde. Mangels entsprechender Daten können aktuell nur vorläufige Empfehlungen für die sichere Anwendung von bekanntermaßen über MDR1 transportierte Arzneistoffe gegeben werden; ein Zustand der sowohl in der tierärztlichen Praxis als auch von Seiten der Forschung als äußerst unbefriedigend zu bewerten ist.

Neben diesem hier nur kurz angerissenen Forschungsbedarf zur Sicherheit der Arzneitherapie bei MDR1-defekten Hunden, ergeben sich im „Umfeld“ um den einzigen derzeit bekannten nt230(del4) MDR1-Gendefekt in der Veterinärmedizin eine ganze Reihe weiterer relevanter Fragen. Diese basieren im Wesentlichen auf der Erkenntnis, dass bei Mensch und Tier die therapeutische Sicherheit Makrozyklischer Laktone wie Ivermectin ganz entscheidend, wenn nicht gar allesentscheidend von der MDR1-Transportaktivität in der Blut-Hirn-Schranke abhängt (siehe **Publikation #11**). Es ist aber bereits bekannt, dass einige Hunde mit homozygot intaktem nt230(del4) MDR1-Allel eine auffallende Empfindlichkeit gegenüber Ivermectin zeigen. Ähnliches gilt für einzelne Katzen sowie für einige Vogel- und Reptilienarten. Darüber hinaus scheinen Jungtiere (z.B. Fohlen) empfindlicher auf Ivermectin zu reagieren als ausgewachsene Tiere. In einer Reihe von Forschungsprojekten versuchen wir zu ermitteln, ob auch diese genannten Ivermectin-Sensitivitäten auf einer Störung in der

MDR1-Transportfunktion oder auf einer verminderten MDR1-Expression in der Blut-Hirn-Schranke beruhen. Einige dieser Projekte sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

### **6.1 Weitere Polymorphismen im MDR1-Gen des Hundes**

Obwohl für den nt230(del4) MDR1-Gendefekt eine klare Korrelation mit der Verträglichkeit von ML und Zytostatika hergestellt werden konnte (Mealey et al. 2008a, Geyer und Janko 2012), gibt es zahlreiche Hinweise aus der Klinik, dass auch nt230(del4) MDR1-intakte Hunde eine ausgeprägte Arzneistoffsensitivität gegenüber beiden Arzneistoffgruppen aufweisen können (Müller und Bettenay 1999, Bissonnette et al. 2009, **Publikation #12**, eigene unveröffentlichte Daten). In den Dissertationen von Frau Tierärztin Dr. Irina Gramer und Frau Tierärztin Jasmin Kranz wurden Hunde mit entsprechenden Arzneistoffsensitivitäten systematisch auf das Auftreten von Polymorphismen untersucht. Dabei wurden mehr als 15 Polymorphismen auf Proteinebene identifiziert, welche noch nicht alle funktionell überprüft wurden. Auf Grundlage einer bioinformatischen Bewertung lassen einige davon eine Beeinträchtigung der MDR1-Transportfunktion erwarten. Damit hätten auch diese Polymorphismen erwartungsgemäß eine klinische Relevanz für die Arzneistoffverträglichkeit.

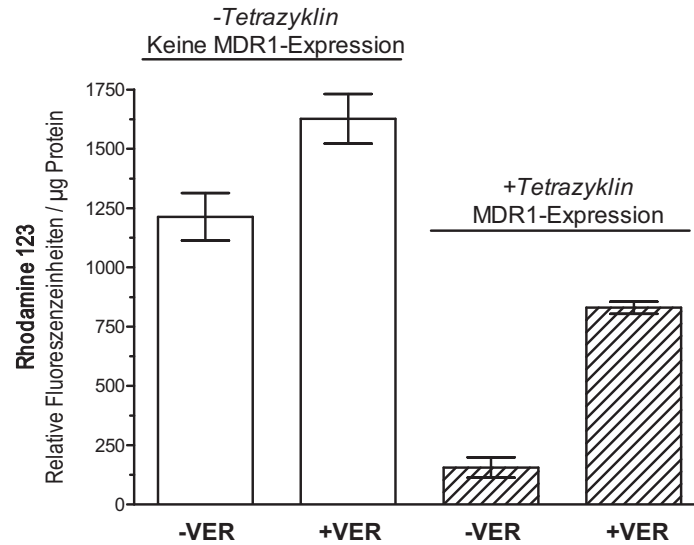
### **6.2 Polymorphismen im MDR1-Gen der Katze und Ivermectin-Sensitivität**

Vergleichbar mit der Ivermectin-Sensitivität bei MDR1-defekten Hunden existieren auch für die Katze Fallbeschreibungen über neurologische Störungen nach der Anwendung von Arzneistoffen aus der Gruppe der Makrozyklischen Laktone. Es wird vermutet, dass auch bei diesen Einzeltieren Polymorphismen im MDR1-Gen vorkommen, welche zu einer verminderten Expression oder zu einer herabgesetzten Transportfunktion von MDR1 führen. Um dies näher untersuchen zu können, musste zunächst eine zuverlässige Gesamtsequenz für das MDR1 der Katze ermittelt werden, was im Rahmen der Dissertation von Frau Tierärztin Jasmin Kranz gelungen ist. Mittlerweile liegt uns eine MDR1-Konsensussequenz für die Hauskatze vor, welche aus 15 Einzeltieren ohne Anzeichen einer Arzneistoffsensitivität ermittelt wurde und bereits in der NCBI/EBI/DDBJ Datenbank unter der Accession No. GU222365 (Kranz J & Geyer J 2009: Felis catus ATP-binding cassette carrier B1 (ABCB1) mRNA, complete cds) registriert ist. Das MDR1 der Katze zeigt mit 94% Sequenzidentität auf

Proteinebene die größte Ähnlichkeit zu dem MDR1 des Hundes, jedoch eine größere Distanz zu dem bisher funktionell am besten untersuchten MDR1 der Maus.

Um die Transportfunktion und Arzneistoffinteraktion für das MDR1 der Katze untersuchen zu können, wurde bereits eine stabile HEK293-Zelllinie generiert, welche nach Behandlung mit Tetrazyklin den MDR1-Transporter in der Zellmembran exprimiert. Dieser MDR1-Transporter der Katze ist, wie dies zuvor schon für MDR1 von Mensch, Ratte und Maus bekannt war, in der Lage, den fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin 123 aus der Zelle auszuschleusen (siehe Abbildung 11). Damit können wir nun erstmals die Funktion des MDR1-Transporters der Katze in einem *in vitro* Modell darstellen. Behandelt man diese Zellen nun mit dem bekannten MDR1-Substrat und -Inhibitor Verapamil, wird der Effluxtransport von Rhodamin 123 signifikant gehemmt. Über diesen anerkannten MDR1-Transportassay wird die Interaktion eines Arzneistoffes mit dem MDR1-Transport untersucht, was für das MDR1 der Katze nun möglich ist.

Nach Etablierung der Wildtyp MDR1-Sequenz der Katze und eines Assays zur Untersuchung der Transportfunktion, wurde bereits damit begonnen, die gesamten MDR1-Sequenzen von einzelnen Katzen zu bestimmen, welche durch Sensitivitäten gegenüber Ivermectin, Milbemyxinoxim oder Moxidectin in der tierärztlichen Praxis aufgefallen sind. Bei diesen Sequenzierungen wurden auch einzelne SNPs identifiziert, welche sich in einem Aminosäureaustausch im MDR1-Transportprotein äußern. In dem eben bereits dargestellten Rhodamin 123 Efflux-Assay sollen diese polymorphen Sequenzen nun auf ihre Funktionalität untersucht werden, wobei die Wildtyp MDR1-Sequenz der Katze als Positivkontrolle verwendet wird.

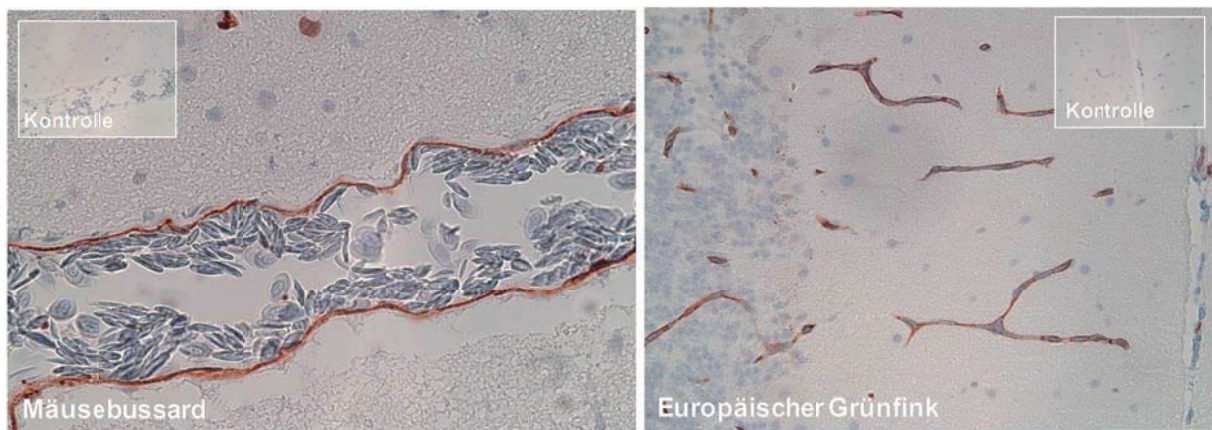


**Abbildung 11:** HEK293-Zellen wurden stabil mit dem MDR1-Konstrukt der Hauskatze transfiziert. Die MDR1-Expression ist in diesen Zellen durch Behandlung mit Tetrazyklin induzierbar. Die Zellen wurden mit 30 µM des fluoreszierenden MDR1-Substrats Rhodamine 123 inkubiert. Eine geringe intrazelluläre Fluoreszenz (dargestellt auf der y-Achse) deutet auf eine hohe MDR1-Effluxleistung hin. Nach Induktion der MDR1-Expression durch Tetrazyklin nimmt die intrazelluläre Fluoreszenz dramatisch ab, was die funktionelle Expression des Katzen-MDR1 belegt. Durch Zugabe des pharmakologischen MDR1-Inhibitors Verapamil (VER) kann der Rhodamin 123 Efflux teilweise blockiert werden. Mit diesem Zellmodell kann erstmals die Interaktion von Arzneistoffen mit dem MDR1-Transporter der Katze untersucht werden. Darüber hinaus kann mit der Expression polymorpher MDR1-Proteine die funktionelle Relevanz einzelner Polymorphismen untersucht werden. Der gezeigte Versuch wurde von den Tierärztinnen Jasmin Kranz und Luise Charlotte Straehle durchgeführt.

### 6.3 Ivermectin-Sensitivität und MDR1-Expression bei Vögeln und Reptilien

Eine ausgeprägte Sensitivität gegenüber Ivermectin ist nicht nur für einzelne Hunde und Katzen bekannt, sondern kommt auch bei bestimmten Vogelarten, wie z.B. dem Dompfaff und dem Stieglitz vor. Bei diesen Vogelarten löst Ivermectin bereits in therapeutischer Dosierung gravierende neurotoxische Symptome aus (Crichlow et al. 1986, Kummerfeld und Schäfer-Nolte 1987, Lierz 2001). Andere Vogelarten wie Falken oder Hühner sind dagegen vergleichsweise unempfindlich gegenüber Ivermectin. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese Ivermectin empfindlichen Vogelarten (I) entweder keinen MDR1-Transporter in der Blut-Hirn-Schranke bilden oder (II) MDR1 bei diesen Vogelarten nicht funktionell aktiv ist. Um dies näher zu untersuchen, wurde im Rahmen der Dissertation von Frau Tierärztin Luise Charlotte Straehle an unserem Institut in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Michael Lierz von

der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische Gehirnproben verschiedener Vogelarten gewonnen und für die RNA-Extraktion und immunhistochemische Untersuchungen genutzt. Aus Gehirn-RNA des Dompfaffs konnte bereits ein Gesamt-MDR1-Transkript von 3870 bp kloniert werden, welches für ein Protein mit 1289 Aminosäuren codiert. Dieses zeigt 86,1% Sequenzidentität zum MDR1-Protein des Huhns und 72,8% Sequenzidentität zum MDR1 des Menschen. In der Immunhistochemie zeigte sich mit einem MDR1-spezifischen Antikörper (C219) eine Anfärbung der Endothelien von Gehirnkapillaren, wie dies auch für das MDR1 bei Säugetieren bekannt ist (siehe Abbildung 12). Noch unklar ist allerdings, ob MDR1 beim Dompfaff auch funktionell aktiv ist, was in zellbasierten Assays weiter untersucht werden soll (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 12:** Immunhistochemische Anfärbung von MDR1 mit dem Antikörper C219 in Gehirnschnitten bei Mäusebussard und Europäischem Grünfink. Die Expression ist in der apikalen Domäne der Gefäßendothelzellen lokalisiert. Kontrollschnitte wurden ohne ersten Antikörper behandelt. Abbildung aus dem Poster "Ivermectin-Sensitivität und MDR1 Expression bei Vögeln" von den Autoren LC Straehle, M Lierz, E Petzinger & J Geyer, vorgestellt auf dem DVG Vet-Congress 2011 in Berlin.

#### 6.4 Ontogenese der MDR1-Expression beim Fohlen

Neben den oben bereits beschriebenen Polymorphismen in der MDR1-Sequenz existiert noch ein weiterer Mechanismus, über welchen die MDR1-Transportfunktion in der Blut-Hirnschranke herabgesetzt sein kann. So wurde gezeigt, dass neugeborene Mäuse bei Geburt ein noch sehr niedriges MDR1-Expressionsniveau aufweisen und die Expression erst in den ersten Lebenswochen auf einen Plateauwert ansteigt (Pinto et al. 2005, Goralski et al. 2006). Diese verzögerte Hochregulation der MDR1-Genexpression *post partum* ist in der Veterinärmedizin von großer klinischer Bedeutung. Dies gilt insbesondere für Pferde bzw.

Fohlen für welche zahlreiche Ivermectin- und Moxidectin-haltige Präparate therapeutisch zugelassen sind (vgl. Tabelle 2). Aus diesem Grund kommt es mitunter auch zum Einsatz dieser Arzneistoffe bei Fohlen in den ersten Lebenswochen. Obwohl ein entsprechender Warnhinweis im Beipackzettel fehlt, wissen wir aus klinischer Erfahrung, dass Fohlen in den ersten Lebenswochen eine schlechte Verträglichkeit für Ivermectin aufweisen. In einem konkreten Fall, welcher im Jahr 2006 in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgestellt wurde, kam es nach Applikation von Ivermectin bei einem 8 Tage alten Fohlen in therapeutischer Dosierung (0,2 mg/kg) zu einer gravierenden Intoxikation mit neurologischen Ausfallerscheinungen, wie man sie von iatrogenen Ivermectin-Intoxikationen von MDR1<sup>-/-</sup> Hunden kennt. Das betroffene Fohlen musste mehrere Tage intensivmedizinisch behandelt werden, erholte sich dann aber innerhalb von 1 Woche und konnte entlassen werden. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Axel Wehrend (Leiter obiger Klinik) hat Frau Tierärztin Jasmin Kranz bereits zahlreiche Gehirnproben von Fohlen verschiedenen Alters und Vergleichsproben von ausgewachsenen Pferden gewonnen. Diese sollen zu einer quantitativen Expressionsbestimmung mittels *real-time* PCR genutzt werden. In Vorbereitung dieser Analysen musste jedoch zunächst die MDR1-Sequenz des Pferdes ermittelt werden, was inzwischen erfolgt ist.

## 7. Zusammenfassung

Die Pharmakogenetik untersucht, inwieweit Variationen in Genen, welche die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Prozesse eines Arzneistoffes kontrollieren für die interindividuellen Unterschiede in der Arzneistoffwirkung oder dem vermehrten Auftreten unerwünschter Arzneistoffwirkungen verantwortlich sind.

Die pharmakogenetische Forschung hat in der Humanmedizin in den vergangenen 10-20 Jahren große Fortschritte erzielt, wobei die auf eine personalisierte Medizin ausgerichtete Berücksichtigung genetischer Variabilitäten bisher nur in wenigen Fällen fest in den klinischen Alltag integriert wurde. Trotz des enormen Zuwachses an genetischen Informationen für die Haus- und Nutztiere in den letzten Jahren, steckt die Pharmakogenetik in der Veterinärmedizin noch in den Kinderschuhen. Dabei ist der Grad der interindividuellen Variabilität für Tierspezies genauso hoch zu bewerten wie für den Menschen. Darüber hinaus hat die Pharmakogenetik in der Veterinärmedizin ein noch viel größeres Aufgabenfeld zu betrachten, welches auch spezies- und rassespezifische Besonderheit in der Wirksamkeit und Verträglichkeit von Arzneistoffen beinhaltet.

Als ein prominentes Beispiel für die Bedeutung der Pharmakogenetik in der Veterinärmedizin wurde im Rahmen der vorliegenden Habilitationsschrift der MDR1-Gendefekt beim Hund untersucht. Hierbei handelt es sich um eine 4-Basendeletion im MDR1-Gen, welche in homozygoter Ausprägung zu einem kompletten Funktionsverlust des MDR1-Arzneistofftransporters führt. Da dieser insbesondere in der Blut-Hirn-Schranke von Bedeutung ist, um die Penetration lipophiler Arzneistoffe in das Gehirn zu blockieren, kommt es bei Hunden mit homozygotem MDR1-Gendefekt zum Auftreten einer multiplen Arzneistoffüberempfindlichkeit. Diese äußert sich z.B. bei der Applikation von 0,2 mg/kg Ivermectin in einer lebensbedrohlichen Intoxikation mit neurologischen Symptomen wie Ataxie, ZNS-Depression, Stupor und Koma.

Im Rahmen dieser Habilitationsschrift wurden neue PCR-basierte Verfahren etabliert, welche heute in der molekulargenetischen Routinediagnostik eingesetzt werden. Systematische Untersuchungen der Hundepopulation auf das Vorkommen und die Häufigkeit des MDR1-Gendefektes haben gezeigt, dass weltweit mehr als 10 Hunderassen mit unterschiedlicher Häufigkeit (Allelfrequenz in %) betroffen sind: Collie (55-57%), Longhaired Whippet (42%),

Shetland Sheepdog (7-35%), Mini Australian Shepherd (20-26%), Silken Windhound (18%), McNab (17%), Australian Shepherd (17-46%), Wäller (17-19%), Weißer Schäferhund (14%), Old English Sheepdog (1-11%), English Shepherd (7%), Deutscher Schäferhund (6%), Border Collie (1-2%). Darüber hinaus sind Mischlingshunde von dem MDR1-Gendefekt betroffen, selbst wenn sie keinerlei Ähnlichkeit zu einer der genannten Rassen erkennen lassen.

In der vorliegenden Arbeit werden einige Fälle beschrieben, bei welchen Hunde mit homozygotem MDR1-Gendefekt gravierende Arzneistoffvergiftungen erlitten haben. Dabei wurden z.B. die Makrozyklischen Laktone Ivermectin, Doramectin oder Moxidectin entweder therapeutisch angewendet oder im Rahmen der Pferde-Entwurmung von den Hunden aufgenommen. Derzeit steht kein spezifisches Antidot für diese Vergiftung zur Verfügung. Therapeutisch hat sich aber neben einer symptom-basierten Therapie die Infusion einer Lipidemulsion über mehrere Tage als günstig erwiesen.

Aus der Klinik ist bekannt, dass Ivermectin, Moxidectin, Milbemycinoxim und Selamectin bei Hunden mit MDR1-Gendefekt in ganz unterschiedlichen Dosierungen neurotoxische Symptome auslösen. Dies wurde in Versuchen an *mdr1*-defizienten Mäusen experimentell näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass Moxidectin bei gleichem Eindringvermögen in das Gehirn ein etwa 3-fach geringeres neurotoxisches Potenzial aufweist als Ivermectin. Milbemycinoxim zeigte dagegen nur eine geringe Permeation ins Gehirn und hat im Vergleich zu Ivermectin ein 200-fach geringeres neurotoxisches Potenzial. Selamectin gelangt bei *mdr1*-defizienten Mäusen zwar signifikant mehr in das Gehirn, löst aber bei der Maus bis zu einer Dosierung von 40 mg/kg keine neurotoxischen Symptome aus.

Hunde mit MDR1-Gendefekt zeigen auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika wie Vincristin und Doxorubicin, welche beim Hund z.B. zur Therapie des malignen Lymphoms eingesetzt werden. Aber auch bei Hunden mit einem niedrigen basalen MDR1-Expressionsniveau steigt während der Chemotherapie die toxische Wirkung auf das blutbildende System und den Gastrointestinaltrakt an.

Neben den genannten Arzneistoffgruppen steht bei Hunden mit MDR1-Gendefekt die therapeutische Sicherheit von zahlreichen weiteren Arzneistoffen in Frage. Dies muss in Zukunft in kontrollierten klinischen Studien weiter untersucht werden.

## 8. Literaturverzeichnis

- Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G (2009) Structure of P-Glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323 (5922):1718-1722
- Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:361-398
- Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A (2006) Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 12 (23):3636-3644
- Banks BJ, Bishop BF, Evans NA, Gibson SP, Goudie AC, Gration KA, Pacey MS, Perry DA, Witty MJ (2000) Avermectins and flea control: structure-activity relationships and the selection of selamectin for development as an endectocide for companion animals. *Bioorg Med Chem* 8:2017-2025
- Barbet JL, Snook T, Gay JM, Mealey KL (2009) ABCB1-1 Delta (MDR1-1 Delta) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis. *Vet Dermatol* 20 (2):111-114
- Bishop BF, Bruce CI, Evans NA, Goudie AC, Gration KA, Gibson SP, Pacey MS, Perry DA, Walshe ND, Witty MJ (2000) Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Vet Parasitol* 91:163-176
- Bissonnette S, Paradis M, Daneau I, Silversides DW (2009) 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* 20 (1):60-66
- Bull K, Cook A, Hopper NA, Harder A, Holden-Dye L, Walker RJ (2007) Effects of the novel antihelminthic emodepside on locomotion, egg-laying behaviour and development of *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol* 37 (6):627-636
- Campbell WC (1981) An Introduction to the Avermectins. *N Z Vet J* 29:174-178
- Campbell WC, Fisher MH, Stapley EO, Albers-Schonberg G, Jacob TA (1983) Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 221:823-828
- Campbell WC and Benz GW (1984) Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J Vet Pharmacol Ther* 7:1-16

- Cascorbi I (2011) P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. In: Drug Transporters, Handbook of Experimental Pharmacology 201, Fromm MF, Kim RB (eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 261-283
- Chaudhary PM and Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 66 (1):85-94
- Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB (1992) Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80 (11):2735-2739
- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47 (3):381-389
- Crichlow EC, Mishra PR, Crawford RD (1986) Anticonvulsant effects of ivermectin in genetically-epileptic chickens. *Neuropharmacol* 25 (10):1085-1088
- Clarke DL, Lee JA, Murphy LA, Reineke EL (2011) Use of intravenous lipid emulsion to treat ivermectin toxicosis in a Border Collie. *J Am Vet Med Assoc* 239 (10):1328-1333
- Cooray HC, Blackmore CG, Maskell L, Barrand MA (2002) Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* 13:2059-2063
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (2):695-698
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 38 (9):1277-1287
- Crandell DE and Weinberg GL (2009) Moxidectin toxicosis in a puppy successfully treated with intravenous lipids. *J Vet Emerg Crit Care* 19 (2):181-186
- Cully DF, Wilkinson H, Vassilatis DK, Etter A, Arena JP (1996) Molecular biology and electrophysiology of glutamate-gated chloride channels of invertebrates. *Parasitol Suppl* 113:191-200
- Dawson GR, Wafford KA, Smith A, Marshall GR, Bayley PJ, Schaeffer JM, Meinke PT, McKernan RM (2000) Anticonvulsant and adverse effects of avermectin analogs in mice are mediated through the  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1051-1060

- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11 (7):1156-1166
- Dean M and Annilo T (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:123-142
- Decottignies A and Goffeau A (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* 15 (2):137-145
- Doran A, Obach RS, Smith BJ, Hosea NA, Becker S, Callegari E et al. (2005) 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* 33 (1):165-174
- Dornetshuber R, Kamyar MR, Rawnduzi P, Baburin I, Kouri K, Pilz E, Hornbogen T, Zocher R, Berger W, Lemmens-Gruber R (2009) Effects of the antihelminthic drug PF1022A on mammalian tissue and cells. *Biochem Pharmacol* 77 (8):1437-1444
- Ericsson CD and Johnson PC (1990) Safety and efficacy of loperamide. *Am J Med* 88 (6A):10S-14S
- European Medicines Agency (2008) Profender: EPAR Scientific Discussion.  
[www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)
- Fassler PE, Tranquilli WJ, Paul AJ, Soll MD, DiPietro JA, Todd KS (1991) Evaluation of the safety of ivermectin administered in a beef-based formulation to ivermectin-sensitive Collies. *J Am Vet Med Assoc* 199:457-460
- Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1):265-269
- Fromm MF (2000) P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38 (2):69-74
- Fromm MF (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 25 (8):423-429
- Gerloff T (2004) Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369 (1):69-77
- Geyer J, Döring B, Godoy JR, Moritz A, Petzinger E (2005a) 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* 28 (1):95-99

- Geyer J, Döring B, Godoy JR, Leidolf R, Moritz A, Petzinger E (2005b) Frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J Vet Pharmacol Therap* 28:545–551
- Geyer J, Klintzsch S, Meerkamp K, Wöhlke A, Distl O, Moritz A, Petzinger E (2007) 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 Therap* 30:482–485
- Geyer J and Janko C (2012) Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Curr Pharm Biotechnol*, 13:969-986
- Ginn PE (1996) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. *Vet Pathol* 33:533-541
- Goralski KB, Acott PD, Fraser AD, Worth D, Sinal CJ (2006) Brain cyclosporin A levels are determined by ontogenic regulation of *mdr1a* expression. *Drug Metab Dispos* 34: 288-295
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2 (1):48-58
- Gramer I, Leidolf R, Döring B, Klintzsch S, Krämer EM, Yalcin E, Petzinger E, Geyer J (2011) Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Vet J* 189:67-71
- Hadrick MK, Bunch SE, Kornegay JN (1995) Ivermectin toxicosis in two Australian shepherds. *J Am Vet Med Assoc* 206:1147-1150
- Harder A and von Samson-Himmelstjerna G (2002) Cyclooctadepsipeptides - a new class of antihelmintically active compounds. *Parasitol Res* 88 (6):481-488
- Harder A, Holden-Dye L, Walker R, Wunderlich F (2005) Mechanisms of action of emodepside, *Parasitol Res* 97:S1-S10
- Heine J, Krieger K, Dumont P, Hellmann K (2005) 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* 97 (Suppl 1):S89-S96
- Henthorn TK, Liu Y, Mahapatro M, Ng KY (1999) Active transport of fentanyl by the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 289 (2):1084-1089
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67-113

- Hori S, Ohtsuki S, Tachikawa M, Kimura N, Kondo T, Watanabe M, Nakashima E, Terasaki T (2004) Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s). *J Neurochem* 90:526-536
- Huang J and Casida JE (1997) Ivermectin B<sub>1a</sub> 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* 281:261-266
- Hugnet C, Cadore JL, Buronfosse F, Pineau X, Mathet T, Berny PJ (1996) Loperamide poisoning in the dog. *Vet Hum Toxicol* 38 (1):31-33
- Hugnet C, Bentjen SA, Mealey KL (2004) Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of Collies from France. *J Vet Pharmacol Therap* 27:227–229
- Jagannathan S, Laughton DL, Critten CL, Skinner TH, Horoszok L (1999) Ligand-gated chloride channel subunits encoded by the *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum* orthologues of the *Caenorhabditis elegans* *gbr-2* (*avr-14*) gene. *Mol Biochem Parasitol* 103 (2):129-140
- Johnson DR, Finch RA, Lin ZP, Zeiss CJ, Sartorelli AC (2001) The pharmacological phenotype of combined multidrug-resistance *mdr1a/1b*- and *mrp1*-deficient mice. *Cancer Res* 61:1469-1476
- Juliano RL and Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455 (1):152-162
- Jun K, Lee SB, Shin HS (2000) Insertion of a retroviral solo long terminal repeat in *mdr3* locus disrupts mRNA splicing in mice. *Mamm Genome* 11 (10):843-848
- Kane NS, Hirschberg B, Quian S, Hunt D, Thomas B, Brochu R, Ludmerer SW, Zheng Y, Smith MC, Arena JP, Cohen CJ, Schmatz D, Warmke J, Cully DF (2000) Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chlorid channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (25):13949-13954
- Kawabata A, Momoi Y, Inoue-Murayama M, Iwasaki T (2005) Canine *mdr1* gene mutation in Japan. *J Vet Med Sci* 67:1103–1107
- Kerb R (2006) Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Letters* 234 (1):4-33
- Klitzsch S, Meerkamp K, Döring B, Geyer J (2009) Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *Vet J* 185:272-277

- Krugman L, Bryan JN, Mealey KL, Chen A (2012) Vincristine-induced central neurotoxicity in a collie homozygous for the ABCB1 $\Delta$  mutation. *J Small Anim Pract* 53 (3):185-187
- Kummerfeld N and Schäfer-Nolte C (1987) Behandlung eines Milbembefalls bei Wellensittichen und Finken mit Ivermectin im Spot-on-Verfahren. *Kleintierpraxis* 32:293-296
- Kwei GY, Alvaro RF, Chen Q, Jenkins HJ, Hop CE, Keohane CA, Ly VT, Strauss JR, Wang RW, Wang Z, Pippert TR, Umbenhauer DR (1999) Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in *mdr1a* P-glycoprotein. *Drug Metabol Dispos* 27:581-587
- Lankas GR, Cartwright ME, Umbenhauer D (1997) P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 143:357-365
- Lierz M (2001) Evaluation of the dosage of ivermectin in falcons. *Vet Rec* 148 (19):596-600
- Linek J, Spiess B, Dallmeyer C, Geyer J (2007) Ivermectin intoxication in three dogs with and without MDR1 gene mutation caused by vermicide paste licensed for use in horse. *Tierärztl Prax Kleint Heimt* 35 (4):272-278
- Löscher W and Potschka H (2005) Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 76 (1):22-76
- Maggio-Price L, Shows D, Waggle K, Burich A, Zeng W, Escobar S, Morrissey P, Viney JL (2002) *Helicobacter bilis* infection accelerates and *H. hepaticus* infection delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (*mdr1a*<sup>-/-</sup>) mice. *Am J Pathol* 160 (2):739-751
- Maggio-Price L, Bielefeldt-Ohmann H, Treuting P, Iritani B, Zeng W, Nicks A, Tsang M, Shows D, Morrissey P, Viney JL (2005) Dual infection with *Helicobacter bilis* and *Helicobacter hepaticus* in P-glycoprotein-deficient *mdr1a*<sup>-/-</sup> mice results in colitis that progresses to dysplasia. *Am J Pathol* 166 (6):1793-1806
- Martinez M, Modric S, Sharkey M, Troutman L, Walker L, Mealey KL (2008) The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 31 (4):285-300
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 75 (1):13-33
- Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11 (8):727-733

- Mealey KL, Bentjen SA, Waiting DK (2002) 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* 63:479–481
- Mealey KL, Northrup NC, Bentjen SA (2003) Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *J Am Vet Med Assoc* 223 (10):1453-1455
- Mealey KL (2004) Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Ther* 27 (5):257-264.
- Mealey KL, Munyard KA, Bentjen SA (2005) Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Vet Parasitol* 10:193–196
- Mealey KL, Gay JM, Martin LG, Waiting DK (2007) Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in MDR1-1 $\Delta$  and MDR1 wildtype dogs. *J Vet Emerg Crit Care* 17 (1):61-66
- Mealey KL, Fidel J, Gay JM, Impellizeri JA, Clifford CA, Bergman PJ (2008a) ABCB1-1 $\Delta$  polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine. *J Vet Intern Med* 22 (4):996-1000
- Mealey KL, Greene S, Bagley R, Gay J, Tucker R, Gavin P, Schmidt K, Nelson F (2008b) P-glycoprotein contributes to the blood-brain, but not blood-cerebrospinal fluid, barrier in a spontaneous canine P-glycoprotein knockout model. *Drug Metab Dispos* 36 (6):1073-1079
- Mealey KL and Meurs KM (2008) Breed distribution of the ABCB1-1 $\Delta$  (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *J Am Vet Med Assoc* 233:921–924
- Michael B, Meinke PT, Shoop W (2001) Comparison of ivermectin, doramectin, selamectin, and eleven intermediates in a nematode larval development assay. *J Parasitol* 87:692-696
- Mühlfeld S, Schmitt-Wrede HP, Harder A, Wunderlich F (2009) FMRFamide-like neuropeptides as putative ligands of the latrophillin-like HC110-R from *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 164 (2):162-164
- Müller RS and Bettenay SV (1999) A proposed new therapeutic protocol for the treatment of canine mange with ivermectin. *J Am Anim Hosp Assoc* 35 (1):77-80
- Müller MB, Keck ME, Binder EB, Kresse AE, Hagemeyer TP, Landgraf R, Holsboer F, Uhr M (2003) ABCB1 (MDR1)-type P-glycoprotein at the blood-brain-barrier modulate the

- activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: implications for affective disorder. *Neuropsychopharmacol* 28 (1):1991-1999
- Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, Mealey KL, Pedersen NC (2004) Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11725–11730
- Nelson OL, Carsten E, Bentjen SA, Mealey KL (2003) Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies. *J Vet Intern Med* 17 (3):354-356
- Novotny MJ, Krautmann MJ, Ehrhart JC, Godin CS, Evans EI, McCall JW, Sun F, Rowan TG, Jernigan AD (2000) Safety of selamectin in dogs. *Vet Parasitol* 91:377-391
- Ohtsuki S and Terasaki T (2007) 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* 24 (9):1745-1758
- Panwala CM, Jones JC, Viney JL (1998) A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol* 161 (10):5733-5744
- Parker HG, Kim LV, Sutter NB, Carlson S, Lorentzen TD, Malek TB, Johnson GS, DeFrance HB, Ostrander EA, Kruglyak L (2004) Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science* 304:1160–1164
- Pastan I and Gottesman MM (1991) Multidrug resistance. *Annu Rev Med* 42:277-286
- Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS Jr, DiPietro JA (1987) Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res* 48 (4):684-685
- Paul AJ, Tranquilli WJ, Hutchens DE (2000) Safety of moxidectin in ivermectin-sensitive collies. *Am J Vet Res* 61:482-483
- Paul AJ, Hutchens DE, Firkins LD, Borgstrom M (2004a) Dermal safety study with imidacloprid/moxidectin topical solution in the ivermectin-sensitive collie. *Vet Parasitol* 121:285-291.
- Paul AJ, Hutchens DE, Firkins LD, Keehan CM (2004b) Effects of dermal application of 10.0% imidacloprid-0.08% ivermectin in ivermectin-sensitive Collies. *Am J Vet Res* 65:277-278
- Petzinger E and Moritz A (2006) Der Ivermectin-sensitive Collie. *Kleintiermedizin* 1/2:13-16

- Pinto N, Halachmi N, Verjee Z, Woodland C, Klein J, Koren G (2005) Ontogeny of renal P-glycoprotein expression in mice: Correlation with digoxin renal clearance. *Pediatric Res* 58: 1284-1289
- Pritchard J (2010) Treating ivermectin toxicity in cats. *Vet Rec* 166 (24):766
- Pulliam JD, Seward RL, Henry RT, Steinberg SA (1985) Investigating ivermectin toxicity in collies. *Vet Med* 80:33-40.
- Pulliam JD and Preston JM (1989). *Safety of Ivermectin in Target Animals*. In Ivermectin and Abamectin. Ed Campbell, W. C. pp. 149-161, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg
- Putman M, van Veen HW, Konings WN (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (4):672-693
- Raviv Y, Pollard HB, Bruggemann EP, Pastan I, Gottesman MM (1990) Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J Biol Chem* 265 (7):3975-3980
- Rochat B (2009) Importance of influx and efflux systems and xenobiotic metabolizing enzymes in intratumoral disposition of anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* 9 (5):652-674
- Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T (2003) MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur J Pharmacol* 460 (2-3):85-91
- Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnate defense system. *Physiol Rev* 86 (4):1179-1236
- Sartor LL, Bentjen SA, Trepanier L, Mealey KL (2004) Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. *J Vet Intern Med* 18 (1):117-118
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77 (4):491-502
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P (1995) Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 96 (4):1698-1705

- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97 (11):2517-2524
- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Borst P (1997) Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (8):4028-4033
- Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 8 (3):161-170
- Schinkel AH (2001) The roles of P-glycoprotein and MRP1 in the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Adv Exp Med Biol* 500:365-372
- Schneider E and Hunke S (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 22 (1):1-20
- See AM, McGill SE, Rasis AL, Swindells KL (2009) Toxicity in three dogs from accidental oral administration of a topical endectocide containing moxidectin and imidacloprid. *Aust Vet J* 87 (8):334-337
- Sharom FJ, Lugo MR, Eckford PD (2005) New insights into the drug binding, transport and lipid flippase activities of the p-glycoprotein multidrug transporter. *J Bioenerg Biomembr* 37 (6):481-487
- Shoop W, Mrozik H, Fisher M (1995) Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet Parasitol* 59:139-156
- Sigel E and Baur R (1987) Effect of avermectin B<sub>1a</sub> on chicken neuronal  $\gamma$ -aminobutyrate receptor channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol* 32:749-752
- Soontornmalai A, Vlaming ML, Fritschy JM (2006) Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine choroid plexus and blood-brain barrier. *Neuroscience* 138:159-169
- Sutherland IH and Campbell WC (1990) Development, pharmacokinetics and mode of action of ivermectin. *Acta Leiden* 59 (1/2):161-168
- Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5 (3):219-234

- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (21):7735-7738
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 37 (2):159-164
- Thompson SJ, Koszdin K, Bernards CM (2000) Opiate-induced analgesia is increased and prolonged in mice lacking P-glycoprotein. *Anesthesiology* 92 (5):1392-1399
- Tranquilli WJ, Paul AJ, Seward RL, Todd KS, DiPietro JA (1987) Response to physostigmine administration in collie dogs exhibiting ivermectin toxicosis. *J Vet Pharmacol Ther* 10 (1):96-100
- Tranquilli WJ, Paul AJ, Todd KS (1991) Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *Am J Vet Res* 52:1170-1172
- Turner MJ and Schaeffer JM (1989) Mode of action of ivermectin. *Ivermectin and Abamectin*. (W.C. Campbell, ed.) Springer-Verlag, New York, pp. 73-88
- Ueda K, Clark DP, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM, Pastan I (1987) The human multidrug resistance (*mdr1*) gene. cDNA cloning and transcription initiation. *J Biol Chem* 262 (2):505-508
- Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N, Komano T, Hori R (1992) Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 267 (34):24248-24252
- Uhr M, Holsboer F, Muller MB (2002) 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* 14 (9):753-759
- Umbenhauer DR, Lankas GR, Pippert TR, Wise LD, Cartwright ME, Hall SJ, Beare CM (1997) Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicol Appl Pharmacol* 146 (1):88-94
- Verma S, Robertson AP, Martin RJ (2009) Effects of SDPNFLRF-amide (PF1) on voltage-activated currents in *Ascaris suum* muscle. *Int J Parasitol* 39 (3):315-326

- Wagner R and Wendlberger U (2000) Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes* spp., *Demodex* spp. and *Psoroptes* spp. mites. *Vet Parasitol* 93:149-158
- Wandel C, Kim R, Wood M, Wood A (2002) Interaction of morphine, fentanyl, sufentanil, alfentanil, and loperamide with the efflux drug transporter P-glycoprotein. *Anesthesiology* 96 (4):913-920
- Wang CC and Pong SS (1982) Actions of avermectin B1a on GABA nerves. *Prog Clin Biol Res* 97:373-395
- Weinberg G (2006) Lipid rescue resuscitation from local anaesthetic cardiac toxicity. *Toxicol Rev* 25 (3):139-145
- Zong J and Pollack GM (2000) Morphine antinociception is enhanced in *mdr1a* gene-deficient mice. *Pharm Res* 17 (6):749-753

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Ernst Petzinger** für die allseits gewährte Unterstützung meiner Forschungsvorhaben, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie die zügige Durchsicht dieser Arbeit. Vor allem bedanke ich mich aber für das mir entgegengebrachte Vertrauen und den mir gewährten Freiraum für die Verwirklichung eigener Ideen und Forschungsprojekte.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen lieben Kollegen und langjährigen Weggefährten **Dr. Barbara Döring** und **Dr. José Godoy**. Ihr habt durch Euer Engagement gerade in den ersten Jahren ganz wesentlich dazu beigetragen, dass wir mit der Diagnostik und der Forschung zum MDR1-Gendefekt überhaupt so weit gekommen sind! Auch **Regina Leidolf** danke ich an dieser Stelle ganz herzlich. Sie hat unzählige Genotypisierungen durchgeführt und den Diagnostikbereich über lange Zeit sehr engagiert und professionell gemanagt. Auch Stefanie Klintzsch und Kerstin Meerkamp danke ich für die Mitarbeit in der MDR1-Diagnostik.

Ein großer Dank geht auch an **Dr. Olga Gavrilova, Christina Janko und Dr. Irina Gramer**, von welchen Projekte aus ihren Doktorarbeiten auch in die vorliegende Arbeit eingeflossen sind. Danke auch an **Julia Aretz, Clarissa Prinzing, Luise Charlotte Straehle, Jasmin Kranz und Sabrina Collica** für Eure fleißige Mitarbeit im Bereich Pharmakogenetik in der Veterinärmedizin und die Bereitstellung von Abbildungen aus Euren Dissertationen.

Ein Dankeschön geht auch an alle Kooperationspartner (**Prof. Dr. A. Moritz, Prof. Dr. O. Distl, Dr. J. Linek, Prof. Dr. R. Neiger und Dr. M. Kessler**) für die kollegiale und professionelle Zusammenarbeit, von welcher diese Arbeit sehr profitiert hat.

## Danksagung

Ein großer Dank geht an die Firmen **Pfizer Tiergesundheit, Bayer HealthCare und Novartis Animal Health** für die finanzielle Unterstützung einzelner Projekte dieser Arbeit sowie die Bereitstellung der radioaktiv markierten Substanzen [<sup>3</sup>H]Selamectin, [<sup>3</sup>H]Moxidectin und [<sup>3</sup>H]Milbemycinoxim.

Weiterhin möchte ich mich bei **Manuela Binz** sowie allen anderen **Tierpflegerinnen und Tierpflegern** für die gute und liebevolle Betreuung unserer Versuchstiere bedanken.

Allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am **Institut für Pharmakologie und Toxikologie** danke ich für die jederzeit freundliche Unterstützung sowie die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Schließlich danke ich **Frau von Schnakenburg** für ihre Hilfsbereitschaft in allen bürokratischen Angelegenheiten.

Zu allerletzt danke ich meiner Frau **Sabine** und meinen Kindern **Lea-Paulin und Madita-Elin**, die durch ihre moralische Unterstützung ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Leider musste ich viel zu viele Stunden für diese Arbeit "opfern" in denen ich nicht bei Euch sein konnte.

## 10. Anhang - Publikationen

Der Eigenanteil an den Publikationen wird für die Bereiche *Idee und Planung* (Pla), *experimentelle Arbeit* (Exp) sowie *Auswertung und Publikation* (Pub) in Form von Prozenten angegeben.

	Pla	Exp	Pub
1) PETZINGER E & <u>GEYER J</u> (2006) Drug transporters in pharmacokinetics. <i>Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology</i> 372(6):465-475	50	-	50
2) <u>GEYER J</u> , DÖRING B, GODOY JR, MORITZ A & PETZINGER E (2005) Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. <i>Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics</i> , 28(1):95-99.	100	50	95
3) <u>GEYER J</u> , DÖRING B, GODOY JR, LEIDOLF R, MORITZ A & PETZINGER E (2005) Frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. <i>Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics</i> , 28(6):545-551.	100	50	95
4) <u>GEYER J</u> , KLINTZSCH S, MEERKAMP K, WÖHLKE A, DISTL O, MORITZ A & PETZINGER E (2007) Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. <i>Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics</i> , 30(5):482-485.	90	25	90
5) KLINTZSCH S, MEERKAMP K, DÖRING B & <u>GEYER J</u> (2009) Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. <i>The Veterinary Journal</i> , 185(3):272-277.	95	25	95
6) GRAMER I, LEIDOLF R, DÖRING B, KLINTZSCH S, KRÄMER EM, YALCIN E, PETZINGER E & <u>GEYER J</u> (2011) Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. <i>The Veterinary Journal</i> , 189(1):67-71.	95	10	95

Anhang - Publikationen

	Pla	Exp	Pub
7) <u>GEYER J</u> , GAVRILOVA O & PETZINGER E (2009) Brain penetration of ivermectin and selamectin in <i>mdr1a,b</i> P-glycoprotein and bcrp deficient knockout mice. <i>Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics</i> , 32(1):87-96.	95	25	95
8) JANKO C & <u>GEYER J</u> (2012) Moxidectin has a lower neurotoxic potential but comparable brain penetration in P-glycoprotein deficient CF-1 mice compared to ivermectin. <i>Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics</i> , 36:275-284.	95	10	90
9) LINEK J, SPIESS B, DALLMEYER C & <u>GEYER J</u> (2007) Ivermectin intoxication in three dogs with and without MDR1 gene mutation caused by vermicide paste licensed for use in horse. <i>Tierärztliche Praxis</i> , 35(4):272-278.	90	50	90
10) HELD S, GAMER I, HASSDENTEUFEL E, NEIGER R & <u>GEYER J</u> (2012) Therapie einer Avermectin-Intoxikation bei zwei Hunden mit homozygotem nt230(del4) MDR1-Gendefekt durch Lipidinfusion. <i>Kleintierpraxis</i> , 57(6):313-319.	50	10	80
11) <u>GEYER J</u> & JANKO C (2012) Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. <i>Current Pharmaceutical Biotechnology</i> , 13:969-986.	100	-	95
12) GRAMER I, KESSLER M & <u>GEYER J</u> (2013) Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma. <i>Veterinary and Comparative Oncology</i> , in press, doi: 10.1111/vco.12051.	90	10	90

Im Laufe der letzten Jahre wurden neben den im Anhang aufgelisteten wissenschaftlichen Originalarbeiten auch verschiedene Übersichtsarbeiten zur Rasseverteilung des MDR1-Gendefektes und dessen klinischer Relevanz verfasst, welche an einen jeweils unterschiedlichen Leserkreis gerichtet waren. Hier ist zunächst die bereits erwähnte englischsprachige Übersichtsarbeit (*invited review*) von Geyer und Janko (2012, **Publikation**

**#11)** zu nennen, welche Teil eines Sonderbandes über *Makrozyklische Laktone* in der Zeitschrift *Current Pharmaceutical Biotechnology* ist. In diesem Band sind 18 Artikel über die Entwicklung, Anwendung, Pharmakokinetik und therapeutische Sicherheit von ML enthalten. Der Sonderband wurde von Prof. Aránzazu González-Canga als Guest Editor organisiert und wird in Kürze erscheinen. Ein weiterer Artikel (Döring B, Geyer J, Godoy JR, Moritz A, Petzinger E, 2005, Defekt des MDR1-Transporters bei Collie-Hunden, *Biospektrum* 2:169-171) wurde in der Zeitschrift *BIOspektrum* publiziert, welche das Publikationsorgan u.a. der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) e.V. darstellt und von deutschsprachigen Pharmakologen und Toxikologen gelesen wird. Für diesen Artikel wurde jedoch keine Abdruckerlaubnis im Rahmen dieser Arbeit erteilt.

Des Weiteren wurden für Tierärztinnen und Tierärzte relevante Publikationen erstellt. Hierunter fällt die im Anhang angeführte **Publikation #13**. In dieser sind Informationen über den MDR1-Gendefekt, dessen Rassenverteilung, Diagnostik und klinische Bedeutung in deutscher Sprache zusammengefasst.

Darüber hinaus wurde im Zuge des Wissenstransfers auch in verschiedenen nicht-wissenschaftlichen Zeitschriften über das Problem „MDR1-Gendefekt beim Hund“ informiert, wie z.B. in den Zeitschriften *Collie Revue*, *Schweizer Hundemagazin*, *Der Hund*, *HundKatzePferd*, *HundeWelt*, *BreederSpecial* oder *SitzPlatzFuss*. Der Schwerpunkt dieser Publikationen lag darauf interessierten Hundebesitzern und Züchtern, aber auch der interessierten Öffentlichkeit dieses Thema verständlich darzustellen und näher zu bringen. Repräsentativ für diese Rubrik *Verständliche Wissenschaft* ist im Anhang unter **Publikation #14** der Artikel *MDR1-Gendefekt und multiple Arzneistoffüberempfindlichkeit beim Hund*, erschienen in der Zeitschrift *SitzPlatzFuss* aufgeführt. Weitere, nicht im Einzelnen im Anhang angefügte Publikationen aus diesem Bereich sind im Folgenden genannt:

GEYER J, DÖRING B, GODOY JR, MORITZ A & PETZINGER E (2004) Die Ivermectin-Empfindlichkeit beim Collie. *Vet-MedReport* V6:2.

GEYER J (2004) Die Ivermectin-Empfindlichkeit beim Collie steht in Zusammenhang mit einem genetischen Defekt in der Blut-Hirn-Schranke. *Collie Revue* 108:72-74.

GEYER J (2004) Die Ivermectin-Empfindlichkeit beim Collie steht in Zusammenhang mit einem genetischen Defekt in der Blut-Hirn-Schranke. *Club für Britische Hütehunde, Club-Report* 1:12-14.

GEYER J (2005) Der MDR1-Defekt, ein Gendefekt mit weit reichenden Folgen. *Schweizer Hundemagazin* 1:26-29.

GEYER J (2005) Der „Ivermectin-empfindliche Collie“. *Berufsverband der Arzt-, Zahnarzt- und Tierärzthelferinnen, Praxisnah* 7/8:22-25.

PETZINGER E, DÖRING B, GEYER J, GODOY JR, SCHIRK U & ZAHNER D (2005) Arzneistofftransporter, über Pforten, Barrieren und Hintertüren der Arzneitherapie. *Spiegel der Forschung der JLU Gießen* 1/2:26-33.

GEYER J (2006) Der MDR1-Defekt bei Britischen Hütehunden bedingt eine multiple Medikamentenüberempfindlichkeit. *Collie Revue* 115:71-75.

GEYER J (2006) Der MDR1-Defekt bei Britischen Hütehunden bedingt eine multiple Medikamentenüberempfindlichkeit. *Breeder Special* 3:30-36.

GEYER J, GODOY JR, DÖRING B, MEERKAMP K, KLINTZSCH S, MORITZ A & PETZINGER E (2006): Avermectin-Toxizität beim Collie, genetischer Hintergrund und klinische Relevanz. *Vet-MedReport* V4:2.

GEYER J (2006) MDR1-Gendefekt – Zu Risiken und Nebenwirkungen. *Der Hund* 9:18-20.

KLINTZSCH S, PETZINGER E & GEYER J (2008) MDR1-Gendefekt. Über Risiken und Nebenwirkungen. *HundKatzePferd* 01/08:61-64.

GEYER J (2010) Brennpunkt Collie: Heiße Diskussion um die Fakten. *HundeWelt* 09.10:38-43.

GEYER J (2010) MDR1: Gendefekt oder Genvariante? *BreederSpecial* 5/2010:44-47.

## 10. Anhang - Publikationen

### 1) PETZINGER E & GEYER J (2006)

Drug transporters in pharmacokinetics.

*Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Volume 372, Issue 6, pp 465-475*

DOI: 10.1007/s00210-006-0042-9

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00210-006-0042-9>

Ernst Petzinger · Joachim Geyer

## Drug transporters in pharmacokinetics

Received: 14 November 2005 / Accepted: 30 January 2006 / Published online: 11 March 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** This review deals with the drug transporters allowing drugs to enter and leave cells by carrier-mediated pathways. Emphasis is put on liver transporters but systems in gut, kidney, and blood-brain barrier are mentioned as well. Drug-drug interactions on carriers may provoke significant modification in pharmacokinetics as do carrier gene polymorphisms yielding functional carrier protein mutations. An integrated phase concept should reflect the interplay between drug metabolism and drug transport.

**Keywords** Drug transport · SLC transporters · ABC carriers · Drug metabolism · Carrier polymorphisms · Clinics

### Historical background

Pharmacokinetics comprises drug liberation, drug absorption, drug distribution, drug metabolism and drug excretion. The issue of xenobiotic elimination, also termed evasion, is defined in pharmacokinetics by two processes, drug metabolism and drug excretion, whereby metabolism is described to comprise sequential biotransformation steps termed phase 1 and phase 2 metabolism (Williams 1959; Gillette 1963; Gerok and Sickinger 1973). The “phase concept” has long been embedded in pharmacokinetics: R. T. Williams divided phenacetin detoxification into two parts, phase I which consists of an oxidative dealkylation reaction to yield 4-acetamidophenol, followed by phase II in which an organic acid is formed, yielding the highly polar 4-acetamidophenyl- $\beta$ -glucuronide (Fig. 1). Emphasis was put on phase II as an essential detoxification phase because increase of polarity was considered the essential step for drug elimination via bile and urine.

Since the detoxification reactions occur within cells, it is surprising that the questions of how the drug reaches the

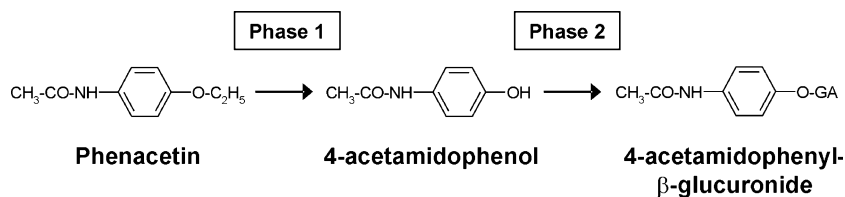
endoplasmic reticulum of, for example, a liver parenchymal cell from the blood, and how the drug is released out of the hepatocyte into bile, have not been subject to equally intense studies as those concerning drug metabolism. In analogy to intestinal absorption, which in those days was thought to follow the physical diffusion concept of non-charged molecules (Brodie and Hogben 1957; Hogben et al. 1959; Brodie 1964), the permeation of organic compounds into and out of cells was considered to be governed by non-selective physical diffusion processes (Stein 1967; Diamond and Wright 1969; Elleroy and Lew 1977).

However, it was soon recognized that at least for highly polar organic compounds such as sugars, so-called facilitated passive diffusion, which involves a biological carrier with saturation and competition kinetics (Wilbrandt 1975) or even active, energy-dependent uphill transport by membrane carriers, is mandatory (LeFevre 1948; Crane and Krane 1959). An  $\text{Na}^+$ -dependent intestinal glucose-carrier from a mammalian species was not cloned until 1987 (Hediger et al. 1987; Wright and Turk 2004). In general, biological non-electrolyte transport is a strong pillar of physiological cell functions. Its energetics comprises ion-coupled cotransport or ion-coupled countertransport, allowing secondary uphill transport, or pumping by ABC-carriers (ATP-binding cassette-carriers), allowing primary active transport, or countertransport with endogenous non-electrolytes or even simple facilitated diffusion along the compound's concentration gradient (Fig. 2).

It has long been established that transporters exist for endogenous compounds such as glucose, amino acids, nucleosides, water soluble hormones and neurotransmitters. However, the perspective that xenobiotics are also substrates of membrane carriers has emerged only in the last two decades. Xenobiotics are by definition compounds which are not essential for the maintenance of a physiological function; they may, however, modulate, ameliorate or damage such functions, depending on whether they are drugs, diagnostics, or toxins. Living organisms, therefore, have also developed processes to eliminate “non-physiological” xenobiotics by carrier mediated transport (LeFevre

E. Petzinger (✉) · J. Geyer  
Institute of Pharmacology and Toxicology,  
Frankfurter Str. 107,  
35392 Giessen, Germany  
e-mail: Ernst.petzinger@vetmed.uni-giessen.de

**Fig. 1** Detoxification of phenacetin taken from Smith and Williams 1949. This description was a hallmark in drug metabolism and the first description of an O-dealkylation reaction of drugs



1975). This article focuses mainly on transporter-based elimination of drugs by the liver.

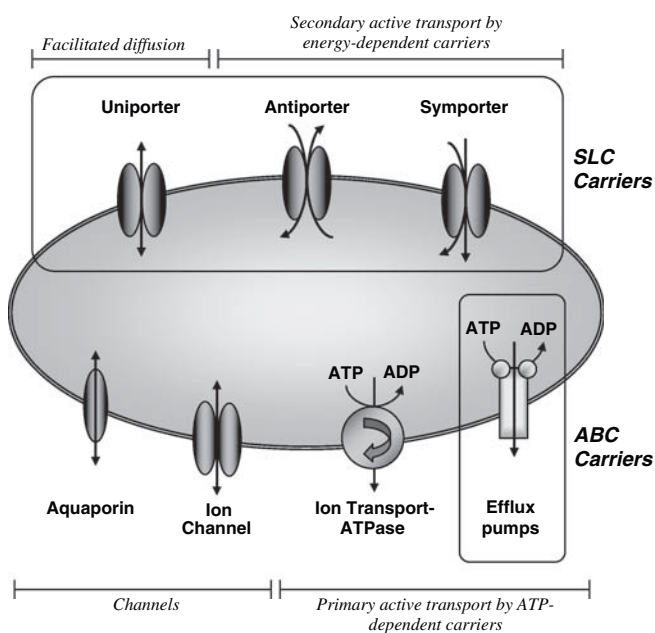
## Functional indications of drug transporters

Early functional studies on the elimination of drugs by the liver (Klaassen and Watkins 1984), gut (Kramer and Lauterbach 1977; Jackson 1987), and kidney (Ullrich 1997) indicated the existence of carriers for xenobiotics, defined by transport saturation, cell specificity, and mutual transport interferences. Without any molecular knowledge of the carrier proteins themselves, descriptions were made of driving forces for uphill transport such as electrochemical gradients of ions (Heinz 1972; Semenza and Kinne 1985; Alvarado and Van Os 1986), counter- or antiport-transport (Rosenberg and Wilbrandt 1957; Heinz 1978), membrane potential (Ward 1970; Athayde and Ivory 1985) or direct energy transmission due to ATP-cleavage (Caldwell 1956, 1960; Keynes 1961; Carafoli and Scarpa 1982). Although it was suggested very early (Sperber 1959), it was later shown that drug excretion and absorption is strongly dominated by membrane carrier proteins, i.e. in liver (Petzinger et al. 1989; Petzinger 1994), kidney (Greger et al. 1981) and gut (Gilles-Baillieu and Gilles 1983). As with the detoxification enzymes of phase I and phase II, these carriers are subject to postnatal development in neonates (Gao et al. 2004), and regulation and induction by diseases

may occur (Trauner and Boyer 2003; Kullak-Ublick et al. 2004). With the availability of cloned carrier genes, pharmacogenomics of drug transporters have recently been the subject of pharmacological and clinical research (Tirona et al. 2001; Tirona and Kim 2002; Ieiri et al. 2004).

## Molecular classification of SLC- drug transporters

Drug transporter gene identification started in the 1990s by cloning Oatps (organic anion transporting polypeptides) from the liver (Jacquemin et al. 1994; Hagenbuch and Meier 2003) and Oats/Octs (organic anion transporters/organic cation transporters) from the kidney (Gründemann et al. 1994; Sekine et al. 1997; Sweet et al. 1997; Burckhardt and Burckhardt 2003; Koepsell and Endou 2004). These carriers have now been grouped in the large family of solute carriers SLC (Hediger et al. 2004). Table 1 shows a list of selected families of SLCs, which currently comprise 43 families with an expanding number of subfamilies and individual carriers. Over 300 human genes are assumed to encode SLC carriers. Many of these carriers can be considered to transport physiological endogenous substrates alone; several transport a few foreign compounds in addition, and some even transport xenobiotics predominantly. The SLC-families receive sequential numbers from the HUGO (human genome organisation) nomenclature committee HGNC. Overviews of several families of drug transporters have been published. Since this field is rapidly expanding, this article can only present a momentary snapshot, and several other



**Fig. 2** Classification of solute carriers (SLC), ATP-dependent carriers (ABC-carriers), and channels in the plasma membrane

**Table 1** List of solute carrier (SLC) families, according to the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), depicting the SLC-transporters performing drug transport

The HGNC solute carrier superfamily (SLC)	Total
SLC1 to SLC 14	109
SLC15: The proton oligopeptide cotransporter family	4
SLC16: The monocarboxylate transporter family	14
SLC17 to SLC 20	16
SLC21/SLCO: The organic anion transporting family; OATPs	20
SLC22: The organic cation/anion/zwitterion transporter family, OATs/OCTs	18
SLC23 to SLC 27	55
SLC28: Na <sup>+</sup> -coupled nucleoside transport family	3
SLC29 to SLC 43	81
<b>TOTAL</b>	<b>320</b>

For the complete list with 43 SLC-families comprising 320 individual carriers see <http://www.bioparadigms.org/slc>

reviews are recommended (Pritchard and Miller 1993; Burckhardt and Wolff 2000; Kullak-Ublick et al. 2000; Ayrton and Morgan 2001; Dean et al. 2001; Dresser et al. 2001; Borst and Oude Elferink 2002; Russel et al. 2002; Burckhardt and Burckhardt 2003; Daniel and Rubio-Aliaga 2003; Hagenbuch and Meier 2003; Mizuno et al. 2003; Daniel 2004; Koepsell and Endou 2004; Hediger et al. 2004; Pauli-Magnus and Meier 2004, and also reviews in this journal issue, i.e. König et al. 2006 and Geyer et al. 2006).

### An extended phase concept

Drug transporter / drug metabolism interplay represents a new challenge in cellular pharmaco- and toxicokinetics (Liu and Pang 2005). Reflecting the meaning of drug transport in cellular pharmacokinetics, the historical two-phase concept, which has only considered the relevance of biotransformation of drugs for drug evasion, needs extension.

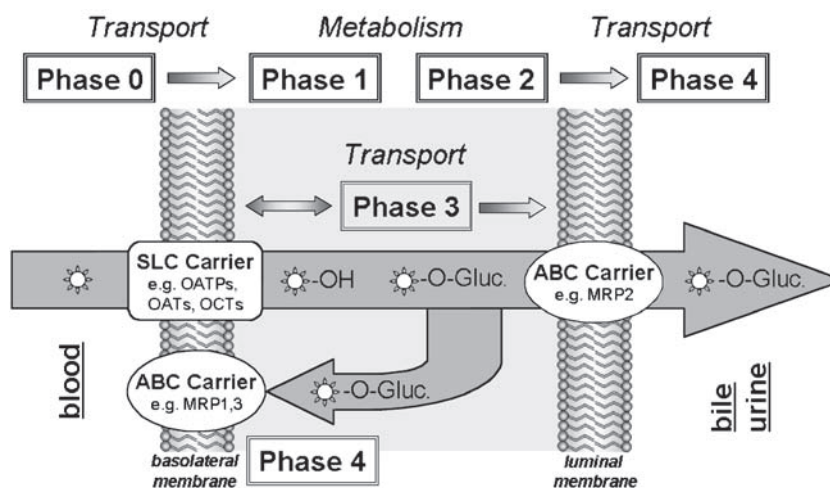
Figure 3 shows an extended phase concept encompassing interactions between transporter phases for uptake and excretion, and the metabolic steps. The metabolic phases 1 and 2 are flanked by drug transporter phases 0 and 4, while intracellular cytoplasmic drug traffic is regarded as phase 3. In the following, some implications of this model are presented.

*Phase 0* SLC transporters mediate the earliest phase in drug kinetics on cells, which is here termed phase zero (phase 0). Phase 0 is the first step of drug elimination from blood via uptake across the basolateral membrane into the cells, i.e. of the proximal tubule or into hepatocytes respectively, or the first step of absorption from the gut, i.e. the uptake across the luminal membrane into enterocytes. Thus, SLC transporters are located in both the basolateral and the luminal cell membrane. This type of carrier imposes a selection, although not a really stringent “filter” gate, for certain classes of xenobiotics. SLC-drug carriers are multispecific, which means they allow permeation of a spectrum of compounds with

variable chemical structures. An example of this type of multispecificity are members of the organic anion transporting polypeptide carriers Oatps (SLC21 / SLCO) which transport weak organic acids, neutral compounds and even a few cationic compounds (Hagenbuch and Meier 2003). Quantitative structure–activity relationships (QSARs) (Yarim et al. 2005) were elaborated to predict structural criteria of compounds essentially needed to fulfill the requirements for transport by individual carrier proteins. Systems in the liver and kidney have been reviewed in detail (Van Montfort et al. 2003; Hagenbuch and Meier 2003; Chandra and Brouwer 2004). Similarly, another family of organic anion transporters, the Oat-family, transports negatively and positively charged compounds, and is very closely related to the Oct-family, specialised for organic cation transport (Burckhardt and Wolff 2000; Burckhardt and Burckhardt 2003; Koepsell and Endou 2004). Oats and octs, therefore, are members of the same SLC22 family (Table 1). Phase 0 drug transporters jointly influence compound allocation for drug metabolism.

*Phase 4* Phase 4 pathways are well-defined. They comprise final steps of excretion, e.g. in the bile canaliculus of the liver, or secretory steps in the luminal membrane, e.g. in the gut, counteracting absorption. Phase 4 is predominantly maintained by directly driven “primary” uphill transport of xenobiotics across cell membranes, which is achieved by ATP-consuming transport ATPases belonging to the ABC-carrier proteins (Müller and Jansen 1998; Chan et al. 2004) (Table 2). A prominent member of these transport proteins, first detected in drug-resistant tumour cells (Juliano and Ling 1976), is P-glycoprotein. This drug resistance was conferred by a gene named multidrug resistance (*MDR*) gene, which was characterised in 1986 (Roninson et al. 1986). P-glycoprotein substrates are lipophilic, and are generally non-conjugated compounds, whereas water-soluble drug conjugates (sulfated, glucuronidated and glutathione-conjugated drugs) are transported in the liver by the multidrug resistance-associated protein MRP2 (Homolya et al. 2003; Hoffmann and Kroemer 2004; Fardel et al. 2005). Other members of

**Fig. 3** Schematic principle of vectorial drug evasion in liver and kidney. Phase 0 = drug uptake out of blood, Phases 1 and 2 = biotransformation exemplified by hydroxylation and glucuronidation, Phase 3 = transport of xenobiotics/metabolites towards excretion, Phase 4 = efflux into excreted fluids and/or backward into blood. ☼ xenobiotic



**Table 2** List of selected human ATP-binding cassette (ABC) transporters enabling drug transport

Symbol	Alias	Function
ABCA2	ABC2	Drug resistance
ABCB1	MDR, PGP	Multidrug resistance
ABCB11	SPGP	Bile salt transport
ABCC1	MRP1	Drug resistance
ABCC2	MRP2	Organic anion efflux
ABCC3	MRP3	Drug resistance
ABCC4	MRP4	Prostaglandin and steroidsulfate transport
ABCC5	MRP5	Nucleoside transport
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	Toxin efflux, drug resistance

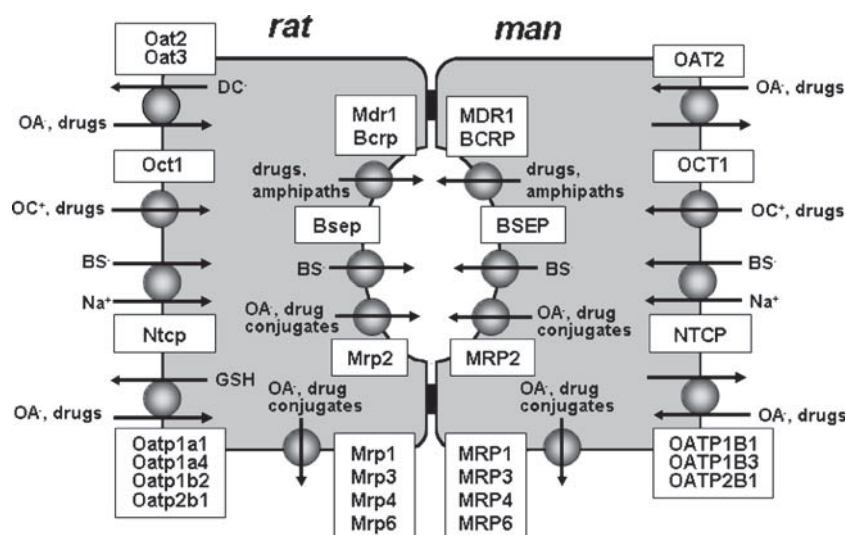
Full list given by Dean et al. 2001

the ABCC-transporter family (MRPs 1, 3, 4, 5, and 6), in conjunction with the BCRP (breast cancer resistance protein)-carrier belonging to the ABCG-family (Table 2) provide a panel of export pumps in the liver and elsewhere in the body (Haimeur et al. 2004) (Fig. 4). Carrier genes comprise at least 5% of all human genes with 49 genes belonging to human ABC-carrier genes (Dean et al. 2001).

ABC-carriers for xenobiotics, i.e. P-glycoprotein, MRP2 and BCRP, are mainly located at the luminal membrane of a cell facing, for example, the bile canaliculus, the lumen of the gut or the tubule lumen of a nephron. The general function which results from this location is drug excretion, providing evidence that these types of ABC-carriers convey protection against xenobiotics (Leslie et al. 2005). In the gut, these ABC-carriers are gatekeepers of drug absorption, limiting drug bioavailability (Dietrich et al. 2003).

Certain ABC-carriers, i.e. MRPs 1, 3, 4, and 6, are mainly found in the basolateral membrane, where they confer secretion of organic compounds into blood. In the liver MRP1 and MRP6 are strongly expressed, whereas MRP3 and MRP4 expression is low in normal liver. MRP1 transports non-metabolized cytotoxic drugs including certain cytostatics (daunomycin, doxorubicin, vincristine, but not cisplatin) known to be also P-glycoprotein transportates. In addition, ATP-dependent efflux of conjugated endogenous compounds, i.e. bilirubin glucuronides, cysteinyl-leukotriene C<sub>4</sub>, estradiol 17 $\beta$ -glucuronide and dianionic bile salts, is promoted, and efflux of xenobiotic conjugates via MRP1 may also occur (Leslie et al. 2001).

MRP3, normally present in the liver at low expression level, is highly expressed if hepatobiliary drug excretion is impaired due to extrahepatic cholestasis (Ogawa et al. 2000; Soroka et al. 2001; Scheffer et al. 2002). Under cholestasis (Donner and Keppler 2001) and in patients suffering from Dubin-Johnson syndrome (König et al. 1999), this carrier allows reflux of drug metabolites out of the hepatocyte into blood (*small arrow* of Fig. 3). At certain blood/tissue barriers such as the blood/brain and blood/testis barrier, reflux out of the cell into the blood occurs via P-glycoprotein (MDR1) and other carriers of the ABCC and ABCG family (Fromm 2004). P-glycoprotein could act as a “vacuum cleaner” (Bolhuis et al. 1997), sucking lipophilic drugs out of membrane phospholipids. Such drugs will not have penetrated through the membrane into the cell cytoplasm, and are thus not subjected to phase 1/phase 2 metabolism. This mechanism would impose a strict barrier at the membrane level between blood and tissues.



**Fig. 4** Individual carriers in the hepatocyte which are involved in drug uptake and secretion. OAT/Oat = organic anion transporter belonging to the SLC22 family; OCT/Oct = organic cation transporter belonging to the SLC22 family; NTCP/Ntcp = Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide belonging to the SLC10 family; OATP/Oatp = organic anion transporting polypeptide belonging to the SLCO family (previously called SLC21). MDR1/

MDR1 = multidrug resistance protein (ABCB1), BCRP/Bcrp = breast cancer resistance protein (ABCG2), MRP2/Mrp2 = multidrug resistance-associated protein (ABCC2), BSEP/Bsep = bile salt export pump (ABCB11) all belonging to ABC-carrier proteins; OA<sup>-</sup> = organic anion; BS<sup>-</sup> = bile salt; OC<sup>+</sup> = organic cation; DC<sup>-</sup> = dicarboxylate; GSH = glutathion

### Perspective: intracellular transport of xenobiotics within a polarised cell

A mandatory step following phase 0 and also the biotransformation phases 1 or 2 is a cytoplasmic shuttle service of xenobiotics between differing cell poles. Pharmacokinetic phases 1 and 2 of drug metabolism preferably, but not exclusively, occur in the endoplasmic reticulum (ER), and are related to drug metabolism by membrane-bound cytochrome P450s (CYPs) and comparable enzymes (phase 1), followed by reactions of phase 2. Here, conjugating enzymes within or outside of the ER, such as glucuronosyltransferases (UGT-GTs), glutathione-S-transferases (GSTs), sulfotransferases (SULTs), cytoplasmic N-acetylases (NATs) and others, generate drug metabolites which are suited for rapid excretion (Fig. 3, *main arrow*). The metabolism phases afford delivery of drugs from the basolateral cell membrane to the ER and, later, of drug metabolites from the ER to the secretory sites of the cell membrane. This step is referred to as transport phase 3 in this review (Fig. 3). Cytoplasmic phase 3 transport represents a vectorial transport phase which has not yet been described in detail in any of the various pharmacokinetic cell transport models that have to date been published. It appears unlikely that cytoplasmic drug trafficking is a matter of simple physical diffusion, because diffusion would account for neither the velocity nor the efficiency of drug excretion by polarized cells. Thus, phase 3 drug transport needs floating carrier proteins or carrier particles. Previously, a protein named ligandin was considered as an important protein for cytoplasmic drug delivery in the liver (Levi et al. 1969). Later it was recognized that this protein was a glutathione-S-transferase (Habig et al. 1974). Other travelling proteins considered were cytosolic fatty acid-binding proteins (cFABPs), ileal lipid-binding proteins (ILBP) and bile acid-binding proteins (for a review see Petzinger 1994; Kramer et al. 2001). They comprise intracellular steps of the enterohepatic circulation of bile acids and drugs. Such binding proteins are assumed to travel together with transporter ligands along cytoskeletal tracks to their distinctive membrane sites (Bilej and Vetvicka 1989). Modern reflexions consider also endocytic trafficking pathways as important routes of drugs in the cell (Watson et al. 2005). For example, some weakly basic drugs such as doxorubicin may accumulate within acidic lysosomal organelles (Weaver et al. 1991), and thus may follow the traffic via vesicular pathways either in the lysosomal compartment (Lloyd 2000) or after fusion with endosomes in the multivesicular body (MVB) compartment. Vesicular cytoplasmic drug traffic may also require the participation of the cytoskeleton (Murray and Wolkoff 2003), and could explain cholestatic effects of toxins destroying the cytoskeleton (Ohashi et al. 2002). During cholestasis, the redistribution of some membrane carrier proteins would change the hepatobiliary secretion route for drugs which, instead of circulating into bile, reflux back to the blood (*small arrow* Fig. 3) (Rost et al. 1999). New approaches use fluorescent drugs or drugs coupled to fluorescent dyes

for live cell imaging of intracellular transport pathways (Watson et al. 2005). This will better help to elucidate phase 3 drug transport in the future.

### Clinical importance of implementing drug transporter phases

Drug transporters of the SLC-families preferably transport hydrophilic and amphiphilic xenobiotics. These carriers could confer some organ selectivity in xenobiotic elimination and toxicity. E.g. the Green Death Cap mushroom toxin phalloidin has long been recognised to be a liver-selective toxin. It was suggested by the author in the early 1980s that the bicyclic heptapeptide phalloidin should be transported by a liver-specific bile acid transporter (Petzinger et al. 1979; Petzinger 1981). In 2003 the liver-specific human OATP1B1, syn. OATP-C was shown to transport phalloidin (Fehrenbach et al. 2003). Only in the hepatocyte can the peptide accumulate to such an extent that the cytoskeletal protein actin is blocked. OATP carriers transport bile acids (Trauner and Boyer 2003) and a plethora of drugs (Hagenbuch and Meier 2003) including HMG-CoA reductase inhibitors such as pravastatin (Ziegler and Stünkel 1992; Ziegler and Hummelsiep 1993; Hsiang et al. 1999). Oatps were addressed by drugs conjugated with bile acids in a bile acid-based drug targeting approach for the liver (Kramer et al. 1992; Meijer 1993; Petzinger et al. 1995; Kramer and Wess 1996).

Drug–drug interferences already occur at the level of phase 0. A known example is inhibition of tubular secretion of  $\beta$ -lactam antibiotics penicillin G and cephalosporine by probenecid (Burckhardt and Burckhardt 2003). In the past this interaction was used clinically to diminish renal excretion of penicillins and to prolong their half-life times in serum. The timely development of  $\beta$ -lactam antibiotics with longer half-lives now makes the co-application of probenecid unnecessary. Dibromosulfophthalein is a substrate of the basolateral Oatp1a1 and of canalicular Mrp2 in rat liver (compare Fig. 4). It inhibited the hepatobiliary excretion of fexofenadine into rat bile by blockage of fexofenadine entry into the hepatocyte and, thereby, markedly reduced fexofenadine liver-tissue concentration (Milne et al. 2000). Decreased absorption of fexofenadine from gut after concomitant intake of grapefruit, orange, or apple juice has been reported (Dresser et al. 2002) and was partly related to transport competition. Further examples of clinically relevant drug interactions versus phase-0 carriers have been noted elsewhere (Ayrton and Morgan 2001).

Better known are drug–drug interactions resulting from transport competition on phase 4 ABC-carriers. For example, hepatobiliary liver excretion of the antihistaminic drug fexofenadine is reduced by 46% if co-administered with erythromycin, due to competition on P-glycoprotein (Milne et al. 2000). In contrast to dibromosulfophthalein (see above), erythromycin did not reduce the intrahepatic concentration of fexofenadine. The  $\beta$ -blocker talinolol is transported by P-glycoprotein (Grammatté et al. 1996). Therefore, the P-glycoprotein inhibitor verapamil inhibited

the excretion of talinolol via the gut (Grammatté and Oertel 1999) and enhanced the oral exposure to the drug (Spahn-Langguth et al. 1998). Co-substrates of P-glycoprotein are the commonly used drugs ketoconazole/itraconazole, erythromycin, and quinidine. Previous clinical observations of a significant increase of plasma concentrations of digoxin, a cardiac glycoside, by simultaneous application of the antiarrhythmic drug quinidine (Doering 1979; Dahlquist et al. 1980; Pedersen et al. 1983) are now explained by transport competition on P-glycoprotein (Fromm et al. 1999; Drescher et al. 2003). This clinically important interaction was previously interpreted to be caused predominantly by phase 1 interactions (Dresser et al. 2001). The implementation of drug-carrier interactions (phase 4) into the picture of drug-CYP interactions (phase 1) (Ito et al. 1998) may also resolve certain drug-drug interactions among the modern anti-HIV-protease inhibitors ritonavir and saquinavir. Combinations of ritonavir with saquinavir boosted saquinavir blood levels severalfold (Van Heeswijk et al. 2001). Both compounds are P-glycoprotein substrates (Kim et al. 1998; Washington et al. 2000) but are also metabolized by CYP3A4 enzyme. A recent clinical study indicated that ritonavir exerted both types of interactions, namely inhibition of first-pass metabolism and increased bioavailability due to inhibition of intestinal P-glycoprotein secretion (Kilby et al. 2002).

Conversely, examples of co-stimulation of phase 2 enzyme and MRP-transporter expression under drug therapy are also known (Catania et al. 2004). For example, the herbal medicine St. John's Wort is a strong inducer of several human drug-metabolizing enzymes (Delgoda and Westlake 2004) but also induces MRP2 transcription in rats and in human HepG2 cells respectively (Shibayama et al. 2004; Krusekopf and Roots 2005). Via the same PXR-mediated transactivation, human CYP3A4 and P-glycoprotein expression is enhanced, too (Synold et al. 2001). It is due to this mode of action that St. John's Wort had a detrimental effect on therapy with immunosuppressants cyclosporin A and tacrolimus, with antineoplastic agents irinotecan and imatinib mesylate, and with hormonal contraceptives (Mannel 2004). Several drugs, i.e. oltipraz, garlic compound allyl sulphide, rifampicin, tamoxifen, and phenobarbital—already known inducers of phase 1 CYP enzymes—also induce or enhance MRP2- and P-glycoprotein-related drug transport (Fardel et al. 2005). For example, the well-known CYP inducers rifampicin/rifampin and phenobarbital are co-inducers of P-glycoprotein. Such changes complicate the prediction of drug-drug interactions enormously (Ito et al. 1998). Under rifampin, the plasma concentration of digoxin and talinolol decreased due to induction of intestinal digoxin secretion via P-glycoprotein (Greiner et al. 1999; Westphal et al. 2000). It is the extent of either inhibition or stimulation of metabolism, together with effects on transport, which alters the pharmacokinetic balance between the phases and which finally modulates drug-drug interactions in a very subtle manner (Zhang et al. 1998; Wandel et al. 1999).

## Drug carrier polymorphisms and pathologies

Genetic carrier polymorphisms cause functional alterations of drug kinetics and their effects, and also of hereditary diseases. There are reports addressing pharmacokinetic consequences related to MDR1 polymorphism (Hoffmeyer et al. 2000; Drescher et al. 2002, 2003; Ieiri et al. 2004) and OATP-polymorphisms (Tirona et al. 2001; Nozawa et al. 2002; König et al. 2006). A frequent polymorphism of phase 4 MDR1 carrier occurring in about 12% of patients is the homozygous C3435T exchange. In these patients, (i) less than half of the normal MDR1 gene expression in the intestine, (ii) much lower gene induction by rifampin, and (iii) decreased excretion of digoxin into the gut was reported. Therefore, the homozygous T/T patients had digoxin plasma levels under rifampin stimulation four times higher than those of rifampin-stimulated homozygous C/C MDR1 patients (Hoffmeyer et al. 2000). On the other hand, plasma kinetics of P-glycoprotein substrate fexofenadine was not altered in patients bearing the C3435T or a G2677T mutation, although the activity of P-glycoprotein was markedly reduced (Drescher et al. 2002). Therefore, the known variability of the plasmakinetics of this drug in normal populations may have other reasons, and alterations in the phase 0 uptake transporters were considered (Drescher et al. 2002).

Other authors reported that certain SNPs and haplotypes of MDR1 affecting P-glycoprotein expression are associated with treatment outcome and/or host susceptibility to renal epithelial tumors (Siegsmond et al. 2002), Balkan endemic nephropathie (Atanasova et al. 2004), Parkinson's disease (Drozdik et al. 2003), breast cancer (Kafka et al. 2003), inflammatory large-bowel disease (IBD) (Brant et al. 2003) and ulcerative colitis (Schwab et al. 2003).

Many of the known polymorphisms in the human MDR1 gene are either functionally silent, or only marginally alter P-glycoprotein-mediated transport. None of them resulted in a complete loss of transport. This, however, was observed when a deletion mutation was found to occur frequently in the Collie dog MDR1 gene (Mealey et al. 2001; Roulet et al. 2003; Geyer et al. 2005a,b). These dogs suffer from neurotoxic symptoms of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin that normally do not reach the central nervous system (Geyer et al. 2005a). In these dogs, lethal outcomes following drug application have even occurred (Pulliam et al. 1985; Paul et al. 1987).

Single nucleotide polymorphisms are also frequent in human phase zero OATP carriers. In the OATP-C gene (OATP1B1), which is specifically expressed only in the liver, the cholesterol-lowering effect of pravastatin decreased in patients exhibiting multiple SNPs, due to the decreased drug uptake into hepatocytes where the drug inhibits HMG-Co-A reductase (Kim 2004; Niemi et al. 2004, 2005a). An analogous kinetic change was reported for fexofenadine, which uses this carrier for hepatobiliary clearance. Patients with the T512C-SNP had higher plasma levels of this H<sub>1</sub>-receptor antihistamine when compared

with patients lacking or exhibiting non-functional SNPs (Niemi et al. 2005b). SNPs have been also reported for other human OATP members, namely OATP1A2, 1B3, and 2B1 (Iida et al. 2001).

Pathologies of the liver related to single carrier defects and associated with severe inherited diseases are rare in humans. Of those that have been identified, all are caused by loss of function of phase 4 carriers (Jansen 2001; Kubitz et al. 2005). Examples are Dubin–Johnson syndrome caused by MRP2 (ABCC2) loss (Paulusma and Oude Elferink 1997) and subtypes of progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC), of which PFIC type 2 and PFIC type 3 are the most progressive cholestases caused by functional loss of BSEP (ABCB11) and of MDR3 (ABCB4; syn. Mdr2 in rodents), respectively (DeVree et al. 1998; Maissonnette et al. 2005; Wagner and Trauner 2005). Dubin–Johnson syndrome results in black pigmentation of the liver and high serum levels of glucuronidated bilirubins. Since conjugated bilirubin is not toxic, the MRP2 defect does not elevate serum cytotoxicity markers, and prognosis is good (Jansen 2001). In Dubin–Johnson syndrome, the defect of MRP2 is counteracted by an overexpression of MRP3, enabling the release of glucuronidated bilirubin into blood. PFIC2, also named Byler’s syndrome, is characterised by marginal biliary bile acid secretion (1% of normal), jaundice and progressive cholestasis requiring liver transplantation within the first decade (Wagner and Trauner 2005). PFIC3 is characterised by defective phospholipid, particularly phosphatidylcholine secretion into bile, and high serum  $\gamma$ -glutamyltransferases levels (DeVree et al. 1998). The prognosis of this disease is infaust.

On the other hand, and already mentioned, remarkable reconstruction of carrier expression resulting in synchronous up- and down-regulation of multiple transporters in the basolateral and canalicular membrane is observed in patients with intra- or extrahepatic cholestasis (Trauner et al. 1998, 2005; Shoda et al. 2001). These phenomena reflect adaptive transport modulation aiming to prevent excessive load of liver cells with toxic bile acids and cholephilic xenobiotics. Whilst the understanding of the molecular mechanisms of cholestasis is becoming more and more detailed on this level, this knowledge also offers an intriguing approach for a rational treatment of liver diseases (Wagner and Trauner 2005).

## In conclusion

We would like to emphasize an integrated drug metabolism/drug transporter concept consisting of the “old” metabolism phases 1 and 2 but extended for new transport phases: the sequential processes of carrier-mediated drug uptake, intracellular drug transport, and carrier-mediated drug excretion. A carrier-mediated uptake phase 0 precedes the metabolism phases 1 and 2. A transcellular transport of a xenobiotic/metabolite through the cytosol of a polar excretory cell is termed phase 3, and the final carrier-mediated excretory process across the cell membrane is

named phase 4. Each phase is prone to drug–drug interactions, both by blockade or induction. Prediction models for drug pharmacokinetics based hitherto on metabolism need to be expanded to include transport phases. Clinical and toxicological relevancies have been reported in the literature.

**Acknowledgement** We wish to thank Dr. Bruce Boschek for critically reading the manuscript.

## References

- Alvarado F, Van Os CH (1986) (eds) Ion gradient-coupled transport. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 442
- Atanasova S, von Ahnen N, Dimitrov T, Armstrong V, Oellerich M, Toncheva D (2004) MDR1 haplotypes modify BEN disease risk: a study in Bulgarian patients with Balkan endemic nephropathy compared to healthy controls. *Nephron Exp Nephrol* 96:7–13
- Athayde AL, Ivory CF (1985) Electrical pumping in carrier-mediated membrane transport. *J Membr Sci* 24:309–323
- Ayrton A, Morgan P (2001) Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 31:469–497
- Bilej M, Vetvicka V (1989) The transmembrane and intracellular transport of drugs: interactions with the cytoskeletal network. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 6:613–691
- Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B, Driessen AJ, Konings WN (1997) Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev* 21:55–84
- Borst P, Oude Elferink R (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537–592
- Brant SR, Panhuysen CI, Nicolae D, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R, Zhang L, Swanson E, Datta LW, Moran T, Ravenhill G, Duerr RH, Achkar JP, Karban AS, Cho JH (2003) MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 73:1282–1292
- Brodie BB (1964) Physico-chemical factors in drug absorption. In: Binns TB (ed) *Absorption and distribution of drugs*. Livingstone, Edinburgh, pp 16–48
- Brodie BB, Hogben CAM (1957) Some physico-chemical factors in drug action. *J Pharmacy Pharmacol* 9:345–380
- Burckhardt BC, Burckhardt G (2003) Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 146:95–158
- Burckhardt G, Wolff NA (2000) Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F853–F866
- Caldwell PC (1956) The effects of certain metabolic inhibitors on the phosphate esters of the squid giant axon. *J Physiol (London)* 132:35
- Caldwell PC (1960) The phosphorus metabolism of squid axons and its relationship to the active transport of sodium. *J Physiol (London)* 152:545–560
- Carafoli E, Scarpa A (1982) (eds) Transport-ATPases. *Ann N Y Acad Sci, New York* (402):604
- Catania VA, Sanchez Pozzi EJ, Luquita MG, Ruiz ML, Villanueva SS, Jones B, Mottino AD (2004) Co-regulation of expression of phase II metabolizing enzymes and multidrug resistance-associated protein 2. *Ann Hepatol* 3:11–17
- Chan LMS, Lowes S, Hirst BH (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharmaceut Sci* 21:25–51
- Chandra P, Brouwer KL (2004) The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* 21:719–735
- Crane RK, Krane SM (1959) Studies on the mechanism of intestinal active transport of sugars. *Biochim Biophys Acta* 31:397–401

- Dahlquist R, Ejvinsson G, Schenk-Gustaffson K (1980) Effect of quinidine on plasma concentration and renal clearance of digoxin. A clinically important drug interaction. *Brit J Clin Pharmacol* 9:413–418
- Daniel H (2004) Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 66:361–384
- Daniel H, Rubio-Aliaga I (2003) An update on renal peptide transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F885–F892
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11:1156–1166
- Delgoda R, Westlake AC (2004) Herbal interactions involving cytochrome p450 enzymes: a mini review. *Toxicol Rev* 23:239–249
- DeVree J, Jacquemin E, Sturm E, Creteil D, Bosma PJ, Aten J, DeLeuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink RP, Hadchouel M (1998) Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:282–287
- Diamond JM, Wright EM (1969) Biological membranes: the physical basis of ion and nonelectrolyte selectivity. *Annu Rev Physiol* 31:581–646
- Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RPJ (2003) ABC or oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* 52:1788–1795
- Doering W (1979) Quinidine-digoxin interaction: Pharmacokinetics, underlying mechanism and clinical implications. *N Engl J Med* 301:400–404
- Donner MG, Keppler D (2001) Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* 34:351–359
- Drescher S, Schaeffeler E, Hitzl M, Hofmann U, Schwab M, Brinkmann U, Eichelbaum M, Fromm MF (2002) MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine. *Br J Clin Pharmacol* 53:526–534
- Drescher S, Glaser H, Mürdter T, Hitzl M, Eichelbaum M, Fromm MF (2003) P-glycoprotein-mediated intestinal and biliary digoxin transport in humans. *Clin Pharmacol Ther* 73:223–231
- Dresser MJ, Leabman MK, Giacomini KM (2001) Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *Pharmaceut Sci* 90:397–420
- Dresser GK, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ, Kim RB (2002) Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther* 71:11–20
- Drozdziak M, Bialecka M, Mysliwiec K, Honczarenko K, Stankiewicz J, Sych Z (2003) Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 13:259–263
- Elleroy JC, Lew VL (1977) (eds) *Membrane transport in red cells*. Academic Press, New York, pp 469
- Fardel O, Jigorel E, Le Vee M, Payen L (2005) Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. *Biomed Pharmacother* 59:104–114
- Fehrenbach T, Cui Y, Faulstich H, Keppler D (2003) Characterization of the transport of the bicyclic peptide phalloidin by human hepatic transport proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 368:415–420
- Fromm MF (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 25:423–429
- Fromm MF, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR, Roden DM (1999) Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: a unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine. *Circulation* 99:552–557
- Gao B, St Pierre MV, Stieger B, Meier PJ (2004) Differential expression of bile salt and organic anion transporters in developing rat liver. *J Hepatol* 41:202–208
- Gerok W, Sickinger K (1973) (eds) *Drugs and the liver*. Schattauer Verlag, Stuttgart, pp 441
- Geyer J, Döring B, Godoy JR, Moritz A, Petzinger E (2005a) 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* 28:95–99
- Geyer J, Döring B, Godoy JR, Moritz A, Petzinger E (2005b) Frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds from Germany. *J Vet Pharmacol Ther* 28:545–551
- Geyer J, Wilke T, Petzinger E (2006) The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, this issue
- Gilles-Baillieu M, Gilles R (1983) (eds) *Intestinal transport: fundamental and comparative aspects*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 375
- Gillette JR (1963) Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms. *Progr Drug Res* 6:11–75
- Grammatté T, Oertel R (1999) Intestinal secretion of intravenous talinolol is inhibited by luminal R-verapamil. *Clin Pharmacol Ther* 66:239–245
- Grammatté T, Oertel R, Terhaa, B, Kirch W (1996) Direct demonstration of small intestinal secretion and side-dependent absorption of the  $\beta$ -blocker talinolol in human. *Clin Pharmacol Ther* 59:541–549
- Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK (1999) The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 104:147–153
- Greger R, Lang F, Silbernagl S (1981) (eds) *Renal transport of organic substances*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 314
- Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H (1994) Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature* 372:549–552
- Habig WH, Pabst MJ, Fleischner G, Gatmaitan Z, Arias IM, Jacoby WB (1974) The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:3879–3882
- Hagenbuch B, Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609:1–18
- Haimeur A, Conseil G, Geeley RG, Cole SP (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 5:21–53
- Hediger MA, Coody MJ, Ikeda TS, Wright EM (1987) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *Nature (London)* 330:379–381
- Hediger MA, Romero MF, Peng JB, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA (2004) The ABCs of solute carriers: physiological, pathological, and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pfluegers Arch* 447:465–468
- Heinz E (1972) (eds) *Na-linked transport of organic solutes. The coupling between electrolyte and nonelectrolyte transport in cells*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 201
- Heinz E (1978) (eds) *Mechanics and energetics of biological transport*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 159
- Hoffmann U, Kroemer HK (2004) The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev* 86:669–701
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold H P, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3473–3478
- Hogben CAM, Tocco DJ, Brodie BB, Schanker LS (1959) On the mechanism of intestinal drug absorption of drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 125:275–282
- Homolya L, Varadi A, Sarkadi B (2003) Multidrug resistance-associated proteins: export pumps for conjugates with glutathione, glucuronate or sulfate. *Biofactors* 17:103–114

- Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2) Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 274:37161–37168
- Ieiri I, Takane H, Otsubo K (2004) The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 43:553–576
- Iida A, Saito S, Sekine A, Mishima C, Kondo K, Kitamura Y, Harigae S, Osawa S, Nakamura Y (2001) Catalog of 258 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding three organic anion transporters, three organic anion transporting polypeptides, and three NADH : ubiquinone oxidoreductase flavoproteins. *J Hum Genet* 46:668–683
- Ito K, Iwatsuro T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y (1998) Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* 50:387–411
- Jackson MJ (1987) Drug transport across gastrointestinal epithelia. In: LR Johnson (ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, pp 1597–1621
- Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ (1994) Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:133–137
- Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455:152–162
- Jansen PLM (2001) Hereditary defects of hepatobiliary transport. In: Matern S, Boyer JL, Keppler D, Meier-Abt PJ (eds) *Hepatobiliary transport: from bench to bedside*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp 91–97
- Kafka A, Sauer G, Jaeger C, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H (2003) Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Int J Oncol* 22:1117–1121
- Keynes RD (1961) The energy source for active transport in nerve and muscle. In: A Kleinzeller, A Kotyk (eds) *Membrane transport and metabolism*. Academic Press, London, pp 131–139
- Kilby JM, Hill A, Buss N (2002) The effect of ritonavir on saquinavir plasma concentration is independent of ritonavir dosage: combined analysis of pharmacokinetic data from 97 subjects. *HIV Med* 3:97–104
- Kim RB (2004) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) and genetic variability (single nucleotide polymorphisms) in a hepatic drug uptake transporter: what's it all about? *Clin Pharmacol Ther* 75:381–385
- Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJJ, Roden DM, Wilkinson GR (1998) The drug transporter p-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. *J Clin Invest* 101:289–294
- Klaassen CD, Watkins JB (1984) Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. *Pharmacol Rev* 36:1–67
- Koepsell H, Endou H (2004) The SLC22 drug transporter family. *Pflügers Arch* 447:666–676
- König J, Rost D, Cui Y, Keppler D (1999) Characterisation of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 29:1156–1163
- König J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF (2006) Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, this issue
- Kramer M, Lauterbach F (1977) (eds) *Intestinal permeation*. Excerpta Medica, Amsterdam, pp 449
- Kramer W, Wess G (1996) Bile acid transport systems as pharmaceutical targets. *Eur J Clin Invest* 26:715–732
- Kramer W, Wess G, Schubert G, Bickel M, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Baringshaus K-H, Ehnsen A, Glombik H, Müllner S, Neckermann G, Schulz S, Petzinger E (1992) Liver-specific drug targeting by coupling with bile acids. *J Biol Chem* 267:18598–18604
- Kramer W, Sauber K, Baringshaus K-H, Kurz M, Stengelin S, Lange G, Corsiero D, Girbig F, König W, Weyland C (2001) Identification of the bile acid-binding site of the ileal lipid-binding protein by photoaffinity labelling, matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry, and NMR structure. *J Biol Chem* 276:7291–7301
- Krusekopf S, Roots I (2005) St. John's wort and its constituent hyperforin concordantly regulate expression of genes encoding enzymes involved in basic cellular pathways. *Pharmacogenetics* 15:817–829, *Genomics*
- Kubitz R, Keitel V, Häussinger D (2005) Inborn errors of biliary canalicular transport systems. *Meth Enzymol* 400:558–569
- Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G (2000) Hepatobiliary transport. *J Hepatol* 32:3–18
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ (2004) Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126:322–342
- LeFevre PG (1948) Evidence of active transfer of certain non-electrolytes across the human red cell membrane. *J Gen Physiol* 31:505–507
- LeFevre PG (1975) The present state of the carrier hypothesis. In: Bronner F, Kleinzeller A (eds) *Current topics in membranes and transport*. Academic Press, London, pp 109–215
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2001) Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167:3–23
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:216–237
- Levi AJ, Gatmaitan Z, Arias IM (1969) Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions. *J Clin Invest* 48:2156–2167
- Liu L, Pang KS (2005) The roles of transporters and enzymes in hepatic drug processing. *Drug Metab Dispos* 33:1–9
- Lloyd JB (2000) Lysosome membrane permeability: implications for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 41:189–200
- Maisonnette F, Abita T, Barriere E, Pichon N, Vincensini JF, Descottes B (2005) The MDR3 gene mutation: a rare cause of progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC). *Ann Chir* 130:581–583
- Mannel M (2004) Drug interactions with St John's wort: mechanisms and clinical implications. *Drug Saf* 27:773–797
- Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation in the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11:727–733
- Meijer DK (1993) Drug targeting to the liver with bile acids: the "Trojan horse" resurrected? *Hepatology* 17:945–948
- Milne RW, Larsen LA, Jorgensen KL, Bastlund JF, Stretch GL, Evans AM (2000) Hepatic disposition of fexofenadine: influence of the transport inhibitors erythromycin and dibromosulphothalein. *Pharmaceutical Res* 17:1511–1515
- Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y (2003) Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 55:425–461
- Müller M, Jansen PLM (1998) The secretory step of the liver: new aspects of hepatobiliary transport. *J Hepatol* 28:344–354
- Murray JW, Wolkoff AW (2003) Roles of the cytoskeleton and motor proteins in endocytic sorting. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1385–1403
- Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, Backman J T, Kerb R, Schwab M, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivistö KJ (2004) High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SCL01B1). *Pharmacogenetics* 14:429–440
- Niemi M, Neuvonen PJ, Hofmann U, Backman JT, Schwab M, Lütjohann D, von Bergmann K, Eichelbaum M, Kivistö KT (2005a) Acute effects of pravastatin on cholesterol synthesis are associated with SCL01B1 (encoding OATP1B1) haplotype \*17. *Pharmacogen Genom* 15:303–309

- Niemi M, Kivistö KT, Hofmann U, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm M (2005b) Fexofenadine pharmacokinetics are associated with a polymorphism of the SCL01B1 gene (encoding OATP1B1). *Br J Clin Pharmacol* 59:602–604
- Nozawa T, Nakajima M, Tamai I, Noda K, Nezu JI, Sai Y, Tsuji A, Yokoi T (2002) Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional studies. *J Pharmacol Exp Ther* 302:804–813
- Ogawa K, Suzuki H, Hirohashi T, Ishikawa T, Meier PJ, Hirose K, Akizawa T, Yoshioka M, Sugiyama Y (2000) Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G438–G446
- Ohashi M, Sano N, Takikawa H (2002) Effects of phalloidin on the biliary excretion of cholephilic compounds in rats. *Pharmacology* 66:31–35
- Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS, DiPietro JA (1987) Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res* 48:684–685
- Pauli-Magnus C, Meier PJ (2004) Pharmacogenetics of hepatocellular transporters. *Pharmacogenetics* 13:189–198
- Paulusma LC, Oude Elferink RP (1997) The canalicular multi-specific anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man. *J Mol Med* 75:420–428
- Pedersen KE, Christensen BD, Klittgaard NA, Nielsen-Kudsk F (1983) Effect of quinidine of digoxin bioavailability. *Eur J Clin Pharmacol* 24:41–47
- Petzinger E (1981) Competitive inhibition of the uptake of demethylphalloin by cholic acid in isolated hepatocytes. Evidence for a transport competition rather than a binding competition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316:345–349
- Petzinger E (1994) Transport of organic anions in the liver. An update on bile acid, fatty acid, monocarboxylate, anionic amino acid, cholephilic organic anion, and anionic drug transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 123:47–211
- Petzinger E, Ziegler K, Frimmer M (1979) Inhibition of <sup>3</sup>H-demethylphalloin uptake in isolated rat hepatocytes under various experimental conditions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 307:275–281
- Petzinger E, Kinne RKH, Sies H (1989) (eds) *Hepatic transport of organic substances*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 435
- Petzinger E, Nickau L, Horz JA, Schulz S, Wess G, Ehnsen A, Falk E, Baringhaus K-H, Glombik H, Hoffmann A, Müllner S, Nekermann G, Kramer W (1995) Hepatobiliary transport of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitors conjugated with bile acids. *Hepatology* 22:1801–1811
- Pritchard JB, Miller DS (1993) Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol Rev* 73:765–796
- Pulliam JD, Seward RL, Henry RT, Steinberg SA (1985) Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Vet Med* 80:33–40
- Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I (1986) Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4538–4542
- Rosenberg T, Wilbrandt W (1957) Uphill transport induced by counterflow. *J Gen Physiol* 41:289–296
- Rost D, Kartenbeck J, Keppler D (1999) Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump *Mrp2* in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology* 29:814–821
- Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T (2003) *MDR1*-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur J Pharmacol* 460:85–91
- Russel FG, Masereeuw R, Van Aubel RA (2002) Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu Rev Physiol* 64:563–594
- Scheffer GL, Kool M, de Haas M, de Vree JM, Pijnenborg AC, Bosman DK, Oude Elferink R, Van Borst P, Scheper RJ (2002) Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest* 82:193–201
- Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M (2003) Association between the C3435T *MDR1* gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124:26–33
- Sekine T, Watanabe N, Hosoyamada M, Kanai Y, Endou H (1997) Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter. *J Biol Chem* 272:18526–18529
- Semenza G, Kinne R (1985) (eds) *Membrane transport driven by ion gradients*. *Ann N Y Acad Sci* 456:459
- Shibayama Y, Ikeda R, Motoya T, Yamada K (2004) St John's Wort (*Hypericum perforatum*) induces overexpression of multidrug resistance protein2 (MRP2) in rats: a 30-day ingestion study. *Food Chem Toxicol* 42:995–1002
- Shoda J, Kano M, Oda K, Kamiya J, Nimura Y, Suzuki H, Sugiyama Y, Miyazaki H, Todoroki T, Stengelin S, Kramer W, Matsuzaki Y, Tanaka N (2001) The expression levels of plasma membrane transporters in the cholestatic liver of patients undergoing biliary drainage and their association with the impairment of biliary secretory function. *Am J Gastroenterol* 96:3368–3378
- Siegmund M, Brinkmann U, Schaeffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, Fritz P, Burk O, Decker J, Alken P, Rothenpieler U, Kerb R, Hoffmeyer S, Brauch H (2002) Association of the P-glycoprotein transporter *MDR1*(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol* 13:1847–1854
- Smith JN, Williams RT (1949) The metabolism of phenacetin (p-ethoxyacetanilide) in the rabbit and a further observation on acetanilide metabolism. *Biochem J* 44:239–242
- Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F, Boyer JL (2001) Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 33:783–791
- Spahn-Langguth H, Baktir G, Radschuwiet A, Okyar A, Terhaag B, Ader P, Hanafy A, Langguth P (1998) P-glycoprotein transporters and the gastrointestinal tract: evaluation of the potential in vivo relevance of in vitro data employing talinolol as model compound. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36:16–24
- Sperber I (1959) Secretion of organic anions in formation of urine and bile. *Pharmacol Rev* 11:109–134
- Stein W (1967) (ed) *The movement of molecules across membranes*. Academic Press, New York, pp 367
- Sweet DH, Wolff NA, Pritchard JB (1997) Expression cloning and characterization of ROAT1 The basolateral organic anion transporter in rat kidney. *J Biol Chem* 272:30088–30095
- Synold TW, Dussault I, Forman BM (2001) The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulated drug metabolism and efflux. *Nature Med* 7:584–590
- Tirona RG, Kim RB (2002) Pharmacogenomics of drug transporters. In: J Licinio, M-L Wing (eds) *Pharmacogenomics: the search for individualized therapies*. Wiley-VCH, pp 179–213
- Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB (2001) Polymorphisms in OATP-C: Identification of multispecific allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 276:35669–35675
- Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633–671
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL (1998) Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 339:1217–1227
- Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G (2005) Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J Clin Gastroenterol* 39:S111–S124
- Ullrich KJ (1997) Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *J Membr Biol* 158:95–107
- Van Heeswijk RP, Veldkamp A, Mulder JW, Meenhorst PL, Lange JM, Beijnen JH, Hoetelmans RM (2001) Combination of protease inhibitors for the treatment of HIV-1-infected patients: a review of pharmacokinetics and clinical experience. *J Antivir Ther* 6:201–229

- Van Montfoort JE, Hagenbuch B, Groothuis GMM, Koepsell H, Meier PJ, Meijer DKF (2003) Drug uptake systems in liver and kidney. *Curr Drug Metab* 4:185–211
- Wagner M, Trauner M (2005) Transcriptional regulation of hepatobiliary transport systems in health and disease: implications for a rationale approach to the treatment of intrahepatic cholestasis. *Ann Hepatol* 4:77–99
- Wandel C, Kim RB, Kajiji S, Guengerich FP, Wilkinson GR, Wood AJJ (1999) P-glycoprotein and cytochrome P-450 3 A inhibition: dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Res* 59:3944–3948
- Ward WJ III (1970) Electrically induced carrier transport. *Nature* 227:162–163
- Washington CB, Wiltshire HR, Man M, Moy T, Harris SR, Worth E, Weigl P, Liand Z, Hall D, Marriot L, Blaschke TF (2000) The disposition of saquinavir, in normal and P-glycoprotein deficient mice, rats, and cultured cells. *Drug Metab Disp* 28:1058–1062
- Watson P, Jones AT, Stephens DJ (2005) Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Adv Drug Deliv Rev* 57:43–61
- Weaver JL, Pine PS, Aszalos A, Schoenlein PV, Currier SJ, Padmanabhan R, Gottesman MM (1991) Laser scanning and confocal microscopy of daunorubicin, doxorubicin, and rhodamine 123 in multi-drug resistant cells. *Exp Cell Res* 196:323–329
- Westphal K, Weinbrenner A, Zschiesche M, Franke G, Knoke M, Oertel R, Fritz P, von Richter O, Warzok R, Hachenberg T, Kaumann HM, Schrenk D, Terhaag B, Kroemer HK, Siegmund W (2000) Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction. *Clinical Pharmacol Ther* 68:345–355
- Wilbrandt W (1975) Criteria in carrier transport. In: H Eisenberg, E Katchalski-Kazir, LA Manson (eds) *Biomembranes* vol 7. Plenum Press New York, London, pp 11–31
- Williams RT (1959) (ed) *Detoxification mechanisms the metabolism and detoxification of drugs, toxic substances and other organic compounds*. Chapman & Hall, London, pp 796
- Wright EM, Turk E (2004) The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflügers Arch-Eur J Physiol* 447:510–518
- Yarim M, Moro S, Huber R, Meier PJ, Kaseda C, Kashima T, Hagenbuch B, Folkers G (2005) Application of QSAR analysis to organic anion polypeptide 1a5 (Oatp 1a5) substrates. *Bioorg Med Chem* 13:463–471
- Zhang Y, Guo X, Tin ET, Benet LZ (1998) Overlapping substrate specificities of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein for a novel cysteine protease inhibitor. *Drug Metab Disp* 26:360–366
- Ziegler K, Hummelsiep S (1993) Hepatoselective carrier-mediated sodium-independent uptake of pravastatin and pravastatin-lactone. *Biochim Biophys Acta* 1153:23–33
- Ziegler K, Stünkel W (1992) Tissue-selective action of pravastatin due to hepatocellular uptake via a sodium-independent bile acid transporter. *Biochim Biophys Acta* 1139:203–209

## 10. Anhang - Publikationen

### 2) GEYER J, DÖRING B, GODOY JR, MORITZ A & PETZINGER E (2005)

Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd.

*Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Volume 28, Issue 1, pp 95-99

DOI: 10.1111/j.1365-2885.2004.00625.x

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2004.00625.x/abstract>

## Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd

J. GEYER\*<sup>‡</sup>  
B. DÖRING\*<sup>‡</sup>  
J. R. GODOY\*<sup>‡</sup>  
A. MORITZ<sup>†</sup> &  
E. PETZINGER\*

\*Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, Germany; <sup>†</sup>Clinic for Small Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, Germany

<sup>‡</sup>These authors contributed equally to this work.

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. Therap.* 28, 95–99.

A subpopulation of dogs of the Collie and Australian Shepherd breeds show increased sensitivity to central nervous actions of ivermectin, doramectin, loperamide, and probably several other drugs. The molecular background for this greater sensitivity is a nonsense mutation in the MDR1 efflux pump, which is part of the functional blood–brain barrier and normally limits drug penetration into the brain. This report describes a rapid PCR-based method for detection of this nt230(del4) MDR1 mutation using a small amount of genomic DNA from blood cells. Thereby, homozygous intact, homozygous mutated, and heterozygous mutated MDR1 genotypes can be clearly differentiated by high resolution polyacrylamide gel electrophoresis. Using this diagnostic test two Collies and one Australian Shepherd were screened for the nt230(del4) MDR1 mutation. The Collies had no history of altered drug sensitivity and showed homozygous intact and heterozygous mutated MDR1 alleles, respectively. However, the Australian Shepherd developed clear signs of neurotoxicity including ataxia, crawling, acoustic and tactile hyperexcitability, and miosis after a single dose of moxidectin (400 µg/kg). For this dog two mutated MDR1 alleles were detected. This report describes for the first time moxidectin neurotoxicosis in a dog with a homozygous MDR1 mutation.

(Paper received 20 August 2004; accepted for publication 4 October 2004)

Ernst Petzinger, Institute of Pharmacology and Toxicology, Frankfurter Str. 107, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen, 35392 Giessen, Germany. E-mail: ernst.petzinger@vetmed.uni-giessen.de

### INTRODUCTION

Ivermectin is a widely used drug in the treatment of certain ecto- and endoparasitic diseases in humans and animals. However, neurotoxic side-effects have been described in Collies in many cases, including depression, ataxia, somnolence, mydriasis, salivation, and tremor. The designation 'ivermectin-sensitive Collie' has been established in the literature to describe this particular increased drug sensitivity (Paul *et al.*, 1987; Tranquilli *et al.*, 1989; Vaughn *et al.*, 1989). Pulliam *et al.* (1985) found that an ivermectin-sensitive Collie given ivermectin at an oral dose of 600 µg/kg body weight showed 31-fold higher concentration of the drug in the brain than in the plasma, whereas normal ivermectin concentrations in the central nervous system of other dogs are 1/10th to 1/100th of plasma concentrations. This indicated to a greater penetration of ivermectin through the blood–brain barrier or a reduced elimination from the brain in this Collie (Pulliam *et al.*, 1985).

Similar results were obtained in studies in *mdr1a* [multidrug resistance (MDR)] knock-out mice, which showed 90-fold increased levels of ivermectin in the brain compared with wild-type mice after oral administration of 200 µg/kg, indicating that the MDR1 efflux pump (P-glycoprotein) plays a crucial role in either limiting the passage of ivermectin into the brain or increasing its removal from the brain (Schinkel *et al.*, 1994).

Recently, a MDR1-deficient genotype has also been described in ivermectin-sensitive Collies and an ivermectin-sensitive Australian Shepherd. The MDR1 mutation described here concerns an exonic 4-bp deletion in the palindromic sequence GATAG (ATAG or GATA) at nucleotide position 230 of the MDR1 open reading frame and creates a nonsense frame shift at amino acid position 75 followed by a premature stop codon (Mealey *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2003; Roulet *et al.*, 2003). Furthermore, it has been demonstrated, that the homozygously mutated MDR1 (–/–) genotype is strongly associated with the ivermectin-sensitive phenotype (Mealey *et al.*, 2001). In addition to

ivermectin, several other drugs such as doramectin, loperamide, vincristine, vinblastine, and doxorubicin used in the treatment of dogs may experience unexpected neurotoxic side-effects when there is a MDR1 mutation (Mealey *et al.*, 2003; Yas-Natan *et al.*, 2003; Sartor *et al.*, 2004). Therefore, development of a suitable diagnostic test detecting the nt230(del4) MDR1 mutation will help to ensure safety and should precede drug therapy in predisposed dogs. In this report, we describe the genetic analysis of three dogs, one with an increased sensitivity to moxidectin.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Blood samples from two Collies (Collie nos 1 and 2) were collected from the small animal clinic of the Justus-Liebig-University of Giessen and from one Australian Shepherd by a local veterinarian. The dogs had an unknown MDR1 status. Pedigree was available only for the Australian Shepherd.

### PCR-based diagnostic test detecting the nt230(del4) MDR1 mutation

Genomic DNA was isolated from 200 µL of EDTA-anticoagulated blood, using a DNA isolation kit according to the manufacturer's instructions (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). PCR amplification was performed in the presence of 100 ng of template DNA in 50 µL reaction mixture containing 0.4 µM of each primer (5'-att ggc ttg ata ggt tgt ata tg-3' forward and 5'-aag ttt tgt ttc ttg aaa ttc ctg-3' reward), 0.2 mM of each dNTP (2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate, 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate, 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, and 2'-deoxythymidine 5'-triphosphate), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2.5 units *Taq* DNA polymerase (BioTherm, Genecraft, Lüdinghausen, Germany). Primer setting was based on the MDR1 cDNA sequences of a beagle dog (GenBank Accession no. AF536758) and an ivermectin-sensitive Collie (GenBank Accession no. AJ419568). Reactions were performed according to the following thermocycling conditions: one cycle of 94 °C × 2 min; 10 cycles of 95 °C × 15 s, 55 °C × 15 s minus 0.5 °C each cycle, and 72 °C × 10 s; 22 cycles of 95 °C × 15 s, 50 °C × 15 s, and 72 °C × 10 s plus 5 s each cycle; and final extension of 72 °C × 10 min. After the amplification reaction, samples were held at 4 °C until analysis. Two distinct PCR products were obtained from the wild-type (138-bp) and the mutated MDR1 allele (134-bp), respectively. Since the 4-bp deletion neither created nor abolished a known restriction enzyme recognition site in the amplified sequences, discrimination between these two fragments was carried out by high resolution polyacrylamide gel electrophoresis (6.5 % in 1X Tris-Borate-EDTA buffer). Analysis and documentation of the ethidium-bromide stained gels was performed in an UV-transilluminator (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Germany). Verification of the amplified PCR-fragments was carried out by DNA sequencing on ABI Prism 373A (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

## RESULTS

A male Australian Shepherd, weighing 26 kg, was presented to a veterinarian because of a 3-year history of generalized demodicosis. The referring veterinarian administered orally 2.5 mL (100 µg/kg) of a moxidectin preparation approved for use in sheep only. This application was performed once daily over 1 week and was without any signs of toxicosis. However, an increase of the dosage to 10 mL (400 µg/kg), which has been recommended for the treatment of generalized demodicosis (Wagner & Wendlberger, 2000), caused severe signs of neurotoxicity including ataxia, crawling, acoustic and tactile hyperexcitability, and miosis 30 min after application. The dog received diazepam (5 mg, i.v.) and was administered a balanced electrolyte solution by infusion. Over the next 24 h, the dog's constitution improved slightly and it fully recovered within the next 24 h.

For genotyping of this Australian Shepherd and two other Collie dogs with no history of drug sensitivity, a diagnostic test detecting the nt230(del4) mutation in the canine MDR1 was developed involving PCR amplification of genomic DNA followed by high resolution polyacrylamide gel electrophoresis. Therefore, gene-specific primers were designed encompassing the site of mutation (Fig. 1). PCR products revealed a homozygous wild-type MDR1 genotype for Collie no. 1 and a homozygous mutated MDR1 genotype for the Australian Shepherd with 138 and 134 bp, respectively. The amplified fragments from Collie no. 2 showed bands for both alleles at 134 and 138 bp and, additionally, a heteroduplex band with markedly reduced mobility in the gel (Fig. 2). This heteroduplex results from the cross-hybridization of a mutated (-) with a normal (+) MDR1 strand and offers a further tool of distinction from the homozygous genotypes.

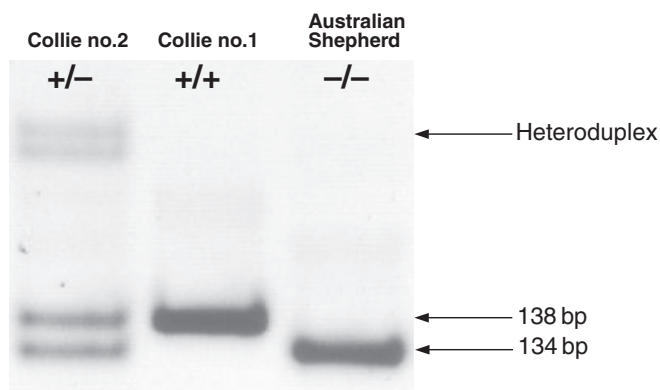
## DISCUSSION

The MDR transporter MDR1 P-glycoprotein (P-gp, ABCB1), the product of the MDR1 gene, belongs to the family of membrane bound ATP-binding cassette (ABC) transporters. Drugs preferred as substrates of P-gp are mainly cationic amphipathic compounds of various molecular structure. The existence of MDR1 P-gp was established in 1976 when tumor cells became resistant to this and several other anticancer drugs upon treatment with colchicine and this phenomenon was named MDR (Juliano & Ling, 1976). Further investigation revealed that P-gp is expressed not only in tumor cells but also in the liver, kidney, intestine, brain, testis, placenta, and adrenals (Thiebaut *et al.*, 1987; Kusuhara *et al.*, 1998; Tanigawara, 2000). Apical/luminal expression of P-gp in these tissues results in reduced drug absorption from the gastrointestinal tract, enhanced drug elimination into bile and urine, and restricted drug penetration into tissues such as brain and testes.

The important role of the P-gp in protecting the brain from the penetration of ivermectin and other drugs across the blood-brain barrier was established by Schinkel *et al.* (1994). They showed

**Fig. 1.** Primer setting for the detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in Collie and Australian Shepherd. Canine MDR1 sequences are derived from the following GenBank Accession numbers: AF536758 for the wild type MDR1 sequence (MDR1\_wt) and AJ419568 for the MDR1 sequence from an ivermectin-sensitive Collie (MDR1\_del4). Primer sequences (MDR1\_F and MDR1\_R) for MDR1 genotyping are indicated.

MDR1_F		<b>ATTGGCTTGATAGGTTGTATATG</b>
MDR1_wt	1	ATTGGCTTGATAGGTTGTATATGTTGGTGGGGACAATGGCTGCCATCATCCATGG
MDR1_del4	1	ATTGGCTTGATAGGTTGTATATGTTGGTGGGGACAATGGCTGCCATCATCCATGG
consensus	1	*****
MDR1_wt	56	AGTGCACTCCCTCTCATGATGCTGGT*****GAAACATGACAGATAGCTTTGCA
MDR1_del4	56	AGTGCACTCCCTCTCATGATGCTGGT*****GAAACATGACAG-----CTTTGCA
consensus	56	*****.....*****
MDR1_R		<b>CAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTT</b>
MDR1_wt	111	AATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTT
MDR1_del4	107	AATGCAGGAATTTCAAGAAACAAAACCTT
consensus	111	*****



**Fig. 2.** Detection of a homozygous (-/-) and heterozygous (+/-) MDR1 mutation. DNA was isolated from whole blood, and subjected to PCR and polyacrylamide gelelectrophoresis. MDR1 fragments with two wild-type alleles (+/+) and two mutated alleles (-/-) with lengths of 138 and 134 bp, respectively. In the case of a heterozygous MDR1 mutation (+/-) fragments of both sizes are visible and an additional heteroduplex with marked decreased mobility in polyacrylamide gels.

that *mdr1a* (-/-) knock-out mice have a 90-fold increased brain penetration of ivermectin associated with a 100-fold higher sensitivity to centrally neurotoxic effects after either i.v. or oral administration compared with mice with intact P-gp function (Schinkel *et al.*, 1994, 1996). Analogously, ivermectin-sensitive Collies and the Australian Shepherd from this report showed a homozygous MDR1 deletion associated with clear signs of neurotoxicosis when exposed to 120–150 µg/kg ivermectin and 400 µg/kg moxidectin, respectively (Paul *et al.*, 1987, 2000; Tranquilli *et al.*, 1989; Vaughn *et al.*, 1989). Moxidectin is a synthetically derived macrocyclic lactone which is structurally related to ivermectin but is more lipophilic (Vanapalli *et al.*, 2002). Like other avermectins and milbemycins, moxidectin is believed to interact with glutamate-gated or  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-gated chloride ion channels in the nervous system of nematodes and arthropods, resulting in paralysis and death (Shoop *et al.*, 1995; De Silva *et al.*, 1997; Bloomquist, 2003). However, in mammals GABA-sensitive neurons are primarily found in the central nervous system and they are efficiently protected from the exposure to avermectins by the P-gp efflux pump in the blood–brain barrier (Campbell *et al.*, 1983; Cordon-Cardo *et al.*, 1989).

There is still controversy on whether moxidectin is a P-gp substrate. Molento and coworkers found that the P-gp

competitor substrate verapamil modifies plasma pharmacokinetics of ivermectin in sheep but had no effect on the kinetics of moxidectin (Molento *et al.*, 2004). However, Lifschitz *et al.* (2002) showed an increase in the systemic availability of moxidectin when coadministered with the P-gp substrate loperamide in cattle. These authors speculated on a potential competition between moxidectin and loperamide for the P-gp mediated hepatobiliary and intestinal secretion process. In a cell culture model using recombinant LLCPK1 cells expressing the murine P-gp, Lespine *et al.* (2003) identified ivermectin as a strong inhibitor of the P-gp mediated rhodamine 123 efflux, whereas moxidectin inhibited to a lesser extent. The same group, using cultured rat hepatocytes, demonstrated that P-gp is involved in the hepatic transport of moxidectin (Dupuy *et al.*, 2001, 2003). Based on these data, we speculate that moxidectin is a weaker substrate of P-gp compared with ivermectin, but is still a substrate. Since none of these studies analysed brain penetration of moxidectin in the presence and absence of a specific P-gp inhibitor, further studies in *mdr1a* (-/-) knock-out mice and dogs with homozygous MDR1 mutation are necessary to finally clarify whether or not moxidectin shows enhanced brain penetration causing increased neurotoxicity in these animals. The increased sensitivity to an oral dose of 400 µg/kg moxidectin of the Australian Shepherd reported in this study supports this assumption. On the other hand, Vanapalli and coworkers treated 18 Beagle dogs infected with *Brugia pahangi* with moxidectin at a dose of 1000 µg/kg body weight orally and all of these dogs tolerated the drug administration with no clinical signs of toxicosis (Vanapalli *et al.*, 2002). This would indicate that the MDR1 mutation was absent in these Beagle dogs.

In contrast to ivermectin and moxidectin other avermectins and milbemycins have been claimed to be safer for the treatment of ivermectin-sensitive dogs. Selamectin produced no severe signs of toxicosis at a topical dosage of 40 and 15 mg/kg orally which is three to seven times the recommended dosage (Bishop *et al.*, 2000; Novotny *et al.*, 2000). On the other hand, milbemycin oxime application in ivermectin-sensitive Collies produced moderate signs of neurologic toxicosis such as depression, excessive salivation and ataxia at a dosage of  $\geq 5$  mg/kg body weight which is two to 10 times greater than the recommended dose (Tranquilli *et al.*, 1991). Although expected, it remains to be proven experimentally whether milbemycins and selamectin are transported by the canine MDR1 P-gp.

As well as avermectins and milbemycins, a large number of other drugs are much better known substrates of the P-gp efflux pump. They all show increased brain penetration in *mdr1a* (-/-) knock-out mice (Schinkel *et al.*, 1996). Therefore, it is very likely that dogs with a homozygous MDR1 mutation would also experience greater sensitivity to these drugs. These include digoxin, loperamide, vinblastine, doxorubicin, quinidine, ondansetron, cyclosporine and dexamethasone (Schinkel *et al.*, 1994, 1995; Kusuhara *et al.*, 1997). Clinical observations have already indicated that some of these drugs exhibit increased neurotoxicity in dogs with a nt230(del4) MDR1 mutation (Mealey *et al.*, 2003; Yas-Natan *et al.*, 2003; Sartor *et al.*, 2004). One, for example, is the antidiarrheal agent loperamide, a potent opiate, which does not produce opioid depressant CNS effects at normal doses. However, loperamide can cause severe neurologic toxicosis in Collies with homozygous mutated MDR1 alleles at doses safely used in other breeds and man (0.14 mg/kg body weight) (Hugnet *et al.*, 1996; Sartor *et al.*, 2004).

In addition to its expression in the blood-brain barrier, P-gp expression occurs also in the intestinal tract, liver, and kidney. In these organs the absence of P-gp will alter the pharmacokinetic properties of drugs identified as P-gp substrates, resulting in enhanced oral bioavailability and/or reduced drug elimination through the liver, kidney and gut. In consequence, plasma concentrations will increase and adverse drug reactions may occur. Moreover, the protective function of P-gp is also important in the blood-testis barrier and placenta limiting the entry of toxic substances into the gonads and the fetal circulation, respectively (Thiebaut *et al.*, 1987; Tanigawara, 2000). Therefore, in addition to enhanced brain penetration of P-gp substrates the nt230(del4) MDR1 mutation is expected to alter drug disposition in other organs as well.

Very recently, Roulet and coworkers reported a PCR-based method for MDR1 genotyping using canine genomic DNA preparations from colon tissue and mouth cells (Roulet *et al.*, 2003). However, length of the amplified PCR-fragment (75 and 79 bp) was not consistent with the reported sequences of the canine MDR1 specific primers used. Moreover, it was noted that these DNA samples did not give fully reliable amplification results, possibly because of contamination with bacterial DNA and the cross-amplification of bacterial ABC-transporter sequences. Therefore, we decided to use blood samples for DNA preparation and used primers which span a DNA sequence of 134 and 138 bp for the mutated and the wild-type MDR1 allele, respectively. Moreover, these primers offer the possibility of detecting an additional heteroduplex band in dogs heterozygous for the MDR1 mutation, which is valuable for discriminating between homozygous (+/+ or -/-) and heterozygous (+/-) alleles. The diagnostic test described in this paper provides rapid testing of the nt230(del4) MDR1 genotype from a small amount of blood (200 µL). Further studies including more dogs are ongoing to clarify the reliability of this test for large scale screening and to define the frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in dog breeds from Germany and other European countries. Based on its feasibility this test should precede drug

therapy of predisposed dogs such as the Collie, Australian Shepherd, Shetland Sheepdog, Border Collie, and Old English Sheepdog and may be a helpful tool for breeding strategies based on an intact MDR1 genotype.

## REFERENCES

- 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. (2000) Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, **91**, 163–176.
- Bloomquist, J.R. (2003) Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **54**, 145–156.
- Campbell, W.C., Fisher, M.H., Stapley, E.O., Albers-Schonberg, G. & Jacob, T.A. (1983) Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, **221**, 823–828.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. & Bertino, J.R. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 695–698.
- De Silva, N., Guyatt, H. & Bundy, D. (1997) Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs*, **53**, 769–788.
- Dupuy, J., Larrieu, G., Sutra, J.F., Eeckhoutte, C. & Alvinerie, M. (2001) Influence of verapamil on the efflux and metabolism of <sup>14</sup>C moxidectin in cultured rat hepatocytes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **24**, 171–177.
- Dupuy, J., Larrieu, G., Sutra, J.F., Lespine, A. & Alvinerie, M. (2003) Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Veterinary Parasitology*, **112**, 337–347.
- Hugnet, C., Cadore, J.L., Buronfosse, F., Pineau, X., Mathet, T. & Berny, P.J. (1996) Loperamide poisoning in the dog. *Veterinary and Human Toxicology*, **38**, 31–33.
- Juliano, R.L. & Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **455**, 152–162.
- Kusuhara, H., Suzuki, H., Terasaki, T., Kakee, A., Lemaire, M. & Sugiyama, Y. (1997) P-Glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **283**, 574–580.
- Kusuhara, H., Suzuki, H. & Sugiyama, Y. (1998) The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **87**, 1025–1040.
- Lespine, A., Roulet, A., Dupuy, J., Pineau, T. & Alvinerie, M. (2003) Role of the P-glycoprotein in the cellular efflux of macrocyclic lactones: influence of interfering agents. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **26** (Suppl. 1), 161–162.
- Lifschitz, A., Virkel, G., Sallovitz, J., Imperiale, F., Pis, A. & Lanusse, C. (2002) Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **25**, 111–120.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M. & Cantor, G.H. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*, **11**, 727–733.
- Mealey, K.L., Northrup, N.C. & Bentjen, S.A. (2003) Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **223**, 1453–1455.
- Molento, M.B., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Lanusse, C. & Prichard, R. (2004) Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the anti-

- parasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitology Research*, **92**, 121–127.
- Nelson, O.L., Carsten, E., Bentjen, S.A. & Mealey, K.L. (2003) Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **17**, 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. (2000) Safety of selamectin in dogs. *Veterinary Parasitology*, **91**, 377–391.
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J., Seward, R.L., Todd, K.S. Jr. & DiPietro, J.A. (1987) Clinical observations in collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research*, **48**, 684–685.
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J. & Hutchens, D.E. (2000) Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research*, **61**, 482–483.
- Pulliam, J.D., Seward, R.L., Henry, R.T. & Steinberg, S.A. (1985) Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Veterinary Medicine*, **80**, 33–40.
- Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J.F., Drag, M., Soll, M., Alvinerie, M. & Pineau, T. (2003) MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology*, **460**, 85–91.
- Sartor, L.L., Bentjen, S.A., Trepanier, L. & Mealey, K.L. (2004) Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **18**, 117–118.
- 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. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood–brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, **77**, 491–502.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A. & Borst, P. (1995) Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *Journal of Clinical Investigation*, **96**, 1698–1705.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A. & van Deemter, L. (1996) P-glycoprotein in the blood–brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 2517–2524.
- Shoop, W., Mrozik, H., & Fisher, M. (1995) Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, **59**, 139–156.
- Tanigawara, Y. (2000) Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Therapeutic Drug Monitoring*, **22**, 137–140.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. & Willingham, M.C. (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 7735–7738.
- Tranquilli, W.J., Paul, A.J. & Seward, R.L. (1989) Ivermectin plasma concentrations in collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis. *American Journal of Veterinary Research*, **50**, 769–770.
- Tranquilli, W.J., Paul, A.J. & Todd, K.S. (1991) Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *American Journal of Veterinary Research*, **52**, 1170–1172.
- Vanapalli, S.R., Hung, Y.P., Fleckenstein, L., Dzimianski, M.T. & McCall, J.W. (2002) Pharmacokinetics and dose proportionality of oral moxidectin in beagle dogs. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, **23**, 263–272.
- Vaughn, D.M., Simpson, S.T., Blagburn, B.L., Whitmer, W.L., Heddens-Mysinger, R. & Hendrix, C.M. (1989) Determination of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and pressure in the cerebrospinal fluid of collie dogs following administration of ivermectin. *Veterinary Research Communications*, **13**, 47–55.
- Wagner, R. & Wendlberger, U. (2000) Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes* spp., *Demodex* spp. and *Psoroptes* spp. mites. *Veterinary Parasitology*, **93**, 149–158.
- Yas-Natan, E., Shamir, M., Kleinbart, S. & Aroch, I. (2003) Doramectin toxicity in a collie. *The Veterinary Record*, **153**, 718–720.

## 10. Anhang - Publikationen

### 3) GEYER J, DÖRING B, GODOY JR, LEIDOLF R, MORITZ A & PETZINGER E (2005)

Frequency of the nt230(del4) *MDR1* mutation in Collies and related dog breeds in Germany.

*Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Volume 28, Issue 6, pp 545-551

DOI: 10.1111/j.1365-2885.2005.00692.x

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2005.00692.x/abstract>

## Frequency of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in Collies and related dog breeds in Germany

J. GEYER\*

B. DÖRING\*

J. R. GODOY\*

R. LEIDOLF\*

A. MORITZ† &

E. PETZINGER\*

\*Institute of Pharmacology and Toxicology  
and †Clinic for Small Animals,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Justus-Liebig-University of Giessen,  
Giessen, Germany

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. Therap.* 28, 545–551.

*MDR1* (*ABCB1*) P-glycoprotein exerts a protective function in the blood–brain barrier thereby limiting the entry of many drugs and other xenobiotics to the central nervous system. A nonsense mutation has been described for Collies and related dog breeds which abolishes this function and is associated with increased susceptibility to neurotoxic side effects of several drugs including ivermectin, moxidectin and loperamide. In order to evaluate the occurrence and frequency of this nt230 (del4) *MDR1* mutation in Germany, we screened 1500 dogs. Frequency of the homozygous mutated genotype was highest for Collies (33.0%), followed by Australian Shepherd (6.9%) and Shetland Sheepdog (5.7%). Thirty-seven percent of the Wäller dogs and 12.5% of the Old English Sheepdogs were heterozygous for the mutant *MDR1* (–) allele. Considering the predominant role of *MDR1* P-glycoprotein in drug disposition and in particular for blood–brain barrier protection, *MDR1* genotype-based breeding programs are recommended for improving the safety of drug therapy in these canine breeds.

(Paper received 10 May 2005; accepted for publication 25 August 2005)

Dr Ernst Petzinger, Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen, Frankfurter Str. 107, 35392 Giessen, Germany. E-mail: ernst.petzinger@vetmed.uni-giessen.de

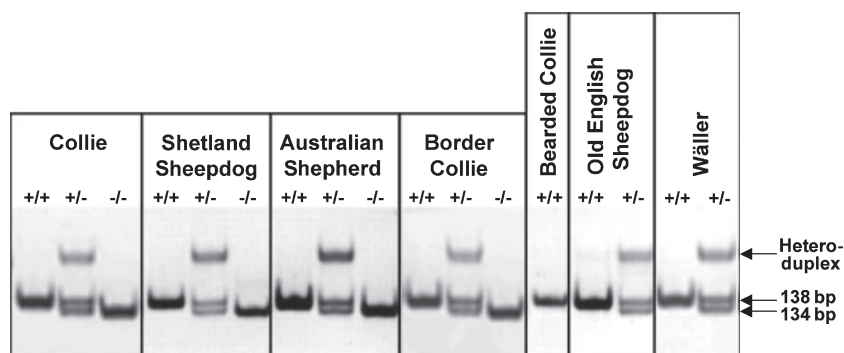
### INTRODUCTION

The multidrug resistance (MDR) transporter P-glycoprotein (P-gp), the product of the *MDR1* (*ABCB1*) gene, belongs to the family of membrane-bound ATP-binding cassette (ABC) transporters (Dean *et al.*, 2001). P-gp acts as an ATP-dependent efflux pump which transports a wide range of structurally unrelated hydrophobic and amphipathic drugs, toxins, and xenobiotics (Borst & Oude-Elferink, 2002). Juliano and Ling (1976) isolated P-gp from chemotherapeutic drug-resistant Chinese hamster ovary cells and identified this protein as a major part of the functional MDR of these cells. In addition, P-gp is expressed in healthy tissues with secretory/excretory function such as the liver (canalicular membrane of hepatocytes), kidney (luminal membrane of proximal tubules), and the intestine (brush border membrane of enterocytes), as well as in capillaries of the brain and testis, trophoblasts in the placenta, and hematopoietic stem cells (Thiebaut *et al.*, 1987; Cordon-Cardo *et al.*, 1989, 1990; Chaudhary & Roninson, 1991). Apical/luminal expression of P-gp in these tissues limits drug absorption from the intestine, promotes drug elimination into bile, urine, and intestine, and restricts drug entry into the central nervous system (CNS). It is now well accepted that an essential function of P-gp in non-neoplastic tissues is to confer an intrinsic MDR by

eliminating potentially toxic xenobiotics from the body and preventing their entry into the brain and organs of reproduction (Schinkel, 1997; Fromm, 2000; Tanigawara, 2000).

The functional importance of P-gp in the blood–brain barrier has been extensively studied in genetically engineered *mdr1a* (–/–) knockout mice, *mdr1a* P-gp-deficient CF-1 mice, and porcine brain capillary cells (Schinkel *et al.*, 1994; Kwei *et al.*, 1999; Nobmann *et al.*, 2001). *Mdr1a* (–/–) knockout mice are healthy and fertile under laboratory conditions, but they have increased sensitivity to drugs known to be P-gp substrates. An example is ivermectin, a widely used anthelmintic and acaricide drug, which is an excellent P-gp substrate (Schinkel *et al.*, 1994; Lankas *et al.*, 1997; Kwei *et al.*, 1999). Ivermectin acts as an agonist of a family of invertebrate-specific glutamate-gated chloride ion channels which are phylogenetically related to vertebrate GABA<sub>A</sub>-gated chloride channels (Edwards, 2003). Normally, plasma ivermectin concentrations exceed brain concentrations by about 10-fold in mammals, because P-gp limits the passage of ivermectin across the blood–brain barrier (Schinkel *et al.*, 1994). Therefore, the contact of ivermectin with mammalian GABA-sensitive neurons which are broadly expressed in the CNS is highly restricted. However, disruption of the *mdr1a* gene in *mdr1a* (–/–) knockout mice leads to 87-fold higher concentrations of ivermectin in the brain associated with





**Fig. 2.** Representative data from *MDR1* genotyping of 1500 dogs from Germany. DNA was isolated from whole blood, and subjected to polymerase chain reaction (PCR) and polyacrylamide gel electrophoresis. Lengths of the PCR fragments from the wild-type *MDR1* allele (+) and the mutated *MDR1* alleles (-) were 138- and 134-bp, respectively. In the case of a heterozygous *MDR1* mutation (+/-) fragments of both sizes are visible and an additional heteroduplex with markedly decreased mobility in the gel. The nt230 (del4) *MDR1* mutation was detected for Collie, Shetland Sheepdog, Australian Shepherd, Border Collie, Old English Sheepdog and Wäller, but not for Bearded Collie.

**Table 1.** Frequencies of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in 1500 dogs in Germany

Race	Allele (%)	Genotype (%)			n
		MDR1 (+/+)	MDR1 (+/-)	MDR1 (-/-)	
Collie	54.6	23.9	43.1	33.0	578
Shetland Sheepdog	30.0	45.7	48.6	5.7	140
Australian Shepherd	19.5	67.9	25.2	6.9	333
Wäller	18.5	62.9	37.1	0	62
Old English Sheepdog	6.3	87.5	12.5	0	24
Border Collie	0.6	99.1	0.6	0.3	334
Bearded Collie	0	100	0	0	29

(134-bp) from the wild-type allele (138-bp). This method is feasible for Collie, Australian Shepherd, Shetland Sheepdog, Border Collie, Bearded Collie, Old English Sheepdog, and Wäller (Fig. 2).

The frequency of the mutated *MDR1* allele varied markedly between these breeds and was highest for Collies (54.6%), followed by Shetland Sheepdog (30.0%), Australian Shepherd (19.5%), Wäller (18.5%), Old English Sheepdog (6.3%), and Border Collie (0.6%) (Table 1). Accordingly, 23.9% of the Collies, 45.7% of the Shetland Sheepdogs, 67.9% of the Australian Shepherds, 62.9% of the Wäller, and 87.5% of the Old English Sheepdogs were tested for homozygous intact *MDR1* alleles. In 334 Border Collies only one dog with homozygous and two dogs with heterozygous mutated *MDR1* alleles were identified, indicating a very rare occurrence of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in this breed. Only few samples were obtained from Bearded Collies. All tested dogs of this breed exhibited the intact *MDR1* (+/+) genotype.

## DISCUSSION

### *In vivo* relevance of *MDR1* in pharmacokinetics

Because of the predominant role of *MDR1* P-gp in drug disposition, mutations of the *MDR1* gene affecting expression

and/or function of P-gp will alter the pharmacokinetic properties of many *MDR1* drugs, leading to enhanced oral bioavailability and reduced drug elimination through the liver, kidney, and gut (Sakaeda *et al.*, 2002; Fromm, 2004; Gerloff, 2004; Marzolini *et al.*, 2004). Moreover, the protective function of P-gp is important in the blood–testis barrier and placenta limiting the entry of toxic substances into the gonads and the fetal circulation, respectively (Cordon-Cardo *et al.*, 1989, 1990). However, as demonstrated in ivermectin sensitivity of *mdr1a* (-/-) knockout mice and dogs with *MDR1* (-/-) mutation, the enhanced brain penetration of P-gp substrates is apparently the most relevant clinical consequence of an abolished P-gp function provoking neurotoxic side effects (Pulliam *et al.*, 1985; Schinkel *et al.*, 1994). In addition to ivermectin, a large number of other drugs are well-known substrates of the *MDR1* efflux pump. Some of these were tested in *mdr1a* (-/-) knockout mice and also showed significantly increased brain penetration over normal control mice. These drugs include cyclosporin A, dexamethasone, digoxin, docetaxel, doxorubicin, flecainide, grepafloxacin, loperamide, ondansetron, paclitaxel, quinidine, sparfloxacin, tacrolimus, verapamil, and vinblastine (Schinkel *et al.*, 1994, 1995, 1996; Kusuhara *et al.*, 1997; Hendrikse *et al.*, 1998; Yokogawa *et al.*, 1999; Tamai *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Van der Sandt *et al.*, 2001; Uhr *et al.*, 2002; Kemper *et al.*, 2003, 2004) (Table 2). Therefore, it is very likely that dogs with the *MDR1* (-/-) mutation would also experience greater toxicity with these drugs.

Because of the expected alterations in drug absorption and pharmacokinetic properties, and the enhanced blood–tissue barrier penetration of *MDR1* drugs in these dogs, clinical studies are necessary for a *MDR1* genotype-based dose adjustment to prevent adverse drug reactions particularly for the brain and the gonads. Clinical observations have already indicated that the anti-diarrheal agent loperamide, which does not produce opioidic depressant CNS effects at usual doses, caused severe neurologic toxicosis in Collies with *MDR1* (-/-) genotype at doses safely used in other breeds and human (0.14 mg/kg body weight) (Sartor *et al.*, 2004). Furthermore, increased sensitivity

Drug	Time after administration	Brain concentration ratio [ <i>mdr1a</i> (-/-)/ <i>mdr1a</i> (+/+)]	Reference
<b>Ivermectin*</b>	24 h	<b>87<sup>§</sup></b>	Schinkel <i>et al.</i> (1994)
<b>Digoxin</b>	4 h	<b>35</b>	Schinkel <i>et al.</i> (1995)
Tacrolimus	5 h	34	Yokogawa <i>et al.</i> (1999)
Quinidine	10 min	28 <sup>†</sup>	Kusuhara <i>et al.</i> (1997)
Flesinoxan	3 h	27	Van der Sandt <i>et al.</i> (2001)
<b>Vinblastine</b>	4 h	<b>22</b>	Schinkel <i>et al.</i> (1994)
Cyclosporine A	4 h	17	Schinkel <i>et al.</i> (1995)
<b>Loperamide*</b>	4 h	<b>13<sup>§</sup></b>	Schinkel <i>et al.</i> (1996)
<b>Paclitaxel</b>	24 h	<b>12<sup>‡</sup></b>	Kemper <i>et al.</i> (2003)
<b>Verapamil</b>	1 h	<b>9.5</b>	Hendrikse <i>et al.</i> (1998)
Docetaxel	24 h	6.2 <sup>‡</sup>	Kemper <i>et al.</i> (2004)
<b>Doxorubicin</b>	24 h	<b>5.0</b>	Zhang <i>et al.</i> (2000)
Cortisol	2 h	4.6 <sup>†,¶</sup>	Uhr <i>et al.</i> (2002)
Ondansetron	30 min	4.0	Schinkel <i>et al.</i> (1996)
Sparfloxacin	2 h	3.8 <sup>‡</sup>	Tamai <i>et al.</i> (2000)
Grepafloracin	2 h	2.6 <sup>‡</sup>	Tamai <i>et al.</i> (2000)
<b>Dexamethasone</b>	4 h	<b>2.5</b>	Schinkel <i>et al.</i> (1995)

Drugs with common veterinary usage are in bold face.

\*Drugs with documented neurotoxicity in dogs with homozygous nt230 (del4) *MDR1* mutation.

<sup>†</sup>Brain-to-plasma partition coefficient ( $K_{p, \text{brain, ko}}/K_{p, \text{brain, wt}}$ ).

<sup>‡</sup>*mdr1a,b* (-/-) double knockout mice were used.

<sup>§</sup>Oral administration.

<sup>¶</sup>s.c. injection.

to an oral dose of 400 µg/kg moxidectin was reported for an Australian Shepherd with homozygous nt230 (del4) *MDR1* mutation (Geyer *et al.*, 2005). Moxidectin is a synthetically derived macrocyclic lactone which is structurally related to ivermectin and is normally tolerated at a dose of 1000 µg/kg body weight orally, as demonstrated in beagle dogs (Vanapalli *et al.*, 2002). Therefore, drugs with intrinsic neurotoxicity, such as ivermectin, moxidectin or loperamide, should be completely excluded from the treatment of dogs with the *MDR1* (-/-) genotype. However, one exception of this rule would be the treatment with low doses of ivermectin (6 µg/kg) and moxidectin (3 µg/kg) for heartworm prevention, the safety of which has been demonstrated in ivermectin-sensitive Collies (Fassler *et al.*, 1991; Paul *et al.*, 2000).

In human, genetic variations of the human *MDR1* gene have been extensively studied in the last few years. Hitherto, more than 20 single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been reported with diverse frequency in different ethnic groups (Ieiri *et al.*, 2004). Only few of these have been shown to affect drug absorption, distribution and elimination, resulting in inter-individual variability in drug response and adverse reactions (Sakaeda *et al.*, 2002; Gerloff, 2004; Marzolini *et al.*, 2004). In spite of the abundance of data for human *MDR1* genotyping, a human null allele has not yet been identified. In particular, the nt230 (del4) corresponding exon 4 region of the human *MDR1* gene differs from the palindromic sequence in the canine gene (GATAG<sub>dog</sub> and GATAT<sub>man</sub>). In addition, human exon 4 has not been reported to cover SNP-based polymorphisms. Nevertheless, serious adverse events were reported in human following treatment with ivermectin for onchocerciasis control. Fifty-five percent of these cases reported from Cameroon were encephal-

**Table 2.** Clinically relevant P-glycoprotein substrates which show enhanced brain concentrations in *mdr1a* (-/-) mice compared with wild-type mice after intravenous injection

opathies and could not be explained by *Loa loa* infection alone (Twum-Danso, 2003). One possible explanation of this increased susceptibility to ivermectin, which was concentrated in specific geographic areas, are blood-brain barrier abnormalities caused by *MDR1* mutations (Mackenzie *et al.*, 2003). Therefore, it would not be surprising if a geographically restricted *MDR1* mutation which is comparable with the ivermectin-sensitive phenotype in dogs exists also in man.

#### Worldwide appearance of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in Collie breeds

When we commenced *MDR1* genotyping of dogs in Germany nothing was known about the occurrence of the nt230 (del4) mutation in European dogs. From seven dog breeds tested in the present study, Collie (33.0%), Australian Shepherd (6.9%), and Shetland Sheepdog (5.7%) are significantly affected by the homozygous nt230 (del4) *MDR1* mutation. The *MDR1* (-/-) genotype was not detected in Wäller or Old English Sheepdogs, despite a high occurrence of the *MDR1* (-) allele in these breeds. Our results are very similar to the results of other *MDR1* genotyping studies from other countries, which determined the *MDR1* (-) allele frequency in the most affected Collie breed to be 51% in the USA (Neff *et al.*, 2004), 60% in the UK (Neff *et al.*, 2004), 56% in the north-west USA (Mealey *et al.*, 2002), 64% in France (Hugnet *et al.*, 2004), and 56% in Australia (Mealey *et al.*, 2005) (Table 3).

Based on these data, we have to assume a worldwide occurrence of the nt230 (del4) *MDR1* mutation with almost identical breed distribution. As it is very unlikely that the same *MDR1* deletion occurred independently in all affected dog breeds,

**Table 3.** Frequencies of the nt230 (del4) *MDR1* mutation in geographic Collie subpopulations

	Allele (%)	Genotype (%)			n	Reference
		MDR1 (-)	MDR1 (+/+)	MDR1 (+/-)		
Germany	54.6	23.9	43.1	33.0	578	This study
USA	51	26	46	28	161	Neff <i>et al.</i> (2004)
UK	60	15	51	34	94	Neff <i>et al.</i> (2004)
North-west USA	56	23	42	35	40	Mealey <i>et al.</i> (2002)
Australia	56	12	64	24	33	Mealey <i>et al.</i> (2005)
France	64	20	32	48	25	Hugnet <i>et al.</i> (2004)

one has to assume that the nt230 (del4) *MDR1* mutation is phylogenetically very old and had occurred before the related continental breed-lines became separated. This was confirmed by Neff *et al.* (2004), who analyzed the extent of lineage disequilibrium and breed history of Collie dogs. These authors concluded that all dogs carrying the nt230 (del4) *MDR1* mutation are descendent of a dog that lived in the UK in the 1800s before the genetic isolation of breeds started by registry. Today, as a consequence of apparently similar breeding strategies and breed registry, the *MDR1* mutation is detectable in dogs all over the world.

The Wäller breed which was established 1994 in Germany is also affected by the nt230 (del4) *MDR1* mutation. This breed is currently maintained by repeated crossbreeding with Australian Shepherd and briard. As the frequency for the mutated *MDR1* (-) allele is rather high in Australian Shepherds, it is very likely that the *MDR1* mutation was introduced into the Wäller breed by this breed. As the Wäller population is still small, outcrossing of the *MDR1* mutation from this race is feasible and could be achieved within the next few years.

Two of the above-mentioned *MDR1* genotyping studies used buccal swabs as source of genomic DNA preparations. However, only 25 of 83 samples (Hugnet *et al.*, 2004) and 61 of 64 samples (Mealey *et al.*, 2005) could be analyzed because of problems in the shipment of the cheek swab samples and non-adequate quantities of DNA. Moreover, it was noted by Roulet *et al.* (2003) that DNA preparations from mouth cells did not give fully reliable amplification results for *MDR1* genotyping, possibly because of contamination with bacterial DNA and the cross-amplification of bacterial ABC-transporter sequences. Therefore, we decided to use blood samples for DNA preparation and received fully reliable PCR amplification of all 1500 DNA preparations used in this study.

#### *Is enhanced drug susceptibility the only consequence of a MDR1 mutation?*

As *mdr1a,b* (-/-) knockout mice are obviously healthy and fertile under laboratory conditions, *mdr1* apparently does not convey life-threatening properties (Schinkel *et al.*, 1994). However, an important physiological function of P-gp is to prevent intracellular accumulation of potentially toxic compounds (Schinkel, 1997). Therefore, it is legitimate to hypothesize that *MDR1*-deficient genotypes in addition to alterations in drug pharmacokinetics are also susceptible to certain diseases. In man

*MDR1* SNPs and haplotypes affecting *MDR1* expression have been associated with treatment outcome and/or host susceptibility to renal epithelial tumors (Siegmund *et al.*, 2002), Balkan endemic nephropathy (Atanasova *et al.*, 2004), Parkinson's disease (Drozdzik *et al.*, 2003), breast cancer (Kafka *et al.*, 2003), inflammatory bowel disease (IBD) (Brant *et al.*, 2003), and ulcerative colitis (Schwab *et al.*, 2003). Furthermore, increased susceptibility for IBD was described for *mdr1a* (-/-) knockout mice. These mice spontaneously developed intestinal inflammation under specific pathogen-free conditions which could be prevented when treated with oral antibiotics (Panwala *et al.*, 1998). Furthermore, it was reported that infection of *mdr1a* (-/-) mice with *Helicobacter bilis* induced diarrhea, weight loss, and IBD before the expected onset of spontaneous IBD (Maggio-Price *et al.*, 2002). These observations have raised speculation that the susceptibility to IBD is due to an intestinal epithelial barrier defect caused by *mdr1* deficiency. Accordingly, a selective advantage of the *mdr1* (+/+) genotype in evolution might have been to possess a defense mechanism against several bacterial toxins. Future clinical studies will be required to clarify whether dogs with homozygous *MDR1* mutation are more susceptible to IBD than other dogs. In conclusion, the Collie breed, in addition to the *mdr1* (-/-) knockout mouse, could be another animal model to test for *MDR1*-related drug discovery and pathologies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr B. Boschek and Philip Bridger for critical reading of the manuscript and all of the dog owners who contributed blood samples. Technical help was provided by J. Habicht.

#### REFERENCES

- Atanasova, S., von Ahsen, N., Dimitrov, T., Armstrong, V., Oellerich, M. & Toncheva, D. (2004) *MDR1* haplotypes modify BEN disease risk: a study in Bulgarian patients with Balkan endemic nephropathy compared to healthy controls. *Nephron. Experimental Nephrology*, **96**, e7-e13.
- Borst, P. & Oude-Elferink, R. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*, **71**, 537-592.
- Brant, S.R., Panhuysen, C.I., Nicolae, D. *et al.* (2003) *MDR1* Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease. *American Journal of Human Genetics*, **73**, 1282-1292.

- Chaudhary, P.M. & Roninson, I.B. (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell*, **66**, 85–94.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. & Bertino, J.R. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 695–698.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J.R. & Melamed, M.R. (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **38**, 1277–1287.
- Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, **11**, 1156–1166.
- Drozdziak, M., Bialecka, M., Mysliwiec, K., Honczarenko, K., Stankiewicz, J. & Sych, Z. (2003) Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene: a possible link between environmental and genetic factors in Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*, **13**, 259–263.
- Edwards, G. (2003) Ivermectin: does P-glycoprotein play a role in neurotoxicity? *Filaria Journal*, **2** (Suppl. 1), S8.
- Fassler, P.E., Tranquilli, W.J., Paul, A.J., Soll, M.D., DiPietro, J.A. & Todd, K.S. (1991) Evaluation of the safety of ivermectin administered in a beef-based formulation to ivermectin-sensitive Collies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **199**, 457–460.
- Fromm, M.F. (2000) P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **38**, 69–74.
- Fromm, M.F. (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences*, **25**, 423–429.
- Gerloff, T. (2004) Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **369**, 69–77.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Moritz, A. & Petzinger, E. (2005) Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230 (del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **28**, 95–99.
- 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. (1998) Complete *in vivo* reversal of P-glycoprotein pump function in the blood-brain barrier visualized with positron emission tomography. *British Journal of Pharmacology*, **124**, 1413–1418.
- Hopper, K., Aldrich, J. & Haskins, S.C. (2002) Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **16**, 89–94.
- Hugnet, C., Bentjen, S.A. & Mealey, K.L. (2004) Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **27**, 227–229.
- Ieiri, I., Takane, H. & Otsubo, K. (2004) The MDR1 (ABCB1) gene polymorphism and its clinical implications. *Clinical Pharmacokinetics*, **43**, 553–576.
- Juliano, R.L. & Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **455**, 152–162.
- Kafka, A., Sauer, G., Jaeger, C., Grundmann, R., Kreienberg, R., Zeillinger, R. & Deissler, H. (2003) Polymorphism C3435T of the MDR-1 gene predicts response to preoperative chemotherapy in locally advanced breast cancer. *International Journal of Oncology*, **22**, 1117–1121.
- Kemper, E.M., van Zandbergen, A.E., Cleypool, C., Mos, H.A., Boogerd, W., Beijnen, J.H. & van Tellingen, O. (2003) Increased penetration of paclitaxel into the brain by inhibition of P-Glycoprotein. *Clinical Cancer Research*, **9**, 2849–2855.
- Kemper, E.M., Verheij, M., Boogerd, W., Beijnen, J.H. & van Tellingen, O. (2004) Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. *European Journal of Cancer*, **40**, 1269–1274.
- Kusuhara, H., Suzuki, H., Terasaki, T., Kakee, A., Lemaire, M. & Sugiyama, Y. (1997) P-Glycoprotein mediates the efflux of quinidine across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **283**, 574–580.
- Kwei, G.Y., Alvaro, R.F., Chen, Q. *et al.* (1999) Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in *mdr1a* P-glycoprotein. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**, 581–587.
- Lankas, G.R., Cartwright, M.E. & Umbenhauer, D. (1997) P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **143**, 357–365.
- Mackenzie, C.D., Geary, T.G. & Gerlach, J.A. (2003) Possible pathogenic pathways in the adverse clinical events seen following ivermectin administration to onchocerciasis patients. *Filaria Journal*, **2** (Suppl. 1), S5.
- Maggio-Price, L., Shows, D., Waggle, K., Burich, A., Zeng, W., Escobar, S., Morrissey, P. & Viney, J.L. (2002) *Helicobacter bilis* infection accelerates and *H. hepaticus* infection delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (*mdr1a*  $-/-$ ) mice. *American Journal of Pathology*, **160**, 739–751.
- Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T. & Kim, R.B. (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **75**, 13–33.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M. & Cantor, G.H. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*, **11**, 727–733.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A. & Waiting, D.K. (2002) Frequency of the mutant MDR1 allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of collies from the northwestern United States. *American Journal of Veterinary Research*, **63**, 479–481.
- Mealey, K.L., Munyard, K.A. & Bentjen, S.A. (2005) Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary Parasitology*, **131**, 193–196.
- Neff, M.W., Robertson, K.R., Wong, A.K., Safra, N., Broman, K.W., Slatkin, M., Mealey, K.L. & Pedersen, N.C. (2004) Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 11725–11730.
- Nobmann, S., Bauer, B. & Fricker, G. (2001) Ivermectin excretion by isolated functionally intact brain endothelial capillaries. *British Journal of Pharmacology*, **132**, 722–728.
- Panwala, C.M., Jones, J.C. & Viney, J.L. (1998) A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *Journal of Immunology*, **161**, 5733–5744.
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J., Seward, R.L., Todd, K.S. Jr & Di Pietro, J.A. (1987) Clinical observations in collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research*, **48**, 684–685.
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J. & Hutchens, D.E. (2000) Safety of moxidectin in ivermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research*, **61**, 482–483.
- Pulliam, J.D., Seward, R.L., Henry, R.T. & Steinberg, S.A. (1985) Investigating ivermectin toxicity in collies. *Veterinary Medicine*, **80**, 33–40.
- Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J.F., Drag, M., Soll, M., Alvinerie, M. & Pineau, T. (2003) MDR1-deficient genotype in collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology*, **460**, 85–91.

- Sakaeda, T., Nakamura, T. & Okumura, K. (2002) MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **25**, 1391–1400.
- Sartor, L.L., Bentjen, S.A., Trepanier, L. & Mealey, K.L. (2004) Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **18**, 117–118.
- Schinkel, A.H. (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Seminars in Cancer Biology*, **8**, 161–170.
- 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. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, **77**, 491–502.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A. & Borst, P. (1995) Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *Journal of Clinical Investigation*, **96**, 1698–1705.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A. & van Deemter, L. (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 2517–2524.
- Schwab, M., Schaeffeler, E., Marx, C. *et al.* (2003) Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology*, **124**, 26–33.
- Siegmund, M., Brinkmann, U., Schaeffeler, E. *et al.* (2002) Association of the P-glycoprotein transporter MDR1 (C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *Journal of the American Society of Nephrology*, **13**, 1847–1854.
- Tamai, I., Yamashita, J., Kido, Y., Ohnari, A., Sai, Y., Shima, Y., Naruhashi, K., Koizumi, S. & Tsuji, A. (2000) Limited distribution of new quinolone antibacterial agents into brain caused by multiple efflux transporters at the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **295**, 146–152.
- Tanigawara, Y. (2000) Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Therapeutic Drug Monitoring*, **22**, 137–140.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. & Willingham, M.C. (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 7735–7738.
- Tranquilli, W.J., Paul, A.J. & Seward, R.L. (1989) Ivermectin plasma concentrations in collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis. *American Journal of Veterinary Research*, **50**, 769–770.
- Twum-Danso, N.A. (2003) Serious adverse events following treatment with ivermectin for onchocerciasis control: a review of reported cases. *Filaria Journal*, **2** (Suppl. 1), S3.
- Uhr, M., Holsboer, F. & Muller, M.B. (2002) 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. *Journal of Neuroendocrinology*, **14**, 753–759.
- Van der Sandt, I.C.J., Smolders, R., Nabulsi, L., Zuideveld, K.P., de Boer, A.G. & Breimer, D.D. (2001) Active efflux of the 5-HT (1A) receptor agonist flesinoxan via P-glycoprotein at the blood-brain barrier. *European Journal of Pharmaceutical Science*, **14**, 81–86.
- Vanapalli, S.R., Hung, Y.P., Fleckenstein, L., Dzimianski, M.T. & McCall, J.W. (2002) Pharmacokinetics and dose proportionality of oral moxidectin in beagle dogs. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, **23**, 263–272.
- Vaughn, D.M., Simpson, S.T., Blagburn, B.L., Whitmer, W.L., Heddens-Mysinger, R. & Hendrix, C.M. (1989) Determination of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and pressure in the cerebrospinal fluid of collie dogs following administration of ivermectin. *Veterinary Research Communications*, **13**, 47–55.
- Yokogawa, K., Takahashi, M., Tamai, I., Konishi, H., Nomura, M., Moritani, S., Miyamoto, K. & Tsuji, A. (1999) P-glycoprotein-dependent disposition kinetics of tacrolimus: studies in *mdr1a* knockout mice. *Pharmaceutical Research*, **16**, 1213–1218.
- Zhang, Z.J., Saito, T., Kimura, Y., Sugimoto, C., Ohtsubo, T. & Saito, H. (2000) Disruption of *mdr1a* p-glycoprotein gene results in dysfunction of blood-inner ear barrier in mice. *Brain Research*, **852**, 116–126.

## 10. Anhang - Publikationen

**4) GEYER J, KLINTZSCH S, MEERKAMP K, WÖHLKE A, DISTL O, MORITZ A & PETZINGER E (2007)**

Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis.

*Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Volume 30, Issue 5, pp 482-485*

**DOI:** 10.1111/j.1365-2885.2007.00885.x

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2007.00885.x/abstract>

## Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis

J. GEYER\*

S. KLINTZSCH\*

K. MEERKAMP\*

A. WÖHLKE†

O. DISTL†

A. MORITZ‡ &

E. PETZINGER\*

\*Institute of Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, Germany;

†Department of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine Hannover, Hannover, Germany; ‡Clinic for Small Animals, College of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, Germany

(Paper received 8 March 2007; accepted for publication 10 June 2007)

Joachim Geyer, Institute of Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University of Giessen, Frankfurter Str. 107, 35392 Giessen, Germany. E-mail: joachim.m.geyer@vetmed.uni-giessen.de

P-glycoprotein is an ATP-driven efflux transporter (ABC transporter), encoded by the multidrug-resistance gene MDR1/ABCB1 (Dean *et al.*, 2001). MDR1 P-glycoprotein transports a wide range of structurally unrelated lipophilic and amphipathic drugs, toxins, and xenobiotics including many commonly used veterinary drugs (for review see Fromm, 2004; Marzolini *et al.*, 2004). P-glycoprotein is expressed in various mammalian tissues including blood capillaries of the central nervous system, brush border membrane of enterocytes, canalicular membrane of hepatocytes, and apical membrane of proximal tubular cells of the kidney (Thiebaut *et al.*, 1987; Cordon-Cardo *et al.*, 1989, 1990; Ginn, 1996). Three decades of research into the physiological significance of P-glycoprotein has established that the MDR1 efflux machinery protects the organism from exposure to drugs and environmental xenobiotics by decreasing their absorption in the intestinal tract and promoting their excretion into bile and urine. Additionally, MDR1 P-glycoprotein in the blood–brain barrier highly restricts the entry of drugs and xenobiotics into the central nervous system (Schinkel, 1997; Fromm, 2000; Borst & Oude-Elferink, 2002; Sarkadi *et al.*, 2006).

The first reports on ivermectin neurotoxicity in dogs appeared in a subpopulation of Collies (Pulliam *et al.*, 1985; Paul *et al.*, 1987). Years later, two groups independently identified an exonic 4-bp deletion in the MDR1 gene of these 'ivermectin-sensitive Collies' and thereby defined the molecular marker for the ivermectin sensitivity in dogs (Mealey *et al.*, 2001; Roulet *et al.*, 2003). Ivermectin toxicosis in affected dogs includes depression, ataxia, somnolence, salivation, tremor, coma, and death at therapeutic doses of 0.2 mg/kg b.w. and above (Tranquilli *et al.*, 1989; Vaughn *et al.*, 1989; Hopper *et al.*, 2002). In contrast, dosages of 2.0 mg/kg can be administered to

beagles and non ivermectin-sensitive Collies without evidence of drug toxicity (Pulliam *et al.*, 1985; Pulliam & Preston, 1989).

Systematic analyses of breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation revealed that besides the Collie, other genetically related dog breeds are affected by this mutation, including herding breeds of the collie lineage (Shetland Sheepdog, Australian Shepherd, Old English Sheepdog, English Shepherd, Border Collie) and two breeds of the sighthound class (Long-haired Whippet and Silken Windhound) (Neff *et al.*, 2004; Geyer *et al.*, 2005a). It was suggested that this mutation occurred in an ancestral dog population that lived in Great Britain in the 1800s, before the emergence of formal breed-lines (Neff *et al.*, 2004). However, occurrence of the MDR1 mutation in the White Swiss Shepherd (Berger Blanc Suisse, FCI no. 347/1.1) has not yet been reported. Here we report on two White Swiss Shepherds, which showed severe signs of toxicosis after application of doramectin, which is commonly used off-label in dogs to manage parasitic diseases. These cases prompted us to analyze the allele frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in a total of 219 White Swiss Shepherd dogs and also to perform microsatellite analysis to reveal the mutation origin.

### CASE 1

A four-year old, male White Swiss Shepherd, weighing 40 kg, was presented to a Small Animal Clinic for bilateral alopecia. The dog was treated with 0.7 mg/kg b.w. doramectin (Dectomax® injectable solution for cattle and sheep; Pfizer, Karlsruhe, Germany) subcutaneously. After 20 h, the dog was presented again to the veterinarians for abnormal mentation. During the

examination the dog showed loss of vision, but closer ophthalmologic and also orthopedic examination did not reveal pathological findings. Neurological examination however, showed clearly delayed postural reactions. At the follow-up examination on the following day, the White Swiss Shepherd showed ataxia, somnolence, hyperventilation, and salivation. During the following 5 days, the dog received supportive care and was administered Ringer's Lactate solution and parenteral nutrition. The patient was unable to walk, eat, or drink without help. During 5 days of hospitalization, the dog slept for 20 h a day and then slowly recovered. At day 5, assisted ingestion and walking was possible, and the dog was discharged. Fourteen days after doramectin application, the dog was free from all signs of neurotoxicosis.

## CASE 2

A five-year old, female, neutered White Swiss Shepherd dog, weighing 25 kg was presented to a veterinarian with a history of chronic skin disease, and the dog was treated with 0.7 mg/kg b.w. doramectin (Dectomax<sup>®</sup> injectable solution for cattle and sheep) subcutaneously. Twenty-four hours following the exposure to doramectin, the dog showed clinical signs of neurotoxicosis including hypersalivation, hyperaesthesia, and motor dysfunction. Two days after the exposure to doramectin, the dog was hospitalized. The patient showed depression, ataxia, tremor, and hyperventilation and had clearly impaired response to acoustic and tactile stimuli. During hospitalization, the dog received supportive care and Ringer's Lactate solution intravenously. From day 3 of hospitalization, the general condition of the dog slowly improved. Six days after exposure to doramectin, the White Swiss Shepherd was neurologically normal and was discharged.

Although the occurrence of the nt230(del4) MDR1 mutation has not yet been reported for the White Swiss Shepherd in the published literature, we strongly supposed that the clinical signs of doramectin toxicosis were caused in both cases by this mutation. Yas-Natan and coworkers recently reported a case of doramectin toxicity in a Collie but the MDR1 genotype was not determined (Yas-Natan *et al.*, 2003). Blood samples were collected from both dogs and analyzed for the MDR1 mutation as described previously (Geyer *et al.*, 2005b). In both dogs, a homozygous nt230(del4) MDR1 mutation was diagnosed. To our knowledge, this is the first documented report that White Swiss Shepherd dogs also are affected by the MDR1 mutation. To investigate better the predisposition of the White Swiss Shepherd breed for this mutation, we collected blood samples from 217 more White Swiss Shepherds and processed them for MDR1-genotyping. Among the analyzed samples, 103 came from Germany, 74 from the Netherlands, 40 from Switzerland, and two from Austria. Within the total number of 219 samples, five White Swiss Shepherds (including the above mentioned cases) showed a homozygous nt230(del4) MDR1 mutation, 47 dogs were heterozygous for the mutation, and 167 White Swiss Shepherds were intact in the MDR1 gene. As shown in Table 1, the overall allele

frequency among the analyzed population accounts for 13%, which is higher than the MDR1(-) allele frequency reported for Border Collie (0.6%), Old English Sheepdog (6.3%), and English Shepherd (7.1%) (Neff *et al.*, 2004; Geyer *et al.*, 2005a).

Based on breeding history, the White Swiss Shepherd is related to the German Shepherd but is not expected to share Collie ancestry. Therefore, the question arose whether the MDR1 mutation in White Swiss Shepherd and Collie dogs stemmed from independent mutation events. Under this situation, marker alleles which were shown to be associated with the mutant MDR1(-) allele, would probably differ in the White Swiss Shepherd. To examine this, we performed microsatellite analysis of seven White Swiss Shepherds using marker loci previously reported by Neff *et al.* (2004). PCR reactions for amplification of these microsatellites (C14.866, REN144I15, REN103E18, and G01506) were carried out as described (Lüpkke & Distl, 2005), and the marker genotypes were determined by gel electrophoresis on an automated sequencer (LICOR 4300, Lincoln, NE, USA). Allele sizes were identified by IRD700- and IRD800-labeled DNA ladders, and the genotypes were evaluated by visual examination. Positions of microsatellites on the canine genome assembly (*Canis familiaris*, Build 2.1) were verified via BLAST analyses, which showed positions on 15.6, 16.5, 17.7, and 19.3 Mb on dog chromosome 14 for C14.866, REN144I15, REN103E18, and G01506, respectively. The MDR1 locus was located at 16.6 Mb, so two microsatellites are flanking each the MDR1 locus. This marker order is different from the genetic map applied by Neff *et al.* (2004). Among the analyzed White Swiss Shepherd dogs, one was homozygous for the MDR1(-) mutant allele, three were heterozygous, and three dogs exhibited the wildtype MDR1(+) allele. All White Swiss Shepherd chromosomes carrying the mutant MDR1(-) allele exhibited the haplotype 249-259-MDR1(-)-173-153 for the respective markers (Table 2). This haplotype shares three of the four marker alleles most strongly associated with the mutant MDR1(-) allele in herding breeds of the collie lineage, indicating that White Swiss Shepherds share the identical MDR1 mutation with the Collie by descent. Furthermore, it is interesting to note that all

**Table 1.** Dog breeds affected by the nt230(del4) MDR1 mutation

Dog breed	Allele (%) MDR1 (-)	Genotype (%)		
		MDR1 (+/+)	MDR1 (+/-)	MDR1 (-/-)
Collie <sup>*,†</sup>	54.6	23.9	43.1	33.0
Longhaired Whippet <sup>†</sup>	41.6	32.6	51.7	15.7
Shetland Sheepdog <sup>*,†</sup>	30.0	45.7	48.6	5.7
Australian Shepherd <sup>*,†</sup>	19.5	67.9	25.2	6.9
Wäller <sup>*</sup>	18.5	62.9	37.1	0
Silken Windhound <sup>†</sup>	17.9	65.5	33.3	1.2
McNab <sup>†</sup>	17.1	68.6	28.6	2.8
White Swiss Shepherd <sup>‡</sup>	13.0	76.2	21.5	2.3
English Shepherd <sup>†</sup>	7.1	85.7	14.3	0
Old English Sheepdog <sup>*,†</sup>	6.3	87.5	12.5	0
Border Collie <sup>*</sup>	0.6	99.1	0.6	0.3

Reported by <sup>\*</sup>Geyer *et al.*, 2005a; <sup>†</sup>Neff *et al.*, 2004; <sup>‡</sup>this study.

	Microsatellite loci on dog chromosome 14				
	C14.866	REN144I15	MDR1	REN103E18	G01506
Haplotype of the White Swiss Shepherd	249	259	MDR1(-)	173	153
Haplotype predominant in sighthounds*	249	259	MDR1(-)	173	153
Haplotype predominant in Collies from the US*	239	259	MDR1(-)	173	153
Haplotype predominant in Collies from the UK*	239	259	MDR1(-)	173	155

\*Rearranged from Neff *et al.* (2004).

White Swiss Shepherd dogs carrying the mutant MDR1(-) allele exhibited the identical haplotype, which is consistent with a recent introgression of the MDR1 mutation into the White Swiss Shepherd breed. However, as this haplotype is also the predominant haplotype in Longhaired Whippet (98.6%), Silken Windhound (73.3%), Shetland Sheepdog (78.1%), and Australian Shepherd (52.1%), but not in Collie (11–18%) (Neff *et al.*, 2004), it may be assumed that the White Swiss Shepherd acquired the MDR1 mutation possibly from a sighthound lineage. Inbreeding might then have caused the occurrence of White Swiss Shepherd dogs homozygous for the MDR1 mutation.

Ivermectin and doramectin are commonly used off-label in dogs to manage parasitic diseases, but this treatment inevitably results in severe neurotoxicosis in dogs with a homozygous nt230(del4) MDR1 mutation. The original indication 'ivermectin-sensitive Collie' is often not made with other drugs, such as doramectin and moxidectin, nor for other dog breeds. Thus, severe toxicosis after application of macrocyclic lactones and other drugs frequently occurs in MDR1 mutant dogs. Besides the group of macrocyclic lactones, several other drugs have been shown to cause problems in the treatment of MDR1 mutant dogs: moxidectin (Geyer *et al.*, 2005b), loperamide (Sartor *et al.*, 2004), digoxin (Henik *et al.*, 2006), doxorubicin and vincristine (Mealey *et al.*, 2003), and dexamethasone (Mealey *et al.*, 2007). All these drugs should be handled with care in dogs that have or may have the MDR1 mutation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Helmut Gmeiner (Veterinarian, Mülheim a.d. Ruhr, Germany) and Dr René Dörfelt (Veterinarian, Norderstedt, Germany) for reporting to us the cases of doramectin toxicosis in White Swiss Shepherd dogs, Regina Leidolf for excellent technical help, Michael Hanna (Medical Manuscript Service) for proof-reading the manuscript, and all of the dog owners and breeders of White Swiss Shepherds who contributed samples. This work was supported by the German Society for Cynological Research (GKF, Bonn, Germany).

#### REFERENCES

Borst, P. & Oude-Elferink, R. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual Review of Biochemistry*, **71**, 537–592.

**Table 2.** Microsatellite analysis of White Swiss Shepherd dogs carrying the MDR1 mutation

- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. & Bertino, J.R. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood–brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 695–698.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J.R. & Melamed, M.R. (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **38**, 1277–1287.
- Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, **11**, 1156–1166.
- Fromm, M.F. (2000) P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **38**, 69–74.
- Fromm, M.F. (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences*, **25**, 423–429.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Leidolf, R., Moritz, A. & Petzinger, E. (2005a) Frequency of the nt230(del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **28**, 545–551.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Moritz, A. & Petzinger, E. (2005b) Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **28**, 95–99.
- Ginn, P.E. (1996) Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. *Veterinary Pathology*, **33**, 533–541.
- Henik, R.A., Kellum, H.B., Bentjen, S.A. & Mealey, K.L. (2006) Digoxin and mexiletine sensitivity in a Collie with the MDR1 mutation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **20**, 415–417.
- Hopper, K., Aldrich, J. & Haskins, S.C. (2002) Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **16**, 89–94.
- Lüpke, L. & Distl, O. (2005) Microsatellite marker analysis of the genetic variability in Hanoverian Hounds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **122**, 131–139.
- Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T. & Kim, R.B. (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **75**, 13–33.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M. & Cantor, G.H. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*, **11**, 727–733.
- Mealey, K.L., Northrup, N.C. & Bentjen, S.A. (2003) Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of American Veterinary Medical Association*, **223**, 1453–1455.
- Mealey, K.L., Gay, J.M., Martin, L.G. & Waiting, D.K. (2007) Comparison of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in MDR1-1Δ and MDR1 wildtype dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, **17**, 61–66.

- Neff, M.W., Robertson, K.R., Wong, A.K., Safra, N., Broman, K.W., Slatkin, M., Mealey, K.L. & Pedersen, N.C. (2004) Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 11725–11730.
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J., Seward, R.L., Todd, K.S. Jr & Di Pietro, J.A. (1987) Clinical observations in collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research*, **48**, 684–685.
- Pulliam, J.D. & Preston, J.M. (1989) Safety of ivermectin in target animals. In *Ivermectin and Abamectin*. Ed. Campbell, W.C., pp. 149–161. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Pulliam, J.D., Seward, R.L., Henry, R.T. & Steinberg, S.A. (1985) Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Veterinary Medicine*, **80**, 33–40.
- Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J.F., Drag, M., Soll, M., Alvinerie, M. & Pineau, T. (2003) MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology*, **460**, 85–91.
- Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G. & Varadi, A. (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiological Reviews*, **86**, 1179–1236.
- Sartor, L.L., Bentjen, S.A., Trepanier, L. & Mealey, K.L. (2004) Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **18**, 117–118.
- Schinkel, A.H. (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Seminars in Cancer Biology*, **8**, 161–170.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. & Willingham, M.C. (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 7735–7738.
- Tranquilli, W.J., Paul, A.J. & Seward, R.L. (1989) Ivermectin plasma concentrations in collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis. *American Journal of Veterinary Research*, **50**, 769–770.
- Vaughn, D.M., Simpson, S.T., Blagburn, B.L., Whitmer, W.L., Heddens-Mysinger, R. & Hendrix, C.M. (1989) Determination of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and pressure in the cerebrospinal fluid of collie dogs following administration of ivermectin. *Veterinary Research Communications*, **13**, 47–55.
- Yas-Natan, E., Shamir, M., Kleinbart, S. & Aroch, I. (2003) Doramectin toxicity in a collie. *The Veterinary Record*, **153**, 718–720.

## 10. Anhang - Publikationen

### 5) KLINTZSCH S, MEERKAMP K, DÖRING B & GEYER J (2009)

Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method.

*The Veterinary Journal, Volume 185, Issue 3, pp 272-277*

DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.07.018

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023309002913>



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvjl](http://www.elsevier.com/locate/tvjl)



## Detection of the nt230[del4] *MDR1* mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method

Stefanie Klintzsch, Kerstin Meerkamp, Barbara Döring, Joachim Geyer\*

Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University of Giessen, Frankfurter Str. 107, D-35392 Giessen, Germany

### ARTICLE INFO

Article history:  
Accepted 26 July 2009

Keywords:

P-glycoprotein  
*MDR1*  
*ABCB1*  
Allelic discrimination  
Pharmacogenetics  
Ivermectin sensitivity

### ABSTRACT

For detection of the nt230[del4] *MDR1* mutation, a 4-bp deletion in the canine *MDR1* (*ABCB1*) gene, a TaqMan allelic discrimination assay was designed that allows for *MDR1* genotyping without post-PCR processing. Directly after completion of the PCR amplification, the *MDR1* genotype can be assigned based on selective fluorescence measurement. For primer selection the locus of a potential 265A>G single nucleotide polymorphism was omitted; this locus is covered by the oligonucleotide PCR primers from most of the hitherto established *MDR1* genotyping methods. Dogs homozygous for the nt230[del4] *MDR1* mutation show highly increased susceptibility to many drugs commonly used in veterinary medicine including ivermectin. As more than 10 dog breeds are predisposed to this mutation, reliable genotyping methods are necessary to identify affected dogs before drug treatment. This study provides a new allelic discrimination method that detects the *MDR1* mutation with high specificity and reliability and is useful for routine diagnostics.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

P-glycoprotein (P-gp), an ATP-driven multidrug efflux carrier, is the product of the multidrug resistance *MDR1* gene. More recently, the *MDR1* gene has also been referred to as *ABCB1* based on the systematic nomenclature of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family (Dean, 2005). P-gp is expressed in various mammalian tissues such as the brush border membrane of epithelial cells in the intestinal tract, the luminal membrane of proximal tubules in the kidney, and the canalicular membrane of liver hepatocytes (Thiebaut et al., 1987). Apical/luminal expression of P-gp in these organs diminishes oral drug bioavailability and promotes drug elimination into urine and bile (Fromm, 2000). Additionally, at the blood–brain barrier P-gp is expressed at the luminal membrane of endothelial cells of the brain capillaries (Cordon-Cardo et al., 1989) and restricts the entry of drugs into the central nervous system by an efflux based transport mechanism (Schinkel, 1997).

P-gp transports a wide range of structurally unrelated drugs, toxins, and xenobiotics, including many drugs commonly used in veterinary medicine (Martinez et al., 2008). Several years ago, a 4-bp gene deletion mutation (nt230[del4]) was identified in the canine *MDR1* gene (Mealey et al., 2001; Roulet et al., 2003; Geyer et al., 2005a) associated with an ivermectin-sensitive phenotype that had been observed in Collie dogs (so-called ivermectin-sensi-

tive Collies) (Pulliam et al., 1985). Currently, *MDR1* genotyping studies from six different countries indicate that, apart from the Collie, many additional dog breeds are affected by this mutation, including Australian Shepherd, Shetland Sheepdog, Old English Sheepdog, Border Collie, English Shepherd, German Shepherd, White Shepherd, Wäller, Longhaired Whippet, Silken Windhound, and McNab (Neff et al., 2004; Geyer et al., 2005b; Mealey and Meurs, 2008).

Dogs with a homozygous nt230[del4] *MDR1* mutation do not express a functionally intact P-gp and, therefore, show highly increased susceptibility to many P-gp transported drugs, such as ivermectin, doramectin, moxidectin, milbemycin oxime, vincristine, digoxin, and loperamide (Sartor et al., 2004; Geyer et al., 2005a, 2007; Mealey et al., 2008; Barbet et al., 2009). For some of these drugs, brain penetration is highly increased and the dogs suffer from severe neurotoxicosis, even when the drugs are administered at normal therapeutic dosage, as it is the case for ivermectin and doramectin. For other drugs, such as fexofenadine and quinidine, pharmacokinetic parameters are significantly altered in *MDR1* mutant dogs (Kitamura et al., 2008). Currently, it is established, at least in the USA and Germany, that it is necessary to check the *MDR1* genotype of a dog from the most predisposed dog breeds before treatment is started with one of the above medications (Geyer et al., 2005b; Martinez et al., 2008).

Several different genotyping methods have been described for the detection of the nt230[del4] *MDR1* mutation. Most of these use PCR amplification of the flanking regions followed by length polymorphism (LP) analysis using polyacrylamide gel electrophoresis

\* Corresponding author. Tel.: +49 641 9938404; fax: +49 641 9938409.  
E-mail address: [Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de](mailto:Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de) (J. Geyer).

(PAGE) (Roulet et al., 2003; Neff et al., 2004; Geyer et al., 2005a). Others use PCR amplification with allele-specific oligonucleotide primers followed by agarose gel electrophoresis (AGE) (Baars et al., 2008). Both approaches require extensive post-PCR processing of the amplified fragments and are not amenable to routine diagnostics.

In this study, we describe a one-step real-time PCR based fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination (AD) method by which the nt230[del4] *MDR1* genotype can be determined directly from the post-PCR sample by selective fluorescence detection. Furthermore, this method omits a potential 265A > G single nucleotide polymorphism (SNP) 25-bp downstream from the nt230 locus that is covered by the oligonucleotide PCR primers from most of the other detection methods and probably affects accurate PCR amplification from this locus.

## Materials and methods

### Animals and blood samples

Blood samples were received from client-owned dogs and analyzed for the nt230[del4] *MDR1* mutation as part of the diagnostic research service of our insti-

**Table 1**

A total of 62 dogs from 25 different breeds were selected for DNA sequencing of the exon 4/intron 4 segment including the *MDR1* nt230[del4] mutation and the potential 265A > G single base-pair substitution.

Dog breed	Number of dogs	
	<i>MDR1</i> (+/+)	<i>MDR1</i> (-/-)
Australian Cattle Dog	1	0
Australian Shepherd	4	1
Beagle	4	0
Bearded Collie	1	0
Berger Blanc Suisse	1	3
Old English Sheepdog	1	0
Border Collie	4	0
Boxer	1	0
Cairn Terrier	1	0
Collie	1	9
Great Dane	1	0
German Wirehaired Pointer	1	0
Elo	1	0
Galgo Espaniol	1	0
Golden Retriever	2	0
Jack Russell Terrier	1	0
Laekenois	1	0
Lagotto Romagnolo	2	0
Podenco	1	0
Praszký Krysavik	2	0
Shar Pei	1	0
Shetland Sheepdog	1	1
Springer Spaniel	1	0
Staffordshire Bull Terrier	1	0
Wäller <sup>a</sup>	1	0
Crossbreed	11	0

<sup>a</sup> Dog breed not recognised by the FCI.

**Table 2**

Summary of canine *MDR1* cDNA sequences available in the GenBank database. Some sequences diverge in the length of the 5' untranslated region. For these sequences position of the CDS and localization of the nt230[del4] *MDR1* mutation are indicated.

Nucleotide				Protein		Dog breed	Tissue
Accession number	cDNA (bp)	CDS position	nt230[del4] position	Accession number	Protein (aa)		
AF045016	4317	70–3912	296	AAC02113	1280	Beagle	Colon
AF536758	4279	17–3862	246	AAN05645	1281	Beagle	Undefined
DQ068953	3846	1–3846	230	AAY67840	1281	Beagle	Blood
AY582533	3846	1–3846	230	AAS91647	1281	Undefined	Undefined
FJ617477	3846	1–3846	230	ACM77791	1281	Border Collie	Undefined
AJ419568	3934	7–282	236	CAD12806	91	Collie	Liver
AB066299	2005	754–2758	–	BAB83959	668	Undefined	Lymphoma
AF092810	1107	1678–2784	–	AAC62505	369	Undefined	Undefined
AF403240	404	1900–2303	–	AA017309	135	Undefined	Undefined

tute. Data from 62 dogs of 25 different dog breeds were included in the study (Table 1).

### Detection of the nt230[del4] *MDR1* mutation by LP analysis

Genomic DNA was isolated from 200 µL of EDTA-preserved blood samples and PCR amplification was performed from 100 ng genomic template DNA as described previously (Geyer et al., 2005a). The PCR generated a 138-bp fragment from the normal *MDR1*(+) allele and a 134-bp fragment from the mutant *MDR1*(-) allele. These two different fragments were discriminated by LP analysis using high-resolution PAGE (6.5% in 1 × Tris-borate-EDTA buffer).

### Screening for the nt230[del4] *MDR1* mutation and the potential 265A > G SNP by DNA sequencing

Additional PCR reactions were performed with the same forward primer as described above using a modified reverse primer derived from the intron 4 sequence of the *MDR1* gene (5'-CAA GGT CTA GAT AAG GTG GTT C-3') to obtain a 449-bp product covering the nt230[del4] and 265A > G loci as well as 290-bp from the intron 4 sequence. PCR products from a total of 62 dogs (see Table 1) were sequenced on both strands (GATC Biotech). Sequencing results were used to directly determine the genotypes of the nt230 and nt265 loci for each dog.

### Detection of the nt230[del4] *MDR1* mutation by fluorogenic 5' nuclease TaqMan AD analysis

The fluorogenic 5' nuclease TaqMan AD assay is a real-time PCR-based assay that is commonly used for routine genotyping of SNPs, nucleotide insertions or nucleotide deletions (Hui et al., 2008). The TaqMan AD method described in the present study involves real-time PCR amplification of the *MDR1* nt230[del4] flanking regions by two gene-specific oligonucleotide primers in the presence of two allele-specific oligonucleotide probes labelled at the 5' end with the fluorescent reporter dyes FAM or VIC and at the 3' end with a non-fluorescent quencher dye (NFQ). Intact probes do not fluoresce in solution because fluorescence of the reporter dyes is quenched by the NFQ. After allele-specific annealing of the probes to their target sequences, cleavage of the probes occurs during PCR amplification from the gene-specific forward oligonucleotide primer by the 5'-3' exonuclease activity of the Taq DNA polymerase (Applied Biosystems). The reporter dyes are separated from the NFQ and the emitted fluorescence is detected by an Applied Biosystems 7300 thermal cycler (Applied Biosystems).

The AD assay mix contained forward 5'-CTC CCT CTC ATG ATG CTG GTT TT-3' and reverse 5'-AGA TCA GTG CCA CAA ATA ATA CTT ACT TTC A-3' gene-specific oligonucleotide primers for amplification of 119-bp and 123-bp amplicons from the *MDR1* nt230[del4] mutant and the *MDR1* normal alleles, respectively. Additionally, the assay mix contains the following fluorescence-labelled allele-specific oligonucleotide probes for AD (TaqMan probes, Applied Biosystems): VIC-5'-ATG ACA GAT AGC TTT GCA-3'-NFQ for hybridisation with the *MDR1* normal allele and FAM-5'-ACA TGA CAG CTT TGC A-3'-NFQ for hybridisation with the *MDR1* nt230[del4] mutant allele. Each TaqMan probe was modified at the 3' end with a minor groove binder to increase the melting temperature ( $T_m$ ) without increasing probe length. This additional modification results in greater differences in  $T_m$  values between matched and mismatched probes, thereby producing more accurate AD. As an additional reference, ROX dye was included in each amplification reaction as a passive internal reference for automated signal normalization. Real-time PCR amplification was done in a total reaction volume of 25 µL consisting of 12.5 µL TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) including AmpliTaq Gold DNA polymerase, dNTP mix, reaction buffer, and ROX reference dye, 2.5 µL TaqMan AD assay (Applied Biosystems), and 100 ng of genomic DNA. The samples were amplified in a 96-well optical plate on an Applied Biosystems 7300 thermal cycler

(Applied Biosystems). The amplification reaction started with activation of the AmpliTaq Gold DNA Polymerase at 95 °C for 10 min before 40 cycles of 92 °C × 15 s and 60 °C × 30 s were applied.

After completion of the amplification cycles, AD was performed onto the post-PCR products. The instrument collected the fluorescence data for VIC, FAM, and ROX over the full PCR amplification cycles as well as for the post-PCR read and the 7300 Real-Time PCR System Sequence Detection Software (SDS) v1.4 (Applied Biosystems) was used to analyze the data for AD. To validate the results of the AD analysis, DNA samples of all 62 dogs were additionally verified by LP analysis and DNA sequencing as described above.

## Results

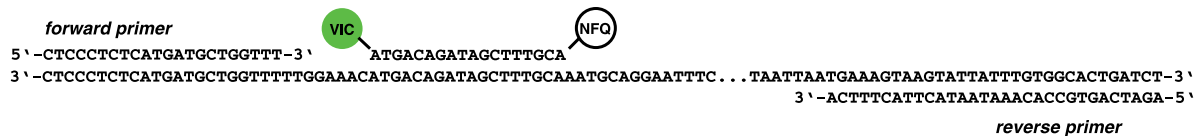
### Searching for potential SNPs in the exon 4 and intron 4 sequences of the canine *MDR1* gene

Before we designed primer and probe sequences for a novel fluorogenic 5' nuclease AD method, we screened all cDNA and

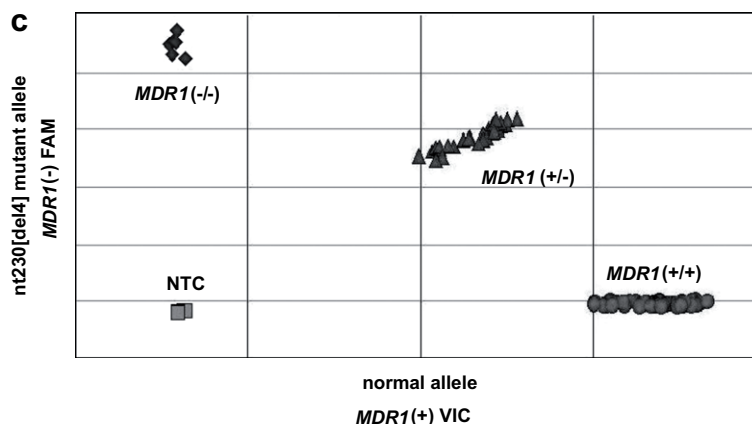
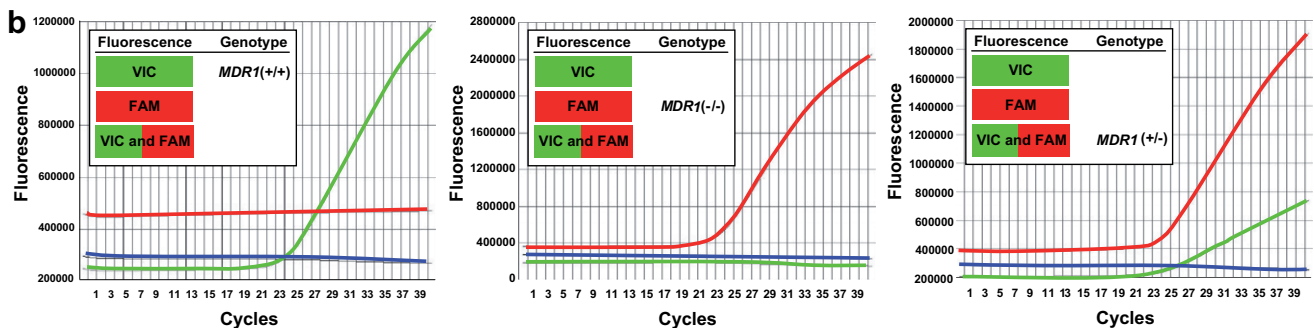
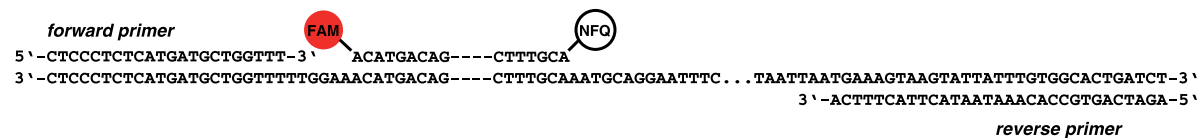
genomic sequences currently available for the canine *MDR1* gene to identify potential SNPs in the exon 4 and intron 4 sequences. A total of nine cDNA sequences were available from the GenBank database including six sequences covering the whole coding sequence of 3846-bp and three partial cDNA sequences. Only one sequence (GenBank Accession No. AJ419568) is available from an ivermectin-sensitive Collie including the nt230[del4] *MDR1* deletion mutation. This sequence served as reference sequence for selection of the TaqMan probe hybridising with the *MDR1* nt230[del4] mutant allele.

In all cDNA sequences present in the GenBank database, localization of this 4-bp deletion differs depending on the sequence starting point, but in all sequences this mutation relates to a 4-bp deletion downstream from nt230 of the coding sequence (CDS) (Table 2). From sequence alignment of all available sequences for the segment of interest, one single A–G base-pair

#### a normal allele *MDR1*(+)



#### nt230[del4] mutant allele *MDR1*(-)

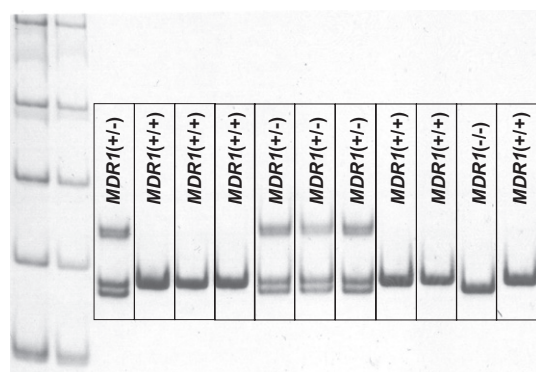


**Fig. 1.** Detection of the nt230[del4] *MDR1* mutation in dogs by fluorogenic 5' nuclease TaqMan AD analysis. (A) Gene-specific oligonucleotide primers were selected from exon 4 (forward primer) and intron 4 (reverse primer) of the *MDR1* gene for PCR amplification of a 119-bp and 123-bp PCR fragment for the *MDR1* nt230[del4] mutant and *MDR1* normal allele, respectively. Additionally, allele-specific probes were selected and selectively labelled with a reporter dye (VIC or FAM) at the 5' end and with a non-fluorescent quencher dye (NFO) at the 3' end. (B) During PCR amplification from the gene-specific forward primer the hybridised dye-labelled probes are selectively cleaved and the respective dyes are separated from the NFO, resulting in increased fluorescence. (C) An additional fluorescence read was performed on the post-PCR samples and AD was done by automatic allele calling with the SDS v1.4 software. Here, determination of the *MDR1* genotype is based on the fluorescence intensity of FAM, VIC, or both dyes.

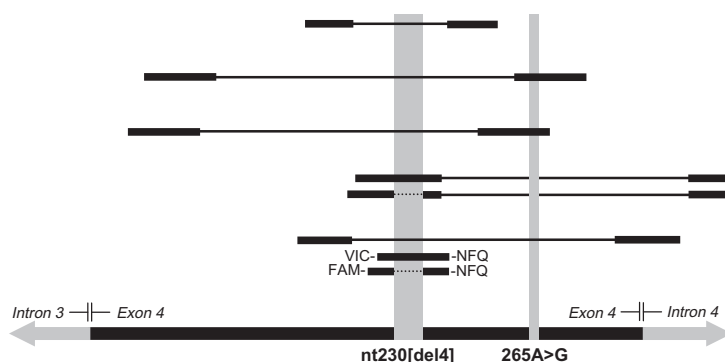
substitution was identified at nucleotide position 265 (265A > G). At this position four *MDR1* cDNA sequences have an adenine base (GenBank Accession Nos. AJ419568, AY582533, DQ068953, AF045016), while two cDNA sequences (GenBank Accession Nos. AF536758 and FJ617477) show a guanine base. This A–G substitution is further referred to as potential SNP 265A > G. As a consequence, this nucleotide position was definitely excluded from primer and probe sequence selection for the TaqMan AD method (see below). In order to search for further potential SNPs, we additionally amplified a 449-bp PCR fragment covering the whole segment of interest from a total of 62 dogs and determined the sequence of the fragments by DNA sequencing. Dogs were selected from 25 different breeds including 48 dogs with *MDR1*(+/+) and 14 dogs with *MDR1*(–/–) genotypes to exclude breed-specific sequence variations (Table 1). All 62 sequences showed an adenine base at nucleotide position 265 (265A) and no further base-pair substitution was identified apart from the nt230[del4] mutation.

#### Development of a fluorogenic 5' nuclease TaqMan AD method for detection of the nt230[del4] *MDR1* mutation

The principle of this novel nt230[del4] *MDR1* TaqMan AD assay is based on the cleavage of allele-specific fluorescence-labelled oligonucleotide probes during PCR amplification. Each allele-specific



**Fig. 2.** Representative data from *MDR1* genotyping using LP analysis. Genomic DNA was subjected to PCR and PAGE analysis. Length of the PCR fragments from the normal *MDR1*(+) allele and the mutant *MDR1*(–) allele were 138-bp and 134-bp, respectively. For the heterozygous *MDR1*(+/-) genotype, fragments of both sizes are visible and an additional heteroduplex with markedly decreased mobility in the polyacrylamide gel.



**Fig. 3.** Schematic overview of the localization of oligonucleotide primer and probe sequences used for *MDR1* genotyping in the present study as well as in previous studies. Localization of the nt230[del4] *MDR1* mutation and the potential 265A > G SNP are indicated by shading. The reverse primers of the most frequently used genotyping methods include the potential 265A > G SNP. In the present study this nucleotide position was omitted to avoid potential problems with primer hybridisation at this locus.

probe, designed for hybridisation to the *MDR1* normal or nt230[del4] mutant allele, is labelled at the 5' end with a different fluorescent reporter dye and both probes are combined in a single reaction with one set of gene-specific oligonucleotide primers (Fig. 1A). During PCR amplification the 5'–3' exonuclease activity of the Taq DNA polymerase degrades the hybridised fluorescence-labelled probes, and the subsequent separation from NFQ results in increased fluorescence from the reporter dyes. Additionally, the reference dye ROX is included in the reaction mix and the fluorescence signals from the reporter dyes are automatically normalised by ROX fluorescence.

Although recording of the real-time PCR run is not directly required for AD, the change in the fluorescence intensity of both VIC and FAM reporter dyes during PCR amplification provides additional quality control for *MDR1* genotyping (Fig. 1B). After PCR amplification over 40 cycles, fluorescence pattern of the post-PCR samples was additionally recorded and used for automated AD (Fig. 1C). Samples without template DNA were used as no template control (NTC) to calibrate the fluorescence pattern.

#### Evaluation of the novel TaqMan AD method by conventional LP analysis and DNA sequencing

All 62 dog samples that underwent *MDR1* genotyping with the novel TaqMan AD analysis method were additionally processed by conventional LP analysis as described before (Geyer et al., 2005a). After traditional PCR amplification, DNA fragments were separated by high-resolution PAGE analysis. PCR products revealed a 138-bp fragment for the normal *MDR1*(+) allele and a 134-bp fragment for the nt230[del4] *MDR1*(–) mutant allele (Fig. 2). Heterozygous genotypes displayed both PCR products and an additional heteroduplex band with markedly reduced mobility in the gel resulting from the cross-hybridisation of a mutated (–) with a normal (+) *MDR1* strand as previously reported (Geyer et al., 2005a). As reference for *MDR1* genotyping by LP and AD analyses, we used direct DNA sequencing of the segment of interest. As a result, all 62 DNA samples displayed the identical genotype by DNA sequencing, LP analysis, and the novel TaqMan AD method.

#### Discussion

In 2001, Mealey et al. (2001) described for the first time a homozygous 4-bp deletion at nucleotide position 230 of the CDS of the *MDR1* gene in an ivermectin-sensitive Collie dog. This nt230[del4] *MDR1* mutation causes a frame shift early in the CDS

Fragments	References
56/60-bp	Roulet et al., 2003; Kawabata et al., 2005
144/148-bp	Hugnet et al., 2004; Neff et al., 2004; Mealey et al., 2005; Fecht et al., 2007
134/138-bp	Geyer et al., 2005a, b, 2007
326-bp	Baars et al., 2008
119/123-bp	This study

**Table 3**  
Primer and probe sequences used for *MDR1* genotyping in different studies.

References	Forward primer	Reverse primer	Fragment	Detection method
Roulet et al., 2003; Kawabata et al., 2005	5'-CCTCTCATGATGCTGGT-3'	5'-TGAAATTCCTGCATTGCA-3'	56/60-bp	LP analysis: PCR, PAGE/AGE, EB
Hugnet et al., 2004; Neff et al., 2004; Mealey et al., 2005; Fecht et al., 2007	5'-GGCTTGATAGGTTGTATATGTTGGT-3'	5'-ATTATAACTGGAAAAGTTTGTTC-3'	144/148-bp	LP analysis: PCR with VIC/FAM-labelled primers, PAGE
Geyer et al., 2005a,b, 2007 Baars et al., 2008	5'-ATTGGCTTGATAGGTTGTATATG-3' 5'-TTGGAACATGACAGATAGC-3' <i>MDR1</i> (+) <sup>a</sup>	5'-AAGTTTGTCTTGAATTCCTG-3' 5'-AACTCTCGGATCTTCTG-3'	134/138-bp 326-bp	LP analysis: PCR, PAGE, EB AD analysis: Allele specific PCR primers, AGE, EB
This study	5'-GTTTTGGAAACATGACAGC-3' <i>MDR1</i> (-) <sup>a</sup> 5'-CTCCCTCATGATGCTGGTTT-3' VIC-5'-ATGACAGATAGCTTGA-3'-NFQ <i>MDR1</i> (+) <sup>a,b</sup> FAM-5'-ACATGACAGCTTGA-3'-NFQ <i>MDR1</i> (-) <sup>a,b</sup>	5'-AGATCAGTCCACAAATAACTACTACTTCA-3'	119/123-bp	Fluorogenic 5' nuclease TaqMan AD analysis

<sup>a</sup> *MDR1*(+), normal *MDR1* allele; *MDR1*(-), nt230[del4] *MDR1* mutant allele.

<sup>b</sup> TaqMan probes are labelled with fluorescent reporter dyes at the 5' end, either with VIC or FAM, and a non-fluorescent quencher dye (NFQ) is attached to the 3' end. LP, length polymorphism; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; AGE, agarose gel electrophoresis; AD, allelic discrimination; EB, ethidium bromide.

and as a consequence P-gp is truncated to 91 amino acids compared with 1281 amino acids of the full length P-gp (Roulet et al., 2003). Following identification of this gene deletion mutation, at least 100 different dog breeds were screened for this particular *MDR1* mutation. These studies consistently used PCR amplification of the nt230 flanking region on exon 4 of the *MDR1* gene with subsequent LP analysis by PAGE. Either fluorescence-labelled primers were used (Hugnet et al., 2004; Neff et al., 2004; Mealey et al., 2005) or polyacrylamide gels were post-run stained with ethidium bromide (Geyer et al., 2005a, b) (see Fig. 3 and Table 3). Using these methods, *MDR1* genotyping was conducted in several thousand dogs and, apart from the Collie, more than 10 additional herding dog and sighthound breeds were found to be predisposed for the nt230[del4] *MDR1* mutation (Mealey and Meurs, 2008).

Recent reports indicate that *MDR1* mutant dogs are also sensitive to other P-gp transported drugs such as vincristine, loperamide, and milbemycin oxime (Sartor et al., 2004; Mealey et al., 2008; Barbet et al., 2009). Therefore, there is a critical need for routine testing of the *MDR1* genotype in predisposed breeds before treatment is started with one of these medications. With this background, the fluorogenic 5' nuclease TaqMan AD method described in the present study has a clear benefit compared to other methods. Firstly, time intensive and error-prone processing of the PCR products by gel electrophoresis is displaced by fully automated AD by fluorescence measurement. Additionally, there is no need for hazardous chemicals such as acrylamide and ethidium bromide and this new method is useful for automated routine diagnostics.

Secondly, combination of two gene-specific oligonucleotide primers with two additional allele-specific oligonucleotide probes provides higher sequence specificity compared with only two gene-specific primers for conventional PCR amplification. Furthermore, inclusion of a minor groove binder in the fluorescence-labelled probes results in greater differences in the  $T_m$  values between matched and mismatched probes and is generally considered to improve the hybridisation properties of sequence-specific DNA probes (Kutyavin et al., 2003).

Thirdly, by using real-time PCR amplification the whole genotyping process can be monitored and retraced by the increase in fluorescence per cycle in contrast to other methods that only allow end point analysis of the PCR products. Fourthly, the *MDR1* genotyping methods described previously covered the potential 265A > G SNP with the reverse primers used for PCR amplification (Hugnet et al., 2004; Geyer et al., 2005a, b; Mealey et al., 2005). Although all 62 dogs screened for this 265A > G single base pair substitution in the present study showed the 265A allele, two inde-

pendent full length *MDR1* cDNA sequences exist in the GenBank database bearing the 265 G allele: one sequence was obtained from a Beagle (GenBank Accession No. AF536758, submitted in 2002) and the other one was derived from a Border Collie (GenBank Accession No. FJ617477, submitted in 2009). Therefore, occurrence of this potential 265A > G SNP cannot be excluded for an individual dog and might cause problems in the PCR amplification with mismatching PCR primers.

## Conclusions

The TaqMan AD assay described in the present study provides a new method for detection of the canine nt230[del4] *MDR1* mutation with high specificity and reliability that is useful for routine diagnostics.

## Conflict of interest statement

*MDR1* genotyping is commercially available from the TransMIT GmbH, division of Pharmacogenetic Diagnostics PGvet (scientific administration by Prof. Dr. Joachim Geyer) at the Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University of Giessen.

## References

- Baars, C., Leeb, T., von Klopmann, T., Tipold, A., Potschka, H., 2008. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional *MDR1* polymorphism in dogs. *The Veterinary Journal* 177, 394–397.
- Barbet, J.L., Snook, T., Gay, J.M., Mealey, K.L., 2009. ABCB1-1 Delta (*MDR1*-1 Delta) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalised demodicosis. *Veterinary Dermatology* 20, 111–114.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R., 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 695–698.
- Dean, M., 2005. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods in Enzymology* 400, 409–429.
- Fecht, S., Wöhlke, A., Hamann, H., Distl, O., 2007. Analysis of the canine *MDR1*-1Delta mutation in the dog breed Elo. *Journal of Veterinary Medicine* 54, 401–405.
- Fromm, M.F., 2000. P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 38, 69–74.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Moritz, A., Petzinger, E., 2005a. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28, 95–99.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Leidolf, R., Moritz, A., Petzinger, E., 2005b. Frequency of the nt230(del4) *MDR1* mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28, 545–551.
- Geyer, J., Klintzsch, S., Meerkamp, K., Wöhlke, A., Distl, O., Moritz, A., Petzinger, E., 2007. Detection of the nt230(del4) *MDR1* mutation in White Swiss Shepherd

- dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30, 482–485.
- Hugnet, C., Bentjen, S.A., Mealey, K.L., 2004. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27, 227–229.
- Hui, L., DelMonte, T., Ranade, K., 2008. Genotyping using the TaqMan assay. *Current Protocols in Human Genetics* 2.10.
- Kawabata, A., Momoi, Y., Inoue-Murayama, M., Iwasaki, T., 2005. Canine MDR1 gene mutation in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 67, 1103–1107.
- Kitamura, Y., Koto, H., Matsuura, S., Kawabata, T., Tsuchiya, H., Kusuhara, H., Tsujimoto, H., Sugiyama, Y., 2008. Modest effect of impaired P-glycoprotein on the plasma concentrations of fexofenadine, quinidine, and loperamide following oral administration in collies. *Drug Metabolism and Disposition* 36, 807–810.
- Kutyavin, I., Lokhov, S., Lukhtanov, E., Reed, M.W., 2003. Chemistry of minor groove binder-oligonucleotide conjugates. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (Chapter 8, Unit 8.4).
- Martinez, M., Modric, S., Sharkey, M., Troutman, L., Walker, L., Mealey, K., 2008. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31, 285–300.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M., Cantor, G.H., 2001. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the MDR1 gene. *Pharmacogenetics* 11, 727–733.
- Mealey, K.L., Munyard, K.A., Bentjen, S.A., 2005. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary Parasitology* 131, 193–196.
- Mealey, K.L., Meurs, K.M., 2008. Breed distribution of the ABCB1-1Delta (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 233, 921–924.
- Mealey, K.L., Fidel, J., Gay, J.M., Impelliseri, J.A., Clifford, C.A., Bergman, P.J., 2008. ABCB1-1Delta polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 996–1000.
- Neff, M.W., Robertson, K.R., Wong, A.K., Safra, N., Broman, K.W., Slatkin, M., Mealey, K.L., Pedersen, N.C., 2004. Breed distribution and history of canine MDR1-1Δ, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11725–11730.
- Pulliam, J.D., Seward, R.L., Henry, R.T., Steinberg, S.A., 1985. Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Veterinary Medicine* 80, 33–40.
- Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J.F., Drag, M., Soll, M., Alvinerie, M., Pineau, T., 2003. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology* 460, 85–91.
- Sartor, L.L., Bentjen, S.A., Trepanier, L., Mealey, K.L., 2004. Loperamide toxicity in a collie with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18, 117–118.
- Schinkel, A.H., 1997. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Seminars in Cancer Biology* 8, 161–170.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C., 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7735–7738.

## 10. Anhang - Publikationen

6) GRAMER I, LEIDOLF R, DÖRING B, KLINTZSCH S, KRÄMER EM, YALCIN E, PETZINGER E & GEYER J

(2011) Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs.

*The Veterinary Journal*, Volume 189, Issue 1, pp 67-71

DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.06.012

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023310002261>



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)



## Breed distribution of the nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs

Irina Gramer<sup>a</sup>, Regina Leidolf<sup>a</sup>, Barbara Döring<sup>a</sup>, Stefanie Klintzsch<sup>a</sup>, Eva-Maria Krämer<sup>b</sup>, Ebru Yalcin<sup>c</sup>, Ernst Petzinger<sup>a</sup>, Joachim Geyer<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University of Giessen, Frankfurter Str. 107, D-35392 Giessen, Germany

<sup>b</sup>Collie Revue, Postfach 2217, D-53819 Neunkirchen-Seelscheid, Germany

<sup>c</sup>Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Uludag University, Turkey

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 21 June 2010

#### Keywords:

P-glycoprotein  
*MDR1*  
Dog  
Ivermectin  
Drug sensitivity

### ABSTRACT

A 4-bp deletion mutation associated with multiple drug sensitivity exists in the canine multidrug resistance (*MDR1*) gene. This mutation has been detected in more than 10 purebred dog breeds as well as in mixed breed dogs. To evaluate the breed distribution of this mutation in Germany, 7378 dogs were screened, including 6999 purebred and 379 mixed breed dogs. The study included dog breeds that show close genetic relationship or share breeding history with one of the predisposed breeds but in which the occurrence of the *MDR1* mutation has not been reported. The breeds comprised Bearded Collies, Anatolian Shepherd Dog, Greyhound, Belgian Tervuren, Kelpie, Borzoi, Australian Cattle Dog and the Irish Wolfhound.

The *MDR1* mutation was not detected in any of these breeds, although it was found as expected in the Collie, Longhaired Whippet, Shetland Sheepdog, Miniature Australian Shepherd, Australian Shepherd, Wäller, White Swiss Shepherd, Old English Sheepdog and Border Collie with varying allelic frequencies for the mutant *MDR1* allele of 59%, 45%, 30%, 24%, 22%, 17%, 14%, 4% and 1%, respectively. Allelic frequencies of 8% and 2% were determined in herding breed mixes and unclassified mixed breeds, respectively.

Because of its widespread breed distribution and occurrence in many mixed breed dogs, it is difficult for veterinarians and dog owners to recognise whether *MDR1*-related drug sensitivity is relevant for an individual animal. This study provides a comprehensive overview of all affected dog breeds and many dog breeds that are probably unaffected on the basis of ~15,000 worldwide *MDR1* genotyping data.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

P-glycoprotein is an adenosine triphosphate (ATP)-driven drug efflux carrier, encoded by the multidrug resistance gene *MDR1*, also referred to as *ABCB1*. P-glycoprotein transports a broad variety of structurally diverse compounds that are usually hydrophilic and amphiphatic (Fromm, 2004), including many drugs commonly used in veterinary medicine (Mealey, 2004). The carrier is expressed in many tissues with secretory or excretory functions, such as the liver, kidney and intestine, where it limits drug absorption from the gut and promotes drug excretion into the bile and urine. Additionally, P-glycoprotein is highly expressed at the blood–brain barrier, where it restricts drug entry into the central nervous system (Thiebaut et al., 1987; Cordon-Cardo et al., 1990).

In 2001, a 4-bp gene deletion mutation was identified in the canine *MDR1* gene and was referred to as *mdr1-1Δ*, *ABCB1-1Δ*, or

*MDR1* nt230(del4) (Mealey et al., 2001; Neff et al., 2004; Geyer et al., 2005a; Mealey and Meurs, 2008). This *MDR1* mutation correlates with the ivermectin-sensitive phenotype that was recognised in Collie dogs in the early 1980s (Seward, 1983; Pulliam et al., 1985). Dogs with homozygous nt230(del4) *MDR1* mutations do not express a functionally intact P-glycoprotein and (in addition to ivermectin) show increased sensitivity to many P-glycoprotein-transported drugs such as moxidectin, milbemycin oxime, acepromazine, butorphanol, digoxin, vincristine and loperamide (Martinez et al., 2008; Mealey, 2008).

Apart from the Collie, many additional dog breeds as well as mixed breed dogs are affected by this mutation (Neff et al., 2004; Geyer et al., 2005b; Mealey and Meurs, 2008) and it is therefore difficult for veterinarians and dog owners to recognise whether *MDR1*-related drug sensitivity is relevant for an individual animal. The purpose of the present study was to provide an overview of all affected as well as many of the most likely unaffected dog breeds on the basis of 7378 *MDR1* genotyping data from Germany and an additional 7500 cases reported in the literature from other countries.

\* Corresponding author. Tel.: +49 641 9938404; fax: +49 641 9938409.  
E-mail address: [Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de](mailto:Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de) (J. Geyer).

## Materials and methods

### Animals and blood samples

Blood samples were obtained from client-owned dogs and analysed for the nt230(del4) *MDR1* mutation as part of the diagnostic research service at our institute. In total, 7378 samples from 106 purebred dog breeds were analysed, including the following breeds (only breeds with at least 20 samples are listed): Collie ( $n = 2227$ ), Australian Shepherd ( $n = 1908$ ), Shetland Sheepdog ( $n = 960$ ), Border Collie ( $n = 527$ ), White Swiss Shepherd ( $n = 274$ ), Anatolian Shepherd Dog ( $n = 193$ ), Wäller ( $n = 110$ ), Bearded Collie ( $n = 79$ ), Greyhound ( $n = 73$ ), Miniature Australian Shepherd ( $n = 72$ ), Old English Sheepdog ( $n = 67$ ), Australian Cattle Dog ( $n = 52$ ), Irish Wolfhound ( $n = 36$ ), Beagle ( $n = 35$ ), Belgian Tervuren ( $n = 33$ ), Borzoi ( $n = 23$ ), Chinese Shar Pei ( $n = 22$ ), Kelpie ( $n = 20$ ) and Longhaired Whippet ( $n = 20$ ).

Additionally, 261 herding breed mixes (dogs for which at least one parent was known to be a herding breed, such as a Collie or Border Collie) and 118 unclassified mixed breed dogs (for which the parentage was either unknown or no parental herding breed was present) were analysed. There were no samples from the English Shepherd, McNab or Silken Windhound breeds, which are uncommon in Germany but for which the nt230(del4) *MDR1* mutation has been identified (Neff et al., 2004; Mealey and Meurs, 2008). Dogs were included in the present study when the animal's name and breed were given by the owner or veterinarian. However, in general no effort was made to confirm the reported breed by inspecting the breeding documents.

### *MDR1* genotyping

Genomic DNA was isolated from 200  $\mu$ L EDTA-preserved blood samples as reported previously (Geyer et al., 2005a). For *MDR1* genotyping, an automated fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method was used as described elsewhere (Klitzsch et al., 2009).

## Results

A total of 7378 dogs from Germany were *MDR1* genotyped. More than half of all samples were derived from Collies and Australian Shepherds. Samples from Shetland Sheepdogs, Border Collies, White Swiss Shepherds, Wällers, Miniature Australian Shepherds and Old English Sheepdogs accounted for approximately 30% of all submissions. The mutant nt230(del4) *MDR1*(-) allele was detected in nine purebred dog breeds, including the Collie, Longhaired Whippet, Shetland Sheepdog, Miniature Australian Shepherd, Australian Shepherd, Wäller, White Swiss Shepherd, Old English Sheepdog, and Border Collie as well as in many herding breed mixes and unclassified mixed breeds (Table 1).

The frequency of the nt230(del4) *MDR1* mutation was highly different between these dog breeds: 81% of all Collies and 75% of all Longhaired Whippets analysed showed at least one mutant *MDR1*(-) allele, which occurred either in the heterozygous *MDR1*(+/-) or the homozygous *MDR1*(-/-) genotype. In Shetland Sheepdogs, Miniature Australian Shepherds, and Australian Shepherds this accounted for 51%, 46%, and 38%, respectively. In the

other breeds listed in Table 1, the occurrence of the homozygous mutant *MDR1*(-/-) genotype was rarely detected (White Swiss Shepherd and Border Collie) or was not found in the sample collection (Wäller and Old English Sheepdog).

Although the German Shepherd is a popular dog breed in Germany, only 13 blood samples from this breed were submitted to our laboratory for *MDR1* genotyping. The nt230(del4) *MDR1* mutation was not detected in any of these samples. We received, however, many samples from the White Swiss Shepherd (Berger Blanc Suisse, FCI number 347/1.1) in which the mutant *MDR1*(-) allele occurred with a high allelic frequency of 14%.

Table 2 summarises the *MDR1* genotyping data from nine previous studies worldwide. The frequency data from the present study are similar to the published data for Collies, Australian Shepherds, Miniature Australian Shepherds and Old English Sheepdogs, but the reported frequency from different countries is variable for the Shetland Sheepdog, with allelic frequencies ranging from 1% ( $n = 42$ ) in Japan, 7% ( $n = 448$ ) in the United States, and 36% ( $n = 49$ ) in the United Kingdom. In comparison, the allelic frequency for Shetland Sheepdogs ( $n = 960$ ) was determined to be 30% in the present study.

It was of particular interest to evaluate whether dog breeds that show a close genetic relationship or share a breeding history with one of the predisposed dog breeds are similarly affected by the nt230(del4) *MDR1* mutation. Therefore, dogs from the Bearded Collie, Anatolian Shepherd Dog, Greyhound, Belgian Tervuren, Kelpie, Borzoi, Australian Cattle Dog, and Irish Wolfhound breeds were included in the *MDR1* genotyping analysis. In all of these breeds, however, the nt230(del4) *MDR1* mutation was not detected (Table 3). Of the samples analysed, breed specification was only unclear for one dog that was classified as an Australian Cattle Dog by the owners and showed the heterozygous *MDR1*(+/-) genotype. Although this animal's phenotype clearly corresponded with the typical Australian Cattle Dog breed appearance (documented by photographs), no official pedigree or breeding documents were available and we therefore classified the dog as a mixed breed.

Apart from studying more than 100 purebred dog breeds, we also analysed 379 mixed breed dogs (Table 1); 261 of these showed sheepdog ancestry and 118 were without breed specification. Surprisingly, both cohorts of mixed breed dogs showed high frequencies for the mutant *MDR1*(-) allele, i.e. 8% for the herding breed mixes and 2% for the unclassified mixed breeds.

## Discussion

In this study, nine purebred dog breeds were shown to be affected by the nt230(del4) *MDR1* mutation in a large collection of

**Table 1**  
*MDR1* genotyping data from 6544 dogs in Germany.

Dog breed	No. of dogs, $\Sigma$ 6544	Allelic frequency (%) <i>MDR1</i> (-)	Genotype (%)		
			<i>MDR1</i> (+/-)	<i>MDR1</i> (+/-)	<i>MDR1</i> (-/-)
Collie <sup>a</sup>	2227	59	19	45	36
Longhaired Whippet	20	45	25	60	15
Shetland Sheepdog	960	30	49	43	8
Miniature Australian Shepherd	72	24	54	43	3
Australian Shepherd	1908	22	62	32	6
Wäller	110	17	65	35	0
White Swiss Shepherd	274	14	75	23	2
Old English Sheepdog	67	4	92	8	0
Border Collie	527	1	98.7	0.9	0.4
Herding breed mix <sup>b</sup>	261	8	86	12	2
Mixed breed <sup>c</sup>	118	2	97	3	0

<sup>a</sup> Dogs classified as American Collie, Longhaired/Rough Collie, Smooth Collie, or Collie were summarised as Collie.

<sup>b</sup> Dogs for which at least one parent was known to be a herding breed (e.g., Collie or Border Collie).

<sup>c</sup> Dogs for which the parentage was either unknown or no parental herding breed was present.

**Table 2**  
Frequency of the *MDR1* genotypes from worldwide genotyping studies.

		US <sup>c</sup>	US <sup>a</sup>	Germany <sup>e</sup>	UK <sup>b</sup>	France <sup>f</sup>	Japan <sup>d</sup>	Germany <sup>g</sup>	UK <sup>a</sup>	North-west US <sup>h</sup>	Australia <sup>i</sup>
Collie	<i>MDR1</i> (+/+)	22.6%	26.0%	23.9%	7.1%	20.0%	25.0%	50.0%	14.9%	22.5%	12.1%
	<i>MDR1</i> (+/-)	42.0%	46.0%	43.1%	40.5%	32.0%	33.3%	50.0%	51.1%	42.5%	63.6%
	<i>MDR1</i> (-/-)	35.4%	28.0%	33.0%	52.4%	48.0%	41.7%	0%	34.0%	35.0%	24.3%
	<i>n</i>	1424	161	578	42	25	12	14	94	40	33
	AF	56%	51%	55%	73%	64%	58%	25%	60%	56%	56%
Shetland Sheepdog	<i>MDR1</i> (+/+)	88.2%	84.2%	45.7%	40.8%		97.6%	33.3%			57.1%
	<i>MDR1</i> (+/-)	10.5%	14.7%	48.6%	47.0%		2.4%	0%			42.9%
	<i>MDR1</i> (-/-)	1.3%	1.1%	5.7%	12.2%		0%	66.7%			0%
	<i>n</i>	448	190	140	49		42	3			7
	AF	7%	8%	30%	36%		1%	67%			21%
Australian Shepherd	<i>MDR1</i> (+/+)	53.0%	68.5%	67.9%	32.1%		44.4%	33.3%			35.7%
	<i>MDR1</i> (+/-)	37.0%	29.8%	25.2%	42.9%		44.4%	66.7%			42.8%
	<i>MDR1</i> (-/-)	10.0%	1.7%	6.9%	25.0%		11.2%	0%			21.5%
	<i>n</i>	1421	178	333	28		9	3			14
	AF	29%	17%	20%	46%		33%	33%			43%
Border Collie	<i>MDR1</i> (+/+)	98.4%	100.0%	99.1%	95.3%			87.5%			
	<i>MDR1</i> (+/-)	1.3%	0%	0.6%	4.7%			12.5%			
	<i>MDR1</i> (-/-)	0.3%	0%	0.3%	0%			0%			
	<i>n</i>	306	222	334	43			8			
	AF	1%	0%	1%	2%			6%			
Old English Sheepdog	<i>MDR1</i> (+/+)	97.5%	92.7%	87.5%	78.8%						
	<i>MDR1</i> (+/-)	2.5%	7.3%	12.5%	21.2%						
	<i>n</i>	40	151	24	33						
	AF	1%	4%	6%	11%						
	Australian Shepherd Miniature	<i>MDR1</i> (+/+)	63.1%	51.8%							
<i>MDR1</i> (+/-)		33.7%	44.6%								
<i>MDR1</i> (-/-)		3.2%	3.6%								
<i>n</i>		285	56								
AF		20%	26%								
Longhaired Whippet	<i>MDR1</i> (+/+)	41.7%	32.6%								
	<i>MDR1</i> (+/-)	58.3%	51.7%								
	<i>MDR1</i> (-/-)	0%	15.7%								
	<i>n</i>	24	89								
	AF	29%	42%								
McNab	<i>MDR1</i> (+/+)		68.6%								
	<i>MDR1</i> (+/-)		28.6%								
	<i>MDR1</i> (-/-)		2.8%								
	<i>n</i>		35								
	AF		17%								
Silken Windhound	<i>MDR1</i> (+/+)	68.8%	65.5%								
	<i>MDR1</i> (+/-)	31.2%	33.3%								
	<i>MDR1</i> (-/-)	0%	1.2%								
	<i>n</i>	16	84								
	AF	16%	18%								
German Shepherd	<i>MDR1</i> (+/+)	89.8%	100.0%								
	<i>MDR1</i> (+/-)	8.4%	0%								
	<i>MDR1</i> (-/-)	1.8%	0%								
	<i>n</i>	166	95								
	AF	6%	0%								
English Shepherd	<i>MDR1</i> (+/+)	100.0%	85.7%								
	<i>MDR1</i> (+/-)	0%	14.3%								
	<i>n</i>	28	91								
	AF	0%	7%								
	Wäller	<i>MDR1</i> (+/+)			62.9%						
<i>MDR1</i> (+/-)				37.1%							
<i>n</i>				62							
AF				19%							

Note: *n*, number of dogs analysed; AF, allelic frequency for the mutant *MDR1*(-) allele; a-i, data derived from the following studies:

<sup>a</sup> Neff et al. (2004).

<sup>b</sup> Tappin et al. (2008).

<sup>c</sup> Mealey and Meurs (2008).

<sup>d</sup> Kawabata et al. (2005).

<sup>e</sup> Geyer et al. (2005b).

<sup>f</sup> Hugnet et al. (2004).

<sup>g</sup> Baars et al. (2008).

<sup>h</sup> Mealey et al. (2002).

<sup>i</sup> Mealey et al. (2005).

7378 dogs from Germany. These breeds comprised the Collie, Long-haired Whippet, Shetland Sheepdog, Miniature Australian Shep-

herd, Australian Shepherd, Wäller, White Swiss Shepherd, Old English Sheepdog, and Border Collie. Furthermore, many mixed

**Table 3**

Purebred dogs genotyped with *MDR1*(+/+) in different studies worldwide.

Dog breed <sup>a</sup>	Σ of dogs
Bearded Collie	438 <sup>a,b,c,e,g</sup>
Anatolian Shepherd Dog	198 <sup>a,b</sup>
Elo	188 <sup>b,f</sup>
Greyhound	183 <sup>a,b</sup>
Australian Cattle Dog	180 <sup>a,b,c</sup>
Labrador Retriever	169 <sup>a,b,c,d</sup>
Belgian Tervuren	133 <sup>a,b</sup>
Pembroke Welsh Corgi	132 <sup>a</sup>
Kelpie	129 <sup>a,b</sup>
Italian Greyhound	120 <sup>a,b</sup>
Borzoi	114 <sup>a,b</sup>
Bernese Mountain	113 <sup>a,b</sup>
Flat-Coated Retriever	111 <sup>a</sup>
Whippet	105 <sup>a</sup>
Jack Russell Terrier	99 <sup>a,b</sup>
Shih Tzu	89 <sup>a,b,c,d</sup>
Skye Terrier	87 <sup>a,b,c</sup>
English Setter	73 <sup>a</sup>
Golden Retriever	66 <sup>a,b,c,d</sup>
Belgian Malinois	65 <sup>a,b</sup>
Belgian Sheepdog	60 <sup>a,b</sup>
Koolie	56 <sup>a</sup>
Saluki	49 <sup>a,b</sup>
Newfoundland	43 <sup>a,b</sup>
Beagle	40 <sup>a,b</sup>
Weimaraner	39 <sup>a,b</sup>
Welsh Sheepdog	37 <sup>a</sup>
Dachshund	36 <sup>a,b,d</sup>
Icelandic Sheepdog	36 <sup>a,b</sup>
Irish Wolfhound	36 <sup>b</sup>
Poodle	34 <sup>a,b</sup>
Welsh Corgi	34 <sup>b,c</sup>
West Highland White Terrier	34 <sup>a,b</sup>
Boxer	28 <sup>a,b,c</sup>
Cardigan Welsh Corgi	28 <sup>a</sup>
Shiba Inu	27 <sup>a,d</sup>
Canaan	25 <sup>a</sup>
Pug	24 <sup>a,b</sup>
Bulldog	22 <sup>a,c</sup>
Chinese Shar Pei	22 <sup>b</sup>
Rottweiler	22 <sup>a,b</sup>
Doberman Pinscher	20 <sup>a,b,c</sup>
Rhodesian Ridgeback	20 <sup>a,b</sup>
Deerhound	17 <sup>b</sup>
Gordon Setter	12 <sup>a,b</sup>
Irish Setter	12 <sup>a</sup>
Great Dane	12 <sup>a,b</sup>
Cavalier King Charles Spaniel	11 <sup>a,b</sup>
Heading dog	11 <sup>a</sup>
Akabash	10 <sup>c</sup>
American Pit Bull Terrier	10 <sup>c</sup>
Manchester Terrier	9 <sup>a,b</sup>
Norfolk Terrier	9 <sup>a</sup>
Scottish Terrier	9 <sup>a,b</sup>
Tibetan Terrier	9 <sup>a,b</sup>
Dalmatian	8 <sup>a,b</sup>
Kerry Blue Terrier	8 <sup>a</sup>
Miniature Pinscher	8 <sup>a,b</sup>
Saint Bernard	8 <sup>a</sup>
Siberian Husky	8 <sup>a,b</sup>
Silky Terrier	8 <sup>a</sup>
Soft Coated Wheaten Terrier	8 <sup>a</sup>
Akita	7 <sup>a,b</sup>
Alaskan Malamute	7 <sup>a,b</sup>
Basenji	7 <sup>a,b</sup>
Border Terrier	7 <sup>a</sup>
Cairn Terrier	7 <sup>a,b</sup>
Cocker Spaniel, American	7 <sup>a,b</sup>
Curly-Coated Retriever	7 <sup>a</sup>
English Springer Spaniel	7 <sup>a,b</sup>
Finnish Spitz	7 <sup>a</sup>
Great Pyrenees	7 <sup>a</sup>
Manchester Terrier, Toy	7 <sup>a</sup>
Pomeranian	7 <sup>a</sup>

**Table 3 (continued)**

Dog breed <sup>a</sup>	Σ of dogs
Schnauzer, Miniature	7 <sup>a</sup>
Vizsla	7 <sup>a,b</sup>
American Eskimo	6 <sup>a</sup>
American Foxhound	6 <sup>a</sup>
American Staffordshire Terrier	6 <sup>a</sup>
Bichon Frise	6 <sup>a</sup>
Bordeaux Mastiff	6 <sup>b</sup>
Boston Terrier	6 <sup>a,b</sup>
Brussels Griffon	6 <sup>a</sup>
Chow Chow	6 <sup>a</sup>
English Cocker Spaniel	6 <sup>a</sup>
German Shorthaired Pointer	6 <sup>a,b</sup>
German Wirehaired Pointer	6 <sup>a,b</sup>
Giant Schnauzer	6 <sup>a,b</sup>
Japanese Chin	6 <sup>a</sup>
Kuvasz	6 <sup>a</sup>
Lowchen	6 <sup>a</sup>
Mastiff	6 <sup>a,b</sup>
Petit Basset Griffon Vendeen	6 <sup>a</sup>
Schnauzer, Standard	6 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dog breeds were included if at least six dogs were analysed per breed in the following studies:

<sup>a</sup> Neff et al. (2004).

<sup>b</sup> Present study.

<sup>c</sup> Mealey and Meurs (2008).

<sup>d</sup> Kawabata et al. (2005).

<sup>e</sup> Geyer et al. (2005b).

<sup>f</sup> Fecht et al. (2007).

<sup>g</sup> Baars et al. (2008).

breed dogs showed the heterozygous *MDR1*(+/-) and even the homozygous *MDR1*(-/-) mutant genotypes. This outcome was expected because all of these purebred and mixed breed dogs have been shown to be affected by the *MDR1* mutation in previous studies (Neff et al., 2004; Geyer et al., 2005b; Mealey and Meurs, 2008).

It was unexpected to find breeds that show a genetic relationship (Parker et al., 2004) or share a breeding history with one of the predisposed purebred dog breeds (i.e. Bearded Collie, Anatolian Shepherd Dog, Greyhound, Belgian Tervuren, Kelpie, Australian Cattle Dog, Borzoi, and Irish Wolfhound) were free of the *MDR1* mutation. Like a previous study (Neff et al., 2004), a large sample collection was analysed so these breeds are most likely not to be affected by the *MDR1* mutation. This applies in particular to the Bearded Collie, which was re-established in 1949 and is essentially based on working dogs of different origins. Bearded Collies were included in most of the published *MDR1* genotyping studies worldwide and 438 dogs have been tested so far, all with the *MDR1*(+/+) genotype.

It is less clear for the German Shepherd. In a previous study, the nt230(del4) *MDR1* mutation was identified in the White Swiss Shepherd with a high allelic frequency of 13% (Geyer et al., 2007). This study was initiated because of several cases of ivermectin- and doramectin-induced neurotoxicosis among White Swiss Shepherd dogs that were clinically identical with ivermectin-sensitive Collie dogs affected by the nt230(del4) *MDR1* mutation. Based on breeding history, the White Swiss Shepherd is related to the German Shepherd and is not expected to share a Collie ancestry. However, microsatellite analyses showed (Geyer et al., 2007) that White Swiss Shepherd chromosomes carrying the mutant *MDR1*(-) allele exhibited a haplotype that was strongly associated with the mutant *MDR1*(-) allele in breeds of the Collie lineage (Neff et al., 2004). Therefore, White Swiss Shepherd dogs likely acquired the *MDR1* mutation from the Collie lineage by descent (Geyer et al., 2007).

In contrast to Europe (where the White Swiss Shepherd and German Shepherd are independent breed lines) in the US the

White Shepherd is an unacknowledged breed and is generally referred to as the German Shepherd. This might be one reason for the classification of the German Shepherd as a predisposed dog breed for the *MDR1* mutation in US studies (Mealey and Meurs, 2008). Nevertheless, since only a small amount of brown-coloured German Shepherd dogs were analysed for the nt230(del4) *MDR1* mutation in Germany and all were free of this mutation, further *MDR1* genotyping studies are necessary to clarify whether the *MDR1* mutation occurs only in the white or white-factored German Shepherd dogs or even in the brown-coloured ones.

## Conclusions

The widespread breed distribution of the nt230(del4) *MDR1* mutation transfers the *MDR1*-related drug sensitivity (first identified in the Collie) to an unpredictable number of individual canine patients. The results should be helpful in providing a first risk estimation for dog breeds that are most likely not affected by this mutation as well as for dog breeds that are definitely affected on the basis of ~15,000 *MDR1* genotyping data from different countries. In the case of the German Shepherd, additional genotyping studies are necessary to evaluate further the occurrence and frequency of the nt230(del4) *MDR1* mutation in this breed.

## Conflict of interest statement

*MDR1* genotyping is commercially available from TransMIT GmbH, division of Pharmacogenetic Diagnostics PGvet (Professor Joachim Geyer and Professor Ernst Petzinger) at the Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University of Giessen.

## Acknowledgement

This study was supported by the GKF (Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V., Bonn, Germany).

## References

- Baars, C., Leeb, T., von Klopmann, T., Tipold, A., Potschka, H., 2008. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional *MDR1* polymorphism in dogs. *The Veterinary Journal* 177, 394–397.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J.R., Melamed, M.R., 1990. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 38, 1277–1287.
- Fecht, S., Wöhlke, A., Hamann, H., Distl, O., 2007. Analysis of the canine *mdr1-1Δ* mutation in the dog breed Elo. *Journal of Veterinary Medicine, A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 54, 401–405.
- Fromm, M.F., 2004. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 423–429.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Moritz, A., Petzinger, E., 2005a. Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28, 95–99.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Leidolf, R., Moritz, A., Petzinger, E., 2005b. Frequency of the nt230(del4) *MDR1* mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 28, 545–551.
- Geyer, J., Klintzsch, S., Meerkamp, K., Wöhlke, A., Distl, O., Moritz, A., Petzinger, E., 2007. Detection of the nt230(del4) *MDR1* mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 30, 482–485.
- Hugnet, C., Bentjen, S.A., Mealey, K.L., 2004. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in a sample of Collies from France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27, 227–229.
- Kawabata, A., Momoi, Y., Inoue-Murayama, M., Iwasaki, T., 2005. Canine *mdr1* gene mutation in Japan. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 67, 1103–1107.
- Klintzsch, S., Meerkamp, K., Döring, B., Geyer, J., 2009. Detection of the nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *The Veterinary Journal* 185, 272–277.
- Martinez, M., Modric, S., Sharkey, M., Troutman, L., Walker, L., Mealey, K., 2008. The pharmacogenomics of P-glycoprotein and its role in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 31, 285–300.
- Mealey, K.L., 2004. Therapeutic implications of the *MDR1* gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27, 257–264.
- Mealey, K.L., 2008. Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: heartworm prevention and pharmacogenetics. *Veterinary Parasitology* 158, 215–222.
- Mealey, K.L., Meurs, K.M., 2008. Breed distribution of the ABCB1-1Δ (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 233, 921–924.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M., Cantor, G.H., 2001. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11, 727–733.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Waiting, D.K., 2002. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with ivermectin sensitivity in a sample population of Collies from the northwestern United States. *American Journal of Veterinary Research* 63, 479–481.
- Mealey, K.L., Munyard, K.A., Bentjen, S.A., 2005. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary Parasitology* 10, 193–196.
- Neff, M.W., Robertson, K.R., Wong, A.K., Safra, N., Broman, K.W., Slatkin, M., Mealey, K.L., Pedersen, N.C., 2004. Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11725–11730.
- Parker, H.G., Kim, L.V., Sutter, N.B., Carlson, S., Lorentzen, T.D., Malek, T.B., Johnson, G.S., DeFrance, H.B., Ostrander, E.A., Kruglyak, L., 2004. Genetic structure of the purebred domestic dog. *Science* 304, 1160–1164.
- Pulliam, J.D., Seward, R.L., Henry, R.T., Steinberg, S.A., 1985. Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Veterinary Medicine* 80, 33–40.
- Seward, R.L., 1983. Reactions in dogs given ivermectin. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183, 493.
- Tappin, S.W., Goodfellow, M.R., Peters, I.R., Day, M.J., Hall, E.J., Bentjen, S.A., Mealey, K.L., 2008. Frequency of the mutant *MDR1* allele associated with multidrug sensitivity in dogs in the United Kingdom. In: BSAVA Congress, Scientific Proceedings: Veterinary Programme, 83/49.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C., 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7735–7738.

## 10. Anhang - Publikationen

### 7) GEYER J, GAVRILOVA O & PETZINGER E (2008)

Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a,b* P-glycoprotein and *bcrp* deficient knockout mice.

*Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Volume 32, Issue 1, pp 87-96

DOI: 10.1111/j.1365-2885.2008.01007.x

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2008.01007.x/abstract>

## Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a,b* P-glycoprotein- and *bcrp*- deficient knockout mice

J. GEYER  
O. GAVRILOVA &  
E. PETZINGER

*Institute of Pharmacology and Toxicology,  
Justus Liebig University of Giessen, Giessen,  
Germany*

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. Therap.* 32, 87–96.

P-glycoprotein, which is encoded by the multi-drug resistance gene (MDR1), highly restricts the entry of ivermectin into the brain by an ATP-driven efflux mechanism at the blood–brain barrier. In dogs with a homozygous MDR1 mutation though, ivermectin accumulates in the brain and provokes severe signs of neurotoxicosis and even death. In contrast to ivermectin, selamectin is safer in the treatment of MDR1 mutant dogs, suggesting that selamectin is transported differently by P-glycoprotein across the blood–brain barrier. To test this, we applied selamectin to *mdr1*-deficient *mdr1a,b*<sup>-/-</sup> knockout mice and wild-type mice. Brain penetration, organ distribution, and plasma kinetics were analyzed after intravenous, oral, and dermal spot-on application in comparison with ivermectin. We found that *in vivo* both macrocyclic lactone compounds are substrates of P-glycoprotein and that these strongly accumulate in the brain of *mdr1a,b*<sup>-/-</sup> knockout mice compared with wild-type mice at therapeutic doses of 12 mg/kg selamectin and 0.2 mg/kg ivermectin. However, selamectin accumulates to a much lesser degree (5–10 times) than ivermectin (36–60 times) in the absence of P-glycoprotein. This could explain the broader margin of safety of selamectin in MDR1 mutant dogs. In liver, kidney, and testes, ivermectin and selamectin accumulated less than four times as much in *mdr1a,b* mutant mice as in wild-type mice. Breast cancer resistance protein (Bcrp)-deficient *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice were also included in the application studies, but showed no differences in brain concentrations or organ distribution of either ivermectin or selamectin compared with wild-type mice. This indicates that Bcrp is not a relevant efflux carrier for these macrocyclic lactone compounds *in vivo* at the blood–brain barrier.

(Paper received 9 November 2007; accepted for publication 10 July 2008)

*Dr Joachim Geyer, Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University of Giessen, Frankfurter Str. 107, 35392 Giessen, Germany. E-mail: joachim.m.geyer@vetmed.uni-giessen.de*

### INTRODUCTION

P-glycoprotein is an ATP-driven efflux transporter and was initially identified through its ability to confer multidrug resistance (MDR) in mammalian tumor cells (Juliano & Ling, 1976). It is encoded by the multidrug resistance gene MDR1 (Dean *et al.*, 2001). P-glycoprotein is highly expressed at the blood–brain barrier where it restricts the entry of many drugs and xenobiotics into the central nervous system (Schinkel *et al.*, 1996; Doran *et al.*, 2005; Summerfield *et al.*, 2006). Moreover, P-glycoprotein protects the organism by limiting the uptake of such compounds from the gastrointestinal tract and by promoting their excretion in the liver, kidney, and intestine (Schinkel, 1997; Fromm, 2000). Many dogs of the Collie, Shetland

Sheepdog, Australian Shepherd, Old English Sheepdog, Border Collie, Longhaired Whippet, Silken Windhound, McNab, English Shepherd, and Swiss White Shepherd breeds are affected by a 4-bp deletion in the MDR1 gene that causes a complete loss of the transport function of P-glycoprotein (Mealey *et al.*, 2001; Roulet *et al.*, 2003; Neff *et al.*, 2004; Geyer *et al.*, 2005a, 2007). This is associated with increased drug penetration into the central nervous system and dramatically increased susceptibility to drugs such as ivermectin and other macrocyclic lactone parasiticides (Pulliam *et al.*, 1985; Tranquilli *et al.*, 1991; Geyer *et al.*, 2005b, 2007).

Macrocyclic lactones have potent anthelmintic and ectoparasitic properties, and they are widely used in veterinary medicine for the treatment of parasitic diseases (Shoop *et al.*, 1995).

Commercially available products for dogs include the avermectins, ivermectin (*HEARTGARD*) and selamectin (*STRONGHOLD*, *REVOLUTION*), and the milbemycins, moxidectin (*ADVOCATE*, *ADVANTAGE MULTI*) and milbemycin oxime (*MILBEMAX*, *PROGRAM PLUS*). In vertebrates, all macrocyclic lactones have the same mechanism-based toxicity, i.e. binding to GABA-gated chloride channels that are confined to the central nervous system (Sigel & Baur, 1987; Huang & Casida, 1997; Dawson *et al.*, 2000). In general, macrocyclic lactones have a high margin of safety in mammals (Pulliam & Preston, 1989), because P-glycoprotein efficiently restricts their penetration across the blood–brain barrier (Schinkel *et al.*, 1994). However, MDR1 P-glycoprotein lacking dogs have much less tolerance for treatment with macrocyclic lactone compounds. Extra-label use of ivermectin and doramectin at doses of 0.2 and 0.2–1.0 mg/kg, respectively, provokes severe signs of neurotoxicosis including apparent depression, ataxia, somnolence, mydriasis, salivation, and tremor (Paul *et al.*, 1987; Hopper *et al.*, 2002; Yas-Natan *et al.*, 2003; Geyer *et al.*, 2007). In contrast, selamectin, moxidectin, and milbemycin oxime at therapeutic doses can safely be administered to dogs with a homozygous MDR1 mutation without any signs of toxicosis (Tranquilli *et al.*, 1991; Bishop *et al.*, 2000; Novotny *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2000, 2004a). This suggested either of two hypotheses: (1) macrocyclic lactone compounds have different affinities to vertebrate CNS receptors or (2) they are transported differently by P-glycoprotein across the blood–brain barrier.

Recently, Brayden and coworkers showed in *in vitro* studies that ivermectin and selamectin are transported equally by P-glycoprotein expressing Caco-2 monolayers and also were secreted by P-glycoprotein transfected MDCK II cells in a verapamil-sensitive manner (Griffin *et al.*, 2005). Based on these findings, the accumulation of selamectin in the brain of MDR1 mutant dogs is expected to be comparable with that of ivermectin. To test this assumption, we applied selamectin to *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice and wild-type mice and then analyzed plasma kinetics, brain penetration, and organ distribution after intravenous, oral, and dermal application in comparison with ivermectin. Besides P-glycoprotein, other related drug efflux carriers such as the breast cancer resistance protein Bcrp, are also expressed at the blood–brain barrier (Cooray *et al.*, 2002; Hori *et al.*, 2004; Soontornmalai *et al.*, 2006) and there might be further candidates for ivermectin/selamectin efflux. Therefore, we also included Bcrp-deficient *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice in our application studies.

In the present study, we found significant differences between the accumulation of selamectin and ivermectin in the brain of *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, but we could not find any *in vivo* relevance for macrocyclic lactone transport by Bcrp.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Humans and other vertebrate species express only one MDR1 P-glycoprotein isoform; whereas, two *mdr1* genes exist in the

mouse (*mdr1a* and *mdr1b*). We therefore used *mdr1a,b*<sup>-/-</sup> double knockout mice (further referred to as *mdr1*<sup>-/-</sup> mice) together with wild-type FVB mice (w.t. mice) in our studies. Male w.t. mice, *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice were purchased from Taconic Farms Inc. (Germantown, NY, USA). All mice were housed in isolated, ventilated cages and provided with sterilized food and water *ad libitum*. The mice were between 12 and 19 weeks of age. All animal experiments were registered with and approved by the local administration.

### Drug preparation and application

Ivermectin (mixture of 80% 22,23-dihydroavermectin B<sub>1a</sub> and 20% 22,23-dihydroavermectin B<sub>1b</sub>) was purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and [24,25-<sup>3</sup>H]ivermectin (22,23-dihydroavermectin B<sub>1a</sub>, 20 Ci/mmol) was purchased from American Radiolabeled Chemicals Inc. (St Louis, MO, USA). [<sup>3</sup>H]Selamectin (33 Ci/mmol) was kindly provided by Pfizer Animal Health (Sandwich, UK) along with the unlabeled compound. Ivermectin was used at a standard therapeutic dosage of 0.2 mg/kg, and selamectin was applied at the maximum therapeutic dose for the body weight range of 12 mg/kg. For each animal, 2–2.5  $\mu$ Ci of the respective radiolabeled compound was used for intravenous (i.v.) and oral (p.o.) applications and 6  $\mu$ Ci was used for topical spot-on applications. Topical application was performed directly onto the skin in a single spot of <0.5 cm<sup>2</sup> at the base of the neck (spot-on application). A mixture of the radiolabeled and unlabeled compounds was prepared in 50  $\mu$ L PEG 400 and PBS (80/20, v/v) for i.v. administration, in 200  $\mu$ L sesame oil for p.o. application, or in 10  $\mu$ L isopropyl alcohol for spot-on application. For oral drug administration, the animals were first made to fast overnight, and food was again made available to the animals 3 h after the drug administration.

### Study design and sample analysis

The application study included six groups of three to four animals each for ivermectin and selamectin applications: Wild-type mice, i.v. application; knockout mice, i.v. application; wild-type mice, p.o. application; knockout mice, p.o. application; wild-type mice, spot-on application; and knockout mice, spot-on application. Heparinized blood samples (20  $\mu$ L) were collected by tail venepuncture at 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 240, 360, and 480 min after intravenous injection. After oral drug application, the blood samples were taken at 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 720, and 1440 min. After spot-on administration, blood was collected at 6, 12, 24, 48, and 72 h. At the last indicated time point (8 h, 24 h, 72 h after i.v., p.o., and spot-on application, respectively), the animals were killed by cervical dislocation and the organs were removed and homogenized in 100–6000  $\mu$ L 0.05 M NaOH, depending on the tissue weight. The levels of radioactivity in plasma and tissue homogenates were quantified by a Wallac 1409 liquid scintillation counter.

### Pharmacokinetic analysis

Pharmacokinetic parameters were analyzed for each animal by noncompartmental model analysis with intravascular (i.v. administration) or extravascular (p.o. and spot-on application) input using WinNonlin Professional Edition Version 2.1 (Pharsight, Mountain View, CA, USA). The maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ) and the time to reach the maximum concentration ( $T_{max}$ ) were determined from the plotted concentration–time curves. The area under the plasma concentration–time curve ( $AUC_{last}$ ) was determined from  $t = 0$  to the latest time point for each application experiment. The oral bioavailability ( $F$ ) was determined over a time period of 8 h by dividing  $AUC_{8h}$  values after p.o. and i.v. application.

### Real-time quantitative RT-PCR analysis

cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g brain RNA of wild-type FVB mice, *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice. Quantitative PCR expression analysis was performed using ABI PRISM 7300 technology with the TaqMan Gene Expression Assays Mm00607939\_s1 for mouse  $\beta$ -actin, Mm01344332\_m1 for mouse Mrp1, Mm00496899\_m1 for mouse Mrp2, Mm00551550\_m1 for mouse Mrp3, Mm01226387\_m1 for mouse Mrp4, Mm00496364\_m1 for mouse Bcrp, Mm00440761\_m1 for mouse Mdr1a, and Mm00440736\_m1 for mouse Mdr1b. The expression data of  $\beta$ -actin was used as the endogenous control. Triplicate determinations were performed for all targets in a 96-well optical plate using 5  $\mu$ L cDNA, 1.25  $\mu$ L TaqMan Gene Expression Assay, 12.5  $\mu$ L of TaqMan Universal PCR Master Mix, and 6.25  $\mu$ L of water in each 25  $\mu$ L reaction. The plates were heated for 5 min at 95 °C, and then 40 cycles for 15 sec at 95 °C and for 60 sec at 60 °C were applied. The relative carrier expression ( $\Delta C_T$ ) was calculated by subtracting the signal threshold cycle ( $C_T$ ) of the internal standard  $\beta$ -actin from the  $C_T$  value of the respective carrier. Then,  $\Delta\Delta C_T$  values were calculated by subtracting the  $\Delta C_T$  value of each carrier from the  $\Delta C_T$  value of Mrp2 of wild-type mice (the carrier with the lowest expression level in the brain) and transformed by the equation  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  according to Livak and Schmittgen (2001).

### Statistical analysis

All data are presented as the mean  $\pm$  SD of three or four animals. Student's two-tailed unpaired *t*-test and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test were used to identify significant differences between groups.

## RESULTS

### Plasmakinetics of selamectin and ivermectin

To assess the role of P-glycoprotein for the plasma kinetics and tissue levels of ivermectin and selamectin, we determined plasma concentration vs. time curves after i.v., p.o., and topical spot-on application of 0.2 mg/kg ivermectin and 12 mg/kg selamectin to wild-type mice, *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice (the latter only for p.o. application). Additionally, we analyzed organ concentrations at the endpoints for each application group, i.e. 8 h after i.v., 24 h after p.o., and 72 h after spot-on application. None of the animals of either genotype or application group showed signs of neurotoxicity after drug application during the study.

The blood concentrations vs. time profiles for selamectin and ivermectin are shown in Figs 1 & 2, respectively, and pharmacokinetic parameters are given in Table 1. Following intravenous drug application, plasma concentrations of ivermectin and selamectin tended to be higher in the *mdr1*<sup>-/-</sup> mice than in w.t. mice within 2 h after application, but these higher plasma levels only reached a significant value of  $P < 0.05$  for ivermectin at  $t = 0.5$  h and 1.5 h. After oral application, no differences among the w.t., *mdr1*<sup>-/-</sup>, and *bcrp*<sup>-/-</sup> mice were observed for selamectin, but ivermectin plasma concentrations tended to be higher in the *mdr1*<sup>-/-</sup> and *bcrp*<sup>-/-</sup> mice compared with w.t. mice. Though in the ivermectin application groups no significant difference was found for any of the pharmacokinetic parameters, the maximum plasma concentration ( $C_{max}$ ), the areas under the plasma concentration–time curve ( $AUC_{last}$ ), and the absolute oral availability (FA8h) were generally higher in *mdr1*<sup>-/-</sup> mice than in w.t. mice. In contrast, equal  $C_{max}$  and  $AUC_{last}$  values

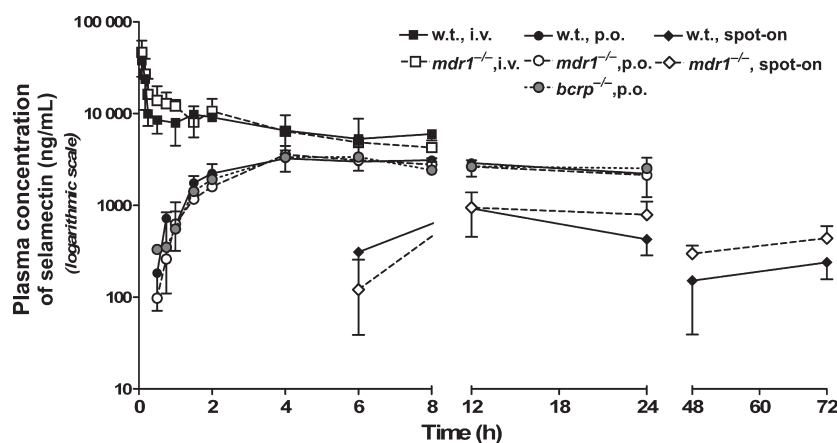


Fig. 1. Plasma concentrations vs. time profiles of selamectin in wild-type mice (w.t., continuous line, closed symbols), *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice (broken line, open symbols), and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice (dotted line, shaded symbols) after intravenous (squares), oral (circles), and spot-on (rhombs) application of 12 mg selamectin per kg body weight. The time line at the x-axis is broken for better illustration. Each bar represents the mean  $\pm$  SD of three to four animals per group.

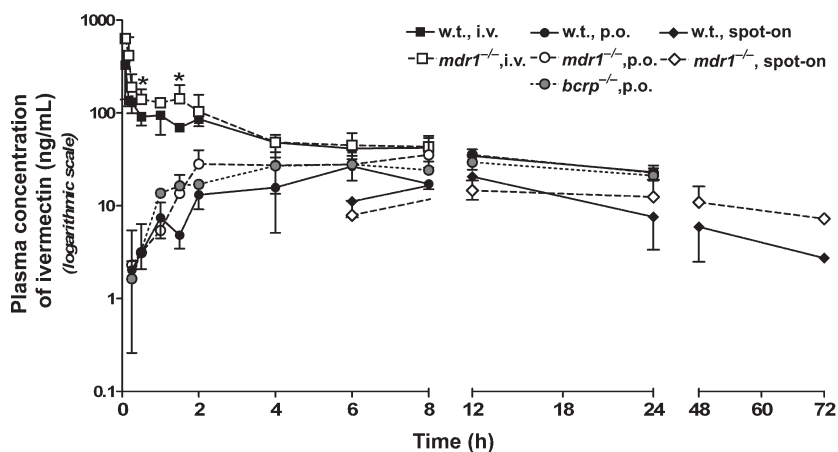


Fig. 2. Plasma concentrations vs. time profiles of ivermectin in wild-type mice (w.t., continuous line, closed symbols), *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice (broken line, open symbols), and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice (dotted line, shaded symbols) after intravenous (squares), oral (circles), and spot-on (rhombs) application of 0.2 mg ivermectin per kg body weight. The time line at the x-axis is broken for better illustration. Each bar represents the mean  $\pm$  SD of three animals per group. \*Significantly higher plasma concentrations in *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice compared to wild-type mice ( $P < 0.05$ ).

Table 1. Pharmacokinetic parameters of selamectin (12 mg/kg b.w.) and ivermectin (0.2 mg/kg b.w.) following intravenous (i.v.), oral (p.o.), and spot-on application to wild-type FVB mice, *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice

Genotype	Application (time)	Selamectin				Ivermectin			
		$C_{\max}/C_0$ (ng/mL)	$T_{\max}$ (h)	$AUC_{\text{last}}$ (h•ng/mL)	F48 h (%)	$C_{\max}/C_0$ (ng/mL)	$T_{\max}$ (h)	$AUC_{\text{last}}$ (h•ng/mL)	F48 h (%)
Wild-type mice	i.v. (8 h)	52558.2 $\pm$ 9315.8	–	58482.0 $\pm$ 12067.3	100	642.3 $\pm$ 390.8	–	524.3 $\pm$ 62.2	100
	p.o. (24 h)	3714.0 $\pm$ 401.5	5.5 $\pm$ 3.8	62285.7 $\pm$ 6645.3	42.8	35.0 $\pm$ 7.6	9.3 $\pm$ 3.8	573.1 $\pm$ 85.5	26.5
	spot-on (72 h)	969.6 $\pm$ 329.5	10.0 $\pm$ 2.8	24799.0 $\pm$ 6148.9	–	20.6 $\pm$ 7.4	12.0 $\pm$ 0.0	582.0 $\pm$ 245.1	–
<i>mdr1</i> <sup>-/-</sup> knockout mice	i.v. (8 h)	69038.7 $\pm$ 21675.3	–	56816.2 $\pm$ 23865.9	100	944.1 $\pm$ 298.6	–	693.3 $\pm$ 163.6	100
	p.o. (24 h)	3839.0 $\pm$ 864.8	5.0 $\pm$ 1.0	58667.5 $\pm$ 6440.8	42.5	42.0 $\pm$ 8.3	10.7 $\pm$ 1.9	670.6 $\pm$ 52.1	32.9
	spot-on (72 h)	1052.5 $\pm$ 232.3	16.0 $\pm$ 5.7	35781.0 $\pm$ 9107.9	–	16.1 $\pm$ 4.3	16.0 $\pm$ 5.7	726.3 $\pm$ 218.8	–
<i>bcrp</i> <sup>-/-</sup> knockout mice	p.o. (24 h)	3989.0 $\pm$ 415.8	5.0 $\pm$ 1.0	60571.9 $\pm$ 8975.6	–	32.4 $\pm$ 2.5	10.0 $\pm$ 3.5	576.2 $\pm$ 39.2	–

Values are given as mean  $\pm$  SD.  $T_{\max}$ , time to reach the peak plasma concentration;  $C_{\max}$ , maximum observed plasma concentrations after p.o. and spot-on application;  $C_0$ , concentration after i.v. application at time zero;  $AUC_{\text{last}}$ , area under the plasma concentration–time curve from  $t = 0$  (application) to the last sampling time, i.e.  $t = 8$  h after i.v. application, 24 h after p.o. application, and 72 h after spot-on application; F, systemic availability over a time period of 8 h ( $\Delta 8$  h).

were measured for the *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice and the w.t. mice. No differences in the  $C_{\max}$ ,  $AUC_{\text{last}}$ , and F48h values were found among *mdr1*<sup>-/-</sup>, *bcrp*<sup>-/-</sup>, and w.t. mice in the oral selamectin application groups (Table 1).

Following topical spot-on application, the plasma profiles of ivermectin and selamectin were similar between *mdr1*<sup>-/-</sup> and w.t. mice, but the  $AUC_{\text{last}}$  values were slightly higher in the *mdr1*<sup>-/-</sup> mice for both compounds. The maximum plasma concentrations after spot-on application reached about 1/4 those after oral application for selamectin, but about 1/2 for ivermectin. Though this ratio difference could indicate higher dermal availability of ivermectin, one must consider that intestinal absorption was different between the compounds that also affects plasma levels. As shown in Table 1, selamectin showed a markedly higher oral availability of 42% than ivermectin (26% and 33% in w.t. and *mdr1*<sup>-/-</sup> mice, respectively). Thus, our *in vivo* data give support to similar dermal penetration of ivermectin and selamectin. The application studies were terminated at 8 h, 24 h, and 72 h in the respective application groups, because the study design gives

priority to covering differences in plasma concentrations and tissue distributions between the three mouse genotypes at early time points rather than determinations of plasma elimination half-lives and plasma clearance data for ivermectin and selamectin.

#### Tissue concentrations of selamectin and ivermectin

Brain tissue concentrations of ivermectin increased 60 $\times$  in the *mdr1*<sup>-/-</sup> mice after p.o. application compared with w.t. mice (127.2 ng/g vs. 2.2 ng/g) (Fig. 4). Significantly higher tissue concentrations in liver, kidney, testes, heart, and fat were also observed in the *mdr1*<sup>-/-</sup> mice (Table 2). In contrast, the plasma levels of ivermectin 24 h after oral application did not differ among the *mdr1*<sup>-/-</sup>, *bcrp*<sup>-/-</sup>, and w.t. mice. Similar results were obtained after intravenous and topical spot-on application of ivermectin at an equal dose, where 36 times higher (144.1 ng/g vs. 4.02 ng/g) and 48 times higher (27.17 ng/g vs. 0.56 ng/g) ivermectin brain concentrations were measured in the *mdr1*<sup>-/-</sup> mice, respectively (Table 3, Fig. 4).

**Table 2.** Tissue concentrations 24 h after oral application of selamectin (12 mg/kg b.w.) and ivermectin (0.2 mg/kg b.w.) to wild-type FVB mice, *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice

Tissue	Oral application								
	Selamectin			Ivermectin					
	w.t. ( $\mu\text{g/g}$ or $\mu\text{g/mL}$ )	<i>mdr1</i> <sup>-/-</sup> ( $\mu\text{g/g}$ or $\mu\text{g/mL}$ )	Ratio ( <i>mdr1</i> <sup>-/-</sup> /w.t.)	<i>bcrp</i> <sup>-/-</sup> ( $\mu\text{g/g}$ or $\mu\text{g/mL}$ )	Ratio ( <i>bcrp</i> <sup>-/-</sup> /w.t.)	<i>mdr1</i> <sup>-/-</sup> ( $\mu\text{g/g}$ or $\mu\text{g/mL}$ )	Ratio ( <i>mdr1</i> <sup>-/-</sup> /w.t.)	<i>bcrp</i> <sup>-/-</sup> ( $\mu\text{g/g}$ or $\mu\text{g/mL}$ )	Ratio ( <i>bcrp</i> <sup>-/-</sup> /w.t.)
Brain	0.70 ± 0.19	3.43 ± 0.57	4.9*	0.75 ± 0.05	1.1	0.13 ± 0.022	59.2*	0.002 ± 0.0001	1.0
Plasma	2.21 ± 0.82	2.14 ± 0.39	1.0	2.53 ± 0.66	1.1	0.02 ± 0.004	1.0	0.02 ± 0.004	1.0
Liver	15.26 ± 6.15	8.31 ± 1.48	0.5	14.91 ± 4.05	1.0	0.10 ± 0.03	3.7*	0.09 ± 0.07	0.9
Small intestine	21.58 ± 8.57	17.95 ± 6.01	0.8	13.62 ± 3.73	0.6	0.15 ± 0.07	2.1	0.10 ± 0.08	0.7
Colon	66.85 ± 26.71	43.91 ± 14.57	0.7	34.70 ± 11.00	0.5	0.35 ± 0.15	2.8	0.45 ± 0.34	1.3
Kidney	15.70 ± 4.08	7.36 ± 0.97	0.5	23.84 ± 4.47	1.5	0.08 ± 0.03	2.3*	0.04 ± 0.02	0.5
Stomach	20.32 ± 6.98	10.38 ± 3.34	0.5	16.17 ± 2.98	0.8	0.07 ± 0.03	2.4	0.09 ± 0.06	1.3
Spleen	7.38 ± 3.19	3.44 ± 1.00	0.5	4.92 ± 0.79	0.7	0.03 ± 0.02	1.8	0.02 ± 0.01	0.7
Testes	5.14 ± 3.86	3.38 ± 0.69	0.7	2.95 ± 0.44	0.6	0.03 ± 0.01	3.2*	0.02 ± 0.01	0.5
Heart	8.59 ± 4.21	4.56 ± 1.15	0.5	5.55 ± 1.07	0.6	0.04 ± 0.01	2.3*	0.02 ± 0.01	0.5
Lung	7.50 ± 4.35	2.90 ± 0.83	0.4	3.97 ± 0.46	0.5	0.02 ± 0.01	2.7	0.01 ± 0.004	0.7
Fat	21.61 ± 7.64	10.25 ± 7.61	0.5	23.78 ± 4.72	1.1	0.15 ± 0.05	2.5*	0.09 ± 0.05	0.6

Values are given as mean ± SD. \*Significantly higher concentrations in *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice compared to wild-type mice ( $P < 0.05$ ).

We generally found the same results in the selamectin application studies, but the extent of organ accumulation in the *mdr1*<sup>-/-</sup> mice was much less dramatic for selamectin than for ivermectin. Selamectin brain concentrations were seven times higher (2532 ng/g vs. 387 ng/g), five times higher (3428 ng/g vs. 702 ng/g), and 10 times higher (1117 ng/g vs. 112 ng/g) in the *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice after i.v., p.o., and spot-on application, respectively (Tables 2 & 3; Fig. 3). Furthermore, selamectin concentrations in the liver and testes were three times higher in the *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice after topical spot-on application. This increase was not seen after intravenous or oral application of the drug. As expected from the plasma concentrations, ivermectin and selamectin total brain concentrations were clearly lower after topical spot-on application compared with oral application. In the *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, brain concentrations after topical application were five times lower for ivermectin (127.2 ng/g vs. 27.17 ng/g) and three times lower for selamectin (3428 ng/g vs. 1117 ng/g), compared with oral application (Table 2 & 3).

In contrast to the *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, no significant alterations in organ concentrations or tissue distributions of ivermectin or selamectin were observed in the *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice, indicating that Bcrp had no significant effect on the tissue distribution or pharmacokinetics of these compounds. In particular, the brain concentrations in the *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice were all at the level of wild-type mice for both compounds (Figs 3 & 4).

#### Relative carrier expression in the brain

Besides P-glycoprotein, other drug efflux transporters are expressed at the blood-brain barrier and are also candidates for ivermectin and selamectin efflux from the brain. To investigate whether up or down regulation of one of these carriers could have falsified the absolute brain concentrations in the application studies, we investigated the expression levels of the efflux transporters Mrp1, Mrp2, Mrp3, Mrp4, Bcrp, and P-glycoprotein in the brains of *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice and compared them with the expression levels of the wild-type mice. The results presented in Fig. 5 show that Mdr1a P-glycoprotein is the most dominantly expressed efflux transporter in the brain in mice, followed by Bcrp and Mrp1, whereas the carriers Mrp2, Mrp3, and Mrp4 showed low mRNA expression levels in the brain of FVB wild-type mice. In general, we found comparable mRNA expression levels for all efflux transporters analyzed in the three mouse genotypes, except for Bcrp which was up-regulated about twofold in the brain of *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice.

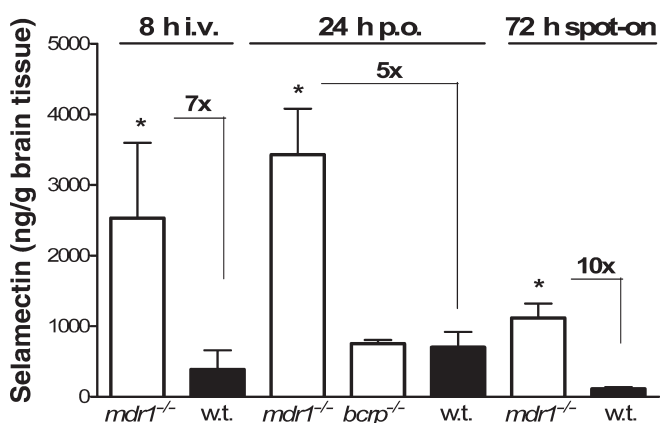
#### DISCUSSION

The important role of P-glycoprotein in protecting the brain from the penetration of drugs such as ivermectin across the blood-brain barrier was first observed by Schinkel *et al.* (1994). They showed that disruption of the *mdr1a* gene led to brain concentrations of ivermectin that were 87 times higher than

**Table 3.** Tissue concentrations 72 h after spot-on application of selamectin (12 mg/kg b.w.) and ivermectin (0.2 mg/kg b.w.) to wild-type FVB mice and *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice

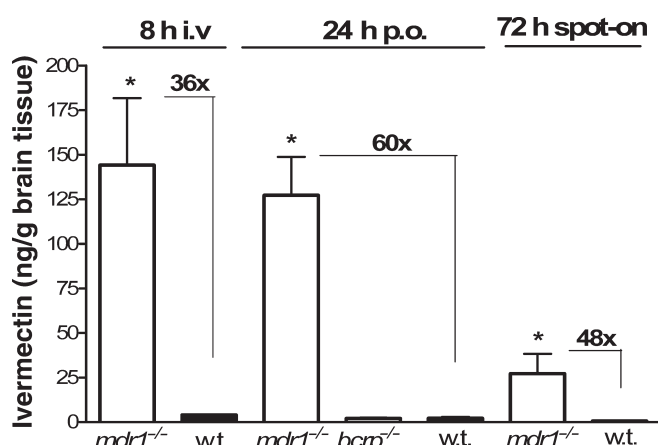
Tissue	Spot-on application					
	Selamectin			Ivermectin		
	w.t. (ng/g or ng/mL)	<i>mdr1</i> <sup>-/-</sup> (ng/g or ng/mL)	Ratio ( <i>mdr1</i> <sup>-/-</sup> /w.t.)	w.t. (ng/g or ng/mL)	<i>mdr1</i> <sup>-/-</sup> (ng/g or ng/mL)	Ratio ( <i>mdr1</i> <sup>-/-</sup> /w.t.)
Brain	112.16 ± 24.29	1117.27 ± 202.40	10.0*	0.56 ± 0.31	27.17 ± 11.08	48.5*
Plasma	483.04 ± 99.28	437.45 ± 156.22	0.9	3.98 ± 2.87	7.23 ± 1.04	1.8
Liver	772.35 ± 329.77	2246.87 ± 1262.71	2.9	30.18 ± 17.51	37.89 ± 6.77	1.3
Small intestine	948.38 ± 281.87	2342.74 ± 355.60	2.5*	30.58 ± 20.06	70.51 ± 22.59	2.3
Colon	1732.00 ± 436.66	3323.68 ± 832.09	1.9	70.87 ± 47.67	88.79 ± 40.97	1.3
Kidney	1031.57 ± 492.80	1948.93 ± 930.07	1.9	24.47 ± 14.35	32.86 ± 18.07	1.3
Stomach	933.08 ± 48.33	2337.10 ± 543.16	2.5	19.91 ± 4.33	26.16 ± 12.61	1.3
Spleen	500.67 ± 170.47	896.15 ± 254.86	1.8	10.79 ± 3.34	14.01 ± 8.43	1.3
Testes	447.22 ± 64.16	1499.34 ± 398.27	3.4*	6.70 ± 2.62	23.36 ± 9.15	3.5*
Heart	562.94 ± 130.98	1093.64 ± 471.14	1.9	20.79 ± 6.17	34.02 ± 14.15	1.6
Lung	615.97 ± 232.54	812.74 ± 180.68	1.3	8.54 ± 0.98	14.70 ± 5.56	1.7
Fat	3707.33 ± 1730.92	3322.95 ± 1028.80	0.9	59.04 ± 53.35	60.33 ± 29.54	1.0

Values are given as mean ± SD. \*Significantly higher concentrations in *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice compared to wild-type mice ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Selamectin concentrations in brain tissue of wild-type mice, *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice after intravenous (i.v.), oral (p.o.), and spot-on application of 12 mg selamectin per kg body weight. \*Significantly higher brain concentrations in *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice compared to wild-type mice ( $P < 0.05$ ).

in *mdr1a*<sup>+/+</sup> wild-type mice, at therapeutic dosage of 0.2 mg/kg. The increased brain penetration of ivermectin was associated with a 50–150 times higher sensitivity to central neurotoxic effects of the knockout mice, including immobilization, inability to right themselves, recumbency, tremors, decreased breathing frequency, and onset of a comatose state that generally resulted in death. The LD<sub>50</sub> values were 0.7–0.8 mg/kg for the *mdr1a*<sup>-/-</sup> knockout mice but 50–60 mg/kg for the *mdr1a*<sup>+/+</sup> mice (Schinkel *et al.*, 1994). The data of the present study, where we used *mdr1a,b*<sup>-/-</sup> double-knockout mice lacking both *mdr1* genes of mice, agrees well with that of this previous report. We found concentrations of ivermectin in the brain of the knockout mice that were 36–60 times higher, depending on the route of application. Except for the brain though, the organ accumulation (e.g. in testes, liver, and kidney) of ivermectin in the



**Fig. 4.** Ivermectin concentrations in brain tissue of wild-type mice, *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice after intravenous (i.v.), oral (p.o.), and spot-on application of 0.2 mg ivermectin per kg body weight. \*Significantly higher brain concentrations in *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice compared to wild-type mice ( $P < 0.001$ ).

*mdr1a,b*<sup>-/-</sup> knockout mice was much less pronounced. Only minor differences between *mdr1a,b*<sup>-/-</sup> knockout mice and wild-type mice were seen for the pharmacokinetic parameters  $C_{max}$ ,  $AUC_{last}$ , and  $F_{\Delta 8h}$ , indicating that *in vivo* the P-glycoprotein defect is most relevant for drug transport at the blood–brain barrier.

Similar to *mdr1*-deficient mice, MDR1 mutation in dogs results in dramatically increased brain penetration of ivermectin (Pulliam *et al.*, 1985). Dogs with a homozygous MDR1 mutation (previously described as ‘ivermectin-sensitive Collies’) show severe signs of neurotoxicosis when exposed to therapeutic doses of 0.2 mg/kg ivermectin. In contrast, ivermectin can be administered to Beagles and ivermectin nonsensitive Collies at a single oral dose of 2.0 mg/kg or at a daily oral dose of

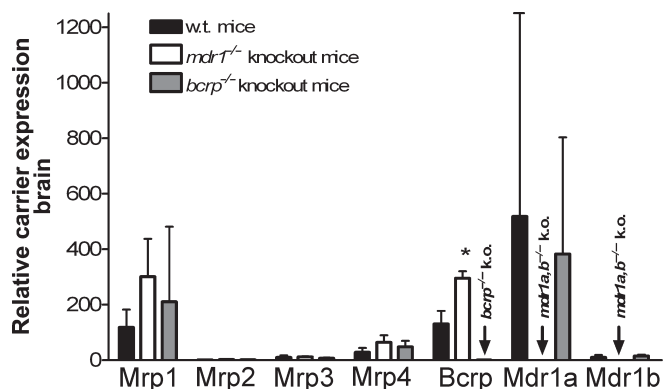


Fig. 5. Quantitative real-time PCR analysis of Mrp1, Mrp2, Mrp3, Mrp4, Bcrp, Mdr1a, and Mdr1b expression in the brain of wild-type mice, *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice. Relative carrier expression shown on the y-axis was calculated by  $2^{-\Delta\Delta CT}$  transformation. The data was calculated from triplicate carrier mRNA determinations from brain tissues of three animals per group and represents means  $\pm$  SD. Carriers that were target deleted in the respective knockout mouse are indicated by arrows and were not analyzed for mRNA expression. \*Significantly higher expression in *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice compared with wild-type mice ( $P < 0.05$ ).

0.5 mg/kg over 14 days without any evidence of toxicosis (Pulliam & Preston, 1989), thus indicating the high safety margin for toxicity in mammals expressing the P-glycoprotein efflux pump at the blood–brain barrier.

In a recent study by Paul *et al.* (2004b), ivermectin-sensitive Collies were treated with a dermal application of up to 130 mg/kg imidacloprid and 1 mg/kg ivermectin without adverse drug reactions during the study. This indicates that the plasma concentrations of ivermectin determined after dermal application were not as high to induce clinical signs of neurotoxicosis. So the dermal application is a more favorable route of ivermectin application in MDR1 mutant dogs (Paul *et al.*, 2004b). In our application studies, we indeed found that ivermectin peak plasma concentrations were significantly lower in *mdr1*<sup>-/-</sup> mice after spot-on application compared with oral application (16.1 ng/mL vs. 42.0 ng/mL maximum plasma concentrations) and thus resulted in lower total brain concentrations (27.17 ng/g vs. 127.2 ng/g).

While ivermectin at doses of 0.2 mg/kg is not approved for usage in dogs because of idiosyncratic toxicity in MDR1 mutant

dogs, selamectin is safe in the treatment of MDR1 mutant dogs. In recent *in vitro* studies, selamectin was found to be equipotent to ivermectin as an MDR1 substrate/inhibitor (Griffin *et al.*, 2005; Brayden & Griffin, 2008). If selamectin, however, is indeed transported by P-glycoprotein similarly to ivermectin, then it should have a comparable toxic potential in dogs with a homozygous MDR1 mutation. This is not the case though. It is known from application studies on ivermectin-sensitive Collies that selamectin is tolerated at much higher concentrations than ivermectin (Bishop *et al.*, 2000; Novotny *et al.*, 2000). For example, the oral dose of ivermectin at which no clinical signs of toxicosis were observed was as low as 0.06 mg/kg for ivermectin (Fassler *et al.*, 1991; Bishop *et al.*, 2000), representing one-third the therapeutic dose; whereas for selamectin, a single topical dose of 40 mg/kg (six times the recommended dose) or a single oral dose of 15 mg/kg caused no adverse signs in ivermectin-sensitive Collies (Bishop *et al.*, 2000; Novotny *et al.*, 2000).

One hypothesis to explain this different drug tolerance is that ivermectin and selamectin at therapeutic dosage (0.2 mg/kg ivermectin and 6–12 mg/kg selamectin) are differently transported by P-glycoprotein at the blood–brain barrier *in vivo*. In our application study, we found that selamectin indeed accumulates in the brain of *mdr1*<sup>-/-</sup> mice by any route of application, but the brain concentration ratios (*mdr1*<sup>-/-</sup> vs. w.t.) of five-fold to 10-fold were much less than for ivermectin in equivalent experiments (36- to 60-fold). Furthermore, we found higher brain:plasma concentration ratios in the wild-type mice (0.32 for selamectin vs. 0.09 for ivermectin), which is consistent with a higher efflux rate at the blood–brain barrier for ivermectin than for selamectin at therapeutic dosage. These findings support a recent study by Lespine *et al.* (2007). They analyzed the modulatory effect of different macrocyclic lactones on the verapamil-stimulated P-glycoprotein ATPase activity in membrane vesicles prepared from DC-3F/ADX cells over-expressing P-glycoprotein and found a much higher affinity to P-glycoprotein for ivermectin than for selamectin ( $K_i$  value: 0.05  $\mu$ M vs. 1.0  $\mu$ M). The authors concluded that the dimension of the sugar moiety on the macrocycle (two sugar substitutions in ivermectin, one sugar substitution in selamectin, see Fig. 6) may account for the different affinities to P-glycoprotein and thus could influence the extent of brain penetration of the respective compounds. Because of the different dosage range for both compounds it cannot be excluded though, that P-glycoprotein efflux at the

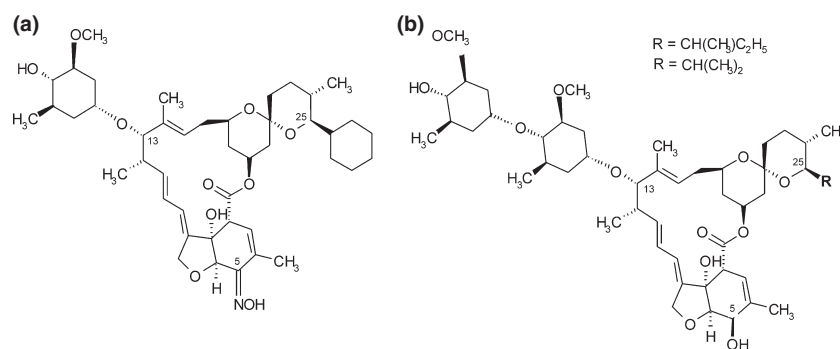


Fig. 6. Structures of the macrocyclic lactone compounds selamectin (a) and ivermectin (b).

blood–brain barrier is saturated after application of 12 mg/kg selamectin. Whether this could alternatively explain the lower efflux rate of selamectin at the blood–brain barrier in the wild-type mice needs to be established.

Apart from drug transport, it is unlikely that the lower brain penetration of selamectin alone improves its safety profile in MDR1 mutant dogs. In our application studies, absolute brain concentrations after oral drug application were at 700 ng/g for selamectin and at 2 ng/g for ivermectin. Thus, regarding their different neurotoxic potentials, we conclude that selamectin and ivermectin should exhibit different affinities for binding on vertebrate CNS receptors, but this was out of the scope of the present study. To answer this question, it will be necessary to conduct comparative receptor binding assays in brain preparations that specifically address the role of the substitutions at positions C5 (NOH in selamectin and OH in ivermectin) and C25 (cyclohexyl in selamectin and *sec*-butyl/isopropyl in ivermectin B1). These represent the only differences in the chemical structure of the two compounds at the macrocycle (Fig. 6), and they have previously been reported to significantly affect the antiparasitic activity of both compounds (Shoop *et al.*, 1995; Banks *et al.*, 2000; Michael *et al.*, 2001).

In our application studies with *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, we found much higher brain:plasma concentration ratios for ivermectin than for selamectin (6.5 vs. 1.6 after p.o. application). This is in opposite order with the brain:plasma ratios in the wild-type mice and is consistent with a much higher brain penetration of ivermectin than selamectin in the absence of P-glycoprotein. This led to the hypothesis that other drug efflux transporters at the blood–brain barrier besides P-glycoprotein, such as Bcrp and Mrp1 (Ito *et al.*, 2005; Leslie *et al.*, 2005), could take-over the efflux function for selamectin but not for ivermectin. In the present study, we only focused on the role of Bcrp as the most likely candidate for selamectin transport using *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice. Mrp1 was not regarded as a candidate efflux carrier for ivermectin or selamectin, as in mice it seems to be expressed at the abluminal membrane (Soontornmalai *et al.*, 2006) which contrasts to humans, where MRP1 is expressed at the luminal membrane of the brain capillary endothelial cells (Nies *et al.*, 2004). Mrp2 and Mrp4 that are also expressed at the blood–brain barrier showed low mRNA expression in the brain of the FVB wild-type mice (Fig. 5) and, therefore, were also not included in the present study. In contrast to the application studies on *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, we did not find any effect of Bcrp-knockout for either selamectin or for ivermectin brain concentrations, indicating that Bcrp does not contribute *in vivo* to the blood–brain barrier efflux of either compound in mice.

To investigate whether up- or down-regulation of any drug efflux carrier at the blood–brain barrier could have falsified brain penetration of ivermectin or selamectin in our application studies, we analyzed and compared the mRNA expression levels of Mrp1, Mrp2, Mrp3, Mrp4, Mdr1a, Mdr1b, and Bcrp in the brains of the *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice, *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice, and FVB wild-type mice. In these experiments, it was of particular interest, whether P-glycoprotein is up-regulated in

the brain of the *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice. This would counteract an increased brain penetration of ivermectin and selamectin in the case that these compounds would be transported by Bcrp. In agreement with previous studies (Lee *et al.*, 2005; Soontornmalai *et al.*, 2006) though, we did not find any significant changes in drug carrier expression in the brains of *mdr1*<sup>-/-</sup> and *bcrp*<sup>-/-</sup> knockout mice. The only exception was Bcrp, which was slightly up-regulated (about 2x) in the brain of *mdr1*<sup>-/-</sup> mice, as previously reported (Cisternino *et al.*, 2004). As ivermectin and selamectin are not transported by Bcrp *in vivo* though, this change in Bcrp expression is unlikely to affect brain penetration of either compound in the *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice.

In conclusion, this *in vivo* study demonstrates that both macrocyclic lactones are P-glycoprotein substrates. They accumulate in the brain of *mdr1*<sup>-/-</sup> knockout mice quite differently: selamectin accumulates in the absence of P-glycoprotein to a much lesser degree than ivermectin. On the other hand, under therapeutic dosage regimens, selamectin produced much higher absolute brain concentrations than ivermectin without provoking neurotoxicity. This indicates different pharmacodynamic potencies at ivermectin and selamectin sensitive receptors in the central nervous system.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors kindly thank Pfizer Animal Health for providing [<sup>3</sup>H]selamectin, Michael Hanna, PhD (Medical Manuscript Service, New York) for proof-reading the manuscript, and Kerstin Meerkamp for assistance with the real-time PCR analyses.

#### REFERENCES

- Banks, B.J., Bishop, B.F., Evans, N.A., Gibson, S.P., Goudie, A.C., Gratton, K.A., Pacey, M.S., Perry, D.A. & Witty, M.J. (2000) Avermectins and flea control: structure–activity relationships and the selection of selamectin for development as an endectocide for companion animals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **8**, 2017–2025.
- Bishop, B.F., Bruce, C.I., Evans, N.A., Goudie, A.C., Gratton, K.A., Gibson, S.P., Pacey, M.S., Perry, D.A., Walshe, N.D. & Witty, M.J. (2000) Selamectin: a novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Veterinary Parasitology*, **91**, 163–176.
- Brayden, D.J. & Griffin, J. (2008) Ivermectin transepithelial transport in MDR1- and MRP-transfected canine kidney monolayers. *Veterinary Research Communications*, **32**, 93–106.
- Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F. & Scherrmann, J.M. (2004) Expression, up-regulation, and transport activity of the multi-drug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood–brain barrier. *Cancer Research*, **64**, 3296–3301.
- Cooray, H.C., Blackmore, C.G., Maskell, L. & Barrand, M.A. (2002) Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport*, **13**, 2059–2063.
- Dawson, G.R., Wafford, K.A., Smith, A., Marshall, G.R., Bayley, P.J., Schaeffer, J.M., Meinke, P.T. & Mckernan, R.M. (2000) Anticonvulsant and adverse effects of avermectin analogs in mice are mediated through the  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **295**, 1051–1060.

- Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, **11**, 1156–1166.
- Doran, A., Obach, R.S., Smith, B.J., Hosea, N.A., Becker, S., Callegari, E., Chen, C., Chen, X., Choo, E., Cianfrogna, J., Cox, L.M., Gibbs, J.P., Gibbs, M.A., Hatch, H., Hop, C.E., Kasman, I.N., Laperle, J., Liu, J., Liu, X., Logman, M., Maclin, D., Nedza, F.M., Nelson, F., Olson, E., Rahe-matpura, S., Raunig, D., Rogers, S., Schmidt, K., Spracklin, D.K., Szewc, M., Troutman, M., Tseng, E., Tu, M., Van Deusen, J.W., Venkatakrishnan, K., Walens, G., Wang, E.Q., Wong, D., Yasgar, A.S. & Zhang, C. (2005) 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 Metabolism and Disposition*, **33**, 165–174.
- Fassler, P.E., Tranquilli, W.J., Paul, A.J., Soll, M.D., DiPietro, J.A. & Todd, K.S. (1991) Evaluation of the safety of ivermectin administered in a beef-based formulation to ivermectin-sensitive Collies. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **199**, 457–460.
- Fromm, M.F. (2000) P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **38**, 69–74.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Leidolf, R., Moritz, A. & Petzinger, E. (2005a) Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **28**, 545–551.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Moritz, A. & Petzinger, E. (2005b) Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **28**, 95–99.
- Geyer, J., Klintzsch, S., Meerkamp, K., Wöhlke, A., Distl, O., Moritz, A. & Petzinger, E. (2007) Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **30**, 482–485.
- Griffin, J., Fletcher, N., Clemence, R., Blanchflower, S. & Brayden, D.J. (2005) Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **28**, 257–265.
- Hopper, K., Aldrich, J. & Haskins, S.C. (2002) Ivermectin toxicity in 17 collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **16**, 89–94.
- Hori, S., Ohtsuki, S., Tachikawa, M., Kimura, N., Kondo, T., Watanabe, M., Nakashima, E. & Terasaki, T. (2004) Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s). *Journal of Neurochemistry*, **90**, 526–536.
- Huang, J. & Casida, J.E. (1997) Ivermectin B<sub>1a</sub> binds to high- and low-affinity sites with dual effects on the  $\gamma$ -aminobutyric acid-gated chloride channel of cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **281**, 261–266.
- Ito, K., Suzuki, H., Horie, T. & Sugiyama, Y. (2005) Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharmaceutical Research*, **22**, 1559–1577.
- Juliano, R.L. & Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **455**, 152–162.
- Lee, Y.J., Kusuhara, H., Jonker, J.W., Schinkel, A.H. & Sugiyama, Y. (2005) Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood–brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **312**, 44–52.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G. & Cole, S.P. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **204**, 216–237.
- Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orlowski, S. & Alvinerie, M. (2007) Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure–affinity relationship. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **30**, 84–94.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, **25**, 402–408.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M. & Cantor, G.H. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*, **11**, 727–733.
- Michael, B., Meinke, P.T. & Shoop, W. (2001) Comparison of ivermectin, doramectin, selamectin, and eleven intermediates in a nematode larval development assay. *The Journal of Parasitology*, **87**, 692–696.
- Neff, M.W., Robertson, K.R., Wong, A.K., Safra, N., Broman, K.W., Slatkin, M., Mealey, K.L. & Pedersen, N.C. (2004) Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 11725–11730.
- Nies, A.T., Jedlitschky, G., König, J., Herold-Mende, C., Steiner, H.H., Schmitt, H.P. & Keppler, D. (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience*, **129**, 349–360.
- 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. (2000) Safety of selamectin in dogs. *Veterinary Parasitology*, **91**, 377–391.
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J., Seward, R.L., Todd, K.S. Jr & DiPietro, J.A. (1987) Clinical observations in collies given ivermectin orally. *American Journal of Veterinary Research*, **48**, 684–685.
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J. & Hutchens, D.E. (2000) Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research*, **61**, 482–483.
- Paul, A.J., Hutchens, D.E., Firkins, L.D. & Borgstrom, M. (2004a) Dermal safety study with imidacloprid/moxidectin topical solution in the ivermectin-sensitive collie. *Veterinary Parasitology*, **121**, 285–291.
- Paul, A.J., Hutchens, D.E., Firkins, L.D. & Keehan, C.M. (2004b) Effects of dermal application of 10.0% imidacloprid-0.08% ivermectin in ivermectin-sensitive Collies. *American Journal of Veterinary Research*, **65**, 277–278.
- Pulliam, J.D. & Preston, J.M. (1989) Safety of ivermectin in target animals. In *Ivermectin and Abamectin*. Ed Campbell, W.C., pp. 149–161. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Pulliam, J.D., Seward, R.L., Henry, R.T. & Steinberg, S.A. (1985) Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Veterinary Medicine*, **80**, 33–40.
- Roulet, A., Puel, O., Gesta, S., Lepage, J.F., Drag, M., Soll, M., Alvinerie, M. & Pineau, T. (2003) MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology*, **460**, 85–91.
- Schinkel, A.H. (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Seminars in Cancer Biology*, **8**, 161–170.
- 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., Berns, A.J. & Borst, P. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood–brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, **77**, 491–502.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A. & van Deemter, L. (1996) P-glycoprotein in the blood–brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *The Journal of Clinical Investigation*, **97**, 2517–2524.
- Shoop, W.L., Mrozik, H. & Fisher, M.H. (1995) Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, **59**, 139–156.

- Sigel, E. & Baur, R. (1987) Effect of avermectin B<sub>1a</sub> on chicken neuronal  $\gamma$ -aminobutyrate receptor channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Pharmacology*, **32**, 749–752.
- Soontornmalai, A., Vlaming, M.L. & Fritschy, J.M. (2006) Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine choroid plexus and blood–brain barrier. *Neuroscience*, **138**, 159–169.
- Summerfield, S.G., Stevens, A.J., Cutler, L., del Carmen, O.M., Hammond, B., Tang, S.P., Hersey, A., Spalding, D.J. & Jeffrey, P. (2006) Improving the *in vitro* prediction of *in vivo* central nervous system penetration: integrating permeability, P-glycoprotein efflux, and free fractions in blood and brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **316**, 1282–1290.
- Tranquilli, W.J., Paul, A.J. & Todd, K.S. (1991) Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *American Journal of Veterinary Research*, **52**, 1170–1172.
- Yas-Natan, E., Shamir, M., Kleinbart, S. & Aroch, I. (2003) Doramectin toxicity in a collie. *The Veterinary Record*, **153**, 718–720.

## 10. Anhang - Publikationen

### 8) JANKO C & GEYER J (2012)

Moxidectin has a lower neurotoxic potential but comparable brain penetration in P-glycoprotein deficient CF-1 mice compared to ivermectin.

*Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Volume 36, Issue 3, pp 275-284*

DOI: 10.1111/j.1365-2885.2012.01424.x

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2885.2012.01424.x/abstract>

## Moxidectin has a lower neurotoxic potential but comparable brain penetration in P-glycoprotein-deficient CF-1 mice compared to ivermectin

C. JANKO &  
J. GEYER

*Institute of Pharmacology and Toxicology,  
Justus Liebig University of Giessen, Giessen,  
Germany*

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. Therap.* 36, 275–284.

The anti-parasitic drugs ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX) normally show limited brain penetration in vertebrates because of effective drug efflux at the blood–brain barrier by P-glycoprotein, encoded by the multi-drug resistance (*MDR1*) gene. However, dogs with homozygous nt230(del4) mutation in the *MDR1* gene do not express a functionally active P-glycoprotein and show increased brain penetration of these drugs, resulting in neurological toxicity to different degrees. Thus, whereas IVM provokes neurological toxicity at 0.1 mg/kg, MOX is tolerated at this dosage. To investigate whether this difference is attributable to lower brain penetration of MOX in the absence of P-glycoprotein or to their neurotoxic potential, we applied IVM and MOX to P-glycoprotein-deficient CF-1 mice and comparatively analysed the absolute drug concentrations in the brain. Furthermore, we quantified drug-induced neurotoxicity by measuring the walking performance of the mice on a rotarod setup. We found that at a dosage of 0.2 mg/kg, representing 0.23  $\mu\text{mol/kg}$  IVM and 0.31  $\mu\text{mol/kg}$  MOX, the absolute drug concentrations in the brain were comparable with 100.8 pmol/g and 140.2 pmol/g, respectively. However, MOX induced the same degree of neurotoxicosis at the higher dosage of 1.09  $\mu\text{mol/kg}$  (0.7 mg/kg) compared with IVM at 0.40  $\mu\text{mol/kg}$  (0.35 mg/kg), demonstrating the 2.7-fold lower neurotoxic potential of MOX compared to IVM. This could be explained by a lower binding affinity or lower intrinsic activity of MOX at the relevant central nervous system receptors compared with IVM.

(Paper received 17 February 2012; accepted for publication 19 June 2012)

*Prof. Dr. Joachim Geyer, Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University of Giessen, Schubertstr. 81, 35392 Giessen, Germany. E-mail: joachim.m.geyer@vetmed.uni-giessen.de*

### INTRODUCTION

The multi-drug carrier P-glycoprotein (P-gp), encoded by the *MDR1* (*ABCB1*) gene, belongs to the family of membrane-bound ATP-binding cassette (ABC) transporters (Dean & Annilo, 2005). P-glycoprotein is an ATP-driven efflux pump that confers multi-drug resistance (MDR) to cancer cells by actively extruding a wide range of structurally unrelated chemotherapeutic compounds from the cell (Juliano & Ling, 1976). For many years, research on P-gp focused on the chemotherapeutic resistance of tumour cells, and so the first P-gp substrates identified were cytostatic drugs (Pastan & Gottesman, 1991). Today, it is well established that P-gp has a broad substrate spectrum and transports a large number of structurally unrelated drugs and xenobiotics including the anti-parasitic macrocyclic lactone drugs ivermectin (IVM), eprinomectin, moxidectin (MOX) and selamectin (Schinkel *et al.*, 1994;

Marzolini *et al.*, 2004; Geyer *et al.*, 2009; Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010).

In addition to neoplastic tissues, P-gp is expressed in many tissues with secretory or excretory functions such as the liver, kidney and intestine, where it limits drug absorption from the gut and promotes drug excretion into the bile and urine (Thiebaut *et al.*, 1987, 1989). P-gp is also highly expressed at the blood–brain barrier, where it can restrict drug entry into the central nervous system (CNS) (Schinkel, 1997). The important role of P-gp in protecting the brain from drug penetration is highly relevant for the treatment of mammals with macrocyclic lactones. In parasitic lower organisms, macrocyclic lactones bind with high affinity to glutamate-gated and GABA-gated chloride ion channels, which are widespread in the nervous system of arthropods and nematodes, resulting in the inhibition of nerve activity, flaccid paralysis and death (Turner & Schaeffer, 1989; Wolstenholme & Rogers, 2005). However, the situation is

completely different in mammals in which neuronal glutamate-gated chloride channels are absent and GABA-gated chloride channels are confined to the CNS (Sigel & Baur, 1987; Huang & Casida, 1997). Here, these channels are protected from high macrocyclic lactone drug concentrations by the highly effective P-gp-mediated drug efflux at the blood–brain barrier (Schinkel *et al.*, 1994; Schinkel, 1997). Therefore, macrocyclic lactones generally have a wide margin of safety in mammals at therapeutic doses, given the expression of a functionally active P-gp at the blood–brain barrier (Pulliam & Preston, 1989).

However, a 4-bp deletion mutation exists in the *MDR1* gene of many dog breeds such as the Collie and the Australian Shepherd, which results in the expression of a non-functional P-gp (Mealey *et al.*, 2001; Neff *et al.*, 2004; Gramer *et al.*, 2011). Accordingly, dogs with the homozygous *MDR1* mutation, referred to as nt230(del4) *MDR1*(-/-), are generally prone to neurotoxicity by macrocyclic lactones because of increased brain penetration and the activation of GABA-gated chloride channels. In the case of IVM and doramectin, *MDR1*(-/-) dogs suffer from life-threatening intoxication when the drugs are applied at therapeutic dosages of 0.2–0.6 mg/kg (Pulliam *et al.*, 1985; Tranquilli *et al.*, 1991; Geyer *et al.*, 2007). In contrast, other macrocyclic lactone compounds such as MOX, selamectin and milbemycin oxime can be applied at much higher concentrations without causing the clinical signs of neurotoxicosis, even in *MDR1*(-/-) dogs (Geyer & Janko, 2012). This may be due to generally lower brain penetration of these compounds, even in the absence of P-gp at the blood–brain barrier or to a difference in the neurotoxic potential at the level of drug interaction with CNS receptors. To further examine these hypotheses, we applied IVM and MOX to P-gp-deficient mice and comparatively analysed (i) the absolute drug concentrations in the brain and (ii) the drug-induced neurotoxicity measured using a rotarod setup at increasing dosages.

## MATERIALS AND METHODS

### *PGP<sup>mut</sup> and PGP<sup>wt</sup> CF-1 mice*

In the present study, we used a subpopulation of the CF-1 mouse strain that shows enhanced avermectin-induced neurotoxicity caused by a murine leukaemia virus insertion in the *mdr1a* gene followed by defective expression of *mdr1a* P-gp in the brain capillary endothelial cells (Lankas *et al.*, 1997; Umbenhauer *et al.*, 1997; Jun *et al.*, 2000). These P-gp-deficient CF-1 mice (PGP<sup>mut</sup>) and a corresponding P-gp-intact CF-1 wild-type strain (PGP<sup>wt</sup>) were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) and used for in-house breeding. All mice were housed in our specific-pathogen-free animal facility in isolated, ventilated cages and were maintained on a 12-h on/off light cycle. They were provided with sterilized food and water *ad libitum*. For the drug administration studies, we used mice between 12 and 19 weeks of age. For the experiments on the rotarod setup, we used 6- to 14-month-old mice. All animal experiments were registered and approved by the local governmental administration

and were conducted in accordance with the 2010/63/EU Directive of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

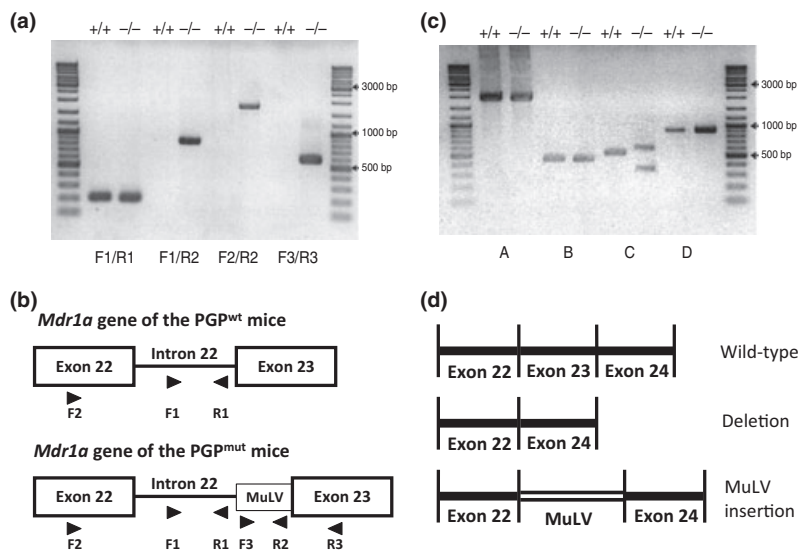
### *Genotyping of the PGP<sup>mut</sup> and PGP<sup>wt</sup> CF-1 mouse strains*

To genotype the PGP<sup>mut</sup> and PGP<sup>wt</sup> CF-1 mouse strains, DNA was obtained from tag biopsies and used for polymerase chain reaction (PCR) amplification with the following oligonucleotide primers in different combinations (see Fig. 1 for further details): F1, 5'-TGG GTA GAT GTG TTG GGA GGT G-3'; F2, 5'-CTT TGA CTC GGG AGC AGA AGT TTG-3'; F3, 5'-CAG GCT GGG CAG TCA ATC ACT C-3'; R1, 5'-TGT GTG AAT TTG GGA AAC TGC CTC-3'; R2, 5'-GCC AGC TAA CTG CAG TAA CGC C-3'; R3, 5'-G AA AAA TAC ATC ATG GCC TGG GTG-3'. The following PCR conditions were used: 10 cycles of 95 °C for 30 sec, 61 °C (subtracting 0.5 °C per cycle) for 30 sec and 72 °C for 2 min, then 25 cycles of 95 °C for 30 sec, 56 °C for 30 sec and 72 °C for 2 min, with a final elongation at 72 °C for 10 min. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and were visualized by staining with ethidium bromide. For sequence verification, representative PCR products were purified and subjected to DNA sequencing (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany).

Genotyping was verified at the RNA level on a single mouse from each of the PGP<sup>wt</sup> and PGP<sup>mut</sup> strains. Total RNA was isolated from brain and liver tissue samples using the phenol-chloroform method (TriReagent, Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany). Five micrograms of RNA was reverse transcribed with the SuperScript III reverse transcriptase using random hexamer primers (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). For the PCR amplification of the whole *mdr1a* coding sequence, we used primer pairs A–D, as previously described by Pippert and Umbenhauer (2001) (see Fig. 1 for further details). The amplification conditions were as follows: 35 cycles of 95 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec and 72 °C for 30 sec (in the case of primer pairs B and C) or 2 min (for the primer pairs A and D). The PCR products were checked by agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining and purified using the PCR Clean-Up & Gel-Extraction Kit (SLG, Gauting, Germany) for DNA sequencing (GATC Biotech AG).

### *Drug administration to PGP<sup>mut</sup> and PGP<sup>wt</sup> CF-1 mice*

Ivermectin (a mixture of 80% 22,23-dihydroavermectin B<sub>1a</sub> and 20% 22,23-dihydroavermectin B<sub>1b</sub>) was purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen), and [24,25-<sup>3</sup>H] IVM (22,23-dihydroavermectin B<sub>1a</sub>, henceforth referred to as [<sup>3</sup>H] IVM, 20 Ci/mmol) was purchased from American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA). MOX (pure substance) as well as [<sup>3</sup>H] MOX (14 Ci/mmol) were kindly provided by Bayer HealthCare (Leverkusen, Germany). All of these compounds were dissolved in sesame oil and were orally (p.o.) administered to the mice by gavage in a maximum total volume of 150 µL. Two hours prior to administration, food was removed from the cages. Directly after drug administration, the mice were placed in



**Fig. 1.** Genotyping of the homozygous PGP<sup>wt</sup> (+/+) and PGP<sup>mut</sup> (-/-) CF-1 mice at the DNA (a,b) and RNA level (c,d). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed from DNA of PGP<sup>wt</sup> (+/+) and PGP<sup>mut</sup> (-/-) CF-1 mice using different combinations of forward and reverse primers (a) located in exons 22 and 23 as well as in intron 22 of the *mdr1a* gene (c). Amplification products generated with the primer combinations F1/R2, F2/R2 or F3/R3 were specific for homozygous PGP<sup>mut</sup> (-/-) CF-1 mice, whereas the F1/R1 primer combination served as the amplification control. (b) Full-length amplification of the whole open reading frame of the *mdr1a* transcript, divided among the four fragments A–D, was performed to verify the genotyping result at the RNA level. Amplicons obtained with primer pair C covered the sequence from exon 21 to exon 24, including the site of mutation. In the PGP<sup>mut</sup> mice, the whole exon 23 sequence is deleted (amplicon of 379 bp) or replaced by the solo long terminal repeat (LTR) sequence of the ecotropic murine leukaemia virus (MuLV) (amplicon of 601 bp). (d) Schematic diagram of the splicing events observed in the PGP<sup>mut</sup> (-/-) CF-1 mice between exon 22 and exon 24 of the *mdr1a* gene.

individual cages and provided with food and water *ad libitum*. In the case of the administration of [<sup>3</sup>H] IVM or [<sup>3</sup>H] MOX, 2.5  $\mu$ Ci of the respective radio-labelled compound was administered to each mouse and dose-adjustment was achieved by adding the respective unlabeled compound. At the last indicated time points (4 h or 24 h after administration), mice were sacrificed by cervical dislocation. All organs listed in Tables 2 and 3 were removed and homogenized in 100–2000  $\mu$ L 3 M NaOH depending on the tissue weight. Blood and urine samples were collected by heart and bladder puncture, respectively. The levels of radioactivity in blood, urine and tissue homogenates were quantified using a Wallac 1409 liquid scintillation counter (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA).

#### Quantification of the neurotoxic potential of IVM and MOX on the rotarod

For quantification of the neurotoxic potential of IVM and MOX, we used a rotarod apparatus (produced at the factory of the Justus Liebig University of Giessen), which consists of a rotating cylinder of 2.50 cm in diameter, separated by dividers in four lanes. The speed of rotation is adjustable from 6 to 60 rpm and is displayed on a speed indicator. The total walking time can be individually displayed for each lane. The duration of walking time is recorded by pushing a start button separately for each lane, and measurement is stopped automatically by a light barrier when the mouse falls from the rotating cylinder. After adequate training of the PGP<sup>mut</sup> mice (indicated by reliable walking on the rotarod at 16 rpm for 2 min), IVM and MOX

**Table 1.** Rating scheme for evaluation of walking performance of PGP<sup>mut</sup> mice on the rotarod

Performance rating	Time	Observations
0	0:00 min	Unable to walk on the rotarod
1	0:00–0:29 min	Atactic and discontinuous walking or crawling on the rotarod
2	0:30–0:59 min	
3	1:00–2:00 min	Continuous walking on the rotarod with mild ataxia
4	1:00–1:59 min	Unaffected and continuous walking on the rotarod
5	2:00 min	

were applied at increasing concentrations. Both drugs were dissolved in a mixture of 1,2-propanediol and glycerol formal at 56/44 (v/v) and were orally administered by gavage in a total volume of 60–100  $\mu$ L per mouse. Each individual mouse was used for a maximum of three independent experiments with an adequate drug excretion phase of at least 4 weeks between trials. It is well established that the initial sign of macrocyclic lactone-induced neurotoxicosis is represented by ataxia (Geyer & Janko, 2012). The mice must continuously walk forward on the rotarod to avoid falling from the rotating cylinder. This setup demands a high level of motor coordination and balance and therefore is an adequate tool to measure ataxia (Dawson *et al.*, 2000). To evaluate the walking performance of the PGP<sup>mut</sup> mice on the rotarod after drug administration, we developed a rating scheme that is depicted in Table 1, which allowed us to quantify the

degree of ataxia. Using this rating scheme, we generated walking performance curves for each mouse over a period of 5 days (see Fig. 3). Area over the curve (AOC) values were determined for each individual curve, representing the degree of ataxia over time, and these were used to grade the neurological toxicity of IVM and MOX at the applied dosages.

#### Statistical analysis

All data are represented as mean  $\pm$  SD. A Student's two-tailed unpaired *t*-test was used to identify significant differences between the groups.

## RESULTS

#### Genotyping of the PGP<sup>wt</sup> and PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice

Researchers at the Merck Research Laboratories identified a subpopulation of mice in the CF-1 mouse strain that was much more sensitive to avermectins compared to other mice (Lankas *et al.*, 1997). Further analysis revealed that these drug-sensitive mice did not express the *mdr1a* P-gp in the brain capillary endothelial cells lining the blood–brain barrier because of the insertion of a solo long terminal repeat of the ecotropic murine leukaemia virus (MuLV), resulting in abnormal splicing of the *mdr1a* transcript and thereby leading to the translation of a truncated non-functional P-gp (Umbenhauer *et al.*, 1997; Jun *et al.*, 2000). The wild-type CF-1 mice (PGP<sup>wt</sup>) and P-gp-deficient PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice used in the present study were obtained from homozygous PGP<sup>wt</sup> and PGP<sup>mut</sup> breeding lines. Nevertheless, prior to drug administration, the *mdr1a* genotype of each mouse was verified by PCR amplification, using different primer combinations to specifically detect MuLV insertion (Fig. 1a,b). This MuLV insertion is arranged at the end of intron 22 and the beginning of exon 23 (Pippert & Umbenhauer, 2001). The other primers used for genotyping were located in the flanking intron 22 (F1 and R1), exon 22 (F2) and exon 23 (R3). Amplification with the F1/R1 primer combination was used as the internal amplification control, whereas the primer combinations F1/R2, F2/R2 and F3/R3 were used to detect homozygous PGP<sup>mut</sup> (–/–) CF-1 mice (Fig. 1a). This genotyping protocol was verified at the RNA level in representative PGP<sup>wt</sup> (+/+) and PGP<sup>mut</sup> (–/–) mice. The full-length *mdr1a* transcript was PCR-amplified in four fragments (A–D), and the sequence was verified by sequencing of the PCR products. Whereas the amplicons generated with the primer pairs A, B and D were identical in sequence in the PGP<sup>mut</sup> (–/–) and PGP<sup>wt</sup> (+/+) mice, they differed in the case of primer pair C (Fig. 1b). Here, the PGP<sup>mut</sup> (–/–) mice either showed deletion of the whole exon 23 sequence from the transcript or replacement of exon 23 by the MuLV sequence. Both splicing events occurred with comparable intensity. While the in-frame deletion of exon 23 results in the deletion of 47 amino acids from positions 926–972 of the intact P-glycoprotein, MuLV insertion leads to an in-frame translation of 73 erroneous amino acids from the MuLV sequence terminated by a premature stop codon. The

full-length *mdr1a* sequence encompassing exons 22, 23 and 24 was undetectable in the PGP<sup>mut</sup> (–/–) mice.

#### Brain penetration of IVM and MOX in PGP<sup>wt</sup> and PGP<sup>mut</sup> mice

Ivermectin and MOX have previously been shown to highly penetrate into the brain in the absence of P-gp at the blood–brain barrier (Schinkel *et al.*, 1994; Geyer *et al.*, 2009; Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010). These studies used genetically engineered knockout mice in which one or both murine *mdr1* genes (*mdr1a* and *mdr1b*) were disrupted by insertional mutagenesis. In the present study, we intended to comparatively analyse the neurotoxic potential of IVM and MOX in *mdr1a* P-gp-deficient PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice. Prior to the neurotoxicity measurements using the rotarod setup, we analysed the tissue distribution and in particular the brain penetration of both drugs in the PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice and their respective PGP<sup>wt</sup> wild-type strain. For better comparability with previous studies (Schinkel *et al.*, 1994; Geyer *et al.*, 2009; Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010), we orally applied [<sup>3</sup>H] IVM and [<sup>3</sup>H] MOX at equal dosages of 0.2 mg/kg, representing 0.23  $\mu$ mol/kg IVM and 0.31  $\mu$ mol/kg MOX, to both CF-1 mouse strains and analysed the absolute drug concentrations in different organs 24 h after drug administration. Drug concentrations were generally higher in the PGP<sup>mut</sup> mice with significant differences for both compounds in the heart, muscle, spleen, kidney, liver and brain (Table 2). In particular, the absolute brain concentrations of IVM were 67.4-fold higher in PGP<sup>mut</sup> mice compared with PGP<sup>wt</sup> mice (100.8 pmol/g vs. 1.5 pmol/g). In the case of MOX, 15.6-fold higher drug concentrations were observed in the brain of the PGP<sup>mut</sup> mice (Fig. 2). Interestingly, MOX showed higher brain penetration in the PGP<sup>wt</sup> mice compared to IVM, indicated by a higher brain/plasma ratio of  $0.52 \pm 0.07$  for MOX vs.  $0.15 \pm 0.02$  for IVM. In the PGP<sup>mut</sup> mice, however, IVM and MOX drug concentrations in the brain were comparable ( $100.8 \pm 26.2$  pmol/g vs.  $140.2 \pm 46.5$  pmol/g) (Table 2).

#### Evaluation of the neurotoxic potential of IVM and MOX in PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice

To measure the macrocyclic lactone-induced neurological toxicity, which is initially characterized by ataxia, we used a rotarod setup. For the present study, a total of approximately 60 PGP<sup>mut</sup> mice were trained to walk on the rotarod for several weeks, but only approximately 30 mice passed this training phase with a walking performance of 2 min at 16 rpm (a score of 5 according to the rating scheme given in Table 1). Prior to drug administration, the solvent used for drug administration (mixture of 1,2-propanediol and glycerol formal) was orally applied at a volume of 100  $\mu$ L to four PGP<sup>mut</sup> mice, and their walking performance was recorded for 48 h. None of these mice showed any decline in their rating scores, indicating that neither the solvent alone nor the schedule itself affected walking performance on the rotarod (data not shown).

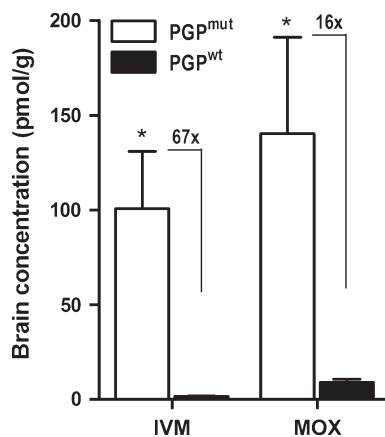
Ivermectin was subsequently orally applied at increasing concentrations to individual PGP<sup>mut</sup> mice, starting with 0.23  $\mu$ mol/kg (0.2 mg/kg) (Fig. 3a,b). No effect on walking

**Table 2.** Tissue drug concentrations 24 h after oral administration of 0.2 mg/kg [<sup>3</sup>H] IVM (0.23 µmol/kg) and [<sup>3</sup>H] MOX (0.31 µmol/kg) to CF-1 wild-type mice (PGP<sup>wt</sup>) and P-gp-deficient CF-1 mice (PGP<sup>mut</sup>). Values are given as mean ± SD of four (IVM) to six (MOX) animals per group

	IVM			MOX		
	PGP <sup>wt</sup> (pmol/g or pmol/mL)	PGP <sup>mut</sup> (pmol/g or pmol/mL)	Ratio (mut/wt)	PGP <sup>wt</sup> (pmol/g or pmol/mL)	PGP <sup>mut</sup> (pmol/g or pmol/mL)	Ratio (mut/wt)
Brain	1.5 ± 0.2	100.8 ± 26.2	67.4*	9.0 ± 1.6	140.2 ± 46.5	15.6*
Liver	44.3 ± 2.4	286.3 ± 112.2	6.5*	124.8 ± 38.4	234.2 ± 85.2	1.9*
Small intestine	49.7 ± 3.3	208.5 ± 97.7	4.2	86.7 ± 32.8	149.9 ± 59.6	1.7
Colon	173.6 ± 22.5	297.2 ± 193.6	1.7	105.1 ± 28.4	218.3 ± 88.0	2.1*
Stomach	41.0 ± 8.6	96.0 ± 49.3	2.3	153.2 ± 34.5	242.6 ± 148.5	1.6
Kidney	26.7 ± 2.9	142.3 ± 35.5	5.3*	95.8 ± 21.5	200.2 ± 73.9	2.1*
Spleen	11.8 ± 0.3	57.9 ± 15.1	4.9*	58.7 ± 13.6	105.1 ± 36.5	1.8*
Fat	24.6 ± 2.2	97.9 ± 58.9	4.0	96.9 ± 25.0	149.3 ± 74.1	1.5
Muscle	1.9 ± 0.5	10.7 ± 4.7	5.5*	10.0 ± 3.1	30.7 ± 17.6	3.1*
Heart	14.7 ± 2.6	85.9 ± 26.6	5.8*	59.8 ± 14.7	139.9 ± 54.3	2.3*
Lung	14.6 ± 0.6	144.1 ± 101.9	9.9	61.3 ± 10.3	129.8 ± 49.9	2.1*
Blood	9.8 ± 0.8	33.3 ± 16.8	3.4	18.3 ± 5.1	21.5 ± 8.7	1.2

IVM, ivermectin; MOX, moxidectin; P-gp, P-glycoprotein.

\*Significantly higher drug concentration in PGP<sup>mut</sup> mice compared with PGP<sup>wt</sup> mice ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX) brain concentrations in CF-1 wild-type (PGP<sup>wt</sup>) and P-glycoprotein (P-gp)-deficient (PGP<sup>mut</sup>) mice after oral administration of 0.2 mg/kg [<sup>3</sup>H] IVM (0.23 µmol/kg) and [<sup>3</sup>H] MOX (0.31 µmol/kg). Data represent mean ± SD of four (IVM) to six (MOX) animals per group. \*Significantly higher brain concentrations in the PGP<sup>mut</sup> mice compared with PGP<sup>wt</sup> mice ( $P < 0.05$ ).

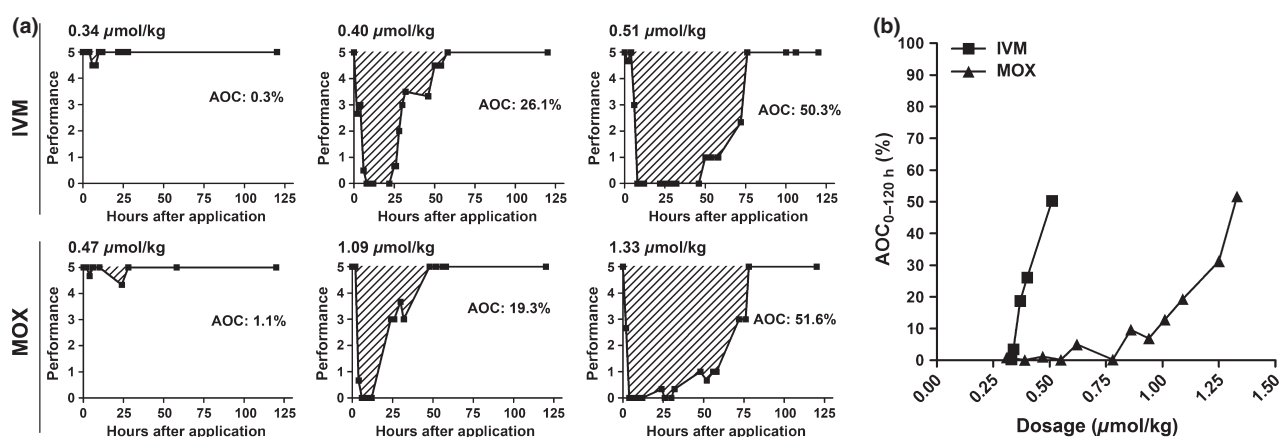
performance was detected up to a dosage of 0.34 µmol/kg (0.3 mg/kg) IVM, and these mice showed completely normal behaviour. However, after the administration of 0.40 µmol/kg (0.35 mg/kg) of IVM, the PGP<sup>mut</sup> mice showed mild ataxia and were unable to walk on the rotarod for a period of approximately 12–14 h. Nevertheless, these mice continued to show normal behaviour (normal eating, drinking, walking and grooming activity) in their housing cages. One PGP<sup>mut</sup> mouse also received 0.51 µmol/kg (0.45 mg/kg) IVM and showed severe signs of neurotoxicosis including stupor, convulsions, crawling and the inability to ingest food and water (Fig. 3a,b). However, it had completely recovered after approximately 3 days.

We also applied MOX at increasing concentrations to individual PGP<sup>mut</sup> mice. The dosage started at 0.31 µmol/kg

(0.2 mg/kg) and was increased stepwise up to 1.33 µmol/kg (0.85 mg/kg). The mice showed totally normal behaviour at a dosage of ≤ 0.55 µmol/kg (≤ 0.35 mg/kg), and their walking performance on the rotarod was not affected. At dosages of 0.62–0.94 µmol/kg (0.4–0.6 mg/kg), we observed mild ataxia in the PGP<sup>mut</sup> mice and a slight decline in walking performance, with differences between individual mice. At dosages of ≥ 0.94 µmol/kg (≥ 0.6 mg/kg), a significant and continuous decline in walking performance was recorded (Fig. 3b). Finally, at dosages of 1.25 µmol/kg (0.8 mg/kg) and 1.33 µmol/kg (0.85 mg/kg), the mice showed severe ataxia and even stupor comparable to the IVM-induced neurotoxicosis that occurred at a dosage of 0.51 µmol/kg (0.45 mg/kg) (Fig. 3a).

To directly compare the neurotoxic potential of IVM and MOX, we selected dosages of 0.40 µmol/kg (0.35 mg/kg) and 1.09 µmol/kg (0.7 mg/kg), respectively, from the dose-titration experiments, which provoked a significant and comparable decline in walking performance on the rotarod but did not severely affect the general behaviour of the mice. These dosages of IVM and MOX were then applied to a larger group of PGP<sup>mut</sup> mice, and their walking performance on the rotarod was recorded over a period of 120 h. As shown in Fig. 4a, the walking performance curves expressed as AOC<sub>0–120h</sub> showed similar values of 13.1 ± 6.2 and 14.9 ± 5.9 for IVM and MOX, respectively. To evaluate the time course of the macrocyclic lactone-induced neurotoxicosis, we also calculated the AOC<sub>0–24h</sub> (representing the initial phase of intoxication) and AOC<sub>0–58h</sub> (representing the phase in which most of the mice recovered to their maximum walking performance). In this sub-analysis, the AOC values for the IVM and MOX administration groups were also comparable.

To determine the absolute drug concentrations of IVM and MOX in the brain that actually provoke neurotoxicosis, we administered 0.40 µmol/kg (0.35 mg/kg) [<sup>3</sup>H] IVM and 1.09 µmol/kg (0.7 mg/kg) [<sup>3</sup>H] MOX to the PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice.



**Fig. 3.** Evaluation of the neurotoxic potential of Ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX) in P-glycoprotein (P-gp)-deficient PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice on the rotarod. The walking performance of the PGP<sup>mut</sup> mice on the rotarod was rated according to the scheme given in Table 1 and is presented as walking performance curves for each mouse over a period of 5 days. (a) Representative walking performance curves for PGP<sup>mut</sup> mice that received 0.34  $\mu\text{mol/kg}$  (0.3 mg/kg), 0.40  $\mu\text{mol/kg}$  (0.35 mg/kg) and 0.51  $\mu\text{mol/kg}$  (0.45 mg/kg) IVM or 0.47  $\mu\text{mol/kg}$  (0.3 mg/kg), 1.09  $\mu\text{mol/kg}$  (0.7 mg/kg) and 1.33  $\mu\text{mol/kg}$  (0.85 mg/kg) MOX. (b) Area over the curve (AOC) values were determined from each individual curve and are presented as dose-titration curves in the range of 0.23–0.51  $\mu\text{mol/kg}$  (0.2–0.45 mg/kg) IVM and 0.31–1.33  $\mu\text{mol/kg}$  (0.2–0.85 mg/kg) MOX.

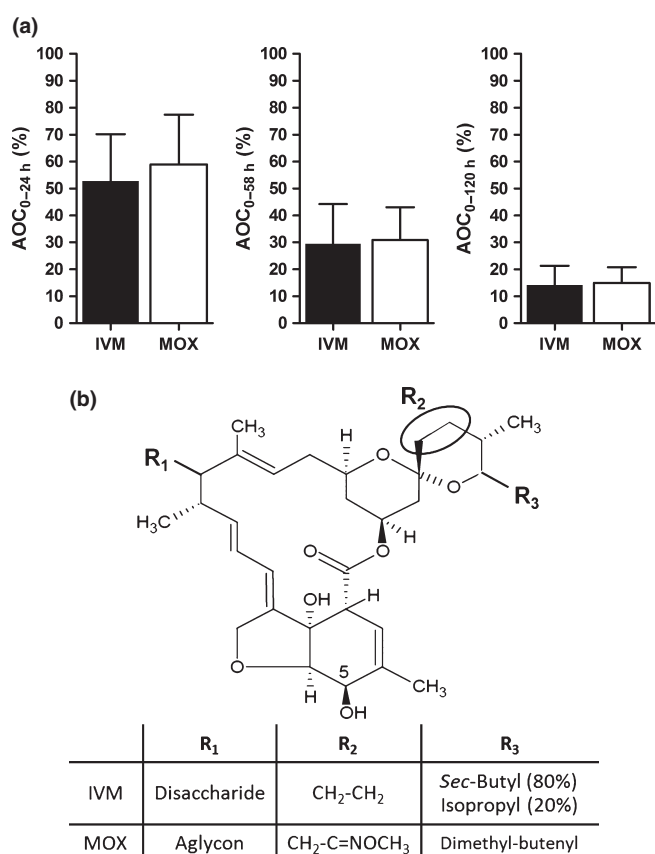
We then analysed the drug concentration in the brain and other organs at the time at which the walking performance dropped to '0' in most of the mice, that is, at 4 h. As shown in Table 3, the absolute brain concentration for MOX at this time was  $349.9 \pm 55.7$  pmol/g and that of IVM was  $81.9 \pm 42.3$  pmol/g. As expected, significantly higher drug concentrations were detected in all organs and the blood for MOX compared with IVM.

## DISCUSSION

In 1994, Schinkel and colleagues showed that homozygous *mdr1a*( $-/-$ ) knockout mice are 50- to 100-fold more sensitive to IVM than *mdr1a*( $+/+$ ) wild-type mice ( $\text{LD}_{50}$  = 0.7–0.8 mg/kg vs. 50–60 mg/kg), accompanied by 87-fold higher drug concentrations in the brain of the knockout mice (131 ng/g vs. 1.5 ng/g; 24 h after oral administration of 0.2 mg/kg) (Schinkel *et al.*, 1994; Schinkel, 1997). Even after the administration of 0.2 mg/kg IVM to *mdr1a,b*( $-/-$ ) double knockout mice, which are also deficient in the *mdr1b* gene, the absolute brain concentrations of IVM were 59-fold (130 ng/g vs. 2 ng/g) higher in the knockout mice compared with the wild-type mice (Geyer *et al.*, 2009). This clearly indicates that the *mdr1b* P-gp, which is predominantly found in the adrenal, placenta, ovary and (pregnant) uterus, but not in the brain (Schinkel *et al.*, 1995), has no relevance for the functional drug efflux of IVM at the blood–brain barrier. In addition to IVM, the concentrations of other macrocyclic lactones in the brain of *mdr1a,b*( $-/-$ ) knockout mice were analysed and were significantly higher than in wild-type mice for selamectin (5- to 10-fold) (Geyer *et al.*, 2009), eprinomectin (16-fold) and MOX (4- to 11-fold) (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010). As well as these genetically engineered *mdr1*-knockout mice, a sub-population of the CF-1 mouse strain (PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice) also showed hypersensitivity to avermectins compared with other CF-1 (PGP<sup>wt</sup>) mice (Lankas *et al.*, 1997).

These avermectin-sensitive CF-1 mice do not express a functionally active P-gp at the blood–brain barrier because of a virus insertion in the *mdr1a* gene (see Fig. 1) (Lankas *et al.*, 1997; Umbenhauer *et al.*, 1997; Jun *et al.*, 2000; Pippert & Umbenhauer, 2001). As a consequence, 24 h after oral administration of 0.2 mg/kg IVM, 70-fold higher absolute drug concentrations were detected in the brain of the PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice compared with the wild-type PGP<sup>wt</sup> CF-1 mice (Kwei *et al.*, 1999).

The main focus of the present study was to investigate the possible differences in the neurotoxic potential of the macrocyclic lactones IVM and MOX. For these experiments, we decided to use the *mdr1a* P-gp-deficient CF-1 mouse model. Prior to the neurotoxicity measurements, we analysed the tissue distribution and in particular the brain penetration of [<sup>3</sup>H] IVM and [<sup>3</sup>H] MOX at a dosage of 0.2 mg/kg, representing 0.23  $\mu\text{mol/kg}$  and 0.31  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively, in PGP<sup>mut</sup> CF-1 mice and the PGP<sup>wt</sup> CF-1 wild-type strain. As expected, both compounds were found at significantly higher concentrations in the brains of the PGP<sup>mut</sup> mice compared with the PGP<sup>wt</sup> mice (100.8 pmol/g vs. 1.5 pmol/g for IVM and 140.2 pmol/g vs. 9.0 pmol/g for MOX). In terms of the absolute drug concentrations in the brain and the brain concentration ratios (mutant vs. wild-type), these data are consistent with previous studies on *mdr1a,b* $^{-/-}$  knockout mice (see Table 4) (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010). The somewhat lower concentrations of IVM and MOX in the brain of the knockout mice in the study conducted by Kiki-Mvouaka *et al.* (2010) likely result from the subcutaneous route of administration in this study compared with the oral route of administration in the present study. Interestingly, however, the absolute brain concentrations in both studies were comparable for IVM and MOX: 100.8 pmol/g (88.2 ng/g) vs. 140.2 pmol/g (89.9 ng/g) in the PGP<sup>mut</sup> mice (present study) and 64.7 ng/g vs. 65.7 ng/g in the *mdr1a,b* $^{-/-}$  knockout mice, respectively (Kiki-Mvouaka *et al.*, 2010), indicating that the two compounds show comparable penetration into the brain in the absence of P-gp. In



**Fig. 4.** Determination of an equivalent neurotoxic dose of ivermectin (IVM) and moxidectin (MOX) in PGP<sup>mut</sup> mice on the rotarod. IVM and MOX were applied at a dosage of 0.40  $\mu\text{mol/kg}$  (0.35 mg/kg) and 1.09  $\mu\text{mol/kg}$  (0.7 mg/kg), respectively, to groups of five to seven PGP<sup>mut</sup> mice, and the walking performance on the rotarod was measured over 5 days. (a) Area over the curve (AOC)<sub>0–24h</sub>, AOC<sub>0–58h</sub> and AOC<sub>0–120h</sub> values were calculated from the walking performance curves and did not differ between groups. (b) Differences in the chemical structures of IVM and MOX that might account for the different neurotoxic potential of both compounds.

contrast, the brain penetration of these compounds differed significantly in wild-type mice, in which 9.0 pmol/g MOX but only 1.5 pmol/g IVM was detected. This accounts for the different brain concentration ratios of 15.6 vs. 67.4 and the higher brain/plasma ratios of 0.52 vs. 0.15, respectively (Table 4). These data clearly indicate that, *in vivo*, MOX is less actively transported by P-gp at the blood–brain barrier than IVM. A similar conclusion has previously been derived from *in vitro* transport studies, which showed that MOX is a weaker substrate and inhibitor of P-gp than IVM (Dupuy *et al.*, 2001; Lespine *et al.*, 2003, 2007; Griffin *et al.*, 2005; Brayden & Griffin, 2008).

IVM and MOX are widely used in veterinary medicine for the treatment for parasitic diseases (Shoop *et al.*, 1995; Plumb, 2005). Both compounds are considered to have the same mechanism-based toxicity in vertebrates by binding to neuronal GABA-gated chloride channels (Sigel & Baur, 1987; Huang & Casida, 1997; Dawson *et al.*, 2000). Therefore, *MDR1*(–/–)

**Table 3.** Tissue drug concentrations 4 h after oral administration of 0.40  $\mu\text{mol/kg}$  [<sup>3</sup>H] IVM (0.35 mg/kg) and 1.09  $\mu\text{mol/kg}$  [<sup>3</sup>H] MOX (0.70 mg/kg) to P-gp-deficient CF-1 mice (PGP<sup>mut</sup>)

	IVM	MOX
	PGP <sup>mut</sup> (pmol/g or pmol/mL)	PGP <sup>mut</sup> (pmol/g or pmol/mL)
Brain	81.9 $\pm$ 42.3	349.9 $\pm$ 55.7
Liver	475.8 $\pm$ 163.1	1,945.4 $\pm$ 306.2
Small intestine	1,745.6 $\pm$ 443.4	7,109.4 $\pm$ 2,328.4
Colon	181.1 $\pm$ 63.7	808.4 $\pm$ 141.3
Stomach	4,570.3 $\pm$ 751.9	8,335.4 $\pm$ 1,076.3
Kidney	265.1 $\pm$ 96.0	978.9 $\pm$ 86.0
Spleen	141.4 $\pm$ 40.2	598.6 $\pm$ 63.0
Fat	32.7 $\pm$ 3.8	279.4 $\pm$ 86.1
Muscle	96.4 $\pm$ 44.6	314.7 $\pm$ 30.6
Heart	204.6 $\pm$ 81.7	869.9 $\pm$ 116.8
Lung	218.4 $\pm$ 75.9	731.4 $\pm$ 72.4
Blood	73.4 $\pm$ 37.0	200.0 $\pm$ 44.0

IVM, ivermectin; MOX, moxidectin; P-gp, P-glycoprotein.

Values are given as mean  $\pm$  SD of three animals per group.

mutant dogs that do not express P-gp at the blood–brain barrier are generally prone to neurological toxicity induced by these compounds because of their increased brain penetration in the absence of P-gp. Nevertheless, clear differences exist in the treatment tolerability of *MDR1*(–/–) mutant dogs towards IVM and MOX (Geyer & Janko, 2012). Whereas neurotoxicosis is induced in *MDR1*(–/–) mutant dogs after oral administration of IVM at  $\geq 0.1$  mg/kg (Pulliam *et al.*, 1985), this dosage is well tolerated in the case of MOX (Paul *et al.*, 2000). Generalized canine demodicosis can be treated with 0.2–0.4 mg/kg MOX per day administered orally, and this treatment is normally well tolerated in dogs (Wagner & Wendlberger, 2000). Higher doses of 1 mg/kg were even tolerated in beagle dogs with no clinical signs of neurological toxicity (Vanapalli *et al.*, 2002). However, as shown in an Australian shepherd with the *MDR1*(–/–) genotype that was treated with a gradually increasing dosage protocol, neurological toxicity was induced after reaching the target dose of 0.4 mg/kg. After discontinuing the treatment, the dog recovered fully, indicating that neurotoxicosis was induced by MOX (Geyer *et al.*, 2005).

In the present study, we hypothesized that this difference in treatment tolerability between MOX and IVM in *MDR1*(–/–) dogs may be due to (i) lower brain penetration of MOX into the brain in the absence of P-gp or (ii) due to the lower neurotoxicological potential of MOX compared with IVM. Given that the administration studies with [<sup>3</sup>H] IVM and [<sup>3</sup>H] MOX showed comparable drug concentrations in the brains of PGP<sup>mut</sup> mice, we excluded the first hypothesis. Therefore, we focused on the comparative measurement of the neurotoxic potential of IVM and MOX. It is well established that the initial sign of macrocyclic lactone-induced neurotoxicosis is represented by ataxia (Geyer & Janko, 2012), and we therefore selected a rotarod setup for our neurotoxicity measurements. Indeed, after the administration of  $>0.34$   $\mu\text{mol/kg}$  (0.3 mg/kg) IVM and  $>0.94$   $\mu\text{mol/kg}$

**Table 4.** Comparison of the absolute brain concentrations (ng/g) and brain/plasma ratios in wild-type FVB mice (FVB), *mdr1a,b* knockout mice (*mdr1a,b*<sup>-/-</sup>), wild-type CF-1 mice (PGP<sup>wt</sup>) and P-gp-deficient CF-1 mice (PGP<sup>mut</sup>) 24 h after oral (p.o.) or subcutaneous (s.c.) administration of 0.2 mg/kg IVM or MOX

	FVB	<i>mdr1a,b</i> <sup>-/-</sup>	Ratio ( <i>mdr1a,b</i> <sup>-/-</sup> /FVB)	PGP <sup>wt</sup>	PGP <sup>mut</sup>	Ratio (mut/wt)
<b>IVM</b>						
Brain concentration after p.o. administration (Geyer <i>et al.</i> , 2009; present study)	2.2 ± 0.6	127.2 ± 17.6	59.2	1.3 ± 0.2	88.2 ± 22.9*	67.4
Brain/plasma ratio	0.09	5.8		0.15 ± 0.02	3.8 ± 1.5	
Brain concentration after s.c. administration (Kiki-Mvouaka <i>et al.</i> , 2010)	2.4 ± 1.0	64.7 ± 9.1	27.0			
Brain/plasma ratio	0.08	2.4				
<b>MOX</b>						
Brain concentration after p.o. administration (present study)				5.8 ± 1.0	89.9 ± 29.8*	15.6
Brain/plasma ratio				0.52 ± 0.07	7.2 ± 2.2	
Brain concentration after s.c. administration (Kiki-Mvouaka <i>et al.</i> , 2010)	6.0 ± 5.2	65.7 ± 23.6	11.0			
Brain/plasma ratio	0.21	1.64				

IVM, ivermectin; MOX, moxidectin, P-gp, P-glycoprotein.

\*Significantly higher values in PGP<sup>mut</sup> mice compared with PGP<sup>wt</sup> mice ( $P < 0.05$ ).

(0.6 mg/kg) MOX, the PGP<sup>mut</sup> mice showed significantly reduced walking performance on the rotarod, although at these concentrations, they continued to show normal general behaviour. This clearly indicates that the measurement of walking performance on the rotarod is a suitable and sensitive method for determining macrocyclic lactone-induced neurological toxicity. From the dose escalation studies using IVM and MOX, we can make the following conclusions: (i) the intoxication curves—in particular those for IVM—are very steep: an increase in the dosage from 0.34  $\mu\text{mol/kg}$  (0.3 mg/kg), at which there was no effect on walking performance or general behaviour, up to 0.51  $\mu\text{mol/kg}$  (0.45 mg/kg) provoked severe neurotoxicosis with stupor, convulsions and the inability to ingest food and water. Further increases in the dosage were fatal with an LD<sub>50</sub> of 0.7–0.8 mg/kg (Schinkel *et al.*, 1994). (ii) To achieve equal impairment of walking performance on the rotarod, MOX required higher dosages than IVM. In a direct comparison between the two compounds, we found that 0.40  $\mu\text{mol/kg}$  (0.35 mg/kg) IVM and 1.09  $\mu\text{mol/kg}$  (0.7 mg/kg) MOX showed identical AOC values for the walking performance curves. At these dosages, the mice showed mild ataxia and were unable to walk on the rotarod for a period of 12–14 h but showed normal general behaviour. From these data, we can conclude that a 2.7-fold dosage ( $\mu\text{mol/kg}$ ) of MOX compared with IVM is required to provoke the same degree of neurological toxicity, at least in our experimental setup. In addition to the rotarod measurements, we applied 0.40  $\mu\text{mol/kg}$  [<sup>3</sup>H] IVM and 1.09  $\mu\text{mol/kg}$  [<sup>3</sup>H] MOX to PGP<sup>mut</sup> mice to determine the absolute drug concentrations in the brain at the point (4 h) at which the walking performance curve dropped to '0'. We found absolute drug concentrations of 81.9 pmol/g and 349.9 pmol/g, respectively, indicating that MOX, in comparison with IVM, requires much higher absolute drug concentrations in the brain to provoke a specific degree of neurological toxicity.

In conclusion, to our knowledge, this is the first experimental study to comparatively measure the neurotoxic potential of different macrocyclic lactone compounds in P-gp-deficient mice. We used a rotarod setup that allowed us to measure a low degree of macrocyclic lactone-induced neurotoxicosis characterized by mild ataxia. The administration of 0.40  $\mu\text{mol/kg}$  (0.35 mg/kg) IVM and 1.09  $\mu\text{mol/kg}$  (0.7 mg/kg) MOX led to a same degree of neurotoxicosis, indicating that MOX is less toxic compared to IVM in PGP<sup>mut</sup> mice. This can be explained by a lower binding affinity or lower intrinsic activity of MOX compared to IVM at the relevant CNS receptors, because of the structural differences between both compounds: (i) the disaccharide chain at C-13 in IVM and no C-13 substitution in MOX, (ii) the methoxime moiety at C-23 unique for MOX and (iii) the C-25 *sec*-butyl/isopropyl substitution in IVM and C-25 dimethyl-butenyl substitution in MOX (see Fig. 4b). To answer this question, it will be necessary to conduct comparative receptor binding assays in brain preparations and CNS receptor expressing cell lines.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Bayer Animal Health GmbH for providing financial support for the present study and for providing [<sup>3</sup>H] MOX and unlabelled MOX. We thank Jasmin Kranz for her assistance with the *in vivo* administration studies and Christoph Zimmerman for the construction of the rotarod apparatus used in the present study.

#### REFERENCES

- Brayden, D.J & Griffin, J. (2008) Ivermectin transepithelial transport in MDR1- and MRP-transfected canine kidney monolayers. *Veterinary Research Communications*, **32**, 93–106.

- Dawson, G.R., Wafford, K.A., Smith, A., Marshall, G.R., Bayley, P.J., Schaeffer, J.M., Meinke, P.T. & Mckernan, R.M. (2000) Anticonvulsant and adverse effects of avermectin analogs in mice are mediated through the  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **295**, 1051–1060.
- Dean, M. & Annilo, T. (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **6**, 123–142.
- Dupuy, J., Larrieu, G., Sutra, J.F., Eeckhoutte, C. & Alvinerie, M. (2001) Influence of verapamil on the efflux and metabolism of <sup>14</sup>C moxidectin in cultured rat hepatocytes. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **24**, 171–177.
- Geyer, J. & Janko, C. (2012) Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **13**, 969–986.
- Geyer, J., Döring, B., Godoy, J.R., Moritz, A. & Petzinger, E. (2005) Development of a PCR-based diagnostic test detecting a nt230(del4) MDR1 mutation in dogs: verification in a moxidectin-sensitive Australian Shepherd. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **28**, 95–99.
- Geyer, J., Klintzsch, S., Meerkamp, K., Wöhlke, A., Distl, O., Moritz, A. & Petzinger, E. (2007) Detection of the nt230(del4) MDR1 mutation in White Swiss Shepherd dogs: case reports of doramectin toxicosis, breed predisposition, and microsatellite analysis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **30**, 482–485.
- Geyer, J., Gavrilova, O. & Petzinger, E. (2009) Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a,b* P-glycoprotein- and *bcrp*-deficient knockout mice. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **32**, 87–96.
- Gramer, I., Leidolf, R., Döring, B., Klintzsch, S., Krämer, E.M., Yalcin, E., Petzinger, E. & Geyer, J. (2011) Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Veterinary Journal*, **189**, 67–71.
- Griffin, J., Fletcher, N., Clemence, R., Blanchflower, S. & Brayden, D.J. (2005) Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **28**, 257–265.
- Huang, J. & Casida, J.E. (1997) Ivermectin B<sub>1a</sub> binds to high- and low-affinity sites with dual effects on the  $\gamma$ -aminobutyric acid-gated chloride channel of cultured cerebellar granule neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **281**, 261–266.
- Juliano, R.L. & Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **455**, 152–162.
- Jun, K., Lee, S.B. & Shin, H.S. (2000) Insertion of a retroviral solo long terminal repeat in *mdr-3* locus disrupts mRNA splicing in mice. *Mammalian Genome*, **11**, 843–848.
- Kiki-Mvouaka, S., Menez, C., Borin, C., Lyazrhi, F., Foucaud-Vignault, M., Dupuy, J., Collet, X., Alvinerie, M. & Lespine, A. (2010) Role of P-glycoprotein in the disposition of macrocyclic lactones: a comparison between ivermectin, eprinomectin and moxidectin in mice. *Drug Metabolism and Disposition*, **38**, 573–580.
- 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. (1999) Disposition of ivermectin and cyclosporin A in CF-1 mice deficient in *mdr1a* P-glycoprotein. *Drug Metabolism and Disposition*, **27**, 581–587.
- Lankas, G.R., Cartwright, M.E. & Umbenhauer, D. (1997) P-glycoprotein deficiency in a subpopulation of CF-1 mice enhances avermectin-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **143**, 357–365.
- Lespine, A., Roulet, A., Dupuy, J., Pineau, T. & Alvinerie, M. (2003) Role of the P-glycoprotein in the cellular efflux of macrocyclic lactones: influence of interfering agents. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **26** (Suppl. 1), 161–162.
- Lespine, A., Martin, S., Dupuy, J., Roulet, A., Pineau, T., Orłowski, S. & Alvinerie, M. (2007) Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure–affinity relationship. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **30**, 84–94.
- Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T. & Kim, R.B. (2004) Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **75**, 13–33.
- Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M. & Cantor, G.H. (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics*, **11**, 727–733.
- Neff, M.W., Robertson, K.R., Wong, A.K., Safra, N., Broman, K.W., Slatkin, M., Mealey, K.L. & Pedersen, N.C. (2004) Breed distribution and history of canine *mdr1-1Δ*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 11725–11730.
- Pastan, I. & Gottesman, M.M. (1991) Multidrug resistance. *Annual Review of Medicine*, **42**, 277–286.
- Paul, A.J., Tranquilli, W.J. & Hutchens, D.E. (2000) Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies. *American Journal of Veterinary Research*, **61**, 482–483.
- Pippert, T.R. & Umbenhauer, D.R. (2001) The subpopulation of CF-1 mice deficient in P-glycoprotein contains a murine retroviral insertion in the *mdr1a* gene. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **15**, 83–89.
- Plumb, C.D. (2005) *Veterinary Drug Handbook*, 5th edn. Blackwell Publishing Professional, Iowa, IA.
- Pulliam, J.D. & Preston, J.M. (1989) Safety of ivermectin in target animals. In *Ivermectin and Abamectin*. Ed Campbell, W.C, pp. 149–161. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Pulliam, J.D., Seward, R.L., Henry, R.T. & Steinberg, S.A. (1985) Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Veterinary Medicine*, **80**, 33–40.
- Schinkel, A.H. (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Seminars in Cancer Biology*, **8**, 161–170.
- 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., Berns, A.J. & Borst, P. (1994) Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood–brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, **77**, 491–502.
- Schinkel, A.H., Mol, C.A., Wagenaar, E., van Deemter, L., Smit, J.J. & Borst, P. (1995) Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *European Journal of Cancer*, **31A**, 1295–1298.
- Shoop, W.L., Mrozik, H. & Fisher, M.H. (1995) Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, **59**, 139–156.
- Sigel, E. & Baur, R. (1987) Effect of avermectin B<sub>1a</sub> on chicken neuronal  $\gamma$ -aminobutyrate receptor channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Molecular Pharmacology*, **32**, 749–752.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. & Willingham, M.C. (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 7735–7738.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. & Willingham, M.C. (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **37**, 159–164.
- Tranquilli, W.J., Paul, A.J. & Todd, K.S. (1991) Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *American Journal of Veterinary Research*, **52**, 1170–1172.

- Turner, M.J. & Schaeffer, J.M. (1989) Mode of action of ivermectin. In *Ivermectin and Abamectin*. Ed Campbell, W.C. pp. 73–88. Springer-Verlag, New York.
- Umbenhauer, D.R., Lankas, G.R., Pippert, T.R., Wise, L.D., Cartwright, M.E., Hall, S.J. & Beare, C.M. (1997) Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **146**, 88–94.
- Vanapalli, S.R., Hung, Y.P., Fleckenstein, L., Dzimianski, M.T. & McCall, J.W. (2002) Pharmacokinetics and dose proportionality of oral moxidectin in beagle dogs. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, **23**, 263–272.
- Wagner, R. & Wendlberger, U. (2000) Field efficacy of moxidectin in dogs and rabbits naturally infested with *Sarcoptes* spp., *Demodex* spp. and *Psoroptes* spp. mites. *Veterinary Parasitology*, **93**, 149–158.
- Wolstenholme, A.J. & Rogers, A.T. (2005) Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, **131** (Suppl), S85–S95.

## 10. Anhang - Publikationen

### 9) LINEK J, SPIESS B, DALLMEYER C & GEYER J (2007)

Ivermectin intoxication in three dogs with and without MDR1 gene mutation caused by vermicide paste licensed for use in horse.

*Tierärztliche Praxis, Volume 35(K), pp 272-278*

<http://www.schattauer.de/en/magazine/subject-areas/journals-a-z/vcot/contents/archive-2003/manuscript/8627.html>

## Ivermectin-Intoxikation bei drei Hunden mit und ohne MDR1-Gen-Defekt durch ein für Pferde zugelassenes orales Antiparasitikum

J. Linek<sup>1</sup>, B. Spiess<sup>2</sup>, C. Dallmeyer<sup>3</sup>, J. Geyer<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Tierärztliche Spezialisten Hamburg, <sup>2</sup>Abteilung für Ophthalmologie (Leiter: Prof. Dr. B. Spiess) der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich, <sup>3</sup>Tierärztliche Praxis Todenbüttel, <sup>4</sup>Institut für Pharmakologie und Toxikologie (geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Petzinger) der Justus-Liebig-Universität Gießen

### Schlüsselwörter:

Ivermectin, Moxidectin, Mydriasis, Visuseinschränkung, MDR1-Gen

### Key words:

Ivermectin, Moxidectin, mydriasis, visual deficits, MDR1 gene

### Zusammenfassung:

**Gegenstand und Ziel:** Es werden Symptomatik und Verlauf einer Ivermectin-Vergiftung bei Hunden beschrieben, die durch die Aufnahme von Pferde-Wurmpaste (Ivomec P<sup>®</sup>, Deutschland bzw. Eqvalan<sup>®</sup>, Schweiz) verursacht wurde. **Material und Methode:** Dokumentation von drei Fällen. **Ergebnisse:** Zwei Hunde besaßen ein intaktes MDR1-Gen, während ein Hund von dem MDR1-Gen-Defekt betroffen war. Dementsprechend entwickelte sich eine unterschiedliche Symptomatik. Das klinische Leitsymptom bei den Hunden mit intaktem MDR1-Gen war eine symmetrische Mydriasis verbunden mit einer Visuseinschränkung bzw. vorübergehendem Visusverlust. Daneben wurden unkontrollierte Muskelzuckungen im Kopfbereich beobachtet. Eine ähnliche Symptomatik würde man bei einer oralen Einzeldosis von etwa 2,5–5 mg Ivermectin/kg Körpergewicht erwarten. Ein homozygot von dem MDR1-Gen-Defekt betroffener Collie (Fall 3) zeigte eine wesentlich gravierendere Symptomatik: Mydriasis, Apathie, Tremor und Hypersalivation, Koma mit krampfartigen Phasen begleitet von Schreien. Ein derartiger Verlauf wäre bei einem Hund mit homozygotem MDR1-Defekt nach einer oralen Einzeldosis von etwa 150–300 µg/kg KM zu erwarten. **Schlussfolgerung:** Für Hunde mit intaktem MDR1-Gen verlaufen derartige Intoxikationen vergleichsweise harmlos und sind von kurzer Dauer, während Hunde mit homozygotem MDR1-Gen-Defekt bereits bei der Aufnahme geringer Mengen Ivermectin-Wurmpaste für Pferde in den letalen Dosisbereich ( $\geq 0,2$  mg/kg KM) kommen. **Klinische Relevanz:** Vergiftungen mit Ivermectin-Pferdepaste beim Hund kommen gelegentlich vor und müssen bei auffälliger Mydriasis mit oder ohne Visuseinschränkung differenzialdiagnostisch in Betracht gezogen werden.

### Summary:

**Objective:** We report on symptoms and course of ivermectin toxicosis in dogs that had taken up ivermectin vermicide paste licensed for use in horses (Ivomec P<sup>®</sup> and Eqvalan<sup>®</sup> in Germany and Switzerland, respectively). **Material and methods:** Documentation of three such cases. **Results:** Two dogs had an intact MDR1 gene and one dog a homozygous MDR1 gene mutation. Different symptoms developed accordingly. The dogs with intact MDR1 gene showed mainly bilateral mydriasis, visual deficits, as well as uncontrolled facial muscular contractions. In these cases, ivermectin intake was estimated to be 2.5–5 mg/kg body weight. One collie dog which was affected by the homozygous MDR1 gene mutation, showed more severe symptoms including apathy, tremor, hypersalivation, and coma with phases of spasm and screaming. In this case, ivermectin intake was estimated to be 150–300 µg/kg body weight. **Conclusion:** Dogs with an intact MDR1 gene usually display harmless symptoms, which subside after two or three days. In contrast, dogs with homozygous MDR1 gene mutation may suffer from a lethal dose of  $\geq 0.2$  mg/kg with the uptake of even small amounts of ivermectin worm-paste for horses. **Clinical relevance:** Ivermectin toxicosis in dogs occasionally occurs after oral uptake of horse vermicide paste and must be considered as differential diagnosis in cases of mydriasis and/or visual deficits of unclear etiology.

**Ivermectin intoxication in three dogs with and without MDR1 gene mutation caused by vermicide paste licensed for use in horses**

Tierärztl Prax 2007; 35 (K): 272-276

## Einleitung

Ivermectin gehört zu einer Gruppe von Substanzen, die von dem in der Erde lebenden Strahlenpilz *Streptomyces avermitilis* gebildet und

als Avermectine bezeichnet werden (3). Chemisch handelt es sich bei dieser Substanzgruppe um makrozyklische Laktone. Avermectine haben ein breites Wirkungsspektrum gegen Endo- und Ektoparasiten und werden daher häufig in der Veterinärmedizin eingesetzt (1).

Ivermectin wiederum ist das am häufigsten angewendete Avermectin und in Deutschland für die Behandlung von Rindern

(200 µg/kg s. c. oder 500 µg/kg pour-on), Schafen (200–400 µg/kg s. c.), Schweinen (300 µg/kg s. c.) und Pferden (200 µg/kg oral) zugelassen (z. B. Ivomec®). Eine Zulassung für den Hund besteht in Deutschland nicht. In anderen Ländern (z. B. USA) ist Ivermectin für den Hund in einer Niedrigdosierung von 6 µg/kg (Heartguard™) zur Prophylaxe gegen eine *Dirofilaria immitis*-Infektion (Herzwurmerkrankung) jedoch zugelassen (4).

Die akute und chronische Toxizität von Ivermectin wurde bei verschiedenen Tierspezies untersucht. Bei Hunden beträgt die höchste orale Einzeldosis, bei der keine neurotoxischen Symptome auftreten, 2 mg/kg KM. Für eine tägliche Applikation über 14 Tage waren dies 0,5 mg/kg KM (19). Der empfindlichste Indikator einer Ivermectin-Vergiftung beim Hund ist das Auftreten einer Mydriasis bei einer oralen Einzeldosis von 2,5 mg/kg KM, einer 14-tägigen oralen Applikation von 1 mg/kg KM/Tag oder einer einmaligen subkutanen Injektion von 4,7 mg/kg KM. Nach höheren Einzeldosen von 5 mg/kg KM per os treten Mydriasis und Tremor auf und ab einer Dosis von 10 mg/kg KM wurden zusätzlich Ataxien beobachtet. In noch höherer Dosierung (40–80 mg/kg KM) kommt es zu komatösen Zuständen und schließlich zum Tod der Tiere. Die LD<sub>50</sub> für Ivermectin wurde für den Hund auf 80 mg/kg KM ermittelt (19). Auf Grundlage dieser Daten kann die therapeutische Sicherheit von Ivermectin beim Hund eigentlich als gut eingestuft werden. Allerdings wurde bereits kurz nach der Einführung von Ivermectin in der Veterinärmedizin beobachtet, dass einzelne Hunde, insbesondere Collies, eine auffällige Überempfindlichkeit gegenüber Ivermectin aufweisen (15, 18, 25, 27). Neurotoxische Effekte wie Mydriasis, Apathie, Tremor, Ataxie, Stupor, Koma und Tod traten bei diesen Tieren bereits bei einer oralen Einzeldosis von 200 µg/kg KM auf. In diesem Zusammenhang wurden im ZNS von zwei verstorbenen Collies hohe Ivermectin-Konzentrationen gemessen (18).

Seit einigen Jahren weiß man, dass ein genetischer Defekt im MDR1-Gen des Hundes für diese Überempfindlichkeit gegenüber Ivermectin verantwortlich ist (10, 13, 20). Das MDR1-Gen kodiert P-Glykoprotein, das ein ATP-getriebener Efflux-Transporter in der Blut-Hirn-Schranke ist. Dieser hält die Ivermectin-Konzentration im ZNS normalerweise sehr niedrig, nämlich bei weniger als 10% des Plasmaspiegels (6). Bei Fehlen von MDR1 kann sich Ivermectin durch den fehlenden Auswärtstransport im ZNS anreichern (bis zu 100-fach höhere Konzentration als im Plasma) und zeigt dadurch bereits bei niedriger Dosierung eine starke neurotoxische Wirkung (18, 21). Die LD<sub>50</sub> für Ivermectin bei Hunden mit homozygotem MDR1-Defekt beträgt etwa 0,2 mg/kg KM und entspricht damit der therapeutischen Dosierung für MDR1-intakte Hunde.

Aufgrund des MDR1-Gen-Defekts kommt es bei Einsatz von Ivermectin-Präparaten beim Hund immer wieder zu iatrogenen Intoxikationen, die häufig tödlich verlaufen. Eine weitere Vergiftungsquelle für Hunde ist die unkontrollierte Aufnahme von Ivermectin-Paste für Pferde, die während oder nach der Behandlung des Pferdes am Boden zurückbleibt. Die hier vorgestellten Vergiftungsfälle mit Ivermectin entstanden alle auf letztere Weise, wobei der MDR1-Status einen gravierenden Einfluss auf den Verlauf und die Prognose dieser Intoxikationen hatte.

## Fallberichte

### Fall 1 (JL)<sup>1</sup>

#### Patient und Anamnese

Eine sechsjährige, unkastrierte Labrador-Retriever-Hündin wurde mit akuter Seheinschränkung überwiesen. Die Hündin hatte bislang keine gesundheitlichen Störungen. Die Visusprobleme traten plötzlich auf und bestanden seit einem Tag. Die Besitzerin berichtete, der Hund habe am Vortag auf der Schafweide die Nachgeburt eines Schafes aufgenommen. Ferner hatte sie ihr Pferd auf der Koppel mit Ivermectin-Paste (Ivomec P®, Fa. Merial) entwurmt. Dabei war Wurmpaste auf den Boden gelangt, die der Hund aufgenommen hatte.

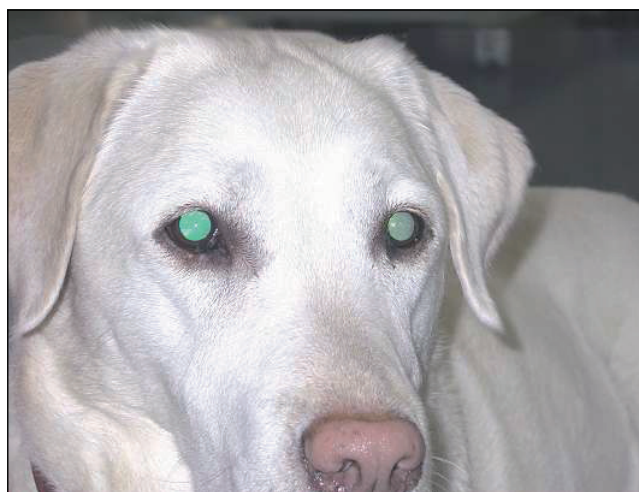
#### Allgemeinuntersuchung und Labordiagnostik

Der Hund wies einen guten Allgemeinzustand auf. Er zeigte unkontrollierte Muskelzuckungen im Bereich der Gesichtsmuskulatur. Gangabnormalitäten konnten nicht festgestellt werden. Die Korrekturreaktionen der Vorder- und Hinterextremitäten (Stellreaktionen) sowie die spinalen Reflexe des M. tibialis cranialis, M. extensor carpi radialis, der Patellarsehne und des M. tibialis cranialis waren normal. Auch der Flexorreflex zeigte sich an allen Extremitäten physiologisch. Weitere auffällige Befunde ergaben sich nicht. Auch ein Blutstatus (hämatologische und klinisch-chemische Parameter) ließ keine abweichenden Werte erkennen.

#### Ophthalmologische Untersuchung

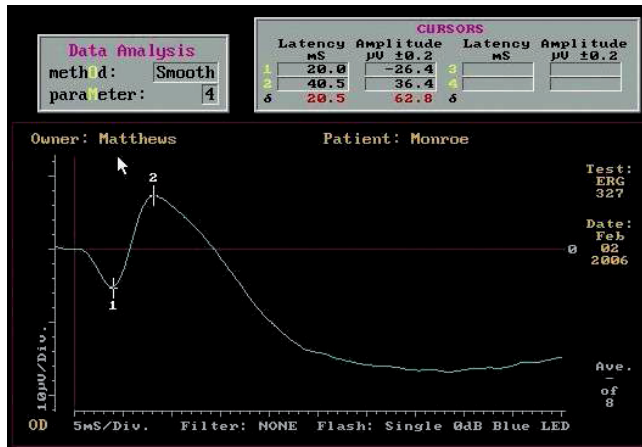
Neben einer Visuseinschränkung bestand beidseits eine auffällige, wenig responsive Mydriasis (Abb. 1). Bei der Spaltlampenbiomikroskopie (Modell SL 14, Fa. Kowa) der Adnexe sowie des vorderen Au-

<sup>1</sup> Buchstaben in Klammern bei den einzelnen Fallberichten = Initialen des jeweiligen Untersuchers



**Abb. 1** Hund mit beidseitiger Mydriasis durch Ivermectin-Intoxikation (Fall 1)

Ivermectin-Intoxikation bei drei Hunden mit und ohne MDR1-Gen-Defekt durch ein für Pferde zugelassenes orales Antiparasitikum  
J. Linek, B. Spiess, C. Dallmeyer, J. Geyer



**Abb. 2** Elektroretinogramm des rechten Auges. Das ERG des linken Auges entsprach dem des rechten.

gensegments beider Augen konnten alle untersuchten Strukturen als unauffällig beurteilt werden. Die Iris entzog sich einer näheren Untersuchung, da aufgrund der starken Mydriasis nur ein kleiner peripherer Randsaum an beiden Augen (Oculi uterqui, OU) erkennbar war. Bei schräger Einsicht in das Auge konnten teilweise die Ziliarfortsätze, an denen die Zonulafasern der Linse inserieren, erkannt werden. Die Linsen zeigten sich in physiologischer Lage. Die Funduskopie mittels indirektem Ophthalmoskop (Modell Omega, Fa. Heine) gestaltete sich wegen der Mydriasis sehr übersichtlich. Auch weiter peripher gelegene Fundusbereiche waren der Untersuchung leicht zugänglich. Pathologische Befunde ergaben sich hierbei nicht. Der mittels Tonometrie (Modell Tonopen XL, Fa. Mentor, Solan) bestimmte Intraokulardruck des rechten Auges (OD) betrug 16 mmHg, der des linken Auges (OS) 17 mmHg.

Bei der neuroophthalmologischen Untersuchung wurden Drohreflex, Blendreflex, Lid- und Korneareflexe sowie der Pupillarreflex (PLR) evaluiert. Die Pupillenreaktion OU erfolgte zwar prompt, war jedoch OU hochgradig unvollständig. Eine konsensuelle Reaktion des Partnerauges ließ sich deshalb nicht sicher feststellen. Im Anschluss an die Pupillenreaktion fand regelmäßig eine Dilatation statt, ohne dass der Lichtreiz unterbrochen wurde („pupillary escape“). Die selektive Beleuchtung der nasalen bzw. temporalen als auch der tapetalen und nichttapetalen Fundusareale wies hierbei keine Unterschiede auf. Droh- und Blendreflex waren OU nicht auslösbar. Der sensorische Lidreflex (N. facialis) wie auch der Korneareflex (N. trigeminus) waren indes OU vorhanden und prompt. Zur Visusprüfung wurden eine Positionierungs-Reaktionsprobe an einer Tischkante und ein Hindernisparcours durchgeführt. Erstere war OU negativ. Beim Hindernisparcours war zu beobachten, dass der Hund offenbar nur im Nahbereich noch etwas Wahrnehmung hatte. Er lief verhältnismäßig zügig z. B. in Richtung auf eine Wand oder eine ihn rufende Person zu, stoppte aber erst kurz vorher oder touchierte das Hindernis mit der Nase.

Ferner fiel der starre Blick des Tieres auf. Der Hund konnte bewegten Objekten nicht oder nur stark verzögert folgen. Er zeigt

den Habitus eines wegen Sehverlusts/-einschränkung desorientierten Tieres.

Aufgrund der unauffälligen Befunde im Bereich der optischen Medien sowie am Hintergrund der Augen erfolgte eine elektroretinographische Untersuchung (Model BPM 100, Fa. Retinographics). Das Elektroretinogramm (ERG) wurde durch Mittelung der Reaktionen von acht Lichtimpulsen (blue-light LED) nach fünfminütiger Dunkeladaptation abgeleitet und zeigte eine normale a- und b-Wellen-Formation (Abb. 2). Auch die entsprechenden Latenzzeiten der Amplituden lagen im Normalbereich. Die a-b-Wellen-Differenz betrug 48,3 µV OS und 62,8 µV OD.

Aufgrund des Vorberichts und der erhobenen Befunde wurde der Verdacht einer Intoxikation durch Ivermectin geäußert. Ein Zusammenhang mit der Aufnahme der Nachgeburt des Schafes wurde als nicht wahrscheinlich angesehen.

## Verlauf

Eine Therapie erfolgte nicht, da der Hund ungestört in der Lage war, Nahrung und Flüssigkeit aufzunehmen, und ansonsten ein normales Allgemeinbefinden aufwies.

Nach 24 Stunden zeigte der Hund bereits eine deutlich verbesserte Orientierung und nahm Objekte gezielter wahr. Die Zuckungen der Gesichtsmuskeln waren nicht mehr vorhanden. Die Mydriasis OU bestand weniger extrem, wenngleich der PLR beidseits noch immer nicht zuverlässig ausgelöst werden konnte. Nach weiteren 48 Stunden normalisierte sich der PLR, sodass drei Tage nach der Erstvorstellung eine vollständige Restitution festgestellt werden konnte.

Es wurde eine genetische Untersuchung auf Vorliegen der nt230(del4)-MDR1-Gen-Mutation eingeleitet. Die Untersuchung ergab den MDR1<sup>+/+</sup> homozygot intakten Genotyp, d. h. ein Gendefekt auf dem Locus MDR1 nt230(del4) war nicht nachweisbar.

## Fall 2 (BS)

### Patient und Anamnese

Eine neunjährige, unkastrierte Golden-Retriever-Hündin zeigte seit 24 Stunden plötzlich auftretend massive Sehstörungen und Orientierungslosigkeit. Laut Vorbericht hatte der Besitzer der Hündin am Vortag sein Pferd mit der Wurmpaste Eqvalan® (Wirkstoff: Ivermectinum 18,7 mg, Excipients ad pastam pro 1 g) entwurmt. Bei der oralen Verabreichung der Paste fiel eine unbestimmte Menge zu Boden, die die Hündin aufnahm. Die Sehstörungen wurden wenige Stunden später bemerkt.

### Allgemeinuntersuchung

Abgesehen von der Blindheit ergab die Allgemeinuntersuchung der Hündin keine auffälligen Befunde.

### Ophthalmologische Untersuchung

Beide Augen waren weit aufgerissen, Droh- und Blendreflex nicht auslösbar. Die stark dilatierten Pupillen reagierten auf Licht nur geringfügig und nicht nachhaltig („pupillary escape“). Die Unter-

suchung der vorderen Augenabschnitte mit einer Handspaltlampe (Clement-Clarke) ergab keine pathologischen Befunde. Die indirekte Ophthalmoskopie (Omega 100, Heine) zeigte beidseits eine völlig unauffällige Netzhaut. Bei der direkten Ophthalmoskopie (Beta 2000, Heine) waren mit Ausnahme einer starken, aber rasetyptischen Myelinisierung der Papillen keine auffälligen Befunde der Sehnervenscheiden zu erkennen.

Der Augendruck (Pneumatograph<sup>®</sup>, Digilab) zeigte sich mit 18 mmHg rechts und 21 mmHg links normal. Um eine mögliche Retrobulbärneuritis von einer Erkrankung der äußeren Netzhautschichten zu unterscheiden, wurde eine ERG (Model BPM 100, Fa. Retinographics) aufgezeichnet. Die Ableitung erfolgte in Narkose durch Mittelung der Reaktionen von acht Lichtimpulsen (white-light LED) nach 15-minütiger Dunkeladaptation. Dabei ließen sich normale Netzhautfunktionen feststellen mit Amplituden und Gipfelzeiten der a- und b-Wellen im Referenzbereich (b-Welle um 105  $\mu$ V OU).

Es wurde eine Retrobulbärneuritis diagnostiziert.

### Weitere Untersuchungen

Eine hämatologische und blutchemische Untersuchung ergab unauffällige Werte. Die Titer für *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* waren negativ. Um eine granulomatöse Meningoenzephalitis (GME) auszuschließen, wurde eine Liquorpunktion vorgenommen. Die Liquoruntersuchung ergab ebenfalls keine pathologischen Befunde. Auch bei der in gleicher Narkose durchgeführten computertomographischen Studie konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

### Therapie und Verlauf

Es wurde eine symptomatische Behandlung der Retrobulbärneuritis eingeleitet. Initial erhielt die Hündin zweimal täglich 1 mg/kg KM Prednisolon per os. Bereits 12 Stunden nach der ersten Applikation bemerkte der Besitzer eine Verbesserung des Sehvermögens. Nach weiteren 24 Stunden schätzte er den Visus der Hündin als normal ein. Die Prednisolonbehandlung wurde daraufhin über einen Zeitraum von vier Wochen ausgeschlichen. Ein Rezidiv trat nicht auf.

Bei einem sechsjährigen, männlichen Flat Coated Retriever stellen wir ein ähnliches Vergiftungsbild fest. Der Rüde hatte ein für Pferde zugelassenes Präparat (Equest<sup>®</sup> = Moxidectin 18,92 mg, Conserv.: Benzylalkohol, Excip. ad gelatum pro 1 g) aufgenommen. Die unter anderem durchgeführte elektroretinographische Untersuchung war unauffällig.

Der MDR1-Genotyp beider Hunde ist unbekannt. Da diese Fälle sechs bzw. 13 Jahre zurückliegen, ließ sich ein Gentest auch nicht nachträglich durchführen. Bisher wurde die nt230(del4)-MDR1-Mutation beim Retriever nicht nachgewiesen, sodass diese Hunde mit hoher Wahrscheinlichkeit den Genotyp MDR1<sup>+/+</sup> hatten.

## Fall 3 (CD)

### Patient, Anamnese und klinische Symptomatik

Bei der Antiparasitenbehandlung eines Isländers (ca. 350–400 kg KM) mit Ivermectin-Wurmpaste (Ivomec P<sup>®</sup>) gelangte eine unbekannte Menge des Präparates auf die Stallgasse. Eine zweijährige Colliehündin nahm etwas davon auf und zeigte bereits eine Stunde später typische Vergiftungserscheinungen wie Apathie, Tremor und Hypersalivation. Nach weiteren zwei Stunden stellten sich eine beidseitige Mydriasis, Sehunvermögen, Bewegungs- und Koordinationsstörungen, Somnolenz, Hypersalivation, generalisierter Tremor, Tachykardie und Dyspnoe ein.

### Labordiagnostische Befunde und Therapie

Die Blutuntersuchung (Vettest 8008/QBC Analyser) ca. drei Stunden nach Ivermectin-Aufnahme ergab eine Hypovolämie mit Hyperalbuminämie bei mäßiger Granulozytose sowie Neutro- und Eosinophilie. Die Retikulozytenzahl lag bei 0,3%. Die Werte von alkalischer Phosphatase (220 U/l), Cholesterin (419 mg/dl) und Glukose (162 mg/dl) waren mäßig erhöht, während ALT (< 10 U/l) und Amylaseaktivität (410 U/l) sowie die Phosphatkonzentration (1,6 mg/dl) erniedrigt waren.

Die Hündin wurde stationär aufgenommen. Die Notfallmaßnahmen umfassten Infusionstherapie mit Ringer-Laktat-Lösung, Gabe von Paraffinöl und Kohle per os, Applikation von Diazepam nach Wirkung.

### Verlauf

In der ersten Nacht nach Giftaufnahme verschlimmerten sich die Symptome dramatisch. Die Hündin lag komatös in Seitenlage und zeigte zwischenzeitlich starke Krämpfe, die von lautem Schreien begleitet waren. Diese Schrei-/Krampfphasen wurden immer wieder von komatösen Zuständen abgelöst. Neben der fortgesetzten Infusionstherapie (Ringer-Laktat-Lösung) erfolgte eine forcierte Diurese mit Furosemid (Dimazon<sup>®</sup>), um die Ivermectin-Ausscheidung zu beschleunigen. Am folgenden Tag wurde die Hündin über eine Schlundsonde ernährt (Convalescence Support, Royal Canine und a/d Diet, Hills). Die Verabreichung erfolgte oft und in kleinen Mengen, da die Magen-Darm-Motilität offensichtlich eingeschränkt war. Am zweiten Tag nach Ivermectinaufnahme zeigte die Hündin keine Krämpfe mehr und befand sich dauerhaft komatös in Seitenlage. Da der Lidreflex nicht mehr vorhanden war, wurden zum Hornhautschutz befeuchtende Augensalben appliziert. Am Abend des dritten Tages war die Hündin erstmals wieder ansprechbar, allerdings nur nach lautem, mehrmaligem Rufen. Eine erste selbstständige Wasser- und Futteraufnahme war assistiert möglich. In einer am vierten Tag durchgeführten Blutbildanalyse waren alle Blutwerte wieder im Referenzbereich mit Ausnahme einer erniedrigten Amylaseaktivität (292 U/l) und Harnstoffkonzentration (6 mg/dl) sowie einem erhöhten Cholesterinwert (360 mg/dl). Am fünften Tag konnte sich die Hündin robbend fortbewegen und nahm wieder Geräusche und Personen wahr. Da sie auch zur selbstständigen Futteraufnahme in der Lage

war, wurde sie nach Hause entlassen. Am achten Tag zeigte die Hündin wieder aktive Momente, fiel aber immer wieder in einen somnolenten Zustand zurück. Sie konnte eigenständig gehen, wies jedoch eine Gangunsicherheit auf und wirkte orientierungslos. Die Hauptproblematik lag zu dieser Zeit im Magen-Darm-Bereich. Bei der Palpation war der Magen schmerzhaft. Es wurde starkes Regurgitieren beobachtet, bei dem es jedoch nicht zum Erbrechen kam. Die Hündin wurde zu Hause bis zum 10. Tag weiterhin infundiert und erhielt zweimal täglich 5 mg/kg KM Cimetidin intravenös. Bei einer Wiedervorstellung der Hündin am Tag 16 nach Ivermectin-Aufnahme waren keine Koordinationsstörungen und Gangunsicherheiten mehr zu beobachten. Das Tier zeigte wieder seine frühere Aktivität.

Am zweiten Tag nach der Ivermectin-Aufnahme wurde ein genetischer Test auf Vorliegen der nt230(del4)-MDR1-Mutation durchgeführt. Er ergab das Vorliegen des homozygot defekten Genotyps MDR1<sup>-/-</sup>.

## Diskussion

Der große therapeutische Erfolg der Avermectine liegt in ihrer Fähigkeit, in relativ niedrigen, für den Wirtsorganismus völlig ungefährlichen Konzentrationen ein breites Spektrum verschiedener Endo- und Ektoparasiten abzutöten. Der antiparasitäre Wirkungsmechanismus der Avermectine beruht auf einer Förderung der präsynaptischen Freisetzung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter, sowie einer Potenzierung dessen Wirkung am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (9, 16, 17). Nach GABA-Bindung öffnet sich ein Chloridkanal im Rezeptorkomplex und paralyisiert die Zielzelle infolge Hyperpolarisation (2, 7, 22). Bei Nichtvertebraten kommt GABA als Neurotransmitter in peripheren Nerven und im Bereich der Nerven-Muskel-Übertragung (neuromuskuläre Endplatte) vor. Bei den Säugetieren hingegen sind die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf das zentrale Nervensystem (ZNS) beschränkt, weshalb sich toxische Wirkungen von Ivermectin vornehmlich dort manifestieren (26). Ferner haben Avermectine zu den Neurorezeptoren der Wirbeltiere (insbesondere GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren) eine viel geringere Affinität als zu den Neurorezeptoren der Invertebraten (insbesondere Glutamat- und GABA-Rezeptoren). Dies wurde in Bindungsstudien an Membranpräparationen gezeigt (9, 17, 26). Neurotoxische Wirkungen treten somit nur bei sehr hoher Ivermectindosis oder bei Fehlen von MDR1 auf (18, 21).

Mit den Avermectinen eng verwandt und ebenso ein makrozyklisches Lakton ist Moxidectin. Es unterscheidet sich vom Ivermectin durch eine ungesättigte Seitenkette an Position C25 und der fehlenden Disaccharid-Gruppe an Position C13 des Makrolidrings. Daraus resultieren Unterschiede im physikalischen und pharmakokinetischen Verhalten. Die klinische Vergiftungssymptomatik ähnelt der von Ivermectin auffällig. So zeigen Hunde mit MDR1-Gen-Defekt ebenfalls eine reduzierte Toxizitätsschwelle gegenüber Moxidectin.

Die in den Fällen 1 und 2 beschriebene Intoxikation resultierte aus der Aufnahme einer relativ hohen Dosis Ivermectin von einem für Pferde vorgesehenen Präparat (Ivermectin-Paste für Pferde enthält in der Regel 120 mg Ivermectin/6,4 g Paste). In einer kontrollierten Studie wurden bei einer oralen Einzeldosis von 2 mg/kg KM Ivermectin keine klinischen Zeichen einer Vergiftung beobachtet, während ab einer Dosis von 2,5 mg/kg KM eine ausgeprägte Mydriasis festzustellen war. Diese wird in noch höheren Konzentrationen von weiteren neurologischen Symptomen wie Ataxie, Tremor und Hypersalivation begleitet (19). Während erste Ivermectin-Vergiftungserscheinungen bei anderen Spezies, z. B. dem Affen, vor allem in Form von Erbrechen auftreten, gilt beim Hund eine Mydriasis als charakteristisches Initialsymptom einer Ivermectin-Vergiftung (12). Entsprechend erhalten Tierbesitzer den Hinweis, bei der Therapie der Demodikose mit Ivermectin den Pupillenreflex ihres Hundes als Monitoring-Kriterium für das Erkennen einer Überdosierung zu überprüfen.

Auf Grundlage der hier dargestellten Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Ivermectin-Intoxikation beim Hund müssen wir davon ausgehen, dass die in Fall 1 und 2 beschriebenen Tiere eine Dosis von mehr als 2 mg/kg KM Ivermectin aufgenommen haben. Dies entspricht etwa ein Drittel bis ein Viertel des gesamten Inhalts einer Applikationsspritze mit 120 mg Wirkstoffinhalt (z. B. Ivomec P®). Im Gegensatz zu diesen Tieren sind Hunde mit homozygotem MDR1-Gen-Defekt (MDR1<sup>-/-</sup>), wie in Fall 3 beschrieben, sehr empfindlich gegenüber Ivermectin. Die niedrigste orale Einzeldosis, die bei diesen Hunden ohne klinische Vergiftungszeichen bleibt, liegt bei 60  $\mu$ g/kg KM. Daher kann Ivermectin in der Dosierung von 6  $\mu$ g/kg KM auch sicher bei Hunden mit MDR1-Gen-Defekt zur Herzwurmprophylaxe eingesetzt werden. Eine Dosis von 100  $\mu$ g/kg KM und höher führt bereits zu massiven neurologischen Symptomen wie Mydriasis, Tremor, Ataxie und Vomitus. Bei Konzentrationen > 150  $\mu$ g/kg KM werden die Hunde komatös und versterben (LD<sub>50</sub> von 200  $\mu$ g/kg KM) im Koma (12, 15, 25, 27). Ein spezifisches Antidot ist nicht bekannt. Die Therapie beschränkt sich daher auf den Erhalt der Vitalfunktionen. Behandlungsversuche mit Picrotoxin und Physostigmin konnten die Prognose insgesamt nicht verbessern (23, 24).

Der MDR1-Gen-Defekt trat vermutlich bei einem einzigen Foundertier vor mehr als 200 Jahren auf und kann heute dementsprechend in zum Teil wenig verwandten Hunderassen nachgewiesen werden: Collie, Australian Shepherd, Shetland Sheepdog, Old English Sheepdog, Border Collie, Wäller, Weißer Schäferhund, English Shepherd, Longhaired Whippet, McNab und Silken Windhound (11, 14). Die Rasse Collie ist dabei mit Abstand am häufigsten (30–40%) von dem homozygoten Genotyp MDR1<sup>-/-</sup> betroffen. Daher sind bei dieser Rasse auch die meisten iatrogenen Ivermectin-Intoxikationen bekannt. Für die Rassen Labrador Retriever und Golden Retriever wurde der MDR1-Defekt bisher nicht nachgewiesen, sein Auftreten bei diesen Rassen kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Zwar gibt es bisher keine dokumentierten Fälle, aber es ist nicht unwahrscheinlich, dass Hunde mit heterozygotem MDR1<sup>+/-</sup>-Geno-

typ bei der Aufnahme hochdosierter Ivermectin-Präparate anfälliger für die Entwicklung neurotoxischer Symptome sind als homozygote Hunde mit Genotyp MDR1<sup>+/+</sup>.

Wegen der GABA-agonistischen Wirkung sind neurologische Intoxikationserscheinungen durch Avermectine grundsätzlich als panzerebrale Störungen zu erwarten (27). GABA findet sich beim Säuger im Zerebellum, im zerebralen und limbischen Kortex, im extrapyramidalen System und in der Retina (8). Im Bereich der Retina kann GABA in den amakrinen Zellen der Retina nachgewiesen werden. Der GABA-Plasmamembran-Transporter GAT-1 wird von diesen Zellen exprimiert und scheint bei der Neurotransmission durch die Retina im Anschluss an die Phototransduktion von Bedeutung zu sein (5). Aufgrund des unauffälligen elektroretinographischen Bildes muss bei den beschriebenen Vergiftungsfällen (Fall 1 und 2 und Fall einer Moxidectin-Intoxikation) jedoch von einem weitgehenden Erhalt der elektrischen Retinafunktionen im Bereich der Photorezeptoren als auch der Überleitung an die Ganglienzellen der Retina ausgegangen werden. Die intoxikationsbedingten Störungen sind vielmehr postretinal zu vermuten; zum einen subkortikal, da der Pupillarreflex hochgradig unvollständig und offenbar dereguliert ausfällt ("pupillary escape"). Zum anderen ist zusätzlich eine kortikale Dysfunktion naheliegend, die die Einschränkung der Sehfähigkeit erklären würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die klinischen Erscheinungen nach einer Ivermectin-Vergiftung bei Hunden mit und ohne MDR1-Gen-Defekt grundsätzlich ähnlich sind. Über die Schwere der Symptomatik entscheidet neben der aufgenommenen Menge aber vor allem der MDR1-Genotyp. Bei homozygoter Mutation im MDR1-Gen kommt es zu einer starken Anreicherung von Ivermectin im ZNS, wodurch neurotoxische Symptome bereits bei 1/100 der Ivermectin-Dosis im Vergleich zum MDR1<sup>+/+</sup>-Genotyp auftreten. Hunde mit MDR1-Defekt zeigen bereits bei therapeutischer Dosierung (0,2 mg/kg KM) schwere neurotoxische Symptome. Bei Hunden mit dem Genotyp MDR1<sup>+/+</sup> bedarf es für eine Ivermectin-Intoxikation hingegen einer Aufnahme in höherer Konzentration (z. B. Pferde-Wurmpaste). Charakteristischweise tritt hier eine Mydriasis verbunden mit einer deutlichen Visuseinschränkung auf, die die betroffenen Hunde meist zwei bis drei Tage lang beeinträchtigt. Aufgrund der noch nicht endgültig geklärten Rasseprädisposition für den MDR1-Gen-Defekt muss jedoch auch bei nicht mit dem Collie verwandten Rassen mit stärkeren Intoxikationserscheinungen und möglicherweise sogar Todesfällen nach der Aufnahme von Ivermectin-Paste gerechnet werden.

## Fazit für die Praxis

Ivermectin-Wurmpaste ist ein weit verbreitetes Antiparasitikum in der Pferdehaltung. Hunde können anlässlich der Entwurmung von Pferden diese Wurmpaste aufnehmen, insbesondere wenn diese auf den Boden gelangt. Die Intoxikationssymptomatik variiert in Abhängigkeit vom vorliegenden MDR1-Genotyp. Das ty-

pische und oftmals einzige Leitsymptom bei Hunden mit intaktem MDR1-Gen ist eine maximale Mydriasis in Verbindung mit Visuseinschränkung. Beide Erscheinungen sind transient und bedürfen in der Regel keiner Therapie. Anders verhält es sich bei Hunden mit defektem MDR1-Gen, bei denen teils intensivmedizinische Maßnahmen erforderlich werden. Je nach Dosis kann auch ein Exitus letalis resultieren.

## Literatur

1. Benz GW, Roncalli RA, Gross SJ. Use of Ivermectin in Cattle, Sheep, Goats, and Swine. In: Ivermectin and Abamectin. Campbell WC, ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer 1989.
2. Bloomquist JR. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Arch Insect Biochem Physiol* 2003; 54: 145–156.
3. Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Omura S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 15: 361–367.
4. Campbell WC. Ivermectin and heartworm. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1987; 2: 48–55.
5. Casini G, Rickman DW, Brecha NC. Expression of the  $\{\gamma\}$ -Aminobutyric Acid (GABA) Plasma Membrane Transporter-1 in Monkey and Human Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* Apr 2006; 47 (4): 1682–1690.
6. Chiu SHL, Lu AYH. Metabolism and tissue residues. In: Ivermectin and Abamectin. Campbell WC, ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer 1989.
7. Dent JA, Smith MM, Vassilatis DK, Avery L. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2674–2679.
8. Dorman D. Neurotoxic drugs in dogs and cats. In: *Current Veterinary Therapy XII*. Kirk RW, Bonagura JD, eds. Saunders 1995; 1140–1145.
9. Drexler G, Sieghart W. Evidence for association of a high affinity ivermectin binding site with the benzodiazepine receptor. *Eur J Pharmacol* 1984; 101: 201–207.
10. Geyer J, Doring B, Godoy JR, 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* 2005; 28: 95–99.
11. Geyer J, Doring B, Godoy JR, 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* 2005; 28: 545–551.
12. Lankas GR, Gordon LR. Toxicology. In: Ivermectin and Abamectin. Campbell WC, ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer 1989.
13. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 727–733.
14. Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, Mealey KL, Pedersen NC. 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 USA* 2004.
15. Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS Jr., Di Pietro JA. Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res* 1987; 48: 684–685.
16. Pong SS, Wang CC, Fritz LC. Studies on the mechanism of action of ivermectin B1a: stimulation of release of gamma-aminobutyric acid from brain synaptosomes. *J Neurochem* 1980; 34: 351–358.
17. Pong SS, Wang CC. Avermectin B1a modulation of gamma-aminobutyric acid receptors in rat brain membranes. *J Neurochem* 1982; 38: 375–379.
18. Pulliam JD, Seward RL, Henry RT, Steinberg SA. Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Vet Med* 1985; 80: 33–40.
19. Pulliam JD, Preston JM. Safety of Ivermectin in target animals. In: Ivermectin and Abamectin. Campbell WC, ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer 1989.
20. Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, 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: 85–91.

Ivermectin-Intoxikation bei drei Hunden mit und ohne MDR1-Gen-Defekt durch ein für Pferde zugelassenes orales Antiparasitikum  
*J. Linek, B. Spiess, C. Dallmeyer, J. Geyer*

21. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP. 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: 491–502.
22. Sigel E, Baur R. Effect of ivermectin B1a on chick neuronal gamma-aminobutyrate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 1987; 32: 749–752.
23. Sivine F, Plume C, Ansay M. Picrotoxin, the antidote to ivermectin in dogs? *Vet Rec* 1985; 116: 195–196.
24. Tranquilli WJ, Paul AJ, Seward RL, Todd KS, Di Pietro JA. Response to physostigmine administration in collie dogs exhibiting ivermectin toxicosis. *J Vet Pharmacol Ther* 1987; 10: 96–100.
25. Tranquilli WJ, Paul AJ, Seward RL. Ivermectin plasma concentrations in collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis. *Am J Vet Res* 1989; 50: 769–770.
26. Turner MJ, Schaeffer JM. Mode of action of Ivermectin. In: *Ivermectin and Abamectin*. Campbell WC, ed. New York, Berlin, Heidelberg: Springer 1989.
27. Vaughn DM, Simpson ST, Blagburn BL, Whitmer WL, Heddens-Mysinger R, Hendrix CM. Determination of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and pressure in the cerebrospinal fluid of collie dogs following administration of ivermectin. *Vet Res Comm* 1989; 13, 47–55.

Dr. Jens Linek  
 Rodigallee 85  
 22043 Hamburg  
 E-Mail: Jens@Linex.de  
 www.tsh.de

## REZENSION

### Zahnmedizin bei Klein- und Heimtieren

C. Gorrel, 224 S., 219 farb. Abb., Berlin: Lehmanns Fachbuchhandlung 2006, ISBN 3-437-57210-5, € 48,00.

Dieses Buch über Zahnmedizin bei Klein- und Heimtieren wendet sich an den niedergelassenen Kleintierpraktiker. Die Autorin Cecilia Gorrel, die weltweit als Koryphäe auf dem Gebiet der tiermedizinischen Zahnheilkunde anerkannt ist und sich intensiv mit Erkrankungen der Mundhöhle bei Hunden und Katzen beschäftigt, stellt mit dem vorliegenden Werk eine ausgewogene Zusammenstellung der relevanten Themen in der tierärztlichen Zahnheilkunde zur Verfügung.

In 15 Kapiteln informiert das Buch praxisorientiert über das notwendige Instrumentarium und dessen Verwendung in der tierärztlichen Zahnheilkunde, die Ätiologie und Pathogenese von Zahnerkrankungen sowie deren Prävention, Diagnostik und Therapie. Hierbei werden alle Themengebiete besprochen, die für

den Praktiker von Bedeutung sind, angefangen bei der Befunderhebung und Anfertigung hochwertiger Röntgenaufnahmen im Zahn- und Kieferbereich über die häufigsten zahnheilkundlichen Befunde mit besonderem Augenmerk auf entzündliche und degenerative Erkrankungen der Zähne und des Zahnhalteapparates bis hin zu Entwicklungsstörungen und Zahnfehlstellungen. Das Vorgehen bei Notfallsituationen nach Traumata im Bereich der Kiefer und Zähne wird ebenso thematisiert wie die Wurzelbehandlung juveniler und fertig entwickelter Zähne.

Ein eigenes Kapitel widmet die Autorin den odontoklastischen resorptiven Läsionen der Zahnhartsubstanz bei Hauskatzen. Sie zollt damit der Tatsache Tribut, dass Patienten mit dieser schmerzhaften Erkrankung immer häufiger in der Praxis vorgestellt werden.

Ein Kapitel beschäftigt sich mit den Zahnerkrankungen bei Hasenartigen und Nagetieren. Da sich diese kleinen Heimtiere immer größerer Beliebtheit erfreuen,

ist das im Buch vermittelte Wissen um die tierartlichen Besonderheiten und Erkrankungen von Kiefern und Zähnen für den Praxisalltag unverzichtbar.

Das Buch ist in klarer, auch für den zahnmedizinischen Laien leicht verständlicher Form geschrieben und ergänzt die instruktiven Texte und Tabellen sinnvoll durch zahlreiche farbige Abbildungen klinischer Fälle und mit schematischen Zeichnungen. Jedes Kapitel wird abschließend in Stichpunkten zusammengefasst.

Das Werk stellt ein unverzichtbares Handbuch für alle interessierten Kleintierpraktiker dar. Für Einsteiger in die Zahnheilkunde ist es sehr zu empfehlen, da es die notwendigen Grundlagen leicht verständlich vermittelt. Aber auch Kleintierpraktiker, die bereits über Erfahrung auf diesem Gebiet der Tiermedizin verfügen, werden dem Buch neue Anregungen und viel Wissenswertes entnehmen können.

Martin Kramer, Thorsten Förnges, Gießen

## 10. Anhang - Publikationen

### 10) HELD S, GAMER I, HASSDENTEUFEL E, NEIGER R & GEYER J (2012)

Therapie einer Avermectin-Intoxikation bei zwei Hunden mit homozygotem nt230(del4) MDR1-Gendefekt durch Lipidinfusion.

*Kleintierpraxis 57, Ausgabe 6, Seiten 313-319*

DOI: 10.2377/0023-2076-57-313

<http://vetline.de/ivermectin-mdr1-vergiftung-lipidinfusion-therapie/150/3231/69952/>

DOI 10.2377/0023-2076-57-313

Klinik für Kleintiere an der Justus-Liebig-Universität Gießen<sup>1</sup>, Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen<sup>2</sup>

## Therapie einer Avermectin-Intoxikation bei zwei Hunden mit homozygotem nt230(del4)-MDR1-Gendefekt durch Lipidinfusion

Susanne Held<sup>1</sup>, Irina Gramer<sup>2</sup>, Esther Haßdenteufel<sup>1</sup>, Reto Neiger<sup>1</sup>, Joachim Geyer<sup>2</sup>

### Zusammenfassung

Avermectine können bei Hunden mit MDR1-Gendefekt lebensbedrohliche Intoxikationen auslösen. Es war das Ziel, durch eine Lipidinfusion die Symptomatik und die Prognose derartiger Fälle zu verbessern. Die Dokumentation erfolgte anhand von zwei Vergiftungsfällen. Zwei Hunde mit homozygotem nt230(del4)-MDR1-Gendefekt wurden mit neurologischen Symptomen in der Klinik vorgestellt. Einem 11 Jahre alten Kurzhaar-Collie war zuvor eine subkutane Injektion mit 1 mg/kg Doramectin verabreicht worden. Aufgrund der hohen Substanzmengen wurde eine insgesamt schlechte Prognose gegeben. Ein fünfjähriger Australian Shepherd hatte eine größere Menge Ivermectin-haltiger Entwurmungspaste für Pferde aufgenommen. Der Hund zeigte bei der Erstvorstellung eine mittelgradige Ataxie und der Zustand verschlechterte sich zunehmend über 24 Stunden. In beiden Fällen wurde eine Lipidinfusion mit einer 10%igen Emulsion eingeleitet, welche aus einer Bolusinjektion mit 4 ml/kg über 60 Minuten und einer anschließenden Dauerinfusion mit 1,5–2 ml/kg/h über vier Stunden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen bestand. Beide Hunde zeigten nach Lipidinfusion eine kontinuierliche Verbesserung der Symptomatik und konnten nach einigen Tagen entlassen werden. Selbst, wenn nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann, dass die hier berichteten Fälle auch ohne Lipidinfusion eine identische Rekonvaleszenz gezeigt hätten, hatte das verwendete Infusionsschema, unter Berücksichtigung der bisherigen klinischen Erfahrung mit derartigen Vergiftungsfällen, eine positive Wirkung auf den Schweregrad und den Verlauf der Avermectin-Intoxikation. Da bei einer Lipidinfusion keine gravierenden Nebenwirkungen zu erwarten sind und für die Therapie von Avermectin-Intoxikationen keine spezifischen Maßnahmen zur Verfügung stehen, kann der Einsatz einer Lipidinfusion empfohlen werden. Selbstverständlich sind alle anderen unterstützenden Maßnahmen weiterhin anzuwenden, eine Senkung der Mortalitätsrate ist jedoch durch zusätzliche Lipidinfusion denkbar.

### Schlüsselwörter:

Ivermectin, MDR1, Vergiftung, Lipidinfusion, Therapie

### Summary

*Lipid-infusion therapy of ivermectin-induced neurotoxicosis in two dogs with homozygous nt230(del4) MDR1 mutation*  
Avermectins can provoke life-threatening neurotoxicosis in MDR1-mutant dogs due to their highly increased permeability across the blood-brain barrier in the absence of MDR1. Therapeutic options are still limited; therefore, we decided to treat this type of intoxication in two dogs using lipid infusion. The two dogs with homozygous nt230(del4) MDR1 mutation were presented with neurological symptoms. An 11-year-old Smooth Collie had received 1 mg/kg doramectin by subcutaneous injection. Based on the high dosage, a poor outcome was assumed. Secondly, a 5-year-old Australian Shepherd had ingested ivermectin vermicide paste licensed for use in horses. Initially, the dog showed mild ataxia, but its depression dramatically increased within 24 hours. In both cases, a 10% lipid infusion was used as a new treatment option, with a daily bolus infusion of 4 ml/kg over 60 minutes followed by infusion of 1.5–2.0 ml/kg/h over four hours for five days. Both dogs showed continuous improvement after lipid infusion and were discharged without any remaining symptoms of neurotoxicosis. Although we cannot definitely exclude that in both dogs the improvement and outcome would have been the same without lipid infusion, based on our clinical experience with such intoxications, both dogs seemed to benefit from the lipid infusion scheme used in terms of accelerated improvement and positive outcome. As no severe adverse effects are to be expected from repeated lipid infusion and no specific treatment is available for ivermectin-induced intoxications, lipid infusion can be recommended as a new treatment option.

### Keywords:

ivermectin, MDR1, neurotoxicosis, lipid infusion, treatment

### Einleitung

Bereits kurz nach der Einführung von Ivermectin als Leitsubstanz der neuen antiparasitären Substanzklasse der makrozyklischen Laktone zeigte sich, dass einige Hunderrassen, insbesondere der Collie, mit einer ausgeprägten Neurotoxizität auf diese Arzneistoffe reagierten (Pulliam

et al., 1985). So traten schon bei einer subtherapeutischen Dosierung von 100–170 µg/kg Ivermectin neurotoxische Symptome wie Ataxie, Mydriasis, Desorientiertheit, Sehverlust, Hypersalivation und Stupor auf (Houston et al., 1987; Paul et al., 1987; Tranquilli et al., 1987, 1989). Höhere Dosierungen im üblichen therapeutischen Bereich von

oral 200 µg/kg Ivermectin führten sogar zu komatösen Zuständen und dem Versterben einzelner Tiere (Vaughn et al., 1989; Hopper et al., 2002; Merola et al., 2009).

Heute ist der molekulare Hintergrund dieser ausgeprägten Ivermectin-Sensitivität bekannt. Er liegt in einer genetischen 4-Basenpaardeletion [nt230(del4)] im Multidrug-Resistance(MDR)1-Gen des Hundes begründet (Mealey et al., 2001). Dieses Gen kodiert für das sogenannte MDR1-P-Glykoprotein, welches normalerweise in der Blut-Hirn-Schranke exprimiert wird und hier durch einen ATP-getriebenen Effluxtransport die Gehirnerneuerung von lipophilen Arzneistoffen, wie dem Ivermectin, massiv limitieren kann (Schinkel et al., 1994; Geyer et al., 2009). Hunde mit homozygoter nt230(del4)-MDR1-Mutation (MDR1<sup>-/-</sup>) können dagegen kein funktionsfähiges P-Glykoprotein bilden, sodass diese Schutzfunktion in der Blut-Hirn-Schranke verloren ist und Ivermectin massiv in das Gehirn eindringen kann (Geyer und Janko, 2012). Hier vermittelt Ivermectin über eine Interaktion mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor eine massive zentrale Depression, welche sich in den bereits beschriebenen klinischen Anzeichen äußert (Sigel und Baur, 1987; Huang und Casida, 1997; Dawson et al., 2000).

Zu den vom nt230(del4)-MDR1-Defekt betroffenen Hunderassen zählen neben dem Collie auch Australian Shepherd, Shetland Sheepdog, Old English Sheepdog, Weißer Schäferhund sowie acht weitere Rassen und viele Mischlingshunde (für eine Übersicht siehe Gramer et al., 2011). Auftreten und Verlauf einer Intoxikation durch Ivermectin oder andere makrozyklische Laktone bei MDR1<sup>-/-</sup>-Hunden sind entscheidend von der Dosierung, der Applikationsart und der verwendeten Einzelsubstanz abhängig (Geyer und Janko, 2012). Daher ist es für die Diagnose, aber auch für die Therapie und Prognose einer solchen Intoxikation entscheidend, die genauen Angaben der Applikation zu ermitteln und den MDR1-Genstatus des Hundes zu bestimmen. Ersteres ist jedoch häufig nicht möglich, wenn die Intoxikation durch eine Aufnahme von hochdosierter „Wurmpaste“ im Rahmen der Entwurmung von Pferden durch Unachtsamkeit geschieht (Linek et al., 2007).

Derzeit ist kein spezifisches Antidot einer Ivermectin-Intoxikation bekannt. Daher bleibt die Behandlung bisher auf symptomatische, intensivmedizinische Maßnahmen beschränkt. Nach oraler Aufnahme oder Verabreichung der Substanz zielt diese Therapie zunächst auf eine Verminderung der intestinalen Absorption ab. Möglich ist der Einsatz von Aktivkohle (Roder und Stair, 1998). Um eine Verminderung der Magensäuresekretion und somit einen gewissen Schutz des Magen-Darm-Traktes zu erreichen, ist die Gabe eines Protonenpumpen-Hemmers wie z. B. Omeprazol oder Pantoprazol angezeigt. Zusätzlich kann bei Übelkeit oder Erbrechen ein Antiemetikum wie der Neurokinin-1-Rezeptorantagonist Maropitant gegeben werden. Bei nicht mehr ansprechbaren Hunden wurde die Gabe von Physostigmin (40 µg/kg Physostigmin, langsam zweimal tgl. i. v. appliziert) erprobt (Tranquilli et al., 1987; Nelson et al., 2003). Diese Maßnahme führt zu einer unspezifisch über Acetylcholin vermittelten zentralen Stimulation und peripheren parasymphomimetischen Wirkung, was die Ansprechbarkeit der Hunde kurzfristig verbesserte (Tranquilli et al., 1987). Eine Applikation von Physostigmin kann aber auch in der Phase der Rekonvaleszenz sinnvoll sein, z. B. vor der Fütterung oder vor einem assistierten Lauftraining (Geyer und Janko, 2012). Trotz der dokumen-

tierten kurzfristigen klinischen Besserung führte Physostigmin jedoch weder zu einer schnelleren Rekonvaleszenz noch zu einer Verbesserung der Prognose (Tranquilli et al., 1987). Auch der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Blocker Picrotoxin wurde als experimentelles Antidot einer Ivermectin-Intoxikation erprobt und zeigte nach einer Infusion mit 1 mg/min über acht Minuten eine Verbesserung der Depression. Allerdings provozierte diese Infusion starke klonische Krämpfe, welche wiederum therapiebedürftig waren (Sivine et al., 1985). Darüber hinaus gibt es Hinweise in der Literatur, dass der spezifische Benzodiazepin-Antagonist Flumazenil bei der Ratte zentrale Ivermectin-Effekte unterdrücken kann (Trai-lovic und Nedeljkovic, 2011). Bisher gibt es jedoch keine eindeutigen Hinweise darauf, dass MDR1-defekte Hunde bei einer Ivermectin-Intoxikation eine Besserung der Symptomatik durch Flumazenil zeigen (eigene Beobachtungen). Neuere Berichte aus der Humanmedizin haben gezeigt, dass die Infusion einer Sojabohnenöl-in-Wasser-Emulsion (Intralipid® 20 %), welche für die parenterale Ernährung entwickelt und zugelassen wurde, auch bei der Therapie von Intoxikationen mit lipophilen Arzneistoffen hilfreich sein kann (Weinberg, 2006). In der Veterinärmedizin wurde diese Lipidinfusion bereits in der Therapie von Intoxikationen mit Moxidectin (bei einem 16 Wochen alten Jack Russel Terrier) und mit Ivermectin (bei einer Europäischen Kurzhaarkatze und einem Border Collie) angewendet und zeigte eine positive Wirkung (Crandell und Weinberg, 2009; Pritchard, 2010; Clarke et al., 2011). Allerdings wurden diese Therapieversuche an MDR1-intakten Tieren durchgeführt, bei welchen auch ohne Therapie, selbst bei initial schwerem Vergiftungsverlauf, mit einer raschen Verbesserung gerechnet werden muss (Geyer und Janko, 2012). Im vorliegenden Artikel beschreiben wir den Einsatz einer Lipidinfusion bei zwei homozygot MDR1-defekten Hunden, welche aufgrund der hohen aufgenommenen Arzneistoffmenge an Ivermectin bzw. Doramectin eine schlechte Prognose hatten.

## Fallbeschreibung Fall 1

### Anamnese

Ein etwa elf Jahre alter, männlich kastrierter Kurzhaar-Collie (19,0 kg) wurde im Notdienst vorgestellt. Vorberichtlich hatte er sechs Tage zuvor breiigen Durchfall abgesetzt. Die daraufhin verabreichte orale Wurmkur hatte der Rüde erbrochen. Vier Tage vor der Vorstellung erhielt der Hund eine subkutane Injektion mit 1 mg/kg Doramectin und 5 mg/kg Praziquantel. Einen Tag nach Applikation entwickelte er Nervosität, Ataxie, Inkontinenz und erbrach einmalig. Am Tag vor der Vorstellung erhielt der Hund aufgrund der Symptomatik 1 mg/kg Prednisolon, 5 mg/kg Enrofloxacin, 0,5 mg/kg Maropitant, 0,5 mg/kg Metoclopramid, 1 mg/kg Ranitidin sowie eine Infusion mit Ringer-Lactat-Lösung.

### Klinische Untersuchung

Bei Vorstellung in der Klinik präsentierte sich der Rüde bei mittelgradig gestörtem Allgemeinbefinden. Er zeigte eine hochgradige Ataxie und Dummkoller. Die Schleimhäute waren gerötet. Es war eine Hypersalivation auffällig. Die Herz- und Pulsfrequenz lagen bei 120 Schlägen/min; die Pulsqualität war gut. Die Atemfrequenz lag bei 20 Atemzügen/min. In der neurologischen Untersuchung waren die Haltungs- und Stellreaktionen generalisiert mittelgradig herabgesetzt. Die spinalen Reflexe waren

normal. Die Untersuchung der Kopfnerven war bis auf geringgradig reduzierte direkte und indirekte Pupillarreflexe unauffällig.

## Blutuntersuchung

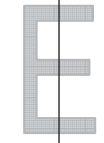
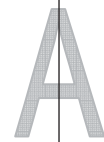
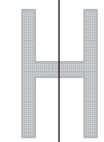
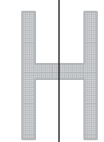
Hämatologie und klinische Chemie ergaben keine therapierelevanten Abweichungen vom Referenzbereich. Die peripher venös entnommene Blutprobe war in der Blutgasanalyse bis auf einen erhöhten Laktatwert (4,4 mmol/l; Referenzbereich: 0,4–2,2 mmol/l) unauffällig. Der MDR1-Genstatus wurde mittels Real-time-PCR (Klitzsch et al., 2010) wie folgt bestimmt: nt230(del4) MDR1<sup>-/-</sup>.

## Therapie

Initial wurde der Rüde mit Vollelektrolytlösungen (8 ml/kg/h über acht Stunden, danach über acht Stunden schrittweise Reduktion auf 5 ml/kg/h) infundiert. Er wurde aufgrund der Vorbehandlung über weitere sieben Tage mit Enrofloxacin (5 mg/kg s. c., Baytril®; Bayer HealthCare AG, D) und Pantoprazol (1 mg/kg i.v., Pantozol®; Altana Pharma Deutschland GmbH, D) sowie einmalig mit Maropitant (1 mg/kg s. c., Cerenia®; Pfizer Deutschland GmbH, D) und Flumazenil (0,1 mg/kg i. v., Anexate®; Roche Deutschland Holding GmbH, D) behandelt. Über eine intranasale Sonde wurde Sauerstoff zugeführt. Die Fütterung erfolgte durch eine nasoösophageale Sonde. Etwa 30 Stunden nach Vorstellung erhielt der Rüde erstmalig einen Lipidbolus (Lipofundin® Sojabohnenöl-in-Wasser-Emulsion 10 %; B. Braun Melsungen AG, D) mit 4 ml/kg über 60 Minuten und anschließend eine Lipidinfusion mit 1,5 ml/kg/h über weitere vier Stunden. Währenddessen wurde die Vollelektrolytinfusion unterbrochen. Diese Lipidinfusion wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. Die Infusionstherapie mit Vollelektrolytlösungen wurde drei Tage über die Lipidtherapie hinaus fortgesetzt und anschließend schrittweise ausgeschlichen.

## Verlauf

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Vorstellung verschlechterte sich der Zustand des Rüden zunehmend, bis er festlag, kein Futter mehr selbstständig aufnehmen konnte und mehrmals gallig erbrach. Er entwickelte eine Hypothermie (37,5 °C). Da eine Aspiration nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden Thoraxröntgenaufnahmen angefertigt, um eine Aspirationspneumonie detektieren zu können. Im rechten Mittellappen war die Lunge mittelgradig interstitiell gezeichnet. Etwa acht Stunden nach der ersten Lipidinfusion war der Rüde zum ersten Mal wieder stehfähig. Nach ca. 24 Stunden nahm er selbstständig Futter auf. Die nasoösophageale Ernährungssonde sowie die intranasale Sauerstoffsonde konnten entfernt werden. Die Ataxie verbesserte sich im Laufe der stationären Behandlung langsam. In der Kontrolle der Blutwerte eine Woche nach Therapiebeginn war die Hämatologie unauffällig. In der klinischen Chemie waren Alaninaminotransferase (92 U/l;



Referenzbereich: 0–85 U/l) und Kreatinkinase (810 U/l; Referenzbereich: < 143 U/l) erhöht. Der Rüde wurde nach elf Tagen mit ungestörtem Allgemeinbefinden und geringgradiger Ataxie ohne weitere medikamentöse Therapie entlassen. Die Ataxie hat laut Besitzerangaben noch zwei bis drei Wochen fortbestanden, seitdem ist der Rüde für die Besitzer völlig unauffällig.

## Fallbeschreibung Fall 2

### Anamnese

Ein etwa fünf Jahre alter, weiblich kastrierter Australian Shepherd (25,2 kg) wurde im Notdienst vorgestellt, weil er nach Besitzerangaben am Abend zuvor 0,5 g einer Wurmkur für Pferde (Bimectin®, 1,87 % Ivermectin) mit dem Wirkstoff Ivermectin aufgenommen hatte. Das entsprach einer oral aufgenommenen Menge an Ivermectin von ca. 0,4 mg/kg. Seit dem Morgen zeigte die Hündin eine zunehmende Ataxie.

### Klinische Untersuchung

Bei Vorstellung in der Klinik präsentierte sich die Hündin mit ungestörtem Allgemeinbefinden. Die klinische Untersuchung war bis auf gerötete Schleimhäute unauffällig. Die Herz- und Pulsfrequenz lagen bei 120 Schlägen/min; die Pulsqualität war gut. Die Atemfrequenz lag bei 24 Atemzügen/min. In der neurologischen Untersuchung zeigte die Hündin eine mittelgradige Ataxie sowie links eine geringgradig verminderte Drohreaktion. Ansonsten waren die Haltungs- und Stellreaktionen, die spinalen Reflexe und die Untersuchung der Kopfnerven unauffällig.

### Blutuntersuchung

Hämatologie und klinische Chemie ergaben auch bei diesem Patienten keine therapielevanten Abweichungen vom Referenzbereich. Der MDR1-Genstatus der Hündin wurde mittels Real-time-PCR (Klitzsch et al., 2010) ermittelt und ergab den homozygot defekten nt230(del4)-MDR1<sup>-/-</sup>-Genotyp.

### Therapie

Zur Verhinderung der weiteren enteralen Resorption erhielt die Hündin 0,5 g/kg Aktivkohle per os (Kohle-Compretten®; Merck Selbstmedikation GmbH, D). Etwa zwei Stunden nach Vorstellung erhielt sie einen Lipidbolus (Lipofundin® 10 %) mit 4 ml/kg über 60 Minuten und anschließend eine Lipidinfusion mit 2 ml/kg/h über

weitere vier Stunden. Dieses Infusionsschema wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. Zwischen den Gaben erhielt die Hündin Infusionen mit Vollelektrolytlösungen (6 ml/kg/h). Diese wurden weitere zwei Tage fortgesetzt und dann schrittweise reduziert. Zusätzlich wurde der Hündin Kaliumchlorid per os substituiert.

### Verlauf

In den ersten Tagen der stationären Behandlung verschlechterte sich der Zustand der Hündin. Nach drei Tagen waren sukzessive deutliche Verbesserungen festzustellen, sodass sie nach sechs Tagen ohne weitere Therapie mit ungestörtem Allgemeinbefinden entlassen werden konnte.

### Diskussion

Bei Intralipid® und Lipofundin® handelt es sich um eine Öl-in-Wasser-Emulsion aus Sojaöl zur intravenösen Infusion. Diese Lipidinfusionen wurden entwickelt und zugelassen, um den Bedarf an Energie und essenziellen Fettsäuren im Rahmen der parenteralen Ernährung zu decken (Fresenius Kabi Austria GmbH, A). In der Literatur der letzten Jahre wird darüber hinaus von einer zusätzlichen nützlichen Indikation berichtet, nämlich dem Einsatz der Lipidinfusion zur unterstützenden Therapie bei Intoxikationen mit lipophilen Arzneistoffen wie beispielsweise Bupivacain, Verapamil, Propranolol und Clomipramin (Rothschild et al., 2010; Fernandez et al., 2011). Untersuchungen in verschiedenen Tiermodellen bestätigten die Wirksamkeit der Lipidinfusion für diese Indikation (Bania et al., 2007; Cave und Harvey, 2009; Jamaty et al., 2010). Basierend auf diesen Untersuchungen wurde die Lipidinfusion sogar in eine der Leitlinien zum Management lokalanästhetikainduzierter Toxizität in der Humanmedizin aufgenommen (Association of Anaesthetics of Great Britain and Ireland, [www.aagbi.org/sites/default/files/la\\_toxicity\\_2010\\_0.pdf](http://www.aagbi.org/sites/default/files/la_toxicity_2010_0.pdf)).

Das genaue Wirkungsprinzip einer Lipidinfusion gegen eine Arzneistoff-Intoxikation ist bis heute unklar. Folgende Hypothesen existieren:

- Durch Ausbildung einer Plasmalipidphase sollen lipophile Arzneistoffe in der intravasalen Lipidphase sequestriert werden, was die im Plasma gelöste Substanzmenge reduzieren würde (Mazoit et al., 2009).
- Im Falle von Lokalanästhetika wie z. B. Bupivacain ist bekannt, dass es zu einer Hemmung des Carnitintransportsystems in den Mitochondrien kommt, welches normalerweise für den Transfer von Fettsäuren durch

die innere Mitochondrienmembran zur  $\beta$ -Oxidation und ATP-Gewinnung verantwortlich ist. Es wird vermutet, dass die Lipidemulsion über einen Anstieg der intrazellulären Fettsäurekonzentration die Inhibition dieses Carnitintransporters aufheben kann und die Zellen damit schneller regenerieren (Weinberg, 2011).

- Bezüglich der Wirkung einer Lipidinfusion nach Intoxikationen mit Kalziumkanalblockern wird postuliert (Huang et al., 1992), dass Fettsäuren den Kalziumgehalt in Herzmuskelzellen steigern können. Dies würde zu positiven inotropen und chronotropen Effekten führen und damit letztlich der kardiodepressiven Wirkung der Kalziumkanalblocker entgegenstehen.

In den letzten Jahren berichteten auch einige Autoren aus der Veterinärmedizin über den Einsatz einer Lipidinfusion bei Intoxikationen mit makrozyklischen Laktanen (Fernandez et al., 2011). Hierbei handelt es sich um Fallberichte über einen Welpen (Jack Russel Terrier), eine Katze (Europäisch Kurzhaar) und einen Border Collie, welche neurotoxische Symptome nach Applikation bzw. Aufnahme von Moxidectin oder Ivermectin gezeigt haben (Crandell und Weinberg, 2009; Pritchard, 2010; Clarke et al., 2011). Daraufhin wurde der Einsatz einer Lipidinfusion bei Intoxikationen mit makrozyklischen Laktanen in der von Weinberg initiierten Homepage zum Indikationspektrum hinzugefügt ([www.lipidrescue.org](http://www.lipidrescue.org)). Allerdings handelt es sich bei diesen Fallberichten mit höchster Wahrscheinlichkeit um MDR1-intakte Individuen. So wurde ein genetischer Defekt im MDR1-Gen der Katze bisher nicht beschrieben und Jack Russel Terrier gehören nicht zu den vom MDR1-Defekt betroffenen Hunderassen (Gramer et al., 2011). Im Falle des mit Ivermectin vergifteten Border Collies wurde der MDR1-Genstatus explizit untersucht. Der Hund zeigte jedoch den homozygot intakten MDR1<sup>+/+</sup>-Genotyp (Clarke et al., 2011). Des Weiteren könnte hierzu kritisch angemerkt werden, dass Ivermectin-Intoxikationen bei MDR1-intakten Individuen, selbst bei initial schwerer Symptomatik, in der Regel auch ohne Therapie eine rasche Verbesserung zeigen. Dies liegt an der ATP-getriebenen Effluxfunktion von MDR1-P-Glykoprotein in der Blut-Hirn-Schranke, welche zu einer aktiven und schnellen Senkung der wirksamen Gehirnkonzentration führt (Geyer und Janko, 2012).

In einem Kongressbeitrag wird die Wirksamkeit einer Lipidinfusion bei Vergiftungen mit Ivermectin angezweifelt (Wright et al., 2011). Hier werden Intoxikationen mit Ivermectin bei einem Australian Shepherd und zwei Miniature Australian Shepherd, alle mit homozygot MDR1<sup>-/-</sup>-defektem Genotyp, beschrieben. Jeder der drei Hunde wies die typischen Symptome einer Ivermectin-Vergiftung auf, jedoch mit unterschiedlicher Ausprägung von Stupor bis Koma und mit der Notwendigkeit zur künstlichen Beatmung. Die Lipidinfusion wurde in diesen Fällen mit einer 20%igen Formulierung durchgeführt, mit einem Bolus von 1,5 ml/kg und einer anschließenden Infusion mit 7,5–15 ml/kg über 30 Minuten (Wright et al., 2011). Mit dieser Maßnahme konnte keine Verbesserung der Symptomatik erreicht werden. Leider sind keine Informationen darüber vorhanden, ob eine weitere Applikation erfolgt ist oder nicht.

Auf der Grundlage dieses Berichtes und der Erfahrung aus den hier beschriebenen Fällen kann festgehalten werden, dass die Wirksamkeit einer Lipidinfusion bei einer Vergiftung mit makrozyklischen Laktanen sicher von

verschiedenen Faktoren abhängig ist. Zum Ersten ist die Effluxleistung von MDR1-P-Glykoprotein zu betrachten. Ist dieser Carrier, wie bei MDR1-intakten Hunden und allen anderen Spezies, funktionell in der Blut-Hirn-Schranke, der Leber und dem Darmepithel exprimiert, kommt es durch die ATP-getriebene Transportleistung zu einer aktiven Elimination dieser Substanzen aus dem Gehirn sowie über Leber und Darm schließlich auch aus dem Organismus (Geyer und Janko, 2012). Es ist nicht auszuschließen, dass die Lipidinfusion in dieser Situation die Ausscheidung der Noxe fördert (Clarke et al., 2011). Wahrscheinlich ist für die Verbesserung der neurotoxischen Symptomatik aber die Transportleistung von MDR1-P-Glykoprotein in der Blut-Hirn-Schranke entscheidend, welche zwischen Gehirn und Blutkompartiment Gradienten von bis zu 1 : 10 aufbauen kann (Geyer und Janko, 2012). Weiterhin scheinen die aufgenommene Menge der entsprechenden Substanz und der Grad der Intoxikation eine Rolle für die Wirksamkeit einer Lipidinfusion zu spielen. So handelte es sich bei den von Wright et al. (2011) beschriebenen Fällen um gravierende Intoxikationen, welche in einem Fall sogar eine künstliche Beatmung erforderten. Da es sich bei der Intralipidinfusion nicht um ein Antidot dieser Vergiftung handelt, sondern diese auf eine Veränderung des Konzentrationsgleichgewichtes zwischen ZNS und Blutkompartiment abzielt, kann von einer einmaligen kurzfristigen Infusion kein rascher Erfolg erwartet werden. Vielmehr scheint hier eine langfristig angelegte wiederholte Behandlung sinnvoll. Schließlich könnten auch Dosierung und Dauer der Lipidinfusion für den Erfolg der Maßnahme entscheidend sein. Bei den hier berichteten Fällen wurden eine erste Bolusinjektion einer 10%igen Emulsion mit 4 ml/kg und eine anschließende Lipidinfusion mit 1,5–2 ml/kg/h über vier Stunden durchgeführt. Dieses Schema wurde über drei bis fünf Tage wiederholt. Mit dieser Therapie wurden gute Erfolge erzielt. Jedoch kann in beiden Fällen nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Verbesserung der Symptomatik nicht auch ohne Einsatz der Lipidinfusion gleichsam eingestellt hätte. Allerdings wurde bei beiden Hunden, auf Grundlage vergleichbarer Fälle, zunächst mit einem deutlich schlechteren Verlauf der Intoxikation gerechnet. So verstarben zuvor zwei MDR1<sup>-/-</sup>-defekte Hunde, ein Collie und ein Australian Shepherd, nach subkutaner Applikation von 1 mg/kg Doramectin nach fünf bzw. sechs Tagen. Bei beiden Hunden wurde post mortem der Gehalt an Doramectin im Gehirn bestimmt und ergab sehr hohe Wirkstoffkonzentrationen von > 100 ng/g (Geyer und Janko, 2012). Im Fall von Ivermectin sind bereits für aufgenommene Mengen von 0,2–0,25 mg/kg schwere Vergiftungsfälle bekannt, welche zu Teil von den Patienten nicht überlebt wurden (Hopper et al., 2002; Paul et al., 1987).

### Schlussfolgerung

Auch wenn nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden kann, dass die hier berichteten Fälle auch ohne Lipidinfusion eine identische Rekonvaleszenz aufgewiesen hätten, zeigte das verwendete Infusionsschema, unter Berücksichtigung der bisherigen klinischen Erfahrung mit derartigen Vergiftungsfällen, eine positive Wirkung auf den Schweregrad und den Verlauf der Ivermectin-Intoxikation. Da bei einer Lipidinfusion keine gravierenden Nebenwirkungen zu erwarten sind und für die Therapie von Ivermectin-Intoxikationen bei MDR1-defekten Hunden keine spezifischen Maßnahmen zur Verfügung stehen,

kann der Einsatz der hier beschriebenen Lipidinfusion empfohlen werden.

## Erklärung

Hiermit erklären die Autoren, dass sie keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen haben, welche die im Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

## Literatur

- Bania TC, Chu J, Perez E, Su M, Hahn IH (2007):** Hemodynamic effects of intravenous fat emulsion in an animal model of severe verapamil toxicity resuscitated with atropine, calcium, and saline. *Acad Emerg Med* 14(2): 105–111.
- Cave G, Harvey M (2009):** Lipid emulsion may augment early blood pressure recovery in a rabbit model of atenolol toxicity. *J Med Toxicol* 5(1): 50–51.
- Clarke DL, Lee JA, Murphy LA, Reineke EL (2011):** Use of intravenous lipid emulsion to treat ivermectin toxicosis in a Border Collie. *J Am Vet Med Assoc* 239(10): 1328–1333.
- Crandell DE, Weinberg GL (2009):** Moxidectin toxicosis in a puppy successfully treated with intravenous lipids. *J Vet Emerg Crit Care* 19(2): 181–186.
- Dawson GR, Wafford KA, Smith A, Marshall GR, Bayley PJ, Schaeffer JM, Meinke PT, McKernan RM (2000):** Anticonvulsant and adverse effects of avermectin analogs in mice are mediated through the gamma-aminobutyric acid (A) receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 295(3): 1051–1060.
- Fernandez AL, Lee JA, Rahilly L, Hovda L, Brutlaq AG, Engebretsen K (2011):** The use of intravenous lipid emulsion as an antidote in veterinary toxicology. *J Vet Emerg Crit Care* 21(4): 309–320.
- Geyer J, Gavrilova O, Petzinger E (2009):** Brain penetration of ivermectin and selamectin in *mdr1a,b* P-glycoprotein- and *bcrp*-deficient knockout mice. *J Vet Pharmacol Ther* 32(1): 87–96.
- Geyer J, Janko C (2012):** Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Curr Pharm Biotechnol* 13(6): 969–986.
- Gramer I, Leidolf R, Döring B, Klintzsch S, Krämer EM, Yalcin E, Petzinger E, Geyer J (2011):** Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Vet J* 189(1): 67–71.
- Hopper K, Aldrich J, Haskins SC (2002):** Ivermectin toxicity in 17 collies. *J Vet Intern Med* 16(1): 89–94.
- Houston DM, Parent J, Matushek KJ (1987):** Ivermectin toxicosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 191(1): 78–80.
- Huang J, Casida JE (1997):** 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* 281(1): 261–266.
- Huang JM, Xian H, Bacaner M (1992):** Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14): 6452–6456.
- Jamaty C, Bailey B, Larocque A, Notebaert E, Sanogo K, Chauny JM (2010):** Lipid emulsions in the treatment of acute poisoning: a systematic review of human and animal studies. *Clin Toxicol* 48(1): 1–27.
- Klintzsch S, Meerkamp K, Döring B, Geyer J (2010):** Detection of the nt230[del4] MDR1 mutation in dogs by a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method. *Vet J* 185(3): 272–277.
- Linek J, Spiess C, Dallmeyer J, Geyer J (2007):** Ivermectin-Intoxikation bei drei Hunden mit und ohne MDR1-Gen-Defekt durch ein für Pferde zugelassenes orales Antiparasitikum. *Tierärztl Prax* 35(1): 272–276.
- Mazoit JX, Le Guen R, Beloeil H, Benhamou D (2009):** Binding of long-lasting local anesthetics to lipid emulsions. *Anesthesiology* 110(2): 380–386.
- Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH (2001):** Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11(8): 727–733.
- Merola V, Khan S, Gwaltney-Brant S (2009):** Ivermectin toxicosis in dogs: a retrospective study. *J Am Anim Hosp Assoc* 45(3): 106–111.
- Nelson OL, Carsten E, Bentjen SA, Mealey KL (2003):** Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies. *J Vet Intern Med* 17(3): 354–356.
- Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS Jr, DiPietro JA (1987):** Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res* 48(4): 684–685.
- Pritchard J (2010):** Treating ivermectin toxicity in cats. *Vet Rec* 166(24): 766.
- Pulliam JD, Seward RL, Henry RT, Steinberg SA (1985):** Investigating ivermectin toxicity in Collies. *Vet Med* 80: 33–40.
- Roder JD, Stair EL (1998):** An overview of ivermectin toxicosis. *Vet Hum Toxicol* 40(6): 369–370.
- Rothschild L, Bern S, Oswald S, Weinberg G (2010):** Intravenous lipid emulsion in clinical toxicology. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 18: 51–59.
- Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L (1994):** Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77(4): 491–502.
- Sigel E, Baur R (1987):** Effect of avermectin B1a on chick neuronal gamma-aminobutyrate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 32(6): 749–752.
- Sivine F, Plume C, Ansay M (1985):** Picrotoxin, the antidote to ivermectin in dogs? *Vet Rec* 116(7): 195–196.
- Tranquilli WJ, Paul AJ, Seward RL, Todd KS, DiPietro JA (1987):** Response to physostigmine administration in collie dogs exhibiting ivermectin toxicosis. *J Vet Pharmacol Ther* 10(1): 96–100.
- Tranquilli WJ, Paul AJ, Seward RL (1989):** Ivermectin plasma concentrations in collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis. *Am J Vet Res* 50(5): 769–770.
- Trailovic SM, Nedeljkovic JT (2011):** Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats. *J Vet Med Sci* 73(5): 591–599.
- Vaughn DM, Simpson ST, Blagburn BL, Whitmer WL, Heddens-Mysinger R, Hendrix CM (1989):** Determination of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and pressure in the cerebrospinal fluid of collie dogs following administration of ivermectin. *Vet Res Commun* 13(1): 47–55.
- Weinberg G (2006):** Lipid rescue resuscitation from local anaesthetic cardiac toxicity. *Toxicol Rev* 25(3): 139–145.
- Weinberg GL (2011):** Intravenous lipid emulsion: why wait to save a life? *Emerg Med Australas* 23(2): 113–115.
- Wright HM, Chen AV, Talcott PA, Poppenga RH, Mealey KL (2011):** Intravenous fat emulsion (IFE) for treatment of ivermectin toxicosis in 3 dogs. *J Vet Intern Med* 25: 632–767, Abstract N-1.

## Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Joachim Geyer  
 Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
 Justus-Liebig-Universität Gießen  
 Schubertstr. 81  
 35392 Gießen  
 Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de

## 10. Anhang - Publikationen

### 11) GEYER J & JANKO C (2011)

Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones.

*Current Pharmaceutical Biotechnology, Volume 13, Issue 6, pp 969-986*

DOI: 10.2174/138920112800399301

<http://www.eurekaselect.com/96885/article>

# Treatment of *MDR1* Mutant Dogs with Macrocylic Lactones

Joachim Geyer\* and Christina Janko

*Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University of Giessen, Frankfurter Str. 107, 35392 Giessen*

**Abstract:** P-glycoprotein, encoded by the *multidrug resistance* gene *MDR1*, is an ATP-driven drug efflux pump which is highly expressed at the blood-brain barrier of vertebrates. Drug efflux of macrocylic lactones by P-glycoprotein is highly relevant for the therapeutic safety of macrocylic lactones, as thereby GABA-gated chloride channels, which are confined to the central nervous system in vertebrates, are protected from high drug concentrations that otherwise would induce neurological toxicity. A 4-bp deletion mutation exists in the *MDR1* gene of many dog breeds such as the Collie and the Australian Shepherd, which results in the expression of a non-functional P-glycoprotein and is associated with multiple drug sensitivity. Accordingly, dogs with homozygous *MDR1* mutation are in general prone to neurotoxicity by macrocylic lactones due to their increased brain penetration. Nevertheless, treatment of these dogs with macrocylic lactones does not inevitably result in neurological symptoms, since, the safety of treatment highly depends on the treatment indication, dosage, route of application, and the individual compound used as outlined in this review. Whereas all available macrocylic lactones can safely be administered to *MDR1* mutant dogs at doses usually used for heartworm prevention, these dogs will experience neurological toxicity following a high dose regimen which is common for mange treatment in dogs. Here, we review and discuss the neurotoxicological potential of different macrocylic lactones as well as their treatment options in *MDR1* mutant dogs.

**Keywords:** Dog, ivermectin, ivermectin-sensitive Collie, *MDR1*, milbemycin oxime, moxidectin, P-glycoprotein, pharmacogenetics.

## P-GLYCOPROTEIN: A MULTIDRUG EFFLUX TRANSPORTER

The multidrug carrier P-glycoprotein (P-gp), encoded by the *MDR1* (*ABCB1*) gene, belongs to the family of membrane bound ATP-binding cassette (ABC) transporters [1]. P-glycoprotein is an ATP-driven efflux pump that confers *multidrug resistance* (MDR) to cancer cells by actively extruding a wide range of structurally unrelated chemotherapeutic compounds from the cell. Juliano & Ling [2] first isolated P-gp as a membrane glycoprotein of approximately 170-kDa from chemotherapeutic drug-resistant Chinese hamster ovary cells that were selected for colchicine resistance and identified this protein as a major part of the functional multidrug resistance of these cells by limiting their permeability into the cell (P-gp, permeability glycoprotein). Many years later a cDNA was isolated from a multidrug-resistant carcinoma cell line, selected for its resistance to colchicine, vinblastine and doxorubicin, and was shown to encode P-gp [3,4]. Subsequently, the name *MDR1* was established for the gene as well as for the encoded P-gp. Later on, by using bioinformatic approaches, the *MDR1* gene was phylogenetically classified as member B1 of the ABC transporter superfamily [5]. The *MDR1* (*ABCB1*) gene exist in all mammals analysed to date including the dog, with the

peculiarity that this gene is duplicated in rodent genomes (referred to as *mdr1a* and *mdr1b*).

Many years of research on P-gp focused on the chemotherapeutic resistance of tumour cells and so the first P-gp substrates identified were cytostatic drugs [6,7]. Today, it is known that P-gp has a broader substrate specificity and transports a large number of structurally unrelated drugs and xenobiotics including anticancer drugs (*e.g.*, vinca alkaloids, paclitaxel, doxorubicin), immunosuppressants (cyclosporine, tacrolimus), antiparasitic agents (ivermectin, moxidectin, selamectin, milbemycin oxime), antimicrobial agents (*e.g.*, erythromycin, rifampicin, ketoconazole, levofloxacin), cardiac drugs (*e.g.*, digoxin, verapamil, diltiazem, quinidine, talinolol, losartan), opioids (*e.g.*, morphine, loperamide, butorphanol, fentanyl), steroid hormones (cortisol, dexamethasone, aldosterone) and many others (*e.g.*, cimetidine, fexofenadine, acepromazine, domperidone, ondansetron) [8-11]. Most P-gp substrates are hydrophobic molecules and partition into the plasma membrane from where they are effluxed by P-gp. Accordingly, P-gp has been thought of as 'hydrophobic vacuum cleaner' for hydrophobic molecules which are embedded into the plasma membrane [12]. This type of substrate recognition makes P-gp a highly effective efflux pump, preventing the cellular entry of toxic compounds [13].

Apart from neoplastic tissues, P-gp shows high expression in the apical (luminal) membranes of epithelial cells lining the lower gastrointestinal tract, in the brush border of renal proximal tubules, in the canalicular membrane of hepatocytes and in capillary endothelial cells in the brain and

\*Address correspondence to this author at the Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University of Giessen, Frankfurter Str. 107, 35392 Giessen, Germany; Tel: +49 641 9938404; Fax: +49 641 9938419; E-mail: Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de

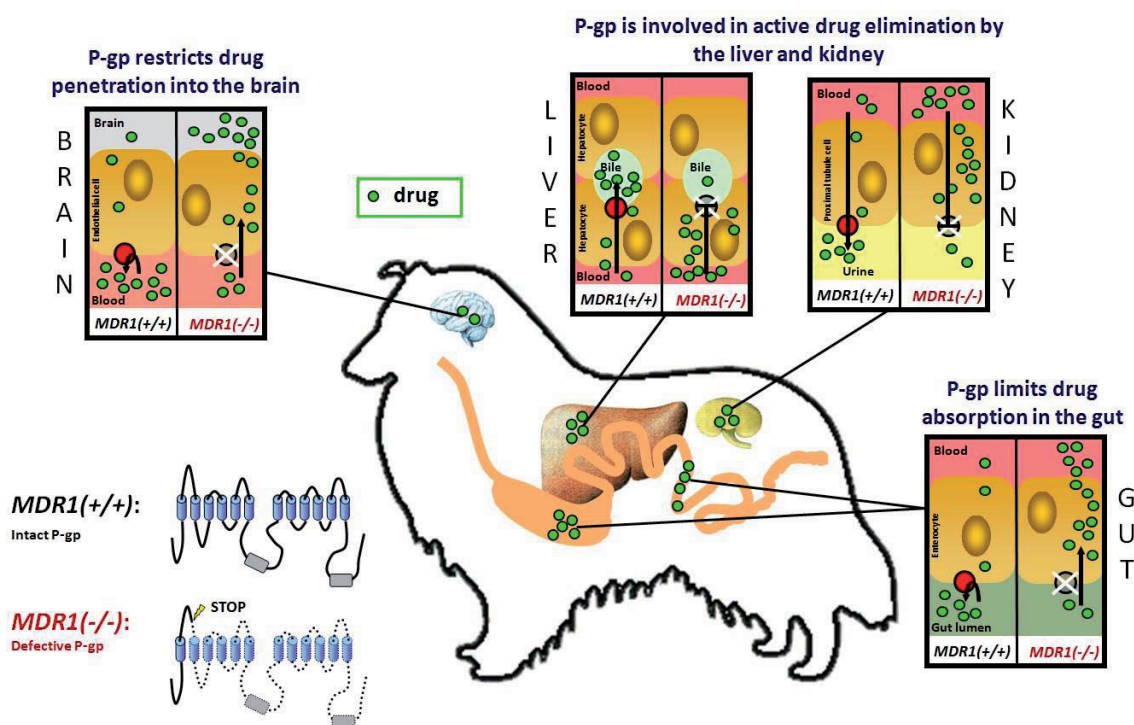
testes. Furthermore, P-gp expression was found in the placenta, the adrenal cortex and CD34+ hematopoietic stem cells [14-20]. According to this expression pattern, it has been shown that P-gp limits drug absorption in the gastrointestinal tract and promotes drug elimination in the liver, kidney and intestine. Furthermore, P-gp restricts drug uptake into cells and tissues, in particular their permeation across the blood-brain barrier Fig. (1). Taken altogether, P-gp has an important protective function for the organism by eliminating potentially toxic compounds from the body and preventing their entry into the brain and organs of reproduction [21-23].

The important role of P-gp in protecting the brain from the penetration of drugs across the blood-brain barrier is highly relevant for the treatment of mammals with macrocyclic lactones. In parasitic lower organisms, macrocyclic lactones bind with high affinity to glutamate-gated and GABA-gated chloride ion channels which are widespread in the nervous system of arthropods and nematodes, resulting in an inhibition of nerve activity, flaccid paralysis and death [24,25]. However, the situation is completely different in mammals where neuronal glutamate-gated chloride channels are absent and GABA-gated chloride channels are confined to the central nervous system [26-28]. Here, these channels are protected from the binding of macrocyclic lactones by the highly effective P-gp mediated drug efflux at the blood-brain barrier which restricts drug penetration into the brain [21]. Therefore, and given the expression of a functionally

active P-gp at the blood-brain barrier, macrocyclic lactones generally have a wide margin of safety in mammals at therapeutic doses [29].

### BRAIN PENETRATION OF MACROCYCLIC LACTONES IN P-GP DEFICIENT MICE

Several experimental models have been developed to analyse drug interactions with P-gp. *In vitro* models include the Caco-2 cell line, which shows, among numerous other carriers, a high expression of P-gp, and cell lines stably transfected with P-gp such as Madin-Darby canine kidney cells [7]. In these cellular systems interactions with P-gp have been demonstrated for a large number of drugs including ivermectin, selamectin, moxidectin, eprinomectin, abamectin and doramectin [30,31]. Furthermore, in 1994 a genetically engineered knockout mouse was established in which first only the *mdr1a* gene and later on both murine *mdr1* genes (*mdr1a* and *mdr1b*) were disrupted by insertional mutagenesis [32,33]. Despite the broad tissue expression of P-gp, loss of either or both genes did not result in an obvious phenotype or any physiological abnormality. The knockout mice were viable and fertile and almost indistinguishable from their wild-type littermates in a range of histological, hematological, serum-chemical and immunological parameters, but spontaneously develop colitis with age [33,34]. However, it has to be emphasised that laboratory mice grow up in a well-controlled and generally toxic-free environment where the importance of the protective function



**Fig. (1).** The role of P-gp in drug disposition. P-glycoprotein (shown in red) is an ATP-driven efflux transporter which pumps its substrates out of the cell. The intact P-gp limits drug entry into the organism after oral administration, promotes drug elimination into bile and urine, and restricts drug penetration across the blood-brain barrier. In *MDR1(-/-)* dogs which do not express a functional P-gp, enteral drug absorption is enhanced, biliary and urinary drug elimination is reduced, and the permeation of blood-tissue barriers is increased at the blood-brain barrier, blood-testis barrier and blood-placenta barrier. As a consequence, P-gp transported drugs can cause an increase in adverse effects in these dogs. This particularly applies to macrocyclic lactones, which would normally be efficiently transported by P-gp.

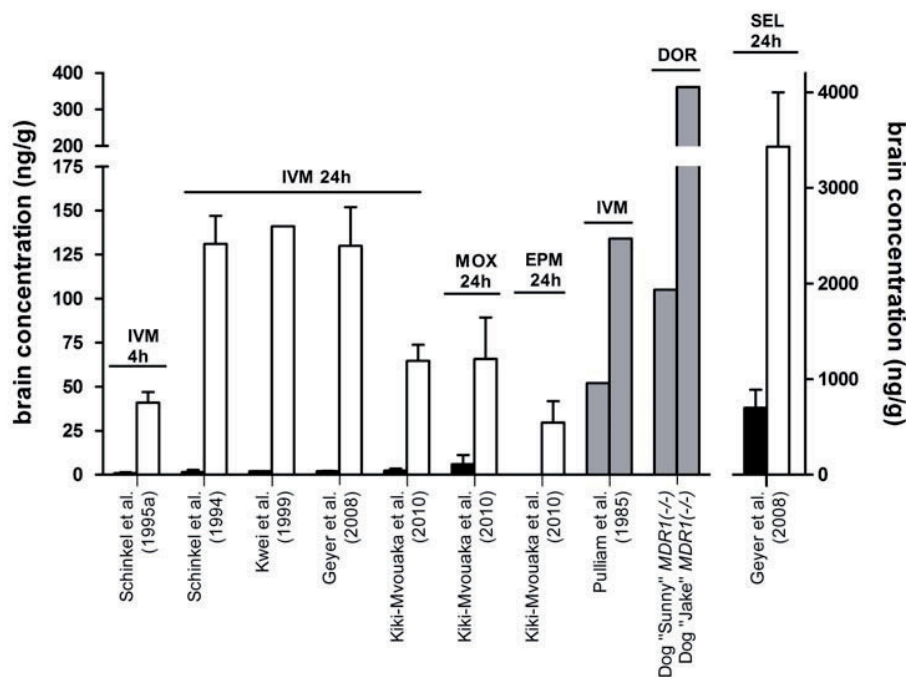
of P-gp may be less relevant. In these mice, the highly important role of P-gp for the safety of treatment with macrocyclic lactones was identified by serendipity.

Following a mite infection of the generated *mdr1a* knockout mice, the mice were sprayed with a dilute solution of ivermectin which is routine in mite infections in an animal facility and is normally well tolerated by the mice even though they ingest part of the drug due to grooming activities. Following the ivermectin application, however, a number of *mdr1a(-/-)* knockout mice, but not the *mdr1a(+/+)* wild-type mice, died with paralytic symptoms including immobilization, inability to right themselves, recumbency, decreased breathing frequency, and finally, onset of a comatose state. After a more detailed toxicity analysis the researchers demonstrated that *mdr1a(-/-)* mice were 50- to 100-fold more sensitive to orally administered ivermectin ( $LD_{50} = 700-800 \mu\text{g/kg}$  in the knockout and  $50-60 \text{ mg/kg}$  in the wild-type mice) due to an increased accumulation in the brain [32,33]. These results were consistent with the suggested role of P-gp and the high expression in brain capillaries [16,17]. Application of radiolabelled ivermectin revealed that absolute brain concentrations were 87-fold higher in the brain of *mdr1a(-/-)* knockout mice compared with the wild-type mice ( $131 \pm 16 \text{ ng/g}$  vs.  $1.5 \pm 1.2 \text{ ng/g}$ ), whereas the drug concentrations in most other tissues were only 3- to 4-fold

higher. This general increase in tissue concentrations was likely due to an increased net uptake of ivermectin from the gastrointestinal tract combined with reduced elimination through the liver and kidney [32]. Even after intravenous and spot-on applications of  $200 \mu\text{g/kg}$  ivermectin to *mdr1a,b(-/-)* knockout mice, where intestinal absorption does not affect the drug bioavailability, the absolute ivermectin concentrations in the brain were 59-fold ( $130 \text{ ng/g}$  vs.  $2 \text{ ng/g}$ ) and 49-fold ( $27 \text{ ng/g}$  vs.  $0.6 \text{ ng/g}$ ) higher in the knockout mice compared with the wild-type mice, respectively [35] Fig. (2).

Apart from the genetically engineered *mdr1* knockout mice, researchers at the Merck Research Laboratories identified in the CF-1 mouse strain a subpopulation of mice which were much more sensitive to avermectins compared to other mice [36]. Further analysis revealed that these drug sensitive mice did not express the *mdr1a* P-gp in the brain capillary endothelial cells lining the blood-brain barrier due to an insertion of a solo long terminal repeat of the ecotropic murine leukemia virus, resulting in abnormal splicing of the *mdr1a* transcript and thereby leading to the translation of a non-functional P-gp [37,38]. As a consequence, high levels of ivermectin accumulated in the brain of the CF-1 mice, up to 70-fold, after oral drug application of  $200 \mu\text{g/kg}$  [36,39].

Based on these data, it became absolutely clear that P-gp expression at the blood-brain barrier is the major and critical



**Fig. (2).** Brain penetration of macrocyclic lactones in wild-type mice (black columns), as well as in P-gp deficient mice (white columns) and dogs (grey columns). Ivermectin (IVM), moxidectin (MOX), eprinomectin (EPM), doramectin (DOR) and selamectin (SEL) were experimentally given to *mdr1a(-/-)* knockout mice (Schinkel *et al.* 1995a [43], 1994 [32]), *mdr1a,b(-/-)* double knockout mice (Geyer *et al.* 2008 [35], Kiki-Mvouaka *et al.* 2010 [44]), drug-sensitive CF-1 mice (Kwei *et al.* 1999 [39]), and ivermectin-sensitive Collies (Pulliam *et al.* 1985 [42]) or were therapeutically applied to *MDR1(-/-)* dogs at the following dosages:  $200 \mu\text{g/kg}$  orally [32,35,39,42 left column,43],  $200 \mu\text{g/kg}$  subcutaneously [44],  $600 \mu\text{g/kg}$  orally [42 right column] and  $1 \text{ mg/kg}$  doramectin subcutaneously. Absolute drug concentrations in brain tissue were determined by liquid scintillation counting using the respective radiolabeled drugs [32,35,39,43] or by HPLC analysis [42,44]. Generally, drug concentrations in the brain were marginal in the wild-type mice and dramatically increased in the absence of P-gp. The two *MDR1(-/-)* dogs, "Sunny" and "Jake", were therapeutically given  $1 \text{ mg/kg}$  doramectin and developed severe neurotoxicosis. Both dogs died 5-6 days after treatment and were subjected to necropsy within 18 hours of death.

determinant for the safety margin of ivermectin and other macrocyclic lactones in mammals. These findings shed new light on clinical data from veterinary medicine that identified a subpopulation of Collie dogs as extremely sensitive to ivermectin in the early 1980s [40,41]. However, it has to be noted that P-gp at that time had not yet been localised in the blood-brain barrier and P-gp transport of macrocyclic lactones was completely unknown. Most interesting was a study by Pulliam *et al.* [42], demonstrating that ivermectin-sensitive Collie dogs showed highly increased ivermectin accumulation in the brain, suggesting that in ivermectin-sensitive dogs the protective barrier function of the blood-brain barrier is defective and ivermectin can penetrate into the brain unhindered Fig. (2). Referring to this study, Schinkel *et al.* [32] and other experts in the field hypothesized that ivermectin-sensitive Collies, analogous to the *mdr1* knockout mice, must have a genetic deficiency in the canine *MDR1* gene resulting in the expression of a non-functional P-gp. From that point researchers began to clone and sequence the canine *MDR1* cDNA in order to identify the proposed genetic defect in ivermectin-sensitive Collies.

#### IVERMECTIN-SENSITIVE COLLIES AND THE NT230(DEL4) *MDR1* MUTATION

When ivermectin-sensitive Collies are exposed to 100-120 µg/kg ivermectin they develop mild neurological toxicity including mydriasis, ataxia and depression [40,41], whereas much higher doses of up to 2 mg/kg are well tolerated by Beagle dogs or ivermectin non-sensitive Collies [29]. Ivermectin susceptibility, though, is not present in all individuals of the Collie breed and it is not related to sex, collie-eye anomaly, or hair coat type. Nevertheless, this was regarded as a genetically determined drug susceptibility [40,42,45]. In 2001, Mealey *et al.* [46] were the first to identify a 4-bp deletion mutation in the *MDR1* gene of an ivermectin-sensitive Collie. This nt230(del4) *MDR1* deletion produces a frame shift at amino acid position 75 followed by a premature stop codon at amino acid position 91 Fig. (3). This severely truncated protein is non-functional and was undetectable by Western blotting [47]. Based on microsatellite analyses it has been proposed that all dogs carrying this mutant nt230(del4) *MDR1* allele are descendants of a dog that lived in the United Kingdom in the 1800s, predating the emergence of formal breed lines [57].

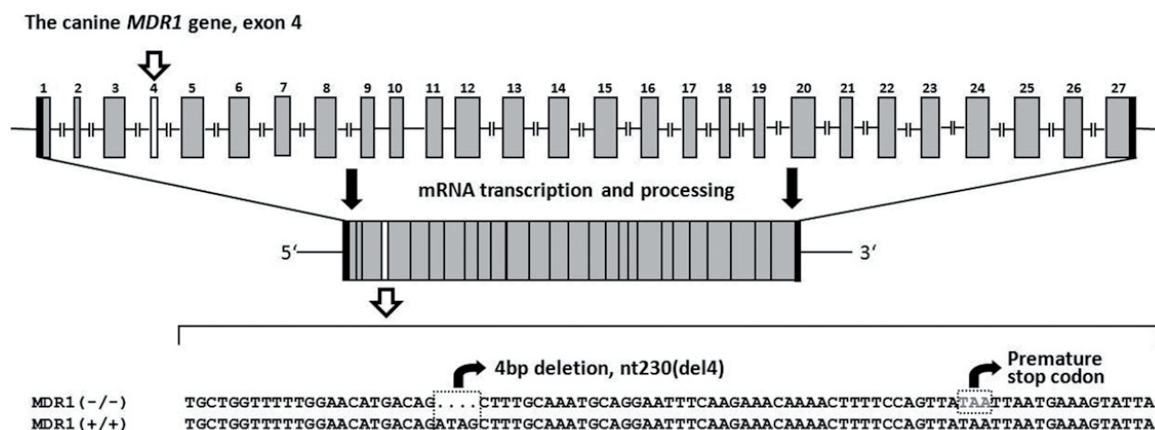
Because of the predominant role of P-gp in drug disposition, mutation of the *MDR1* gene alters the pharmacokinetic properties of P-gp transported drugs, leading to enhanced oral bioavailability and reduced drug elimination through the liver, kidney and gut. Moreover, the brain penetration of P-gp transported drugs is increased and in many cases provokes neurological toxicity [8-10,48,49] Fig. (1). Clinical observations have already indicated that apart from macrocyclic lactones, the antidiarrheal drug loperamide, which is normally excluded from the brain by P-gp, causes neurological toxicosis in *MDR1*(-/-) dogs at normal therapeutic doses [50,51]. Although not explicitly analysed, loperamide toxicosis in these dogs was most likely due to increased brain penetration in the absence of P-gp [52,53]. An increased brain penetration of many further drugs was experimentally demonstrated in *mdr1* knockout mice including vinblastine, doxorubicin, paclitaxel, quinidine, ondansetron, cyclosporine

and verapamil (see Table 1). Although drug transport was not investigated with the canine P-gp for most of these drugs, increased brain penetration and central adverse effects also have to be assumed in *MDR1*(-/-) mutant dogs. The plasma pharmacokinetics of other drugs are altered in *MDR1* mutant dogs and so may provoke increased adverse effects in these dogs. For example, digoxin toxicity was documented in a *MDR1*(-/-) Collie dog which developed an unusually high serum digoxin concentration leading to digoxin toxicosis [54]. Furthermore, increased sensitivity to acepromazine and butorphanol was observed in *MDR1*(-/-) dogs that experienced a more pronounced and protracted central nervous system (CNS) depression compared to *MDR1* normal dogs [55]. A recent clinical study showed that the *MDR1* genotype is also highly relevant for veterinary oncology. Mealey *et al.* [56] analysed 34 dogs diagnosed with lymphoma that were to be treated with vincristine including four *MDR1*(-/-) and four *MDR1*(+/-) dogs. This study showed that *MDR1* mutant dogs are extremely susceptible to myelosuppression and gastrointestinal toxicosis induced by the vincristine treatment, resulting in higher morbidity and mortality rates and treatment delays [56].

Following identification of the nt230(del4) *MDR1* gene deletion mutation several *MDR1* genotyping methods were developed. Most of them use PCR amplification of the nt230 flanking region on exon 4 of the canine *MDR1* gene, followed by length polymorphism analysis using polyacrylamide gel electrophoresis [57-61]. More recently, a fluorogenic 5' nuclease TaqMan allelic discrimination method was described which allows *MDR1* genotyping without post-PCR processing and is useful for routine diagnostics [62]. To date, *MDR1* genotyping is also commercially available in many countries so that veterinarians can find the *MDR1* genotype in a canine patient before treatment is started with a P-gp transported drug.

#### Breed Predisposition of the *MDR1* Mutation

Over the last few years, systematic genotyping analyses of the distribution of the nt230(del4) *MDR1* mutation among different breeds were performed on more than 15,000 dogs worldwide [76]. These studies revealed, that apart from the Collie, 12 further dog breeds are affected by this gene deletion mutation: Longhaired Whippet, Shetland Sheepdog, Miniature Australian Shepherd, Silken Windhound, McNab, Australian Shepherd, Wäller, White Swiss Shepherd, Old English Sheepdog, English Shepherd, German Shepherd and Border Collie (Table 2) [57,61,76,77]. Among all of these dog breeds, the allelic frequency for the mutant *MDR1*(-) allele is highest in the Collie with similar frequency values worldwide: 51%-56% in the USA [57,61,78], 55%-59% in Germany [76,77], 60% in the United Kingdom [57] and 56% in Australia [79]. Apart from these purebred dogs, surprisingly high frequency values were also found in herding breed mixes as well as in many unclassified mixed breed dogs [61,76]. In contrast, several other dog breeds that also show close genetic relationships or share a breeding history with one of these predisposed dog breeds are presumed to be free of this mutation including the Bearded Collie, Anatolian Shepherd Dog, Greyhound, Belgian Tervuren, Kelpie, Borzoi, Australian Cattle Dog and Irish Wolfhound [57, 61,76].



**Fig. (3).** The nt230(del4) *MDR1* mutation in dogs. The canine *MDR1* gene is organised in 27 exons, located on chromosome 14. The transcribed *MDR1* coding sequence comprises 3846 bp and codes for the 1281 amino acids canine P-gp. The nt230(del4) mutation was localised to exon 4 and involves a 4-bp deletion followed by a premature stop codon. The truncated P-gp expressed from the mutant *MDR1*(-) allele is non-functional. Dogs with a homozygous nt230(del4) mutation are extremely sensitive to macrocyclic lactones.

**Table 1. Drugs Transported by P-gp which Show Enhanced Brain Concentrations in *mdr1a*(-/-) or *mdr1a,b*(-/-) Knockout Mice Compared to Wild-Type Mice after Intravenous Application (if not Otherwise Stated). Macrocyclic Lactones are Depicted in Bold Face**

Drug	Time after Application	Brain Concentration Ratio [Knockout / Wild-Type]	Reference
<b>Ivermectin</b>	24 h	87 <sup>a,c</sup>	[32]
<b>Ivermectin</b>	24 h	60 <sup>b,c</sup>	[35]
<b>Ivermectin</b>	4 h	46 <sup>a,c</sup>	[43]
<b>Ivermectin</b>	8 h	36 <sup>b</sup>	[35]
Nelfinavir	4 h	36 <sup>a</sup>	[63]
Digoxin	4 h	35 <sup>a</sup>	[64]
Tacrolimus	5 h	33 <sup>a</sup>	[65]
Quinidine	0.5-5 h	33 <sup>b,d</sup>	[53]
Quinidine	10 min	28 <sup>a,c</sup>	[66]
<b>Ivermectin</b>	24 h	27 <sup>b,d</sup>	[44]
Flesinoxan	3 h	27 <sup>a</sup>	[67]
Vinblastine	4 h	22 <sup>a</sup>	[32]
Verapamil	0.5-5 h	21 <sup>b,d</sup>	[53]
Amiodarone	0.5-5 h	19 <sup>b,d</sup>	[53]
Cyclosporin A	4 h	17 <sup>a</sup>	[64]
Loperamide	0.5-5 h	17 <sup>b,d</sup>	[53]
Loperamide	4 h	14 <sup>a,c</sup>	[52]
Paclitaxel	24 h	12 <sup>b</sup>	[68]
<b>Moxidectin</b>	24 h	11 <sup>b,d</sup>	[44]
Indinavir	4 h	11 <sup>a</sup>	[63]
Verapamil	1 h	9.5 <sup>a</sup>	[69]

(Table 1) contd....

Drug	Time after Application	Brain Concentration Ratio [Knockout / Wild-Type]	Reference
Asimadoline	1 h	9.1 <sup>b</sup>	[70]
Metoclopramide	0.5-5 h	7.6 <sup>b,d</sup>	[53]
Saquinavir	4 h	7.4 <sup>a</sup>	[63]
Docetaxel	24 h	6.2 <sup>b</sup>	[71]
<b>Selamectin</b>	24 h	5.0 <sup>b,c</sup>	[35]
Doxorubicin	24 h	5.0 <sup>a</sup>	[72]
Cortisol	2 h	4.6 <sup>b,d</sup>	[73]
Ondansetron	30 min	4.0 <sup>a</sup>	[52]
Sparfloxacin	2 h	3.9 <sup>b,e</sup>	[74]
Doxorubicin	1 h	3.2 <sup>a,e</sup>	[75]
Grepafloxacin	2 h	2.9 <sup>b,e</sup>	[74]
Dexamethasone	4 h	2.5 <sup>a</sup>	[64]
Morphine	4 h	1.7 <sup>a</sup>	[64]

<sup>a</sup> *mdr1a*(-/-) knockout mice were used; <sup>b</sup> *mdr1a,b*(-/-) double knockout mice were used; <sup>c</sup> oral application; <sup>d</sup> subcutaneous injection; <sup>e</sup> data represent brain-to-plasma partition coefficient ( $K_{p,brain,ko} / K_{p,brain,wt}$ ).

**Table 2. Breed Distribution of the nt230(del4) *MDR1* Mutation in Dogs Worldwide**

Dog Breed	Range of Allelic Frequency (%) <i>MDR1</i> (-)	References
Collie	55 – 57	[57,61,76-79]
Longhaired Whippet	42	[57]
Shetland Sheepdog	7– 35	[57,61,76,77,80]
Miniature Australian Shepherd	20 – 26	[57,61]
Silken Windhound	18	[57]
McNab	17	[57]
Australian Shepherd	17 – 46	[57,61,76,77]
Wäller	17 – 19	[76,77]
White Swiss Shepherd	14	[76]
Old English Sheepdog	1 – 11	[57,61,76,80]
English Shepherd	7	[57]
German Shepherd	6	[61]
Border Collie	1 – 2	[61,76,77,80]
Herding-breed mix	6 – 7	[61,76]
Mixed breed	2 – 7	[61,76]

Note: Data from the referenced studies were included when at least 30 dogs were analysed per breed.

Despite plenty of *MDR1* genotyping data, on a practical basis it is difficult for veterinarians and dog owners to recognise whether this *MDR1* gene deletion mutation is relevant for an individual canine patient/dog. Nevertheless, *MDR1*

genotyping is essential for all of the purebred dogs listed in Table 2 and also for mixed breed dogs prior to extra-label use of higher doses of macrocyclic lactones, e.g. for the treatment of canine generalised demodicosis (see Table 3), if

severe and life-threatening adverse drug reactions are to be avoided. On the other hand, *MDR1* genotyping is not absolutely necessary in other purebred dog breeds not listed in Table 2.

### TREATMENT OF *MDR1* MUTANT DOGS WITH MACROCYCLIC LACTONES

Macrocyclic lactones have potent anthelmintic and ectoparasitic properties and are widely used in veterinary medicine for the treatment of parasitic diseases [81]. Commercially available products include the avermectins ivermectin, doramectin and selamectin as well as the milbemycins moxidectin and milbemycin oxime [82]. In vertebrates, all macrocyclic lactones are considered to have the same mechanism-based toxicity by binding to neuronal GABA-gated chloride channels [26-28]. Therefore, *MDR1* mutant dogs which do not express P-gp at the blood-brain barrier in general are prone to neurotoxicity by macrocyclic lactones due to the increased brain penetration. Nevertheless, treatment of these dogs with macrocyclic lactones does not inevitably result in neurological symptoms, since, the safety of treatment depends on the following four factors:

#### Dosage/Treatment Indication

Neurotoxicosis is induced in *MDR1*(-/-) dogs after oral application of  $\geq 100$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  ivermectin or doramectin [40-42,60,83],  $\geq 400$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  moxidectin [58] or  $\geq 5$   $\text{mg}/\text{kg}$  milbemycin oxime [84]. Treatment below these dosages, e.g. for heartworm prevention, is tolerated even by *MDR1* mutant dogs. The dosage of macrocyclic lactones is also crucial for the outcome from intoxication, irrespective of whether the macrocyclic lactone was therapeutically applied or accidentally ingested. For example, after the subcutaneous application of doramectin at 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  two *MDR* mutant White Swiss Shepherd dogs showed severe neurotoxicosis which required intensive care, but both dogs fully recovered within 14 days [60]. In contrast, we attended two other clinical cases where an Australian Shepherd and a Collie dog, both with the *MDR1*(-/-) genotype, died within 5-6 days after application of a slightly higher dose of 1  $\text{mg}/\text{kg}$  (unpublished cases). Both dogs showed extremely high drug concentrations in their brain see Fig. (2).

#### Route of Application

Spot-on applications of ivermectin and moxidectin did not induce neurological toxicity in *MDR1*(-/-) dogs at dosage of up to 1.0  $\text{mg}/\text{kg}$  and 2.5  $\text{mg}/\text{kg}$ , respectively [85,86]. In contrast, oral application of adequate doses for treatment purposes would be highly toxic for *MDR1* mutant dogs. Therefore, the route of application is crucial for the safety of treatment with macrocyclic lactones [87]. This particularly applies to spot-on formulations of moxidectin and selamectin which are labelled for use in dogs against a number of endo- and ectoparasitic diseases and should not be applied orally to *MDR1*(-/-) dogs. Ivermectin, apart from the oral application, is often extra-label used subcutaneously at concentrations of 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for the treatment of mange disease. This route of application in *MDR1*(-/-) dogs generally results in less severe neurotoxicosis which is, however, longer lasting compared with the oral route of application [60,88,89].

#### Individual Compound

In dogs with homozygous *MDR1*(-/-) mutation, ivermectin and doramectin seem to have a similar neurotoxicological potential and induce severe neurological toxicity at dosages of 200-600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  which often results in coma and death of the animals [40,42,60]. In contrast, other macrocyclic lactones, such as selamectin, moxidectin and milbemycin oxime, claim to be safer in the treatment of *MDR1*(-/-) dogs and seem to have a lower neurotoxicological potential. Milbemycin oxime and selamectin only showed mild neurological toxicity in *MDR1* mutant dogs at oral doses of  $\geq 5$   $\text{mg}/\text{kg}$  and  $>15$   $\text{mg}/\text{kg}$ , respectively [84,90,91]. Moxidectin seems to be intermediate in this respect and induced mild neurotoxicosis in *MDR1* mutant dogs at doses of  $\geq 400$ -1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [58,92]. Nevertheless, it has to be emphasised that for these compounds the safety margin is also dramatically reduced if P-gp is not expressed at the blood-brain barrier, so that treatment of *MDR1* mutant dogs with macrocyclic lactones in general requires particular caution.

#### Heterozygous *MDR1*(+/-) or Homozygous *MDR1*(-/-) Genotype of the Dog

Although systematic studies on the application of macrocyclic lactones to *MDR1*(-/-) and *MDR1*(+/-) dogs have not been performed for any compound, many clinical cases of macrocyclic lactone intoxication in Collies or related dog breeds with unknown genetic *MDR1* status resulted in two different kinds of toxic reactions: dogs with mild ataxia and CNS depression or even more severe neurotoxicosis which quickly recovered (presumably *MDR1*(+/-) dogs) and dogs with severe and long-lasting intoxications (presumably or post-case documented *MDR1*(-/-) dogs) [51,83,93]. Furthermore, it was shown that *MDR1*(+/+) as well as *MDR1*(+/-) dogs can tolerate oral doses of ivermectin at up to 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [40,46,94], whereas this dosage would induce life-threatening neurotoxicosis in *MDR1*(-/-) dogs [42,88]. Therefore, *MDR1*(+/-) dogs can be regarded as having an intermediate macrocyclic lactone sensitive phenotype which is relevant in cases of a high dose protocol, e.g. for the treatment of canine generalised demodicosis [94]. However, it is unlikely (and the authors were not aware of any clinical case) that *MDR1*(+/-) dogs would suffer from coma or death even under such high therapeutic dosage regimens, unlike *MDR1*(-/-) dogs (see Table 3).

#### HEARTWORM PREVENTION IN DOGS WITH MACROCYCLIC LACTONES

Among the available macrocyclic lactones, four compounds are currently used as heartworm preventatives in a variety of different formulations: ivermectin, selamectin, milbemycin oxime and moxidectin. These compounds interrupt larval development during the first two months after infection and, therefore, have a long application phase and are administered monthly or even less frequently [95].

**Ivermectin** is marketed as a once monthly heartworm preventative at 6-12  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (*Heartgard*<sup>®</sup>) and also is microfilaricidal at this dosage [96]. Although *MDR1*(-/-) dogs are extremely sensitive to ivermectin, it has to be emphasised that no adverse drug reactions have been identified at these low preventive doses of ivermectin. Even after oral applica-

**Table 3. Treatment Safety of Ectoparasitic and Endoparasitic Infections with Macrocyclic Lactones in *MDR1*(+/+) Normal and *MDR1*(-/-) Mutant Dogs**

Indication	Drug	Dosage	Label	<i>MDR1</i> (+/+)	<i>MDR1</i> (-/-)
Heartworm prevention	Ivermectin	6-12 µg/kg PO once monthly	Heartgard <sup>a</sup>	+	+
	Moxidectin	170 µg/kg SC every six months	ProHeart <sup>a</sup>	+	+
	Moxidectin	2.5 mg/kg moxidectin + 10 mg/kg imidacloprid spot-on monthly	Advocate <sup>b</sup> , Advantage multi <sup>a</sup>	+	+
	Selamectin	6 mg/kg spot-on monthly	Stronghold <sup>b</sup> , Revolution <sup>a</sup>	+	+
	Milbemycin oxime	500 µg/kg milbemycin oxime + 5 mg/kg praziquantel PO monthly	Milbemax <sup>b</sup>	+	+
	Milbemycin oxime	500-990 µg/kg milbemycin oxime PO monthly	Interceptor <sup>a</sup>	+	+
Generalised demodicosis	Moxidectin	2.5 mg/kg moxidectin + 10 mg/kg imidacloprid spot-on monthly	Advocate <sup>b</sup> , Advantage multi <sup>a</sup>	+	+
	Moxidectin	200-400 µg/kg PO daily	Extra-label	+	-
	Ivermectin	400-600 µg/kg PO daily	Extra-label	+	-
	Doramectin	600 µg/kg SC weekly	Extra-label	+	-
	Milbemycin oxime	0.5-2.0 mg/kg PO daily	Extra-label	+	-
Other ectoparasitic and endoparasitic infections	Ivermectin	50-200 µg/kg PO once	Extra-label	+	+/- <sup>c</sup>
	Ivermectin	300-400 µg/kg PO or SC weekly	Extra-label	+	-
	Moxidectin	250 µg/kg SC weekly	Extra-label	+	?
	Moxidectin	400 µg/kg PO every 3-4 days for 3-6 weeks	Extra-label	+	-
	Moxidectin	2.5 mg/kg moxidectin + 10 mg/kg imidacloprid spot-on monthly	Advocate <sup>b</sup> , Advantage multi <sup>a</sup>	+	+
	Selamectin	6 mg/kg spot-on monthly	Stronghold <sup>b</sup> , Revolution <sup>a</sup>	+	+
	Milbemycin oxime	500 µg/kg milbemycin oxime + 5 mg/kg praziquantel PO monthly	Milbemax <sup>b</sup>	+	+
	Milbemycin oxime	500-990 µg/kg milbemycin oxime PO monthly	Interceptor <sup>a</sup>	+	+

<sup>a</sup> FDA approved; <sup>b</sup> EMEA approved; <sup>c</sup> toxic at > 100 µg/kg; PO, oral application, SC, subcutaneous application; "+", tolerated, "-", not tolerated, may induce neurotoxicosis.

tion of the 10-fold dose of 60 µg/kg [83] no adverse drug reactions were observed in ivermectin-sensitive Collies. This indicates that low dose ivermectin is a safe heartworm preventative even in *MDR1* mutant dogs [83].

Compared with other macrocyclic lactone compounds **selamectin** is unique within its clinical spectrum and is available in a topical formulation (*Stronghold*<sup>®</sup>, *Revolution*<sup>®</sup>). Selamectin is applied at 6-12 mg/kg once per month and at this dosage is effective at preventing heartworm infections and is additionally indicated for flea infestation, sarcoptic mange, ear mites and even tick infestation [90,97]. The safety of selamectin treatment was specifically analysed in ivermectin-sensitive Collies and it produced no adverse drug reactions, even at supra-therapeutic doses [90,91].

**Milbemycin oxime** is, apart from other indications, an effective heartworm preventative at a minimum recommended oral dose of 0.5 mg/kg at monthly intervals (*Interceptor*<sup>®</sup>, *Milbemax*<sup>®</sup>) [98]. When doses of 0.5-2.5 mg/kg

milbemycin oxime were orally applied to ivermectin-sensitive Collies, no clinical signs of neurotoxicosis were observed [84]. Therefore, this compound can be safely used for heartworm prevention in *MDR1*(-/-) dogs. At higher concentrations of 5-10 mg/kg, as well as at daily dosing protocols of 0.5-2.8 mg/kg, which are normally well tolerated in dogs, milbemycin oxime provoked neurological toxicity in *MDR1* mutant dogs including ataxia, salivation and depression [84,99].

**Moxidectin** has been more recently marketed as a heartworm preventative (*ProHeart*<sup>®</sup>) and has been shown to be safe and effective at oral doses of 3 µg/kg given monthly [100]. A safety evaluation was specifically performed in ivermectin-sensitive Collies using an oral application of up to 90 µg/kg. Even at this 30-fold therapeutic dosage, moxidectin produced no neurotoxic adverse effects [92], indicating that moxidectin can be safely used as a heartworm preventative in *MDR1*(-/-) dogs. Apart from the oral formulation, moxidectin is also approved for heartworm prevention in a

topical combination formulation of 10% w/v imidacloprid plus 2.5% w/v moxidectin (*Advocate*<sup>®</sup>, *Advantage multi*<sup>®</sup>) at a monthly application [101]. At the recommended therapeutic dosage, 2.5 mg/kg of moxidectin is applied per interval and this treatment has been shown to be well tolerated, even in ivermectin-sensitive Collies [86].

In summary, ivermectin, selamectin, moxidectin and milbemycin oxime are effective and safe drugs for heartworm prophylaxis with varying spectra and routes of application [95]. All of these drugs can be safely administered to *MDR1*(-/-) mutant dogs at the preventative dosage and by the correct application [102]. However, it has to be emphasised that at doses higher than those used for heartworm prevention, *MDR1* mutant dogs will experience neurological toxicity with any of the macrocyclic lactones in this category (see Table 3).

### MANGE TREATMENT IN DOGS WITH MACROCYCLIC LACTONES

Generalised demodicosis caused by *Demodex canis* mites is one of the most common skin diseases in dogs and is commonly regarded as difficult to treat successfully. Only a very few drugs are approved for the treatment of canine generalised demodicosis, including amitraz, an alpha-adrenergic receptor agonist used as a dip, and the topical combination formulation of 10% w/v imidacloprid plus 2.5% w/v moxidectin marketed as *Advocate*<sup>®</sup> or *Advantage multi*<sup>®</sup>. Apart from these medications, other macrocyclic lactones, although not approved for this indication, are commonly used in the management of this disease including ivermectin, doramectin and milbemycin oxime [103,104]. For example, ivermectin is administered at oral daily doses of 300-600 µg/kg, doramectin at 400-600 µg/kg and milbemycin oxime at 0.5-2.8 mg/kg for the treatment of canine generalised demodicosis [103,105-109]. Due to the hypersensitivity of *MDR1* mutant dogs to macrocyclic lactones, these medications have not been officially approved for the treatment of canine generalised demodicosis. Nevertheless, several therapeutic protocols exist which are generally well tolerated in *MDR1* normal dogs. These protocols usually use a gradual increase in dose over the first few days of treatment in order to recognise sensitive dogs before reaching a critical dosage that would induce life-threatening intoxication. This procedure was essential before the nt230(del4) *MDR1* mutation was discovered, but nowadays it may be replaced by *MDR1* genotyping. Nevertheless, due to the widespread distribution of the *MDR1* mutation amongst different breeds, also including many mixed breed dogs, it is difficult to recognise whether an individual canine patient might be affected by this mutation or not. Therefore, the gradually increasing treatment protocol is still recommended. In detail, such protocols start with e.g. an oral ivermectin application at 50 µg/kg on the first day, followed by 100 µg/kg on the second day, 150 µg/kg on the third day, 200 µg/kg on the fourth day, and finally 300 µg/kg on the fifth and following days for at least 12 weeks [110]. During this dosage regimen it is very important to recognise the initial symptoms of ivermectin-induced neurological toxicity, such as ataxia, mydriasis and hypersalivation, as soon as possible and to immediately discontinue treatment in such a case.

### Ivermectin

As already mentioned above, ivermectin orally applied at 50-60 µg/kg is well tolerated by ivermectin-sensitive dogs [42,83], but neurological toxicity is induced at higher doses of >100 µg/kg: after application of 100-120 µg/kg, mild depression and ataxia, as well as disorientation and mydriasis have been observed within 12 hours after application [40,41,92,111]; 125-170 µg/kg induced more severe ataxia, stupor, recumbency, head bobbing, apparent blindness, facial twitches, hypersalivation, episodes of hyperventilation and bradycardia [40,41,83,112,113]; still higher doses of 200-250 µg/kg caused severe neurotoxicosis, including depression, ataxia and apparent blindness as early onset symptoms, as well as vomiting, paddling movements, tremor and excessive salivation, followed by stupor, feeble attempts to crawl, recumbency, and finally non-responsiveness and coma within 30-50 hours after application, often resulting in death [40-42,88,113-115]; very high doses of ivermectin, of up to 600 µg/kg, accelerated the onset of symptoms and often resulted in death within 48 hours or euthanasia if the option of mechanical ventilation was rejected [40,42,88]. In conclusion, treatment protocols with 300-600 µg/kg ivermectin or even doramectin are unfeasible in *MDR1* mutant dogs and would clearly result in life-threatening intoxication (see Tables 3 and 4).

In contrast, acute and subchronic ivermectin toxicity studies in *MDR1* normal dogs demonstrated a large safety margin: ivermectin can be administered to Beagles, as well as to ivermectin non-sensitive Collies, at a single oral dose of 2 mg/kg or at a daily oral dose of 500 µg/kg over 14 days without any evidence of toxicosis [29]. Only at higher doses of 1 mg/kg ivermectin applied daily for 14 weeks or at a single dose of 2.5 mg/kg did these dogs show mydriasis as the initial symptom of drug-induced neurological toxicity [116,117]. Even higher doses of 5-20 mg/kg additionally caused ataxia and tremor, and 40 mg/kg proved to be fatal [93,115,116]. The oral LD<sub>50</sub> for ivermectin in Beagle dogs was estimated to 80 mg/kg. Post-mortem, these ivermectin-poisoned dogs were pathologically normal and no specific lesions were observed in the brain [118].

### Moxidectin

Several *in vitro* transport studies also confirmed that moxidectin is transported by P-gp, although it seems to be a weaker substrate and inhibitor of P-gp compared with ivermectin [30,119-121]. Closer analysis of the interaction between moxidectin and P-gp revealed that moxidectin can inhibit the P-gp efflux function with a similar efficiency compared to ivermectin, however, it requires concentrations 10 times higher to reach the same inhibitory effect. This would be consistent with a lower affinity binding of moxidectin to P-gp compared with other macrocyclic lactones [31]. Very recently, Kiki-Mvouaka *et al.* [44] analysed the *in vivo* pharmacokinetics of moxidectin in the *mdr1a,b*(-/-) knockout mouse model in comparison with ivermectin. After subcutaneous applications of 200 µg/kg for both drugs, equal drug concentrations of approximately 65 ng/g were found in the brain 24 hours after application, indicating that in the absence of P-gp in the blood-brain barrier both compounds show comparable brain penetration. However, in the wild-type mice absolute brain concentrations were more than 10-

fold higher for moxidectin, demonstrating that P-gp *in vivo* transports moxidectin less effectively at the blood-brain barrier compared with ivermectin [44] see Fig. (2).

For the treatment of canine generalised demodicosis, 200-400 µg/kg moxidectin is commonly applied orally per day and this treatment is normally well tolerated in dogs [108]. Higher doses of 1 mg/kg were even tolerated in Beagle dogs with no clinical signs of neurological toxicity [122]. As already mentioned above, moxidectin is safely tolerated even by ivermectin-sensitive Collies, but only at low oral doses of 90 µg/kg [83,92]. However, as shown in an Australian Shepherd with the *MDR1*(-/-) genotype, which was treated with a gradually increasing dosage protocol, neurological toxicity was induced after reaching the target dose of 400 µg/kg. After discontinuing the treatment the dog fully recovered, indicating that the neurotoxicosis was induced by moxidectin [58] (Table 4). Therefore, a treatment protocol of 400 µg/kg moxidectin orally per day cannot be applied to *MDR1*(-/-) dogs for the treatment of canine generalised demodicosis. On the other hand and in contrast to this extra-label oral application, moxidectin is approved for the treatment of canine generalised demodicosis and a range of other endo- and ectoparasites in a topical combination formulation of 10% w/v imidacloprid plus 2.5% w/v moxidectin [123]. To the best of our knowledge, this topical formulation currently represent the only macrocyclic lactone-containing treatment option which is licensed for the treatment of canine generalised demodicosis. The safety of this formulation was evaluated under field conditions in different dog breeds and was generally well tolerated at the therapeutic dosage [104,123]. During the safety evaluation this combination formulation was also specifically administered to ivermectin-sensitive Collies. At the approved topical application, this formulation was safely tolerated by *MDR1* mutant Collies even at the 5-fold therapeutic dosage containing 32.5 mg/kg moxidectin [86]. However, after oral application of only 40% (1 mg/kg) of the recommended topical dose, neurological toxicity occurred in the drug-sensitive Collies [124], emphasising that oral ingestion of this formulation must definitely be precluded in *MDR1*(-/-) dogs.

### Milbemycin Oxime

Milbemycin oxime has been used for the treatment of generalised demodicosis at doses ranging from 0.5-2.8 mg/kg [103,109]. Only one study is available which analysed the safety of milbemycin oxime in ivermectin-sensitive Collies. In this study, the characteristic neurological toxicity, albeit of short duration, was observed in individual Collies applied with 5 mg/kg milbemycin oxime orally, and included mild depression, excessive salivation and ataxia [84]. At the higher dosage of 10 mg/kg all sensitive Collies developed signs of mild depression and ataxia within 6 hours after treatment. Neurotoxicosis persisted for at least 24 hours, but all dogs fully recovered within 48 hours after treatment. In another study, milbemycin oxime was applied to two ivermectin-sensitive Collies as a sesame oil solution in gelatin capsules. Whereas at 1.25 mg/kg no adverse drug reactions were observed, both dogs became ataxic within 4 hours of treatment at 2.5 mg/kg [90]. In contrast, in an earlier study of the application of milbemycin oxime at dosages of up to 25 mg/kg in rough-coated Collies, no adverse drug reactions

were induced [125]. However, it has to be assumed that these dogs, although of the Collie breed, were not affected by the *MDR1* mutation. More recently, Barbet *et al.* [99] analysed the safety of treatment with milbemycin oxime in 22 dogs diagnosed with generalised demodicosis including two *MDR1*(-/-) and one *MDR1*(+/-) dog. All dogs received milbemycin oxime at a daily dose of 1-2.2 mg/kg, which normally is well tolerated in dogs [109]. None of the *MDR1* normal dogs nor the heterozygous *MDR1*(+/-) dogs experienced any adverse drug reactions under treatment. In contrast, and despite the low dose initiation of treatment with 300-800 µg/kg/day, both *MDR1*(-/-) mutant dogs experienced ataxia following an increase of the dose to 1.5-1.6 mg/kg/day. When the treatment dose of milbemycin oxime then was decreased to a tolerable dose of 600 µg/kg, both dogs recovered [99] (Table 4). This study clearly indicates that the knowledge of the *MDR1* genotype is critical in order to achieve a milbemycin oxime dosage regimen that is tolerated without causing adverse drug reactions. It further shows that milbemycin oxime may be the safer choice than ivermectin or doramectin for the treatment of generalised demodicosis in *MDR1*(-/-) dogs.

### Selamectin

Selamectin is marketed as a spot-on formulation with a minimum therapeutic dosage of 6 mg/kg (*Stronghold*<sup>®</sup>, *Revolution*<sup>®</sup>). Although not effective for the treatment of canine generalised demodicosis, selamectin shows activity against both insect and arachnid classes of ectoparasites and is licensed for the control of canine sarcoptic mange [90,97,126]. *In vitro* transport studies showed that selamectin is transported by P-gp as equally as ivermectin [30,121]. Thus, it was assumed that *MDR1* mutant dogs would also exhibit increased drug sensitivity against selamectin. Indeed, an *in vivo* study by our laboratory confirmed that selamectin at concentrations of 12 mg/kg (representing the maximum dose for the body weight range) shows significantly higher brain penetration in *mdr1a,b*(-/-) knockout mice compared with wild-type mice by any route of application (oral, intravenous, spot-on) [35]. However, the brain concentration ratios (knockout vs. wild-type mice) of 5-fold to 10-fold were much less pronounced than the respective ratios for ivermectin applied at 200 µg/kg (i.e. 36-fold to 60-fold) see Fig. (2). Furthermore, brain-to-plasma concentration ratios in the wild-type mice were much higher for selamectin than for ivermectin (0.32 vs. 0.09, respectively), which is consistent with a higher efflux rate at the blood-brain barrier for ivermectin than for selamectin [35]. These findings support more recent data from *in vitro* studies by Lespine *et al.* [31] which showed that ivermectin has much higher affinity for P-gp compared with selamectin ( $K_i$  values: 0.05 µM vs. 1.0 µM, respectively). Based on this data, it may be speculated that the dimensions of the sugar moiety on the macrocycle (disaccharide substitution in ivermectin, monosaccharide substitution in selamectin) account for these different affinities to P-gp and can thus determine the extent of brain penetration of the respective compounds.

During a safety evaluation of the topical selamectin formulation, application studies were specifically performed in ivermectin-sensitive Collies. Although increased brain penetration has to be assumed in these dogs, selamectin produced

no adverse drug reactions at a dosage of 40 mg/kg topically or 15 mg/kg orally, which represent 3-7 times the minimum therapeutic dosage of 6 mg/kg [90,91] (Table 4). Thus, the neurotoxic potential of selamectin seems to be much lower compared to all of the other macrocyclic lactones which provoke neurological toxicity in *MDR1* mutant dogs at much lower dosages and which reach much lower drug concentrations in the brain see Fig. (2). Therefore, we would anticipate that selamectin and ivermectin would exhibit different affinities or different intrinsic activities for vertebrate GABA-activated chloride channels. To prove this conjecture, it will be necessary to conduct comparative receptor binding assays in brain preparations. These should specifically address the role of the substitutions at positions C5 (NOH in selamectin and OH in ivermectin) and C25 (cyclohexyl in selamectin and *sec*-butyl/isopropyl in ivermectin B1) since these have previously been reported to significantly affect the antiparasitic activity of both compounds [81,127,128].

#### **MDR1 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS AND IVERMECTIN SENSITIVITY**

Several clinical studies showed that ivermectin and even milbemycin oxime or moxidectin applied at a high dose protocol for the treatment of canine generalised demodicosis are generally well tolerated in *MDR1* normal dogs [103]. However, signs of subchronic neurotoxicity are occasionally seen in individual dogs treated with a daily high dose protocol. In these dogs, the onset of toxicity signs is seen several days or weeks after initiation of the treatment, in particular with ivermectin at 400-600 µg/kg/day, but these normally resolve after discontinuing the treatment, indicating that the macrocyclic lactone causes this intoxication [94]. These subchronic neurotoxicity reactions most likely represent individual differences in the sensitivity to ivermectin based on genetic variants [110]. For example, Bissonnette *et al.* [94] described a *MDR1*(+/-) juvenile mixed breed dog which showed neurological toxicity including ataxia, tremor and depression after daily ivermectin application at 670 µg/kg after seven weeks of therapy, indicating that at least one intact *MDR1* allele may protect the dog from acute neurotoxicity after high dose applications of ivermectin. On the other hand, dogs that actually have the intact *MDR1*(+/+) genotype, developed subchronic neurological toxicity at much shorter treatment intervals. It may be speculated that these dogs show lower expression of P-gp at the blood-brain barrier or that they may express a less active polymorphic P-gp. Currently, more than 30 single nucleotide polymorphisms are known in the canine *MDR1* gene (see Table 5) which might affect the transport function of P-gp, such as the Gln532Arg amino acid substitution which is located in direct proximity to the highly conserved and functionally important ABC signature motif of P-gp. However, whether one of these polymorphisms indeed correlates with increased drug sensitivity under high dose treatment protocols with macrocyclic lactones has to be investigated further.

#### **INTOXICATIONS FROM HORSE DEWORMING MEDICATION**

Ivermectin and moxidectin are commonly used in horses to treat parasitic diseases and are available as oral paste, oral liquid gel or tablet formulations, usually with 12-23 mg/g of

the active drug. As these preparations deliver doses intended for the treatment of horses, they are highly concentrated and contain very high absolute amounts of drug (≥ 120 mg ivermectin or > 200 mg moxidectin per applicator or package) which result in severe intoxication when accidentally ingested by dogs [130-134], particularly when the dog has the *MDR1*(-/-) genotype [135-137]. The severity of ivermectin or moxidectin induced neurotoxicosis in such cases is generally a dose-dependent phenomenon. Therefore, prognosis and successful treatment can only be predicted on the basis of certain knowledge about the amount of drug ingested, although in most cases this cannot be reconstructed. In addition, the prognosis and eventual outcome depend on a number of further factors, including, first of all, the *MDR1* genotype of the dog, the individual as well as breed-typical constitution of the dog (which is somewhat different *e.g.* between Collie and Longhaired Whippet dogs) and the history of the toxicosis development (how rapidly and with which clinical signs it appears). Generally, severe clinical CNS depression occurring within 1-2 hours after ingestion or rapidly worsening toxicosis indicate the presence of the *MDR1* mutation and/or ingestion of very high doses of ivermectin. Mostly, these cases have a more critical progression and worse prognosis. On the other hand, *MDR1* mutant dogs with a slow onset of clinical signs, typically mydriasis, ataxia and apparent blindness within 4-8 hours after ingestion, have normally ingested low amounts and can be given a good prognosis. Although the recovery of poisoned dogs may take several weeks, many cases with long comatose episodes have returned to complete health [40,41,88,113,137]. This, however, requires good nursing and supportive care, including fluid treatment, nutritional support and vigilant cardiopulmonary monitoring.

#### **TREATMENT OF MACROCYCLIC LACTONE INDUCED NEUROTOXICOSIS**

Currently, there is no specific and safe antidote available for the treatment of macrocyclic lactone-induced toxicosis. Therefore, treatment is solely based on symptomatic and supportive care [138]. Following oral ingestion, the initial therapy should focus on drug removal by inducing emesis as soon as possible, or by gastric lavage. Then the serial administration of adsorbents (*e.g.* activated charcoal) is indicated, as long as the dog shows responsiveness, in order to discourage enteral absorption of the parent compound and to enhance the elimination of ivermectin via the faeces, which is the main route of excretion [139]. In contrast, forced diuresis will not facilitate the excretion of ivermectin. During long lasting phases of nonresponsiveness and recumbency, supportive care, parenteral alimentation and prevention of decubital ulcers are of particular importance, while electrolytes, fluid balance, blood pressure, heart rate, body temperature, blood gases and respiratory function have to be monitored [40]. In order to reduce gastric irritation and acidification overshoot, substances which inhibit gastric acid secretion such as cimetidine have been applied [118]. However, as cimetidine is a substrate of P-gp, omeprazole is recommended for better medication in *MDR1* mutant dogs. In severe cases with pronounced respiratory depression, mechanical ventilation may be required.

**Table 4. Neurotoxic Potential of Macrocyclic Lactones and Treatment Outcome in *MDR1* Mutant Dog**

Compound	Breed (Genotype or Phenotype)*	Dose (Application)	Clinical Signs of Neurotoxicosis and Outcome	Reference
Ivermectin	Collie (ISC)	60 µg/kg (PO)	No	[83]
	Collie (ISC)	100-120 µg/kg (PO)	Mild depression, ataxia, disorientation, mydriasis, recovery	[40,41,92,111]
	Collie (ISC)	125-170 µg/kg	Ataxia, recumbency, stupor, apparent blindness, hypersalivation, recovery	[83,112,113]
	Collie (ISC)	200-250 µg/kg (PO)	Ataxia, depression, apparent blindness, paddling movements, tremor, excessive salivation, stupor, coma, death/recovery	[40,42,88,113-115]
	Collie (ISC), Australian Shepherd <i>MDR1</i> (-/-)	200 µg/kg (SC)	Ataxia, loss of vision, hypersalivation, recumbency, stupor, recovery	[88,89]
	Collie <i>MDR1</i> (-/-)	400 µg/kg (SC)	Ataxia, salivation, tremor, nonresponsiveness, stupor, coma, recovery	AUD
	Collie (ISC)	1 mg/kg (spot-on)	No	[85]
Doramectin	Collie	200 µg/kg (SC)	Apparent blindness, ataxia, hypersalivation, recumbency, recovery	[129]
	2 White Swiss Shepherd dogs <i>MDR1</i> (-/-)	700 µg/kg (SC)	Loss of vision, ataxia, depression, hypersalivation, hyperventilation, tremor, recumbency, recovery	[60]
	Collie <i>MDR1</i> (-/-), Australian Shepherd <i>MDR1</i> (-/-)	1 mg/kg (SC)	Ataxia, tremor, stupor, coma, death	AUD
Selamectin	Collie (ISC)	40 mg/kg (spot-on) 15 mg/kg (PO)	No	[90,91]
	Collie (ISC)	90 µg/kg (PO)	No	[92]
Moxidectin	Australian Shepherd <i>MDR1</i> (-/-)	100 µg/kg increased to 400 µg/kg (PO)	Ataxia, crawling, hyperexcitability, recovery	[58]
	Collie (ISC)	32.5 mg/kg (plus 130 mg/kg imidacloprid) (spot-on)	No	[86]
Milbemycin oxime	Collie <i>MDR1</i> (-/-)	800 µg/kg/day incrementally increased to 1.5 mg/kg/day (PO)	Ataxia, recovery	[99]
		300 µg/kg/day incrementally increased to 1.6 mg/kg/day (PO)	Ataxia, recovery	
	Collie (ISC)	1.25 mg/kg (PO) 2.5 mg/kg (PO)	No Ataxia, recovery	[90]
	Collie (ISC)	2.5 mg/kg (PO) 5 mg/kg (PO)	No Ataxia, salivation, depression, recovery	[84]

\*Before the discovery of the nt230(del4) *MDR1* mutation, ivermectin-sensitive Collies (ISC) were identified by test application of 120-200 µg/kg ivermectin orally followed by documentation of neurological toxicity including ataxia and CNS depression. PO, oral application; SC, subcutaneous application; AUD, author's unpublished data

Table 5. Single Nucleotide Polymorphisms in the Canine *MDR1* cDNA Sequence

Single Nucleotide Polymorphism	Exon	GenBank Accession No.	Amino Acid Substitution	PolyPhen Prediction	SIFT Prediction
A23G	2	AJ419568	Silent		
A51G	2	AJ419568	Silent		
A86G	3	AJ419568	Silent		
A265G	4	AF536758, FJ617477	Thr89Ala	Benign	Tolerated
T564C	7	AJ419568	Silent		
A574G	7	AF045016	Silent		
A591C	7	AF536758	Silent		
G635C	7	AF045016	Silent		
A862G	9	AF536758	Arg288Gly	Benign	Tolerated
T985A	9	AF045016	Ser329Thr	Benign	Tolerated
A996G	9	AF045016	Silent		
T1232C	12	AJ419568	Silent		
A1595G	14	AB066299, AF045016	Gln532Arg	Probably damaging	May affect protein function
G1863A	15	AF092810	Silent		
G1914C	16	AF092810	Glu638Asp	Benign	Tolerated
A2082T	17	AF045016	Silent		
C2086T	17	AB066299, AF045016	Pro696Ser	Benign	Tolerated
A2181G	17	AF092810	Silent		
A2258T	18	AF092810	Asn753Ile	Benign	May affect protein function
C2322T	18	AF092810	Silent		
C2328T	19	AF092810	Silent		
G2349A	19	AF092810	Silent		
C2426T	20	AF092810	Pro809Leu	Possibly damaging	Tolerated
A2451C	20	AF092810	Silent		
G2471T	20	AF092810	Silent		
A2601G	21	AY582533	Silent		
G2741A	22	AF092810	Arg914Gln	Benign	Tolerated
A2781G	22	AF092810	Silent		
T2758C	22	AF092810	Silent		
G2907A	23	AJ419568	Silent		
A3442G	26	AY582533	Met1148Val	Benign	Tolerated
T3792C	28	AF536758	Silent		
G3817A	28	AF045016	Silent		
G3840A	28	AJ419568	Silent		

Note: The polymorphisms were identified based on sequence alignment of all *MDR1* cDNA sequences available in the GenBank/EBI/DDBJ database with the following accession numbers: AB066299, AF045016, AF092810, AF403240, AF536758, AJ419568, AY582533, DQ068953 and FJ617477. Potential effects of the non-silent polymorphisms were evaluated by SIFT and PolyPhen algorithms. Both programs consistently predicted the Gln532Arg polymorphism located in proximity to the ABC signature motif to functionally affect the P-gp transport function.

In some cases of severe neurotoxicosis where the dogs became unresponsive, physostigmine (a cholinesterase inhibitor) was administered slowly twice a day at a total dose of 40 µg/kg intravenously [41,89,113]. Physostigmine increases the synaptic concentration of acetylcholine in the central and peripheral nervous system. In the central nervous system acetylcholine acts as an excitatory neurotransmitter and induces central stimulation. In the periphery, acetylcholine acts parasympathomimetic and might be beneficial for gastrointestinal and motor stimulation. In the unresponsive dogs, physostigmine application resulted in a transient increase of responsiveness, muscle activity, heart and respiratory rate, and attempts to drink and eat, whereas in mild intoxication and responsive dogs it was of little benefit [41]. Nevertheless, in our experience physostigmine application is a helpful premedication in the recovery phase before food is made available or the dog is exercised by assisted walking. However, the duration of action for physostigmine lasted only 30-90 minutes. Physostigmine has no potency in accelerating the recovery of the dogs, or for general improvements of the outcome. Furthermore, in cases of overdose, physostigmine may be associated with the development of convulsions and bradycardia, and therefore must be handled with caution [41]. Treatment with glycopyrrolate before physostigmine administration may be warranted to avoid severe side effects, e.g. bradycardia. In summary, physostigmine is beneficial for transiently vitalizing a dog's constitution and for encouraging the owners that recovery might be possible. The major difficulty, however, involves the potential toxicity of physostigmine itself.

Picrotoxin has been used in a few cases of ivermectin-induced neurotoxicosis since it blocks GABA-activated chloride channels, and therefore was suggested as a possible antidote to ivermectin poisoning [140]. It was given by intravenous infusion at a dosage rate of 1 mg/min for 8 minutes and appeared to reverse severe CNS depression. However, picrotoxin infusion also induced violent clonic seizures 30 minutes after application which required treatment with thio-pental. Because of this, and due to its narrow safety margin, picrotoxin cannot be recommended for routine use as an antidote for ivermectin intoxication [140].

In the case of ivermectin-induced tremor, which often occurs as a late-onset symptom (typically within 12 hours after oral drug ingestion), benzodiazepine drugs such as diazepam should be avoided as avermectins enhance binding of these drugs to the GABA receptor and further enhance the GABAergic activity, leading to a more pronounced CNS depression [139]. Although not approved in a large number of dogs, propofol as a short acting hypnotic drug might be an appropriate medication in this phase of neurotoxicosis [132, 133].

Although there has been intensive research on macrocyclic lactones over three decades, the search for an effective and direct antidote against macrocyclic lactone-induced neurotoxicosis has not yet been successful. Therapy of intoxication is still based on symptomatic relief, but it lacks a macrocyclic lactone receptor binding antagonist. Ideally, this antagonist should exhibit high binding affinity without or with much less intrinsic activity than the macrocyclic lactones used therapeutically.

## CONCLUSIONS

Identification of the nt230(del4) *MDR1* mutation in drug-sensitive dogs has clearly improved the safety of treatment of parasitic diseases with macrocyclic lactones. Pharmacogenetic diagnostics can determine the *MDR1* genotype for an individual canine patient before macrocyclic lactone treatment is started which is particularly important for dog breeds highly predisposed towards this mutation. Depending on the *MDR1* genotype predictions can be made on whether the treatment will be safe and beneficial or whether the dog may experience neurological toxicity following drug application.

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.

## ACKNOWLEDGEMENT

None declared.

## ABBREVIATIONS

ABC	=	ATP-binding cassette
CNS	=	Central nervous system
GABA	=	Gamma-aminobutyric acid
MDR1	=	Multidrug resistance
P-gp	=	P-glycoprotein

## REFERENCES

- [1] Dean, M.; Annilo, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **2005**, *6*, 123-142.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.*, **2001**, *42*(7), 1007-1017.
- [6] Pastan, I.; Gottesman, M.M. Multidrug resistance. *Annu. Rev. Med.*, **1991**, *42*, 277-286.
- [7] Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Varadi, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev.*, **2006**, *86*(4), 1179-1236.
- [8] Fromm, M.F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2004**, *25*(8), 423-429.
- [9] Gerloff, T. Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **2004**, *369*(1), 69-77.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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. USA*, **1987**, *84*(21), 7735-7738.
- [15] 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.
- [16] 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. USA*, **1989**, *86*(2), 695-698.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Schinkel, A.H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin. Cancer Biol.*, **1997**, *8*(3), 161-170.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Turner, M.J.; Schaeffer, J.M. In: *Ivermectin and Abamectin*; Campbell, Ed.; Springer-Verlag V: New York, **1989**, pp. 73-88.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Pulliam, J.D.; Preston, J.M. In: *Ivermectin and Abamectin*; Campbell, Ed.; Springer-Verlag V: New York, **1989**, pp. 149-161.
- [30] 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.
- [31] Lespine, A.; Martin, S.; Dupuy, J.; Roulet, A.; Pineau, T.; Orłowski, S.; Alvinerie, M. Interaction of macrocyclic lactones with P-glycoprotein: structure-affinity relationship. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2007**, *30*(1), 84-94.
- [32] 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.
- [33] 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. USA*, **1997**, *94*(8), 4028-4033.
- [34] 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*, 5733-44.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] Pulliam, J.D.; Seward, R.L.; Henry, R.T.; Steinberg, S.A. Investigating ivermectin toxicity in collies. *Veterinary Medicine*, **1985**, *80*, 33-40.
- [43] 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.
- [44] Kiki-Mvouaka, S.; Menez, 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.
- [45] Seward, R.L. Reactions in dogs given ivermectin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1983**, *183*(5), 493.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] Tamai, I.; Tsuji, A. Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J. Pharm. Sci.*, **2000**, *89*(11), 1371-1388.
- [49] Mealey, K.L. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2004**, *27*(5), 257-264.
- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] Doran, A.; Obach, R.S.; Smith, B.J.; Hosea, N.A.; Becker, S.; Callegari, E.; Chen, C.; Chen, X.; Choo, E.; Cianfrogna, J.; Cox, L.M.; Gibbs, J.P.; Gibbs, M.A.; Hatch, H.; Hop, C.E.; Kasman, I.N.; Laperle, J.; Liu, J.; Liu, X.; Logman, M.; Maclin, D.; Nedza,

- F.M.; Nelson, F.; Olson, E.; Rahematpura, S.; Raunig, D.; Rogers, S.; Schmidt, K.; Spracklin, D.K.; Szewc, M.; Troutman, M.; Tseng, E.; Tu, M.; Van Deusen, J.W.; Venkatakrishnan, K.; Walens, G.; Wang, E.Q.; Wong, D.; Yasgar, A.S.; Zhang, C. 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.
- [54] 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.
- [55] Mealey, K.L. Adverse drug reactions in herding-breed dogs: the role of P-glycoprotein. *Comp. Contin. Educ. Pract. Vet.*, **2006**, 28(1), 23-33.
- [56] Mealey, K.L.; Fidel, J.; Gay, J.M.; Impellizeri, J.A.; Clifford, C.A.; Bergman, P.J. ABCB1-Delta polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine. *J. Vet. Intern. Med.*, **2008**, 22(4), 996-1000.
- [57] 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 mdr1-1D, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, 101(32), 11725-11730.
- [58] 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.*, **2005**, 28(1), 95-99.
- [59] Kawabata, A.; Momoi, Y.; Inoue-Murayama, M.; Iwasaki, T. Canine mdr1 gene mutation in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **2005**, 67(11), 1103-1107.
- [60] 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.
- [61] Mealey, K.L.; Meurs, K.M. Breed distribution of the ABCB1-Delta (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **2008**, 233(6), 921-924.
- [62] Klintzsch, 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, 272-277.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] 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.
- [66] Kusunohara, 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.
- [67] van, d. Sandt, I.; 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.
- [68] 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.
- [69] Hendrikse, N.H.; Schinkel, A.H.; de Vries, E.G.; Fluks, E.; Van der Graaf, W.T.; Willemssen, 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.
- [70] 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.
- [71] 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.
- [72] 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.
- [73] 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.
- [74] 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.
- [75] Kusunohara, 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.
- [76] 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.*, **2010**, 189(1), 67-71.
- [77] 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.*, **2005**, 28(6), 545-551.
- [78] 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.
- [79] 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.
- [80] 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.
- [81] 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.
- [82] Plumb C.D. *Veterinary Drug Handbook*, 5th ed.; Blackwell Publishing Professional: Iowa, **2005**.
- [83] 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.
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] 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.
- [87] See, A.M.; McGill, S.E.; Rasis, 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.
- [88] Hopper, K.; Aldrich, J.; Haskins, S.C. Ivermectin toxicity in 17 collies. *J. Vet. Intern. Med.*, **2002**, 16(1), 89-94.
- [89] 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.
- [90] Bishop, B.F.; Bruce, C.I.; Evans, N.A.; Goudie, A.C.; Gratton, 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.

- [91] 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.
- [92] Paul, A.J.; Tranquilli, W.J.; Hutchens, D.E. Safety of moxidectin in avermectin-sensitive collies. *Am. J. Vet. Res.*, **2000**, *61*(5), 482-483.
- [93] Lovell, R. A. Ivermectin and piperazine toxicoses in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, **1990**, *20*(2), 453-468.
- [94] Bissonnette, S.; Paradis, M.; Daneau, I.; Silversides, D.W. The ABCB1-Delta 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.
- [95] 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.
- [96] 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.
- [97] 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*(1), 46.
- [98] 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.
- [99] 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.
- [100] Genchi, C.; Poglajen, 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.
- [101] Arther, R.G.; Bowman, D.D.; Slone, R.L.; Travis, L.E. Imidacloprid plus moxidectin topical solution for the prevention of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Parasitol. Res.*, **2005**, *97* (Suppl 1), S76-S80.
- [102] Mealey, K.L. Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: heartworm prevention and pharmacogenetics. *Vet. Parasitol.*, **2008**, *158*(3), 215-222.
- [103] Mueller, R.S. Treatment protocols for demodicosis: an evidence-based review. *Vet. Dermatol.*, **2004**, *15*(2), 75-89.
- [104] 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.
- [105] 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.
- [106] Fondati, A. Efficacy of daily oral ivermectin in the treatment of 10 cases of generalized demodicosis in adult dogs. *Vet. Dermatol.*, **1996**, *7*(2), 99-104.
- [107] Medleau, L.; Ristic, Z.; McElveen, D.R. Daily ivermectin for treatment of generalized demodicosis in dogs. *Vet. Dermatol.*, **1996**, *7*(4), 209-212.
- [108] 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.
- [109] 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.
- [110] 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.
- [111] 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.
- [112] Houston, D.M.; Parent, J.; Matushek, K.J. Ivermectin toxicosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1987**, *191*(1), 78-80.
- [113] 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.
- [114] 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.
- [115] Merola, V.; Khan, S.; Gwaltney-Brant, S. Ivermectin toxicosis in dogs: a retrospective study. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **2009**, *45*(3), 106-111.
- [116] Campbell, W.C.; Benz, G.W. Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **1984**, *7*(1), 1-16.
- [117] Lankas, G.R.; Gordon, L.R. In: *Ivermectin and Abamectin*; Campbell, Ed.; Springer-Verlag V: New York, **1989**, pp. 89-112.
- [118] Campbell, A.; Chapman, M. *Handbook of poisoning in dogs and cats*, 1<sup>st</sup> ed.; Blackwell Science Ltd.: London, **2000**.
- [119] 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.
- [120] 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. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **2003**, *26*(Suppl. 1), 161-162.
- [121] Brayden, D.J.; Griffin, J. Avermectin transepithelial transport in MDR1- and MRP-transfected canine kidney monolayers. *Vet. Res. Commun.*, **2008**, *32*(1), 93-106.
- [122] 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.
- [123] 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 otocariosis in dogs: results of a European field study. *Parasitol. Res.*, **2005**, *97* (Suppl 1), S81-S88.
- [124] Advocate: *Scientific discussion*, EMEA **2009**: CVMP/0297/03
- [125] Sasaki, Y.; Kitagawa, H.; Murase, S.; Ishihara, K. Susceptibility of rough-coated collies to milbemycin oxime. *Nippon Juigaku. Zasshi*, **1990**, *52*(6), 1269-1271.
- [126] 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.
- [127] Banks, B.J.; Bishop, B.F.; Evans, N.A.; Gibson, S.P.; Goudie, A.C.; Gratton, 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.
- [128] 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.
- [129] Yas-Natan, E.; Shamir, M.; Kleinbart, S.; Aroch, I. Doramectin toxicity in a collie. *Vet. Rec.*, **2003**, *153*(23), 718-720.
- [130] Hopkins, K.D.; Marcella, K.L.; Strecker, A.E. Ivermectin toxicosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **1990**, *197*(1), 93-94.
- [131] Hollins, J.D.; Marlow, B.P.; Hatherell, P.J. Ingestion of equine moxidectin by dogs. *Vet. Rec.*, **2000**, *147*(8), 227-228.
- [132] 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.
- [133] Gallagher, A.E. Coma and respiratory failure due to moxidectin intoxication in a dog. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, **2010**, *18*(1), 81-85.
- [134] Crandell, D.E.; Weinberg, G.L. Moxidectin toxicosis in a puppy successfully treated with intravenous lipids. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, **2009**, *19*(2), 181-186.
- [135] 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.
- [136] 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), 1813-7, 1806.
- [137] 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. Pract.*, **2007**, *35*(K).
- [138] Roder, J.D.; Stair, E.L. An overview of ivermectin toxicosis. *Vet. Hum. Toxicol.*, **1998**, *40*(6), 369-370.

[139] 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.

[140] Sivine, F.; Plume, C.; Ansay, M. Picrotoxin, the antidote to ivermectin in dogs? *Vet. Rec.*, **1985**, 116(7), 195-196.

---

Received: May 26, 2010

Accepted: November 06, 2010

## 10. Anhang - Publikationen

### 12) GRAMER I, KESSLER M & GEYER J (2013)

Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma.

*Veterinary and Comparative Oncology, Epub ahead of print*

Article first published online: 3. July 2013

**DOI:** 10.1111/vco.12051.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vco.12051/abstract>

# Determination of MDR1 gene expression for prediction of chemotherapy tolerance and treatment outcome in dogs with lymphoma

I. Gramer<sup>1,2</sup>, M. Kessler<sup>2</sup> and J. Geyer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University of Giessen, Giessen, Germany

<sup>2</sup>Hofheim Animal Hospital, Hofheim am Taunus, Germany

## Abstract

The multidrug resistance gene 1 (MDR1) expression levels were analysed in 27 dogs with different types of malignant lymphomas receiving a standard chemotherapy protocol. Blood samples were used for MDR1 real-time PCR expression analysis. Treatment tolerance and outcome were evaluated on a regular basis by clinical examination and client questioning. Dogs developing severe adverse effects under treatment showed significantly lower basal MDR1 gene expression levels when compared with those who tolerated the drugs well. In the longitudinal MDR1 gene expression analysis during treatment, four dogs showed a greater than two-fold MDR1 up-regulation, compared to baseline expression. All four of these dogs, but none of the others, showed disease progression. In conclusion, basal and follow-up MDR1 gene expression levels could be of predictive value for the occurrence of severe adverse drug reactions and/or the development of MDR during chemotherapy for lymphoma in dogs.

## Keywords

canine, drug susceptibility, lymphoma, MDR1, P-glycoprotein, polymorphism, real-time PCR

## Introduction

Malignant lymphoma is the most common haematopoietic malignancy in dogs and usually responds well to cytostatic chemotherapy.<sup>1,2</sup> Although the most commonly used chemotherapy protocols in veterinary oncology are designed to have a low risk of adverse events (AEs), individual dogs can develop serious AEs which may lead to reduced quality of life and hospitalization. In some cases, AEs can be handled by dose reductions, prolonged treatment intervals or by treatment discontinuation, which however leads to reduced treatment efficacy.<sup>3</sup> In addition, the tumour might develop multidrug resistance (MDR) during treatment, resulting in cross-resistance to a variety of structurally unrelated drugs used for antineoplastic chemotherapy. In the presence of MDR the disease will progress even if chemotherapy is continued.

Dose escalation may temporarily overcome the effects of MDR but is tightly limited by the high toxic potential of the drugs.<sup>4</sup>

The ATP-driven drug efflux by P-glycoprotein is a well-known mechanism regulating the cellular efflux of cytotoxic drugs.<sup>5</sup> P-glycoprotein is encoded by the multidrug resistance gene 1 (MDR1) and transports a wide range of structurally unrelated compounds including the anticancer drugs paclitaxel, docetaxel, vincristine, vinblastine, doxorubicin, daunorubicin, etoposide, teniposide, imatinib and others.<sup>6</sup> The MDR1 gene was phylogenetically classified as member B1 of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family, ABCB1. In a situation of low-basal MDR1 gene expression levels, or lack of functional P-glycoprotein expression, cells are generally more prone to cytotoxic effects because of higher intracellular drug

Correspondence address:  
Prof. Dr Joachim Geyer  
Institute of Pharmacology  
and Toxicology  
Justus Liebig University of  
Giessen  
Faculty of Veterinary  
Medicine  
Biomedical Research Center  
BFS  
Schubertstr. 81  
35392 Giessen  
Germany  
e-mail:  
Joachim.M.Geyer@vetmed.  
uni-giessen.de

concentrations which may lead to haematologic and gastrointestinal toxicity.<sup>7–9</sup> This situation is true for dogs that completely lack functional P-glycoprotein expression due to a 4-bp deletion in the MDR1/ABCB1 gene, referred to as ABCB1-1Δ or MDR1 nt230(del4).<sup>10,11</sup> Many dog breeds are predisposed to this mutation including Collie, Shetland Sheepdog, Australian Shepherd, White Shepherd, Longhaired Whippet and others.<sup>11</sup> When dogs with homozygous MDR1 deletion mutation are treated with vincristine, they more likely develop neutropenia and thrombocytopenia compared to MDR1 intact dogs.<sup>12–14</sup> Therefore, dog breeds predisposed to this mutation are commonly MDR1 genotyped before chemotherapy is initiated. However, as severe AEs also occur in dogs lacking this deletion mutation, further polymorphisms in the MDR1 gene might exist which affect drug efflux function of P-glycoprotein or which lower the basal MDR1 expression level.<sup>15,16</sup>

The goal of this study was to evaluate if MDR1 gene polymorphisms, as well as basal and follow-up MDR1 gene expression levels, have predictive value for the occurrence of adverse drug effects and chemotherapy resistance and thus outcome of therapy.

## Materials and methods

### Collection of blood samples and client questioning

A total of 27 dogs with different types of malignant lymphomas (24 high-grade multicentric lymphomas, two low-grade multicentric lymphomas and one cutaneous T-cell lymphoma) were acquired from patients presenting to the oncology service of Hofheim Animal Hospital (Germany) between April 2010 and July 2011 (Table 1). All dogs had not previously been treated for their lymphoma. All dogs received a standard multi-agent polychemotherapy protocol (Hofheim II-protocol, Table 2). AEs and response to treatment were periodically evaluated by clinical and laboratory examinations and client questioning. Blood samples were routinely taken prior to each chemotherapy treatment to monitor haematological side effects. The first owner questioning was performed before initiation of chemotherapy and

included dog breed, age, sex, weight, premedications and general condition of the patient. Client questioning was repeated following every treatment to monitor changes in the dog's general condition, appetite, weight, diarrhoea/vomitus, prophylactic and/or other medications during the entire chemotherapy. Grading of gastrointestinal and haematologic side effects was performed through use of the Veterinary Comparative Oncology Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) system (Table 3).<sup>17</sup>

Prior to the initiation of chemotherapy, basal MDR1 expression levels were quantified from whole blood samples by real-time PCR, and full-length MDR1 transcripts were sequenced to identify potential polymorphisms in the protein-coding sequences. In parallel with the periodical haematological examinations, blood samples were used for RNA isolation and follow-up MDR1 expression level determinations. As no additional blood samples were taken solely for this study, the total amount of analysis points varied between the patients, but on average five blood samples per dog were used for RNA isolation.

### RNA isolation from blood cells and cDNA synthesis

Blood samples of 0.5 mL were conserved in 1.3 mL RNAlater solution (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. RNA was isolated after removal of the RNAlater solution using the RiboPure Blood Kit according to the manufacturer's protocol (Ambion, Austin, TX, USA). The RNA samples were subjected to standard DNase I digestion (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) and cDNA synthesis was performed with the SuperScript III Polymerase System using random hexamers according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The cDNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Amplification and sequencing of the full-length MDR1 transcripts

In order to amplify the full-length MDR1 transcripts a touchdown PCR protocol was used with the FastStart High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Germany). Briefly, a total reaction

**Table 1.** Patient characteristics and study design

Dog	Breed	Age		Weight		Diagnosis <sup>b</sup>	Subanalysis <sup>c</sup>			Basal MDR1 expression level <sup>d</sup>	Tolerance of chemotherapy <sup>e</sup>
		(years)	Sex <sup>a</sup>	(kg)			I	II	III		
1	Mixed breed	8	Mn	37		ML, V, b	X	X		6.87	MAE
2	Afghan	6	M	31		ML, b	X	X		5.91	WT
3	Golden Retriever	6	M	34		ML, V, a	X	X		7.97	SAE
4	Jack Russel Terrier	16	Mn	7		ML, V, B-cell, a	X	X		8.19	SAE
5	Briard	7	Mn	31		ML, B-cell, a	X	X		4.86	WT
6	Labrador Retriever	12	F	29		ML, V, B-cell, a	X	X		5.54	WT
7	Flat Coated Retriever	8	Mn	29		ML, V, a	X	X		7.07	MAE
8	Mixed breed	12	Fs	21		ML, V, b	X	X	X	6.60	MAE
9	Beagle	9	M	12		Small cell lymphoma, B-cell, a	X	X	X	4.67	WT
10	Mixed breed	4	Mn	33		ML, V, a	X	X	X	5.87	MAE
11	Border Collie	13	Fs	21		ML, V, a	X	X	X	6.24	MAE
12	Mixed breed	14	Fs	14		ML, V, a	X	X		5.50	WT
13	Mixed breed	9	Mn	39		ML, III, a	X	X		8.97	SAE
14	German Shepherd	9	F	35		ML, V, B-cell, a	X	X		5.67	MAE
15	Mixed breed	12	M	33		ML, a	X	X		4.66	WT
16	Rhodesian Ridgeback	6	F	42		ML, V, B-cell, a	X	X		5.23	WT
17	Border Collie	9	M	22		ML, IV, a	X	X		8.55	SAE
18	Malinois	11	Mn	32		ML, V, a	X	X	X	5.32	MAE
19	Labrador Retriever	10	Fs	35		ML, V, B-cell, a	X		X	5.45	WT
20	Shi Tzu	14	M	4		ML, V, a	X		X	4.46	WT
21	Mixed breed	13	Fs	37		ML, V, a	X		X	6.15	SAE
22	Rhodesian Ridgeback	7	M	43		ML, V, T-cell, b	X		X	7.89	WT
23	Standard Poodle	11	Mn	30		Small cell lymphoma, B-cell, a	X		X	5.90	WT
24	Mixed breed	12	Fs	12		ML, V, a	X		X	5.68	WT
25	Pon	12	F	19		Mycosis fungoides, T-cell	X		X	5.55	WT
26	Rhodesian Ridgeback	9	F	38		ML, V, a	X		X	4.07	WT
27	West Highland Terrier	12	Mn	9		ML, V, B-cell, b	X		X	6.86	WT

<sup>a</sup> Sex of dogs is listed as M = male, Mn = male neutered, F = female and Fs = female spayed.

<sup>b</sup> The diagnosis is listed at first, followed by tumour stage (I–V), immunophenotype (B-/T-cell) and substage (a = good general condition, b = poor general condition) as far as known and available; ML = multicentric lymphoma.

<sup>c</sup> Subanalysis I, determination of the basal MDR1 expression levels; subanalysis II, sequencing of the full-length MDR1 transcripts; subanalysis III, longitudinal analysis of the MDR1 expression during chemotherapy.

<sup>d</sup> Basal MDR1 expression levels are stated as  $\Delta C_T$  values ( $C_T$  MDR1 –  $C_T$  HPRT1).

<sup>e</sup> The individual tolerance of chemotherapy was categorized as well-tolerated (WT), mild adverse effects (MAEs) and severe adverse effects (SAEs).

volume of 50  $\mu$ L consisting of 2  $\mu$ L cDNA, 37.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L DMSO, 5  $\mu$ L 10 $\times$  Reaction Buffer, 1  $\mu$ L Nucleotide mix (10 mM each), 1  $\mu$ L forward primer (100  $\mu$ M), 1  $\mu$ L reverse primer (100  $\mu$ M) and 0.5  $\mu$ L Fast Start High Fidelity enzyme. The following forward (F) and reverse (R) primers were used for MDR1 amplification: F1, 5'-AAG GAA AGC CCG AGG TGA CGA TG-3'; R1, 5'-CTG TCT GCC CAC TCT GAA CCT TC-3'; F2, 5'-CGC AAG AGG AGC AGC TTA TGA AAT C-3'; R2, 5'-GGA TCT CCC CAG CTT TGC CAA ATG-3'; F3, 5'-GGA GGA TTC TGA AGC TGA

ACT CAA C-3'; R3, 5'-GGA TGT CTG GTC GAG TGG GAT AG-3'; F4, 5'-CAC ACA TCT TCG GGG TCT CAT TTT C-3'; R4, 5'-CGG CCA CAG TTC ACT AGC GTT TTG-3'. All PCR products were submitted to GATC (Düsseldorf, Germany) for DNA sequencing. The obtained sequences were assembled and aligned with the GenBank reference sequences NM\_001003215 (nucleotide) and NP\_001003215 (protein) using the DNASTAR Lasergene software. The potential functional relevance of the identified MDR1 polymorphisms was evaluated with the bioinformatic algorithms of

**Table 2.** Multi-agent chemotherapy protocol for canine lymphoma (Hofheim II). This protocol was repeated four times with a 2-week interruption after doxorubicin application

Drug	Day						
	1	3	10	20	20–24	32	40
Vincristin <sup>a</sup> 0.7 mg m <sup>-2</sup> i.v.	x						
L-Asparaginase <sup>b</sup> 10 000 IU m <sup>-2</sup> i.m.		x				x	
Cyclophosphamide <sup>c</sup> 200–220 mg m <sup>-2</sup> p.o.			x				
Cytarabin <sup>d</sup> 60 mg m <sup>-2</sup> s.c. TID on 4 consecutive days				x <sup>g</sup>			
Lomustine <sup>e</sup> 80 mg m <sup>-2</sup> p.o.					x <sup>g</sup>		
Doxorubicin <sup>f</sup> 30 mg m <sup>-2</sup> i.v.							x

<sup>a</sup> Cellcrstin 2 mg, Cell Pharm GmbH, Bad Vilbel, Germany.

<sup>b</sup> Asparaginase 5 000 IU Medac and Asparaginase 10,000 IU Medac, Transmed Pharma, El Remal, Gaza, Palestine.

<sup>c</sup> Endoxan, Baxter Oncology GmbH, Halle, Germany.

<sup>d</sup> ARA-cell 1 000 mg, Cell Pharm GmbH, Bad Vilbel, Germany.

<sup>e</sup> CeCeNu Medac, Transmed Pharma, El Remal, Gaza, Palestine.

<sup>f</sup> DOXO-cell 150 mg, Cell Pharm GmbH, Bad Vilbel, Germany.

<sup>g</sup> In T-cell lymphomas and cases with partial remissions following the first three treatments lomustine was administered instead of cytarabin.

PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) and SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) according to Wang *et al.*<sup>18</sup>

### Quantification of the MDR1 expression levels by real-time PCR

The real-time PCR amplification was performed in a total volume of 25  $\mu$ L in 96-well plates on an ABI Prism 7300 apparatus (Applied Biosystems). The reaction mixture consisted of 12.5  $\mu$ L TaqMan Universal PCR Master Mix, 6.25  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 1.25  $\mu$ L TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) and 5  $\mu$ L cDNA. The amplification reaction started with the activation of the AmpliTaq Gold DNA Polymerase at 95 °C for 10 min. Thereafter, 40 cycles of 95 °C  $\times$  15 s and 60 °C  $\times$  1 min were applied. The following TaqMan Gene Expression Assays were used: Cf02693309\_m1 for MDR1 and Cf02626256\_m1 for hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT1). HPRT1 was used as endogenous control as reported previously.<sup>19</sup> Relative MDR1 expression ( $\Delta C_T$ ) was calculated by subtracting the signal threshold cycle ( $C_T$ ) of HPRT1 from the  $C_T$  value of MDR1. Subsequently, for each dog,  $\Delta\Delta C_T$  values were calculated by using the  $\Delta C_T$  value of the dog with the lowest overall MDR1 expression as calibrator. For the longitudinal MDR1 expression analysis, the basal MDR1 expression level was set as a calibrator for each dog. Finally,  $\Delta\Delta C_T$  values were transformed by

the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  equation to show the relative MDR1 expression on the  $y$ -axis. GraphPad Prism 4.03 software was used for data analysis and illustration.

## Results

### Basal MDR1 gene expression levels and treatment tolerance

The basal MDR1 gene expression levels in the 27 dogs were highly variable and ranged from 1 to 30-fold, with '1' representing the patient with the absolute lowest expression level (Table 1). Treatment tolerance was evaluated based on haematological examination and client questioning according to the grading scheme described in Table 3. For each dog a total score was calculated from the sum of the grading values for each category from 8 to 9 rounds of questioning. According to this scoring, three categories of treatment tolerance were defined: well-tolerated (WT) with a total score of 0–5; mild adverse effects (MAE) with a total score of 5–20 and severe adverse effects (SAEs) with a total score of >20. Figure 1 shows the correlation between basal MDR1 gene expression levels and treatment tolerance. A total of 15 dogs tolerated the chemotherapy without significant AEs and revealed a mean  $\pm$  SD MDR1 gene expression level of  $13.4 \pm 7.3$ . Dogs in category MAE ( $n = 7$ ) developed AEs of lower toxicity grades or showed SAEs only once and had a mean  $\pm$  SD MDR1 gene expression level of  $7.3 \pm 3.2$ . Finally, dogs

**Table 3.** Grading of chemotherapy toxicity according to VCOG-CTCAE criteria<sup>17</sup>

AE	Grading	Description
Neutropenia	0	$>2.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
	1	$2.5 - 2.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
	2	$2.0 - 1.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
	3	$1.5 - 1.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
	4	$1.0 - 0.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
	5	$<0.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
Thrombocytopenia	0	$>100 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
	1	$100 \times 10^9 \text{ L}^{-1} - < \text{LLN}^{\text{a}}$
	2	$100 - 50 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
	3	$50 - 25 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
	4	$<25 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$
Haemoglobin	0	$>100 \text{ g L}^{-1}$
	1	$100 \text{ g L}^{-1} - < \text{LLN}^{\text{a}}$
	2	$100 - 80 \text{ g L}^{-1}$
	3	$80 - 65 \text{ g L}^{-1}$
	4	$<65 \text{ g L}^{-1}$
Diarrhoea	0	No diarrhoea
	1	2 – 6 x/day without prophylaxis
	2	2 – 6 x/day with prophylaxis
	3	>6 x/day and bloody
	4	Hospitalization <sup>b</sup>
Vomitus	0	No vomitus
	1	3 – 5 x/day without prophylaxis
	2	3 – 5 x/day with prophylaxis
	3	>5 x/day
	4	Hospitalization <sup>b</sup>

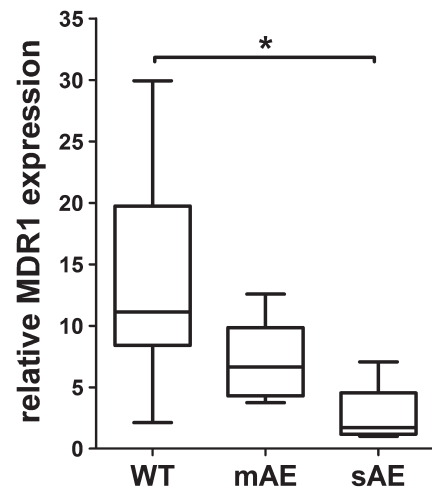
<sup>a</sup> Lower limit of normal.

<sup>b</sup> General condition of the dog poor with fever and/or dehydration, so that intravenous drip infusion, antibiotic and/or antiemetic treatment are necessary.

in category SAE ( $n=5$ ) recurrently developed SAEs of higher toxicity grades and in some cases hospitalization was necessary. These dogs showed a mean  $\pm$  SD MDR1 gene expression level of  $2.6 \pm 2.5$ , which was significantly lower ( $P < 0.01$ ) compared with that in the WT category.

### Identification of MDR1 polymorphisms and treatment tolerance

PCR amplification and DNA sequencing of the full-length MDR1 transcripts were performed in 18 dogs to evaluate if they had developed AEs during chemotherapy due to the expression of a polymorphic and probably non-functional MDR1 sequence. Each sequence was compared with the MDR1 reference sequence and all



**Figure 1.** Basal MDR1 expression in peripheral blood samples from 27 dogs with different types of malignant lymphomas prior to chemotherapy treatment. The relative expression depicted on the y-axis was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method and represents x-fold higher MDR1 expression in relation to the dog with the overall lowest MDR1 expression level (set as calibrator). Expression data are presented for three categories of patients: (1) those who tolerated chemotherapy well (WT), (2) those who developed mild AEs (MAEs) or (3) severe AEs (SAEs) during treatment. Data are presented as median with min/max as well as 25%/75% percentiles. \*Statistically significant at  $P < 0.01$  by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test.

identified polymorphisms are listed in Table 4. As reported previously, we used the PolyPhen and SIFT algorithms to predict whether the identified polymorphisms could have an impact on the protein function.<sup>18</sup> In total, 18 polymorphisms were identified, including 17 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and one triplet insertion. Eight of the SNPs were silent and did not change the protein sequence, whereas nine non-synonymous SNPs were identified that resulted in an amino acid change: F90Y, V192I, P212R, T329S, R532Q, K621N, S696P, M1147V and I1273V. The SNPs at amino acid positions 329, 532, 696 and 1147 were reported previously.<sup>16</sup> Most of the SNPs were rated as benign or tolerated by PolyPhen and SIFT predictions, but P212R and R532Q were considered to have a potential effect on P-glycoprotein efflux function. However, none of these substitutions dominated in dogs who developed AEs during chemotherapy compared with dogs who tolerated the treatment well. Therefore, we decided not

to further investigate these polymorphisms by functional transport assays.

### Development of the MDR1 expression level and treatment outcome

A subgroup of 15 patients (12 with multicentric lymphoma, 2 with small cell lymphoma and 1 with cutaneous lymphoma) were included in the longitudinal MDR1 gene expression analysis during chemotherapy. All 15 dogs regularly underwent clinical examinations including lymph node palpation in order to assess treatment response and remission status. Blood samples were taken before each cytostatic treatment for haematologic monitoring. If possible and practicable, blood samples were additionally analysed for MDR1 gene expression. Eleven of fifteen dogs were treated until completion of the chemotherapy protocol, although among these, one dog was in partial remission and one dog showed stable disease. In four dogs (dogs #8, #22, #24 and #26) chemotherapy was discontinued because of the loss of remission due to disease progression and chemotherapy drug resistance. Figure 2A gives an overview of the longitudinal MDR1 gene expression analysis, where the basal expression level was set as '1' for each dog and the  $x$ -fold increase or decline of MDR1 expression is depicted at the  $y$ -axis. MDR1 gene expression levels did not significantly change in most patients. However, four dogs (#8, #22, #24 and #26) showed an increase of the MDR1 gene expression during treatment, ranging from 4-fold to 54-fold (Fig. 2B). Interestingly, among all dogs analysed only these four experienced disease progression, whereas all other dogs were in complete remission (CR,  $n = 9$ ), partial remission (PR, dog #18) or stable disease (SD, dog #25) (Fig. 2C). In order to correlate the clinical tumour status with the increment in MDR1 gene expression, we defined a cut-off value of '2' for the fold-increase in MDR1 gene expression during chemotherapy which enabled us to separate all dogs with disease progression ( $>2$ ) from the other patients ( $<2$ ).

### Discussion

This pilot clinical study in dogs with lymphoma aimed at identifying factors contributing to

the development of AEs and MDR during chemotherapy and provides important preliminary data that can be used for larger clinical trials. We were able to correlate low basal MDR1 gene expression levels prior to cytostatic treatment with the occurrence of severe AEs during chemotherapy. In the longitudinal MDR1 gene expression analysis we were able to define a cut-off value for the up-regulation of MDR1 that allowed us to distinctly identify patients who developed MDR solely on the basis of the follow-up MDR1 gene expression level in blood cells. We used a standard real-time PCR method and took RNA isolated from whole blood samples that came from routine haematological monitoring of the patient prior to and during chemotherapy, so that these analyses did not require additional sampling. These data can give a perspective on inclusion of the MDR1 gene expression level in the haematological examination spectrum in order to predict if a patient is prone to develop AEs under drug treatment, or may develop MDR that would lead to disease progression and discontinuation of drug treatment. This would contribute to the safety and efficacy of chemotherapy treatment for dogs with lymphoma.

We are aware of the limitations of the present pilot study, as it only includes 27 patients for the quantification of the basal MDR1 gene expression levels and 15 patients for the follow-up study. Furthermore, MDR1 gene expression analysis was only performed from peripheral blood cells as surrogate parameter for MDR1 gene expression in other tissues and tumour cells. Finally, this study focused only on one possible mechanism of MDR (i.e. drug efflux by P-glycoprotein), whereas other members of the ATP-binding cassette transporter family, such as the MDR-related protein MRP1, also might contribute to drug efflux from tumour cells.<sup>20,21</sup> In addition, many other mechanisms underlying drug resistance have been reported to exist in tumour cells.<sup>4,22</sup> Therefore, further clinical trials are needed to support these findings in a larger group of patients. These trials could also implement more frequent blood sampling in order to better define the time point at which a certain cut-off value in MDR1 gene expression level is exceeded and should evaluate the correlation between MDR1 expression in peripheral blood cells and lymph node biopsies.

**Table 4.** Polymorphisms identified in the full-length MDR1 transcripts

SNP <sup>a</sup>	Amino acid substitution <sup>a</sup>	Exon	Motif <sup>b</sup>	PolyPhen prediction	SIFT predicition	Cases	
						WT <sup>c</sup>	AE <sup>d</sup>
nt141 ins AAT	24 ins N	3	N-terminus			<i>n</i> = 8 (hom)	<i>n</i> = 4 (hom)
T338A	F90Y	4	TMD I	Benign	Tolerated	<i>n</i> = 1 (hom)	
G399A	Silent	5				<i>n</i> = 1 (het)	
G643A	V192I	7	TMD III	Benign	Tolerated	<i>n</i> = 9 (hom)	<i>n</i> = 8 (hom)
C704G	P212R	7	TMD IV	Probably damaging	Tolerated	<i>n</i> = 9 (hom)	<i>n</i> = 8 (hom)
A1054T	T329S	9	ABC	Benign	Tolerated	<i>n</i> = 9 (hom)	<i>n</i> = 7 (hom)
G1065A	Silent	9				<i>n</i> = 10 (hom)	<i>n</i> = 7 (hom)
G1664A	R532Q	14	ABC-SM	Probably damaging	May affect protein function	<i>n</i> = 10 (hom)	<i>n</i> = 8 (hom)
G1932T	K621N	15	ATP-BS	Benign	Tolerated		<i>n</i> = 1 (het)
T2151A	Silent	17				<i>n</i> = 9 (hom)	<i>n</i> = 7 (hom)
T2155C	S696P	17	ATP-BS	Benign	Tolerated	<i>n</i> = 9 (hom)	<i>n</i> = 7 (hom)
A2190G	Silent	17				<i>n</i> = 1 (het)	
C2889T	Silent	23				<i>n</i> = 1 (het)	
C2895T	Silent	23				<i>n</i> = 1 (hom)	
A3511G	M1147V	26	ATP-BS	Benign	Tolerated	<i>n</i> = 1 (hom), <i>n</i> = 1 (het)	<i>n</i> = 1 (hom)
C3639T	Silent	27				<i>n</i> = 1 (het)	
A3886G	I1273V	28	ATP-BS	Benign	Tolerated	<i>n</i> = 7 (hom)	<i>n</i> = 2 (hom)
G3909A	Silent	28				<i>n</i> = 1 (hom)	

<sup>a</sup> Nucleotide and amino acid positions are referred to the reference sequences NM\_001003215 (nucleotide) and NP\_001003215 (protein).

<sup>b</sup> Sequence motifs of P-glycoprotein are abbreviated as follows: TMD = transmembrane domain, ABC = ATP binding cassette, ABC-SM = ABC signature motif, ATP-BS = ATP binding site.

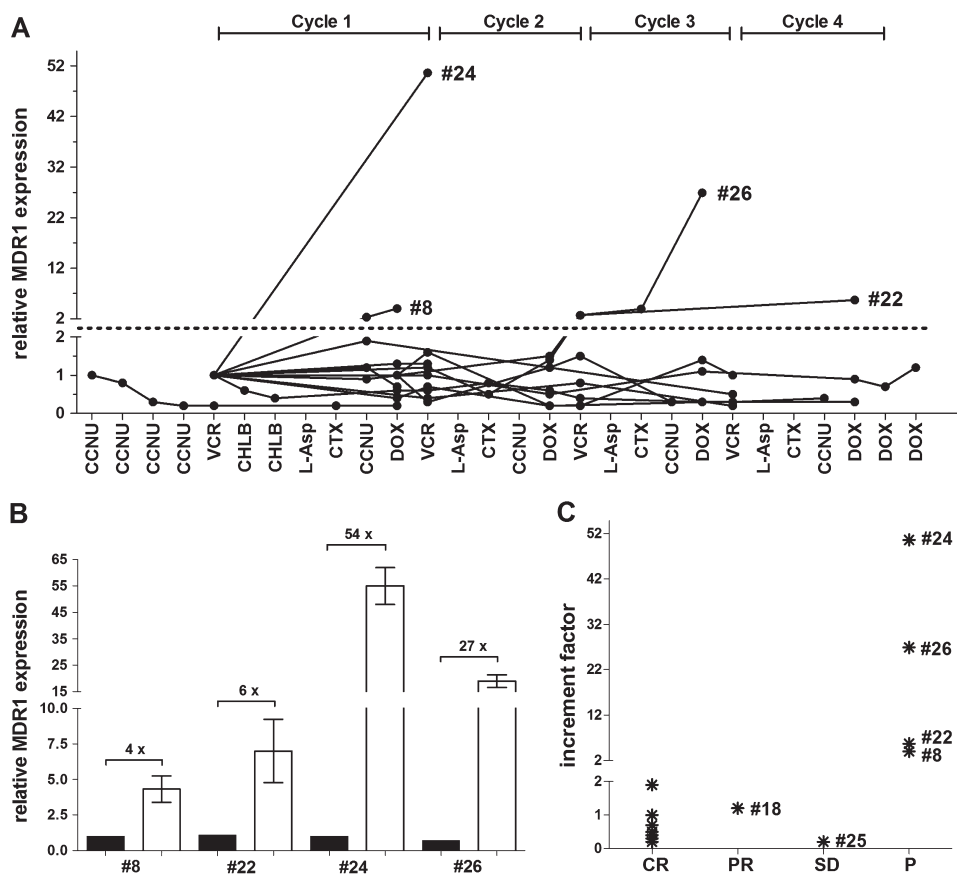
<sup>c</sup> Dogs who tolerated drug treatment well.

<sup>d</sup> Dogs who developed adverse events during chemotherapy. Homozygous (hom) or heterozygous (het) occurrence of the polymorphism.

It has been previously shown on lymph node tissue of both healthy dogs and dogs with lymphoma that the pretreatment MDR1 gene expression levels are highly variable.<sup>19,23–26</sup> However, these studies did not correlate their expression data with clinical drug tolerance. In our study, by using RNA from peripheral blood cells for real-time PCR, we were able to confirm the high variability in pretreatment MDR1 gene expression levels. This expression level was used as a surrogate parameter for MDR1 expression in other tissues relevant to the development of AEs, such as the gut and haematopoietic stem cells. Apart from neoplastic tissues, MDR1 expression can be found in the apical domain of epithelial cells lining the gut, in the brush border of renal proximal tubular cells, in the canalicular membrane of hepatocytes and in capillary endothelial cell of the blood-brain barrier. Furthermore, MDR1 is expressed in CD34+ haematopoietic stem cells.<sup>6,16</sup> According to this expression pattern, P-glycoprotein can limit drug absorption from the intestine, promotes drug

elimination via bile and urine and restricts drug permeation into the brain and drug accumulation in cells of the haematopoietic system. In the case of low MDR1 gene expression levels, elimination of MDR1 transported drugs may be reduced, their brain penetration may be increased and they even could more accumulate in cells of the haematopoietic system, finally leading to an increase in adverse drug effects under chemotherapy.<sup>6,12,14</sup>

In general, different factors might be responsible for the interindividual variances in basal MDR1 gene expression levels as shown in the present and in previous studies. Polymorphisms in the promoter region could determine the transcription level of the MDR1 gene and others may affect the stability of the MDR1 transcript.<sup>15,27</sup> Furthermore, drug treatment preceding chemotherapy may cause drug-induced alterations in MDR1 gene expression levels.<sup>5</sup> In this study, dogs who showed low basal MDR1 gene expression levels in peripheral blood cells were more prone to develop drug toxicity.



**Figure 2.** Follow-up analysis of MDR1 expression during chemotherapy and treatment outcome in dogs with malignant lymphoma. (A) Longitudinal MDR1 expression analysis performed on 15 dogs during all four therapeutic cycles (1–4), except in those cases where treatment was discontinued (see text for further explanations). Blood samples were taken before each cytostatic treatment for routine haematologic monitoring. The x-axis shows all drugs that were applied during the treatment cycles according to Table 2 (CCNU = lomustine, VCR = vincristine, CHLB = chlorambucil, L-Asp = L-asparaginase, CTX = cyclophosphamide, DOX = doxorubicin). Chlorambucil is not listed in Table 2 because this drug was not part of the initial protocol, but was given to one dog until final diagnosis. (B) Relative increase in MDR1 expression shown for all dogs who had disease progression. Filled bars represent the basal MDR1 expression levels prior to the drug treatment and open bars indicate the expression levels at the latest blood analysis before the treatment was discontinued. (C) Respective increment factors were calculated for all dogs and were correlated with the treatment outcome (P = progression, SD = stable disease, PR = partial remission, CR = complete remission). All dogs with disease progression, but none of the others, showed increment factors of >2. Case numbers are depicted for the dogs with disease progression, stable disease and partial remission.

This finding was somewhat expected, as dogs who completely lack functional P-glycoprotein expression because of the 4-bp deletion mutation of the MDR1 gene are more likely to develop neutropenia and thrombocytopenia after treatment with vincristine compared with MDR1 intact dogs, indicating the important role of MDR1 for drug toxicity.<sup>12–14</sup> However, all patients who developed serious AEs had the homozygous intact MDR1 intact genotype and did not belong to the breeds commonly affected by the MDR1 gene deletion

mutation. Therefore, in addition to analysing the basal MDR1 gene expression levels, we also sequenced the full-length MDR1 transcript from 18 dogs to search for polymorphisms that might affect the transport function of P-glycoprotein.<sup>28,29</sup> In general, causal relationships of certain SNPs with the functionality of the coded protein are difficult to draw. There are only a few examples where the situation is clear from sequence analysis alone, such as for the aforementioned MDR1 4-bp deletion frame-shift mutation which results in

a premature stop codon and prevents expression of a functional P-glycoprotein efflux transporter.<sup>10</sup> Apart from that, the presence of further functionally relevant MDR1 polymorphisms in drug-sensitive dogs has been discussed.<sup>16,30,31</sup> However, in this study we were not able to identify any SNP that was more persistent in dogs with SAE compared with dogs who tolerated treatments well. Even more, there was no correlation between the identified SNPs and the basal MDR1 gene expression levels (data not shown). All SNPs identified in this study did not correlate with the chemotherapy tolerance and, therefore, are not regarded as functionally relevant.

Finally, this study demonstrates the development of MDR in 4 of 15 dogs with lymphoma. In most previous studies dealing with MDR in canine lymphoma, lymph node biopsies were analysed for P-glycoprotein prior to the initiation of chemotherapy and at relapse.<sup>24–26</sup> A reason for that might be that a follow-up expression analysis on lymph node material is not really feasible, as it would require repeated sampling from lymph nodes during therapy.<sup>24,32</sup> To overcome this problem, we monitored the MDR1 gene expression levels in blood samples which could be acquired from the routine blood diagnostics and this allowed us to accurately document the time course of the MDR1 gene expression during the entire chemotherapy protocol, at least in peripheral blood cells. Although we did not measure MDR1 gene expression directly in the lymph node, we were able to demonstrate a correlation between disease progression and an increase in the MDR1 gene expression level in peripheral blood cells. In contrast, lymphoma patients with stable MDR1 gene expression levels during chemotherapy remained in remission. But it has to be mentioned that two of these patients achieved only partial remission and stable disease, respectively. We hypothesize that in these two patients the cytostatic drugs probably did not destroy enough tumour cells to achieve complete remission and their drug resistance may have been mediated by other, MDR1 independent, mechanisms.<sup>5</sup> The absolute increase in the MDR1 gene expression in the four drug-resistant dogs varied in the total amount (4–54 fold) and the time of occurrence (cycles 1–4) and could not be

addressed to a certain chemotherapeutic drug that might have triggered MDR1 up-regulation.

In conclusion, the findings from the present pilot study suggest that both basal and follow-up MDR1 gene expression levels may be useful prognostic indicators for the occurrence of severe adverse drug reactions and/or the development of MDR during chemotherapy in canine lymphoma. Further clinical trials are warranted to support these findings in a larger group of patients.

## References

- Greenlee PG, Filippa DA, Quimby FW, Patnaik AK, Calvano SE, Matus RE, Kimmel M, Hurvitz AI and Lieberman PH. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer* 1990; **66**: 480–490.
- Ettinger SN. Principles of treatment for canine lymphoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 2003; **18**: 92–97.
- Vail DM. Supporting the veterinary cancer patient on chemotherapy: neutropenia and gastrointestinal toxicity. *Topics in Companion Animal Medicine* 2009; **24**: 122–129.
- Malayeri R, Filipits M, Suchomel RW, Zöchbauer S, Lechner K and Pirker R. Multidrug resistance in leukemias and its reversal. *Leukemia and Lymphoma* 1996; **23**: 451–458.
- Gottesman MM, Fojo T and Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2002; **2**: 48–58.
- Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2011; **201**: 261–283.
- Johnson DR, Finch RA, Lin ZP, Zeiss CJ and Sartorelli AC. The pharmacological phenotype of combined multidrug-resistance *mdr1a/1b*- and *mrp1*-deficient mice. *Cancer Research* 2001; **61**: 1469–1476.
- Thamm DH and Vail DM. Aftershocks of cancer chemotherapy: managing adverse effects. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2007; **43**: 1–7.
- Rochat B. Importance of influx and efflux systems and xenobiotic metabolizing enzymes in intratumoral disposition of anticancer agents. *Current Cancer Drug Targets* 2009; **9**: 652–674.
- Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM and Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 727–733.

11. Gramer I, Leidolf R, Döring B, Klintzsch S, Krämer EM, Yalcin E, Petzinger E and Geyer J. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *The Veterinary Journal* 2011; **189**: 67–71.
12. Mealey KL, Northrup NC and Bentjen SA. Increased toxicity of P-glycoprotein-substrate chemotherapeutic agents in a dog with the MDR1 deletion mutation associated with ivermectin sensitivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2003; **223**: 1453–1455.
13. Mealey KL, Fidel J, Gay JM, Impellizeri JA, Clifford CA and Bergman PJ. ABCB1-1Delta polymorphism can predict hematologic toxicity in dogs treated with vincristine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; **22**: 996–1000.
14. Krugman L, Bryan JN, Mealey KL and Chen A. Vincristine-induced central neurotoxicity in a collie homozygous for the ABCB1Δ mutation. *Journal of Small Animal Practice* 2012; **53**: 185–187.
15. Kerb R, Aynacioglu AS, Brockmüller J, Schlagenhauer R, Bauer S, Szekeres T, Hamwi A, Fritzer-Szekeres M, Baumgartner C, Ongen HZ, Güzelbey P, Roots I and Brinkmann U. The predictive value of MDR1, CYP2C9, and CYP2C19 polymorphisms for phenytoin plasma levels. *The Pharmacogenomics Journal* 2001; **1**: 204–210.
16. Geyer J and Janko C. Treatment of MDR1 mutant dogs with macrocyclic lactones. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2012; **13**: 969–986.
17. Veterinary Cooperative Oncology Group. Common terminology criteria for adverse events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0. *Veterinary and Comparative Oncology* 2004; **2**: 195–213.
18. Wang L-L, Liu Y-H, Meng L-L, Li CG and Zhou SF. Phenotype prediction of non-synonymous single-nucleotide polymorphisms in human ATP-binding cassette transporter genes. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 2011; **108**: 94–114.
19. Culmsee K, Gruber AD, von Samson-Himmelstjerna G and Nolte I. Quantification of MDR-1 gene expression in canine tissues by real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science* 2004; **77**: 223–229.
20. Zhang DW, Cole SP and Deeley RG. Identification of an amino acid residue in multidrug resistance protein 1 critical for conferring resistance to anthracyclines. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; **276**: 13231–13239.
21. Conrad S, Kauffmann HM, Ito K, Leslie EM, Deeley RG, Schrenk D and Cole SP. A naturally occurring mutation in MRP1 results in a selective decrease in organic anion transport and in increased doxorubicin resistance. *Pharmacogenetics* 2002; **12**: 321–330.
22. O'Connor R. The pharmacology of cancer resistance. *Anticancer Research* 2007; **27**: 1267–1272.
23. Miller TP, Grogan TM, Dalton WS, Spier CM, Scheper RJ and Salmon SE. P-Glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *Journal of Clinical Oncology* 1991; **9**: 17–24.
24. Moore AS, Leveille CR, Reimann KA, Shu H and Arias IM. The expression of P-glycoprotein in canine lymphoma and its association with multidrug resistance. *Cancer Investigation* 1995; **13**: 475–479.
25. Lee JL, Christine SH, Fine RL and Page RL. P-Glycoprotein expression in canine lymphoma. *Cancer* 1996; **77**: 1892–1898.
26. Bergmann PJ, Ogilvie GK and Powers BE. Monoclonal antibody C219 immunohistochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1996; **19**: 354–359.
27. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV and Gottesman MM. Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Research* 2007; **67**: 9609–9612.
28. Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Letters* 2006; **234**: 4–33.
29. Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obanayama K, Kim G, Liew EL, Sakaeda T, Yoshiura K, Niikawa N, Sakurai M and Ishikawa T. Quantitative structure-activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). *Biochemistry* 2007; **46**: 7678–7693.
30. Müller RS and Bettenay SV. A proposed new therapeutic protocol for the treatment of canine mange with ivermectin. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1999; **35**: 77–80.
31. Bissonnette S, Paradis M, Daneau I and Silversides DW. The ABCB1-1Delta mutation is not responsible for subchronic neurotoxicity seen in dogs of non-collie breeds following macrocyclic lactone treatment for generalized demodicosis. *Veterinary Dermatology* 2009; **20**: 60–66.
32. Beck WT and Grogan TM. Methods to detect P-glycoprotein and implications for other drug resistance-associated proteins. *Leukemia* 1997; **11**: 1107–1109.

## 10. Anhang - Publikationen

### 13) GEYER J (2010)

MDR1-Defekt beim Hund: Informationen für Tierärztinnen und Tierärzte.

*Das Copyright liegt beim Verfasser, Druck und Vertrieb sind durch BAYER Vital  
Deutschland erfolgt.*

# MDR1-Defekt beim Hund

**Prof. Dr. Joachim Geyer**

Juniorprofessor für Pharmakogenetik und  
Pharmakogenomik  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Bei den Hunderassen Collie, Australian Shepherd, Shetland Sheepdog, Longhaired Whippet, Silken Windhound, MacNab, English Shepherd, Weißer Schäferhund, Bobtail, Border Collie und Deutscher Schäferhund, ist ein Erbdefekt im sog. MDR1-Gen weit verbreitet. Dieser führt zu einem vermehrten Übertritt von Arzneistoffen in das Zentrale Nervensystem und kann bei der Anwendung von Arzneistoffen wie Ivermectin, Doramectin, Moxidectin oder Loperamid gravierende Vergiftungen auslösen. In zahlreichen Fällen kam es zum Tod der betroffenen Hunde. Bei Vorliegen eines MDR1-Defektes steht die sichere Anwendung einer Vielzahl weiterer Arzneistoffe in Frage, so dass eine vorbeugende Diagnose anzuraten ist. Hierfür steht ein patentierter molekulargenetischer Test zur Verfügung, welcher von der TransMIT GmbH in Gießen angeboten wird.



## MDR1: Ein *multidrug* Transporter

Bei „MDR1“ handelt es sich um einen Membrantransporter für Arzneistoffe, welcher biochemisch zur Familie der *ATP-binding cassette transporter* (ABC-Transporter) gehört. Dieser Arzneistofftransporter wird von dem *multidrug resistance* (MDR1) Gen codiert. Synonyme Bezeichnungen sind P-Glycoprotein oder ABCB1. MDR1 transportiert eine Vielzahl verschiedener Arzneistoffe und darüber hinaus schädliche Naturstoffe, sogenannte Phytoalexine. Es wird heute angenommen, dass die entwicklungsgeschichtliche Bedeutung dieses Transportsystems in dem Schutz eines Organismus vor schädlichen, häufig mit der Nahrung aufgenommenen Giftstoffen liegt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass MDR1 von Bakterien bis hin zu höheren Säugetieren hoch konserviert ist. Entsprechend scheint dieser Transporter im Laufe der Evolution einen klaren Überlebensvorteil gebracht zu haben.

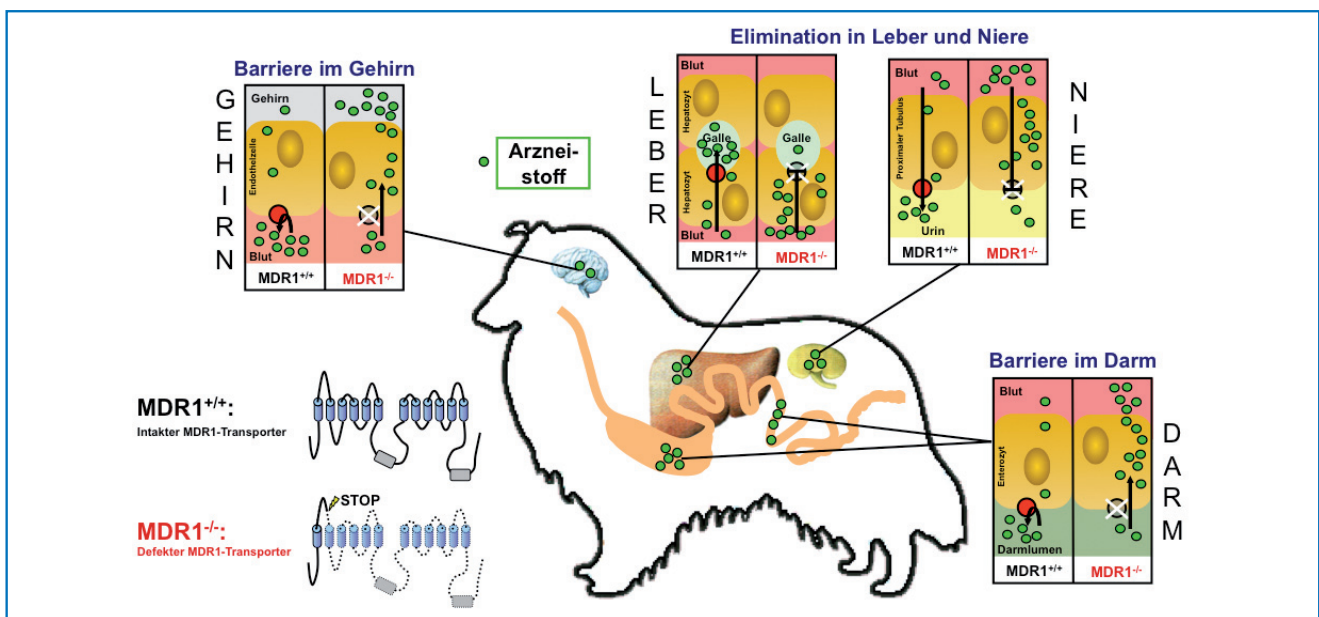
Derzeit sind mehr als 100 verschiedene Arzneistoffe bekannt, welche von MDR1 transportiert werden. Diese gehören zu den Arzneistoffgruppen der Zytostatika, Antihypertensiva, Antiarrhythmika, Antibiotika, Antimykotika, Antiparasitika, Immunsuppressiva, Opioide, Antiemetika, Antazida, Antiepileptika u.v.m. Daher wird bei MDR1 auch von einem „*multidrug*“ Transporter gesprochen. Obwohl der Name einen klaren Zusammenhang mit Arzneistoffen impliziert, transportiert MDR1 auch eine Vielzahl endogener Stoffe, wie z. B. Steroidhormone.

## Bedeutung von MDR1 für den Arzneistofftransport

Wie bei allen Säugetieren, so wird auch MDR1 des Hundes in verschiedenen Geweben gebildet und erfüllt hier vielfältige Aufgaben: An der sogenannten Blut-Hirn-Schranke vermindert MDR1 den Übergang von Arzneistoffen aus dem Blut in das Zentrale Nervensystem; im Darm limitiert MDR1 den Eintritt von Arzneistoffen in den Organismus; in Leber und Niere ist MDR1 an der aktiven Ausscheidung von Arzneistoffen über Galle und Urin beteiligt; darüber hinaus wird MDR1 auch in den Vorläuferzellen des Blutbildenden Systems gebildet und schützt diese vor dem Eindringen von Arznei- und Fremdstoffen.

Bei zahlreichen Hunderassen ist ein Gendefekt im MDR1-Gen weit verbreitet, welcher als nt230(del4) MDR1-Mutation bezeichnet wird. Dieser Gendefekt kann in homozygoter (MDR1<sup>-/-</sup>) oder heterozygoter (MDR1<sup>+/-</sup>) Ausprägung vorliegen; MDR1 intakte Hunde werden entsprechend als MDR1<sup>+/+</sup> beschrieben. Bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden kommt es zu einem vollständigen Funktionsverlust des Transporters in allen oben genannten Organen, was zu gravierenden Veränderungen in der Aufnahme, Ausscheidung und Gewebeverteilung von Arzneistoffen führt: Die Aufnahme von Arzneistoffen aus dem Darm ist erhöht, die Ausscheidung über Leber und Niere dagegen eingeschränkt. Darüber hinaus fehlt die wichtige Schutzfunktion von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke und den Vorläuferzellen des Blutbildenden Systems.

Abbildung 1: **Bedeutung des MDR1-Transporters für den Arzneistofftransport in Gehirn, Leber, Niere und Darm.** MDR1-intakte Hunde (MDR1<sup>+/+</sup>) bilden in diesen Organen einen intakten MDR1-Transporter; bei MDR1-defekten Hunden (MDR1<sup>-/-</sup>) kommt es dagegen zu einem Totalausfall von MDR1 in allen Organen. Dies führt bei der Anwendung von MDR1-Arzneistoffen zu einer vermehrten Resorption aus dem Darm, einer verminderten Ausscheidung über Galle und Urin sowie zu einer ungehinderten Permeation über die Blut-Hirn-Schranke.



Daher muss bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden unter der Therapie mit bestimmten Arzneistoffen mit einem vermehrten Auftreten toxischer Wirkungen auf Gehirn, Leber, Niere und das Blutbildende System gerechnet werden. Dies trifft jedoch nicht zwangsläufig auf alle Arzneistoffe zu, welche durch MDR1 transportiert werden (sog. MDR1-Arzneistoffe). Vielmehr bedarf es für jeden Arzneistoff einer gesonderten Abwägung, welche nur von wissenschaftlich und klinisch erfahrenen Fachleuten vorgenommen werden kann. Das macht den Umgang mit dem MDR1-Gendefekt in der tierärztlichen Praxis häufig schwierig. Erschwerend kommt hinzu, dass klinisch kontrollierte Studien über die therapeutische Sicherheit von MDR1-Arzneistoffen bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden nur in sehr begrenztem Umfang vorliegen. Eine Beachtung des MDR1-Gendefektes in der Hundezucht sowie eine Vermeidung der Zucht von MDR1<sup>-/-</sup> Hunden werden daher von führenden Wissenschaftlern seit vielen Jahren gefordert.

## Betroffene Rassen

In den ersten Jahren der Forschung zu dem MDR1-Gendefekt des Hundes war nur der Collie als Träger dieses Gendefektes bekannt. Mittlerweile wurden weltweit jedoch mehr als 20000 Hunde auf diesen Gendefekt untersucht. Dabei zeigte sich, dass neben dem Collie noch viele weitere Hunderassen und auch Mischlingshunde betroffen sind (siehe Tabelle 1). Für den behandelnden Tierarzt ist daher praktisch nicht zu erkennen, ob ein individueller Hund von dem MDR1-Defekt betroffen ist oder nicht. Daher wird empfohlen vor dem Einsatz relevanter MDR1-Arzneistoffe (s.u.), den MDR1-Genstatus des Hundes zu bestimmen. Dies erfolgt durch ein molekulargenetisches Diagnoseverfahren ausgehend von einer Blutprobe des Hundes; eine äußerliche Erkennbarkeit dieses Gendefektes gibt es nicht.

## Diagnostik und MDR1-Befund

Der genetische Test auf Vorliegen einer nt230(del4) MDR1-Mutation wird durch die TransMIT-Gesellschaft für Technologietransfer mbH, Projektbereich für Pharmakogenetische Diagnostik PGvet am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Gießen unter Leitung von Prof. Dr. Geyer durchgeführt. Der Test bietet Tierärzten, Züchtern und Hundebesitzern eine sichere und einfache Gelegenheit, Arzneistoff sensitive MDR1<sup>+/-</sup> und MDR1<sup>-/-</sup> Hunde zu identifizieren. Der Test kann bei allen Hunderassen ohne Altersbeschränkung, nicht jedoch bei anderen Tierspezies durchgeführt werden. Neben der MDR1-Diagnostik bietet PGvet Exper-

Tabelle 1: **Vorkommen des MDR1-Defektes in verschiedenen Hunderassen**

Rasserverteilung weltweit MDR1 nt230(del4)	Allelfrequenz MDR1(-) in %
Collie, Kurzhaar	68
Collie, Langhaar	55–57
Longhaired Whippet	42–65
Australian Shepherd, Miniature	20–50
Shetland Sheepdog	7–35
Silken Windhound	18–30
Australian Shepherd	17–46
McNab	17–30
Wäller	17–19
Weißer Schäferhund	14
Old English Sheepdog	1–11
English Shepherd	7–15
Deutscher Schäferhund	6–10
Border Collie	1–2
Hütehund Mischling	6–7
Mischling (unspezifiziert)	2–7

tenberatung und schnelle Hilfe bei Vergiftungsfällen auf aktuellem Stand der Wissenschaft und Medizin. Darüber hinaus forscht die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Geyer für eine sichere Arzneitherapie von MDR1<sup>-/-</sup> Hunden und entwickelt Antidots für die gezielte Therapie von Vergiftungsfällen.

Für die MDR1-Diagnostik wird lediglich 1 ml EDTA-Vollblut mit einem entsprechenden Auftragsformular ([www.transmit.de/mdr1-defekt](http://www.transmit.de/mdr1-defekt)) benötigt. Der Befund der MDR1-Diagnostik ist dann wie folgt zu interpretieren:

<b>MDR1<sup>+/+</sup></b>	Kein MDR1-Defekt; MDR1-Gen intakt.
<b>MDR1<sup>+/-</sup></b>	Träger des MDR1-Defektes; Zunahme von Nebenwirkungen unter Therapie mit Zytostatika und makrozyklischen Laktonen (hoch dosiert).
<b>MDR1<sup>-/-</sup></b>	Homozygoter MDR1-Defekt; Totalausfall des MDR1-Transporters, multiple Arzneistoffüberempfindlichkeit, gravierende Intoxikationen z. T. mit Todesfolge.

## MDR1<sup>-/-</sup> Hunde: Multiple Arzneistoffüberempfindlichkeit und eingeschränkte Stresstoleranz

In der tierärztlichen Praxis ist besondere Vorsicht geboten, wenn für einen Hund der Genotyp MDR1<sup>-/-</sup> bestimmt wurde. In diesem Fall fehlt ein funktionsfähiger MDR1-Transporter in allen Geweben und die Behand-

lung mit bestimmten Medikamenten kann erhebliche Probleme bereiten (s.u.).

Unabhängig von der multiplen Arzneistoffüberempfindlichkeit wissen wir heute, dass es bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden zu einer Fehlsteuerung endokriner Regelkreise kommt. Dies äußert sich in erniedrigten Cortisolspiegeln und führt in einem Stress- oder Krankheitszustand unter Umständen zu einer eingeschränkten Stressbewältigung bzw. Regenerationsfähigkeit. Des Weiteren mehren sich die Hinweise, dass MDR1<sup>-/-</sup> Hunde eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen aufweisen. Klinische Studien zur Untersuchung dieser Problembereiche werden in den nächsten Jahren erwartet.

## Kritische Arzneistoffe bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden

### 1. Makrozyklische Laktone

Arzneistoffe aus dieser Gruppe (Ivermectin, Doramectin, Selamectin, Moxidectin, Milbemycinoxim) werden beim Hund zur Therapie parasitärer Erkrankungen eingesetzt. Zu einer Aufnahme kann es aber auch im Rahmen der Entwurmung von Pferden mit hoch dosierten Präparaten kommen, welche bei Unachtsamkeit von Hunden aufgenommen werden. In beiden Fällen kommt es bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden zu gravierenden und zum Teil lebensbedrohlichen Vergiftungen. Diese äußern sich initial als Mydriasis, Visusverlust, Ataxie, Hypersalivation, Desorientiertheit und Krämpfen und gehen dann in einen mehrere Tage andauernden komatösen Zustand über, welcher einer intensivmedizinischen Behandlung bedarf. Besonders kritisch ist dabei der lang anhaltende ZNS-depressive Zustand sowie eine Beeinträchtigung der Magen-Darm-Motorik bei zeitweise aussetzendem Schluckreflex. Dies führt häufig zum Auftreten von Sekundärkomplikationen.

### Therapeutische Maßnahmen bei Vergiftungen von MDR1<sup>-/-</sup> oder MDR1<sup>+/-</sup> Hunden mit Makrozyklischen Laktone

- Aktivkohle (sofort, aber nur wenn das Tier noch ansprechbar ist und bei vorhandenem Schluckreflex)
- Infusion
- In der Krampfphase Vermeidung von Benzodiazepinen, Propofol bevorzugen
- Omeprazol o. Pantoprazol zur Hemmung der Säuresekretion im Magen
- Parenterale Ernährung
- Ggf. künstliche Beatmung
- Regelmäßiges gestütztes Laufen zur Aufrechterhaltung vitaler Funktionen
- Nach Verbesserung der Symptomatik, Futtergabe unterstützt durch vorherige Applikation von Physostigmin

### 1.1 Vergiftungen durch therapeutische Applikation

Makrozyklische Laktone dürfen, sofern nicht explizit für den Hund zugelassen, nicht bei MDR<sup>-/-</sup> Hunden angewendet werden, da es zu lebensbedrohlichen Vergiftungen kommen kann. Ein MDR1-Gentest ist daher zwingend vor dem hoch-dosierten Einsatz von Makrozyklischen Laktone, z. B. zur Therapie der generalisierten Demodikose. Auch heterozygote MDR1<sup>+/-</sup> Hunde zeigen hierbei vermehrt Nebenwirkungen wie Mydriasis und Ataxie, welche aber beim Absetzen der Präparate auch ohne Behandlung innerhalb eines Tages reversibel sind.

### 1.2 Unbewusste Aufnahme im Rahmen der Entwurmung von Pferden

MDR1<sup>-/-</sup> Hunde müssen der Entwurmung von Pferden mit Ivermectin- oder Moxidectin-haltigen Präparaten

Tabelle 2: **Verträglichkeit (✓) bzw. Nicht-Verträglichkeit (⊗) Makrozyklischer Laktone, welche üblicherweise zur Therapie der generalisierten Demodikose eingesetzt werden.**

Präparat/Arzneistoff	Dosierung	Applikation	MDR1 <sup>+/+</sup>	MDR1 <sup>-/-</sup>
Advocate®	2,5 mg Moxidectin/kg 10 mg Imidacloprid/kg	Spot-on, 4-wöchentlich	✓	✓
Milbemycinoxim*	0,5–2,0 mg/kg	Oral, täglich	✓	⊗
Moxidectin*	0,2–0,4 mg/kg	Oral, täglich	✓	⊗
Ivermectin*	0,4–0,6 mg/kg	Oral, täglich	✓	⊗
Doramectin*	0,4–0,6 mg/kg	Subkutan, wöchentlich	✓	⊗

\*Es gibt kein für den Hund zugelassenes Fertigarzneimittel, in welchem einer dieser Wirkstoffe enthalten ist und welches in dieser Applikationsform für diese Indikation zugelassen ist. Umwidmung erforderlich.

dringend fern gehalten werden, da es selbst bei Aufnahme sehr geringer Mengen dieser hoch dosierten Präparate zu gravierenden Vergiftungen von MDR1<sup>-/-</sup> und auch MDR1<sup>+/-</sup> Hunden kommen kann. Insbesondere neuere Präparate in Tablettenform wie Equimax Tabs®, Eraquell Tabs®, oder Vectin® können für Hunde mit MDR1-Defekt extrem gefährlich sein: Bereits die Aufnahme einer einzigen Tablette mit ~20 mg Ivermectin kann bei MDR1<sup>+/-</sup> Hunden leichte Vergiftungssymptome hervorrufen und ist für MDR1<sup>-/-</sup> Hunde sogar tödlich!

### 1.3 Sichere Anwendung von Makrozyklischen Laktone

Nur für sehr wenige Arzneistoffe wurde bisher die Sicherheit der Therapie auch bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden untersucht und bestätigt. Dazu zählen insbesondere drei für den Hund zugelassene Präparate aus der Gruppe der Makrozyklischen Laktone: das Moxidectin-Präparat Advocate®, das Selamectin-Präparat Stronghold® und die Milbemycinoxim-Präparate Milbemax® und Program Plus®. Allerdings müssen alle genannten Präparate auf Grund der geringeren therapeutischen Breite bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden streng nach Herstellerangaben verabreicht werden. Insbesondere sind eine Überdosierung dieser Präparate sowie eine versehentliche orale Verabreichung der spot-on Präparate Advocate® und Stronghold® zu vermeiden.

### 2. Loperamid (Imodium®)

Loperamid wird häufig auch ohne Konsultation eines Tierarztes zur Behandlung von Durchfallerkrankungen des Hundes eingesetzt. Bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden passiert das sonst nur peripher wirksame Loperamid die Blut-Hirn-Schranke und löst so ein schweres und komplexes Vergiftungsgeschehen aus, welches nur schwer zu therapieren ist. Loperamid darf daher bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden nicht angewendet werden.

### 3. Zytostatika

Zytostatika wie Vincristin oder Doxorubicin, welche zum Beispiel im Rahmen der Lymphomtherapie beim Hund eingesetzt werden, sind hoch toxisch für MDR1<sup>-/-</sup> Hunde. Dabei sind vor allem das Blutbildende System und der Gastrointestinaltrakt betroffen. Ein Test auf MDR1-Defekt wird daher vor der klinischen Anwendung dringend empfohlen. Unter Therapie bedürfen sowohl MDR1<sup>-/-</sup>, als auch MDR1<sup>+/-</sup> Hunde einer besonderen Überwachung, um gravierende Nebenwirkungen rechtzeitig zu erkennen und die Therapie entsprechend anzupassen bzw. abzusetzen.

### 4. Emodepsid (Profender®)

Der in dem Präparat Profender® enthaltene Wirkstoff Emodepsid gehört zu den MDR1-Arzneistoffen.

Entsprechend ist bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden die therapeutische Breite dieser Substanz reduziert. So wurde bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden schon nach Gabe der doppelten empfohlenen Dosis kurzzeitiges, leichtes Zittern und Ataxie beobachtet. Die Symptome klangen ohne Behandlung vollständig ab; ein spezifisches Gegenmittel ist bisher nicht bekannt. Darüber hinaus wird von Seiten des Herstellers darauf hingewiesen, dass die Anwendung wegen der Formulierung als Retardtablette nur bei nüchternen Tieren erfolgen darf und eine Fütterung vor oder nach der Tabletteneingabe die Verträglichkeit herabsetzt. Während sich bereits gezeigt hat, dass es bei korrekter Anwendung und Dosierung von Profender® selbst bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden nicht zu einem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen kommt, kann es bei der Anwendung an nicht-nüchternen MDR1<sup>-/-</sup> Hunden bereits bei einer Standarddosis zu neurologischen Nebenwirkungen und Erbrechen kommen. Bei der Anwendung von Profender® an MDR1<sup>-/-</sup> Hunden sind die Anwendungsvorschriften des Herstellers daher zwingend einzuhalten.

### 5. Opioide

Neben Loperamid wurde für zahlreiche weitere Opioide eine Interaktion mit dem MDR1-Transporter nachgewiesen. In einem MDR1-defekten Mausmodell konnte sogar gezeigt werden, dass Morphin, Methadon und Fentanyl bei Fehlen von MDR1 viel stärker über die Blut-Hirn-Schranke permeieren und so eine stärkere analgetische Wirkung erzeugen als bei MDR1-intakten Mäusen. Entsprechendes muss auch für MDR1<sup>-/-</sup> Hunde angenommen werden, wobei klinisch insbesondere die atemdepressive Wirkung dieser Opioide im Rahmen von Narkosen als kritisch zu bewerten ist. Ein Einsatz der genannten Arzneistoffe bedarf bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden daher besonderer Sorgfalt und Überwachung.

### 6. Weitere kritische Arzneistoffe

Für zahlreiche weitere Arzneistoffe wurde eine Interaktion mit dem MDR1-Transporter bestätigt. Diese Arzneistoffe sollten nur unter gründlicher Nutzen-Risiko-Abwägung und unter Beachtung der pharmakokinetischen Besonderheiten bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden angewendet werden. Durch das Fehlen eines funktionsfähigen MDR1-Transporters kann es leicht zu einer unbewussten Überdosierung der entsprechenden Arzneistoffe kommen und es muss mit einem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen gerechnet werden.

Tabelle 3: Übersicht über problematische Wirkstoffe und Wirkstoffgruppen bei Hunden mit MDR1-Defekt.

	<p><b>Ivermectin-Präparate:</b> Animec<sup>®</sup>, Chanectin<sup>®</sup>, Diapec<sup>®</sup>, Ecomectin<sup>®</sup>, Equimax<sup>®</sup>, Eraquell<sup>®</sup>, Furexel<sup>®</sup>, Hippomectin<sup>®</sup>, Ivomec<sup>®</sup>, Noromectin<sup>®</sup>, Paramectin<sup>®</sup>, Qualimec<sup>®</sup>, Vectin<sup>®</sup>, Virbamec<sup>®</sup></p> <p><b>Doramectin-Präparat:</b> Dectomax<sup>®</sup></p> <p><b>Moxidectin-Präparate:</b> Cydectin<sup>®</sup>, Equest<sup>®</sup></p> <p><b>Loperamid-Präparat:</b> Imodium<sup>®</sup></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Nicht bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden anwenden.</b></li> <li>• <b>Es kann zu schweren Intoxikationen mit Todesfolge kommen.</b></li> </ul>
	<p><b>Zytostatika:</b> Vincristin, Vinblastin, Paclitaxel, Doxorubicin, Mitoxantron, Dactinomycin, u. a.</p> <p><b>Immunsuppressiva:</b> Cyclosporin A, Tacrolimus, u. a.</p> <p><b>Opioide:</b> Morphin, Methadon, Fentanyl, Butorphanol</p> <p><b>Herz/Kreislaufmedikamente:</b> Digoxin, Methyl Digoxin, Verapamil, Diltiazem, Chinidin, Talinolol, Losartan, u. a.</p> <p><b>Antiemetika:</b> Ondansetron, Domperidon</p> <p><b>Ulku-therapeutika:</b> Cimetidin, Ranitidin</p> <p><b>Antimykotika:</b> Itraconazol, Ketoconazol</p> <p><b>Antibiotika:</b> Rifampicin, Erythromycin, Levofloxacin, u. a.</p> <p><b>Andere:</b> Acepromazin, Fexofenadin, u.v.a.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Unbewusstes Überdosieren</b></li> <li>• <b>Zunahme neurotoxischer, hepatotoxischer oder nephrotoxischer Wirkungen möglich</b></li> </ul>
	<p><b>Advocate<sup>®</sup></b> (Wirkstoff Moxidectin), <b>Milbemax<sup>®</sup></b> und <b>Program Plus<sup>®</sup></b> (Wirkstoff Milbemycinoxim), <b>Stronghold<sup>®</sup></b> (Wirkstoff Selamectin), <b>Profender<sup>®</sup></b> (Wirkstoff Emodepsid)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Sicher auch bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden, wenn Herstellerangaben zu Dosierung und Applikation exakt befolgt werden.</b></li> </ul>

Eine MDR1-Genotyp basierte Dosierung wäre bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden wünschenswert, ist für die meisten problematischen Arzneistoffe aber bisher noch nicht etabliert. Für die Arzneistoffe Acepromazin und Butorphanol kann aber auf Grundlage klinischer Erfahrung bereits eine Dosisreduktion um 30 – 50% empfohlen werden.

## MDR1-Vigilanzsystem

Sollten Sie unerwünschte Arzneimittelwirkungen beobachten oder vermuten, so sollte stets eine Nebenwirkungsmeldung über den Hersteller an die zuständige Behörde erfolgen, oder direkt über ein Online-Formular unter [www.vet.uaw.de](http://www.vet.uaw.de).

Darüber hinaus können Sie zusätzlich folgende Adresse nutzen: Auf der Internetseite [www.uni-giessen.de/mdr1-vigisys](http://www.uni-giessen.de/mdr1-vigisys) besteht die Möglichkeit, MDR1-spezifische unerwünschte Arzneimittelwirkungen sowie Narkosezwischenfälle und Narkoseprotokolle von Hunden mit MDR1-Gendefekt zu melden. Mithilfe dieser Daten soll in Zukunft eine bessere Aussage über die Sicherheit von Arzneistoffen und Narkosen bei Hunden mit MDR1-Gendefekt getroffen werden. Die Kenntnis des MDR1-Genotyps ist dabei unerlässlich.

### Kontakt:

Prof. Dr. Joachim Geyer  
 Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
 Justus-Liebig-Universität Gießen  
 Frankfurter Str. 107  
 35392 Gießen

### Beratung und Rückfragen:

Tel. +49 641 99 38411 oder 38418  
 FAX +49 641 99 38419

### Diagnostik, Fachinformationen und Auftragsformular:

[www.transmit.de/mdr1-defekt](http://www.transmit.de/mdr1-defekt)  
 Weiterführende Literatur beim Verfasser erhältlich

## 10. Anhang - Publikationen

### 14) GEYER J (2012)

MDR1-Gendefekt und multiple Arzneistoffüberempfindlichkeit beim Hund.

*SitzPlatzFuss, Ausgabe Januar-Februar-März 2012, Seiten 74-81*

Foto: Neddens-Tierfoto



Vom MDR1-Gendefekt ist der Collie eine recht häufig betroffene Rasse.

Hund &amp; Gesundheit

# MDR1-Gendefekt und multiple Arzneistoffüberempfindlichkeit beim Hund

von Prof. Dr. Joachim Geyer <<

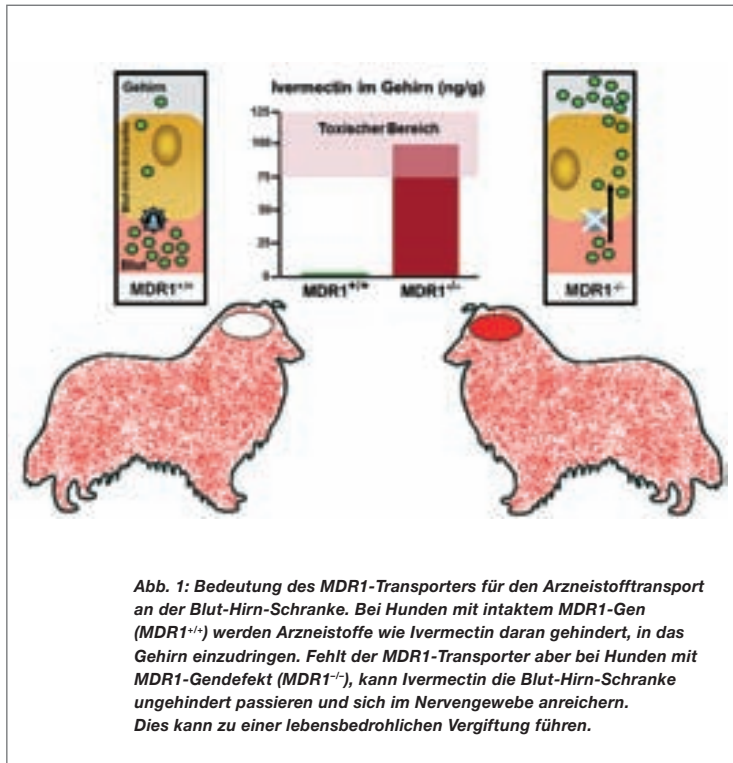
Bei den Hunderassen Collie, Australian Shepherd, Shetland Sheepdog, Longhaired Whippet, Silken Windhound, MacNab, English Shepherd, Weißer Schäferhund, Bobtail, Wäller, Border Collie, Deutscher Schäferhund und vielen Mischlingshunden ist der sog. MDR1-Gendefekt weit verbreitet. Dieser führt zu einem vermehrten Übertritt von Arzneistoffen in das Gehirn und kann bei der Anwendung von Arzneistoffen wie z. B. dem Antiparasitenmittel Ivermectin gravierende Vergiftungen auslösen. Diese haben in vielen Fällen bereits zum Tod betroffener Hunde geführt. Bei Vorliegen des MDR1-Gendefekts steht die sichere Anwendung einer Vielzahl weiterer Arzneistoffe infrage, sodass eine vorbeugende Diagnose anzuraten ist. Darüber hinaus sollte der MDR1-Gendefekt bei den genannten Rassen in der Zucht berücksichtigt werden. Zur Bestimmung des MDR1-Status eines Hundes steht ein molekulargenetischer Test zur Verfügung, der durch die TransMIT GmbH in Gießen angeboten wird.

## MDR1: EIN „MULTIDRUG“-TRANSPORTER

Bei „MDR1“ handelt es sich um ein Transportsystem für Arzneistoffe, da in die Plasmamembran von Zellen eingebettet ist. Dieses wird von dem sog. Multidrug-resistance- (MDR1-) Gen codiert. Synonyme Bezeichnungen sind P-Glycoprotein oder ABCB1. MDR1 transportiert eine Vielzahl verschiedener Arzneistoffe und darüber hinaus schädliche Naturstoffe, sogenannte Phytoalexine. Es wird heute angenommen, dass die entwicklungsgeschichtliche Bedeutung

dieses Transportsystems in dem Schutz des Organismus vor schädlichen, häufig mit der Nahrung aufgenommenen Giftstoffen liegt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass MDR1 von Bakterien bis hin zu den viel höher entwickelten Säugetieren und dem Menschen hoch konserviert ist. Entsprechend scheint der MDR1-Transporter im Lauf der Evolution einen klaren Überlebensvorteil gebracht zu haben. Derzeit sind mehr als 100 verschiedene Arzneistoffe bekannt, die von MDR1 transportiert werden. Daher wird bei MDR1 auch von einem „Multidrug“-Transporter gesprochen.





### MDR1 UND BLUT-HIRN-SCHRANKE

Der MDR1-Transporter ist im Organismus an der Verteilung und Ausscheidung von Arzneistoffen beteiligt. Seine bedeutendste Funktion erfüllt dieser an der sog. Blut-Hirn-Schranke (Abb. 1): Versucht ein Arzneistoff wie Ivermectin aus dem Blut über diese Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn einzudringen, wird dieser von MDR1 erkannt und zurück in das Blut transportiert. Durch diesen aktiven Transport wird der Übertritt von Arzneistoffen in das Nervengewebe blockiert. Damit schützt der MDR1-Transporter das Gehirn vor einer Überschwemmung mit diesen potenziell schädlichen Stoffen. Fehlt MDR1 bei Hunden mit MDR1-Gendefekt ( $MDR1^{-/-}$ ) kann der Arzneistoff die Blut-Hirn-Schranke passieren und so ungehindert in das Gehirn eindringen. Im Falle des Ivermectin werden dabei so hohe Konzentrationen erreicht, dass es zu gravierenden Nebenwirkungen kommt, die häufig zum Tod des betroffenen Hundes führen. Da neben Ivermectin zahlreiche weitere Arzneistoffe von MDR1 transportiert werden, sind Hunde mit MDR1-Defekt von einer multiplen Arzneistoffüberempfindlichkeit betroffen.

Rasseverteilung weltweit Allelfrequenz  
MDR1 nt230 (del4) MDR1(-) in %

Collie, Kurzhaar	68
Collie, Langhaar	55–57
Longhaired Whippet	42–65
Australian Shepherd, Miniature	20–50
Shetland Sheepdog	7–35
Silken Windhound	18–30
Australian Shepherd	17–46
McNab	17–30
Wäller	17–19
Weißer Schäferhund	14
Old English Sheepdog	1–11
English Shepherd	7–15
Deutscher Schäferhund	6–10
Border Collie	1–2
Hütehund-Mischling	6–7
Mischling (unspezifiziert)	2–7

**Tabelle 1**  
Vorkommen des MDR1-Gendefekts bei verschiedenen Hunderassen

### DER IVERMECTIN-SENSITIVE COLLIE ( $MDR1^{-/-}$ )

Bereits seit mehr als 25 Jahren ist bekannt, dass einige Hunderassen, insbesondere der Collie, eine auffallende Überempfindlichkeit gegenüber Arzneistoffen wie Ivermectin aufweisen. Allerdings war der Grund dafür lange Zeit völlig unbekannt. Erst vor wenigen Jahren wurde eine Mutation in dem MDR1-Gen dieser Ivermectin-sensitiven Collies entdeckt, die wie oben beschrieben zu einem Totalausfall des MDR1-Transporters führt. Aufgrund seiner Lokalisation und Ausprägung wird dieser MDR1-Gendefekt auch als nt230 (del4) MDR1-Mutation bezeichnet. Mithilfe einer molekulargenetischen Analyse kann der MDR1-Status aus einer Blutprobe des Hundes bestimmt werden.

### BETROFFENE RASSEN

In den ersten Jahren der Forschung zu dem MDR1-Gendefekt des Hundes war nur der Collie als Träger dieses Gendefekts

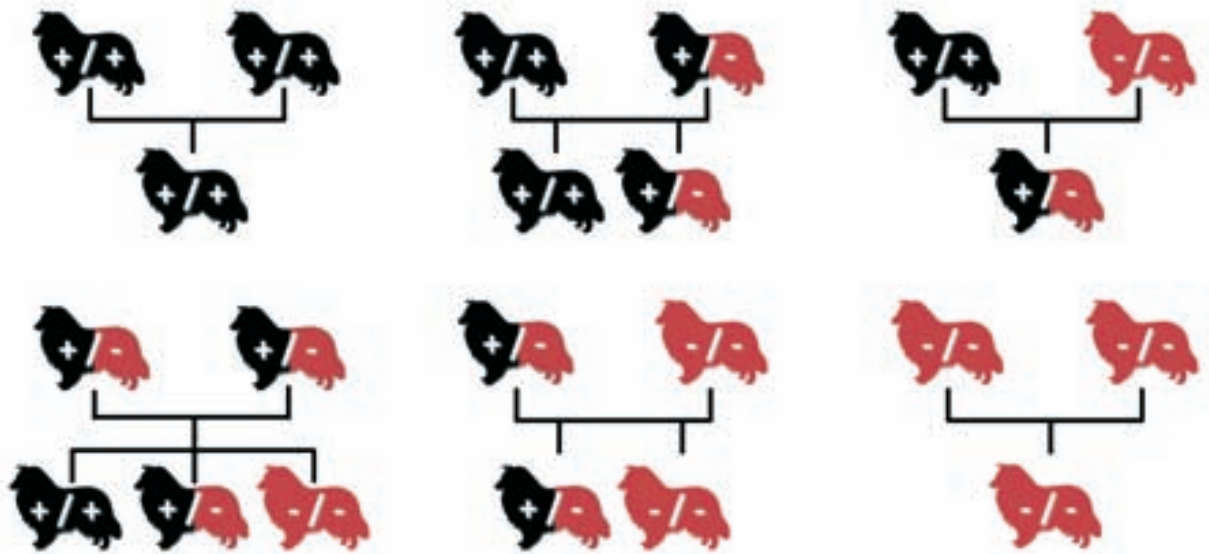


Abb. 2: Der MDR1-Genotyp eines Hundes ergibt sich aus den MDR1-Genotypen der Elterntiere. Nur Nachkommen, die den MDR1-Defekt von väterlicher und mütterlicher Seite erben, sind von dem Defekt betroffen und tragen den homozygoten Genotyp MDR1<sup>-/-</sup>. Angegeben sind verschiedene Paarungskombinationen, bei denen MDR1<sup>-/-</sup>-Nachkommen entstehen können (unten) oder nicht entstehen können (oben).

bekannt. Mittlerweile wurden weltweit jedoch mehr als 20.000 Hunde auf diesen Gendefekt untersucht. Dabei zeigte sich, dass neben dem Collie noch viele weitere Hunderassen und auch Mischlingshunde betroffen sind (s. Tabelle 1). Daher ist es rein äußerlich schwerlich zu erkennen, ob ein individueller Hund von dem MDR1-Gendefekt betroffen ist oder nicht. Aus diesem Grund wird empfohlen, vor dem Einsatz relevanter MDR1-Arzneistoffe (s. u.), den MDR1-Genstatus des Hundes zu bestimmen.

## VERERBUNG UND ZUCHT

Aufgrund der oben geschilderten Problematik sollte der MDR1-Gendefekt in der Zucht betroffener Hunderassen berücksichtigt werden. Dabei muss insbesondere bei den stark betroffenen Rassen, wie dem Collie, eine langfristige angelegte Zuchtstrategie verfolgt werden. Der MDR1-

Genotyp eines Hundes ergibt sich aus der Kombination eines von väterlicher (+ oder -) und eines von mütterlicher Seite (+ oder -) vererbten Merkmals. „+“ steht dabei für ein intaktes MDR1-Gen und „-“ für ein defektes MDR1-Gen bezogen auf das Merkmal MDR1 nt230 (del4). Für den MDR1-Genotyp eines Hundes gibt es drei verschiedene Möglichkeiten: nicht betroffen (MDR1<sup>+/+</sup>), heterozygot betroffen (MDR1<sup>+/-</sup>) und homozygot betroffen (MDR1<sup>-/-</sup>). Ist der MDR1-Genotyp zweier Zuchttiere bekannt, kann bereits eine theoretische Voraussage über den MDR1-Genstatus der Nachkommen-generation getroffen werden. Betroffene Tiere mit dem Genotyp MDR1<sup>-/-</sup> können aus einer Kreuzung der Genotypen MDR1<sup>+/-</sup> x MDR1<sup>+/-</sup>, MDR1<sup>+/-</sup> x MDR1<sup>-/-</sup> oder MDR1<sup>-/-</sup> x MDR1<sup>-/-</sup> entstehen. Bei Kreuzung der Genotypen MDR1<sup>+/+</sup> x MDR1<sup>-/-</sup>, MDR1<sup>+/+</sup> x MDR1<sup>+/-</sup> und MDR1<sup>+/+</sup> x MDR1<sup>+/+</sup> entstehen dagegen keine homozygot betroffenen MDR1<sup>-/-</sup> Tiere (s. Abb. 2).



*Am MDR1-Gendefekt erkrankte Hunde haben eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit.*

äußern sich initial durch Visusverlust, Gangunsicherheit und Krämpfe und gehen dann in einen mehrere Tage andauernden komatösen Zustand über, der einer intensivmedizinischen Behandlung bedarf. Daher ist bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden Folgendes zu beachten:

### UMGANG MIT MDR1<sup>-/-</sup> HUNDEN

Wenn für einen Hund der Genotyp MDR1<sup>-/-</sup> bestimmt wurde, sind bei der Arzneitherapie besondere Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. In diesem Fall fehlt nämlich ein funktionsfähiger MDR1-Transporter in allen Geweben des Hundes und die Behandlung mit bestimmten Medikamenten kann erhebliche Probleme bereiten (s. u.).

Unabhängig von der multiplen Arzneistoffüberempfindlichkeit wissen wir heute, dass es bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden zu einer Fehlsteuerung des Hormonsystems kommt. Dies äußert sich in erniedrigten basalen Cortisolspiegeln und führt in einem Stress- oder Krankheitszustand unter Umständen zu einer eingeschränkten Regenerationsfähigkeit und Stressbewältigung von MDR1<sup>-/-</sup> Hunden. Des Weiteren mehren sich die Hinweise, dass MDR1<sup>-/-</sup> Hunde eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen aufweisen. Klinische Studien zur Untersuchung dieser Problembereiche werden in den nächsten Jahren erwartet.

### KRITISCHE ARZNEISTOFFE BEI MDR1<sup>-/-</sup> HUNDEN

#### Makrozyklische Laktone

Arzneistoffe aus dieser Gruppe (Ivermectin, Doramectin, Moxidectin, Milbemycin Oxime) werden beim Hund zur Therapie parasitärer Erkrankungen eingesetzt. Zu einer Aufnahme kann es aber auch im Rahmen der Entwurmung von Pferden mit hoch dosierten Präparaten kommen, die bei Unachtsamkeit von Hunden aufgenommen werden. In beiden Fällen kommt es bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden zu gravierenden und zum Teil lebensbedrohlichen Vergiftungen. Diese

- 1. Makrozyklische Laktone dürfen, sofern nicht explizit für die Anwendung beim Hund zugelassen, nicht bei MDR<sup>-/-</sup> Hunden angewendet werden.
- 2. Ein MDR1-Gentest ist zwingend vor einer hoch dosierten Therapie mit makrozyklischen Laktone n z. B. bei generalisierter Demodikose, einer durch parasitäre Milben ausgelösten Hauterkrankung. Hier reagieren MDR1<sup>+/-</sup> Hunde ebenfalls empfindlicher als MDR1<sup>+/+</sup> Hunde. Allerdings sind die auftretenden Nebenwirkungen nicht gravierend und innerhalb eines Tages ohne Behandlung reversibel und sind damit nicht mit dem Vergiftungsbild bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden vergleichbar.
- 3. MDR1<sup>-/-</sup> Hunde müssen grundsätzlich der Entwurmung von Pferden mit Ivermectin- oder Moxidectin-haltigen Präparaten ferngehalten werden, da es selbst bei Aufnahme kleinster Mengen dieser hoch dosierten Präparate zu gravierenden Vergiftungen von MDR1<sup>-/-</sup> und auch MDR1<sup>+/-</sup> Hunden kommen kann. Insbesondere neuere Präparate in Tablettenform wie Equimax Tabs<sup>®</sup>, Eraquell Tabs<sup>®</sup> oder Vectin<sup>®</sup> sind extrem gefährlich für Hunde mit MDR1-Defekt: Bereits die Aufnahme einer einzigen Tablette mit ~20 mg kann bei MDR1<sup>+/-</sup> Hunden leichte Vergiftungssymptome hervorrufen und ist für MDR1<sup>-/-</sup> Hunde sogar tödlich.
- 4. Folgende Präparate können bei korrekter Anwendung auch bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden sicher angewendet werden: Stronghold<sup>®</sup>, Milbemax<sup>®</sup> und Advocate<sup>®</sup>. Allerdings müssen alle genannten Präparate aufgrund der geringeren therapeutischen Breite bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden streng nach Herstellerangaben verabreicht werden. Insbesondere ist eine versehentliche orale Verabreichung der Spot-on-Präparate Advocate<sup>®</sup> und Stronghold<sup>®</sup> sowie eine Überdosierung zu vermeiden.





Foto: K.

*Bei stark vom MDR1-Gendefekt betroffenen Rassen ist eine langfristig angelegte Zuchtstrategie besonders wichtig.*

#### Loperamid (Imodium®)

Loperamid wird häufig auch ohne Konsultation eines Tierarztes zur Behandlung von Durchfallerkrankungen des Hundes eingesetzt. Bei MDRI<sup>-/-</sup> Hunden passiert das sonst nur im Darm wirksame Loperamid die Blut-Hirn-Schranke und löst so ein schweres und komplexes Vergiftungsgeschehen aus, da nur schwer zu therapieren ist. Loperamid darf daher bei MDRI<sup>-/-</sup> nicht angewendet werden.

#### Emodepsid (Profender®)

Der in dem Präparat Profender® enthaltene Wirkstoff Emodepsid gehört ebenfalls zu den MDRI-Arzneistoffen. Entsprechend ist bei MDRI<sup>-/-</sup> Hunden die therapeutische Breite dieser Substanz reduziert. So wurden in einem kontrollierten Versuch an MDRI<sup>-/-</sup> Collies schon nach Gabe der doppelten empfohlenen Dosis Nebenwirkungen wie Zittern und Ataxie beobachtet. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass die Anwendung von Profender® wegen der Formulierung als Retardtablette nur bei nüchternen Tieren erfolgen darf und eine Fütterung vor oder



Auch der Weiße Schäferhund ist eine vom MDR1-Gendefekt betroffene Rasse.

nach der Tabletteneingabe die Verträglichkeit zusätzlich herabsetzt. Während wir derzeit davon ausgehen, dass es bei korrekter Anwendung und Dosierung von Profender® selbst bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden nicht zu einem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen kommt, kann es bei der Anwendung an nicht nüchternen MDR1<sup>-/-</sup> Hunden bereits bei einer Standarddosis zu neurologischen Nebenwirkungen kommen. Daher sind in diesem Fall die Anwendungsvorschriften des Herstellers streng einzuhalten: Der Hund muss über zehn Stunden vor der Anwendung (z. B. über Nacht) nüchtern sein und darf frühestens vier Stunden nach der Behandlung wieder gefüttert werden.

#### Zytostatika

Zytostatika wie Vincristin oder Doxorubicin, die häufig im Rahmen der Tumorthherapie beim Hund eingesetzt werden, sind hochgiftig für MDR1<sup>-/-</sup> Hunde. Ein Test auf MDR1-Gendefekt ist daher zwingend vor der klinischen Anwendung. Unter Therapie bedürfen sowohl MDR1<sup>-/-</sup> als auch MDR1<sup>+/-</sup> Hunde einer besonderen Überwachung, um gravierende Nebenwirkungen rechtzeitig zu erkennen.



#### Weitere kritische Arzneistoffe

Für zahlreiche weitere Arzneistoffe wurde eine Interaktion mit dem MDR1-Transporter bestätigt. Diese Arzneistoffe sollten nur unter gründlicher Nutzen-Risiko-Abwägung und unter Beachtung bestimmter Besonderheiten bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden angewendet werden. So kann es durch das Fehlen eines funktionsfähigen MDR1-Transporters leicht zu einer unbewussten Überdosierung der entsprechenden Arzneistoffe kommen und es muss mit einem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen gerechnet werden.

### DIAGNOSTIK UND MDR1-BEFUND

Der molekulargenetische Test auf Vorliegen einer nt230 (del4) MDR1-Mutation wird durch die TransMIT GmbH, Projektbereich für Pharmakogenetische Diagnostik PGvet am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Leitung von Prof. Dr. Geyer durchgeführt. Der Test bietet Hundebesitzern,



	<b>Ivermectin-Präparate:</b> Animec <sup>®</sup> , Chanectin <sup>®</sup> , Diapec <sup>®</sup> , Ecomectin <sup>®</sup> , Equimax <sup>®</sup> , Eraquell <sup>®</sup> , Furexel <sup>®</sup> , Hippomectin <sup>®</sup> , Ivomec <sup>®</sup> , Noromectin <sup>®</sup> , Paramectin <sup>®</sup> , Qualimec <sup>®</sup> , Vectin <sup>®</sup> , Virbamec <sup>®</sup> <b>Doramectin-Präparat:</b> Dectomax <sup>®</sup> <b>Moxidectin-Präparate:</b> Cydectin <sup>®</sup> , Equest <sup>®</sup> <b>Loperamid-Präparat:</b> Imodium <sup>®</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nicht bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden anwenden</li> <li>• Es kann zu schweren Vergiftungen und Todesfällen kommen</li> </ul>
	<b>Zytostatika:</b> Vincristin, Vinblastin, Paclitaxel, Doxorubicin, Mitoxantron, Dactinomycin, u.a. <b>Immunsuppressiva:</b> Cyclosporin A, Tacrolimus, u.a. <b>Opiode:</b> Morphin, Methadon, Fentanyl, Butorphanol <b>Herz/Kreislaufmedikamente:</b> Digoxin, Methyldigoxin, Verapamil, Diltiazem, Chinidin, Talinolol, Losartan, u.a. <b>Antiemetika:</b> Ondansetron, Domperidon <b>Ulkuetherapeutika:</b> Cimetidin, Ranitidin <b>Antimykotika:</b> Itraconazol, Ketoconazol <b>Antibiotika:</b> Rifampicin, Erythromycin, Levofloxacin, u.a. <b>Andere:</b> Acepromazin, Fexofenadin, u.v.a.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unbewusstes Überdosieren bei MDR1<sup>-/-</sup> Hunden</li> <li>• Zunahme von Nebenwirkungen möglich</li> </ul>
	<b>Advocate<sup>®</sup></b> (Wirkstoff Moxidectin), <b>Milbemax<sup>®</sup></b> und <b>Program Plus<sup>®</sup></b> (Wirkstoff Milbemycinoxim), <b>Stronghold<sup>®</sup></b> (Wirkstoff Selamectin), <b>Profender<sup>®</sup></b> (Wirkstoff Emodepsid)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Für den Hund zugelassene Präparate</li> <li>• <b>Aber:</b> Herstellerangaben zu Dosierung und Applikation exakt befolgen</li> </ul>

Tab. 2: Übersicht über problematische Wirkstoffe und Wirkstoffgruppen bei Hunden mit MDR1-Gendefekt.

Züchtern und Tierärzten eine sichere und einfache Gelegenheit, Arzneistoff-sensitive MDR1<sup>+/-</sup> und MDR1<sup>-/-</sup> Hunde zu identifizieren. Für die MDR1-Diagnostik wird lediglich 1 ml EDTA-Vollblut mit einem entsprechenden Auftragsformular ([www.transmit.de/mdr1-defekt](http://www.transmit.de/mdr1-defekt)) benötigt. Der Test kann bei allen Hunderassen ohne Altersbeschränkung, nicht jedoch bei anderen Tierspezies durchgeführt werden. Neben der MDR1-Diagnostik bietet PGvet Expertenberatung und schnelle Hilfe bei Vergiftungsfällen auf aktuellem Stand der Wissenschaft und Medizin. Darüber hinaus forscht die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Geyer für eine sichere Arzneitherapie von MDR1<sup>-/-</sup> Hunden und entwickelt Antidots für die gezielte Therapie von Vergiftungsfällen.



Prof. Dr. Joachim Geyer

## PROF. DR. JOACHIM GEYER

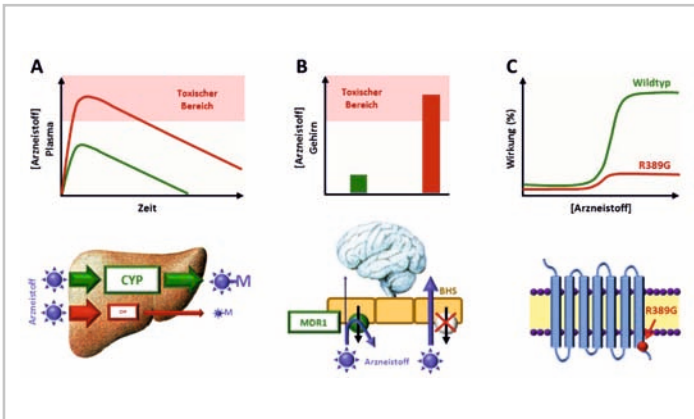
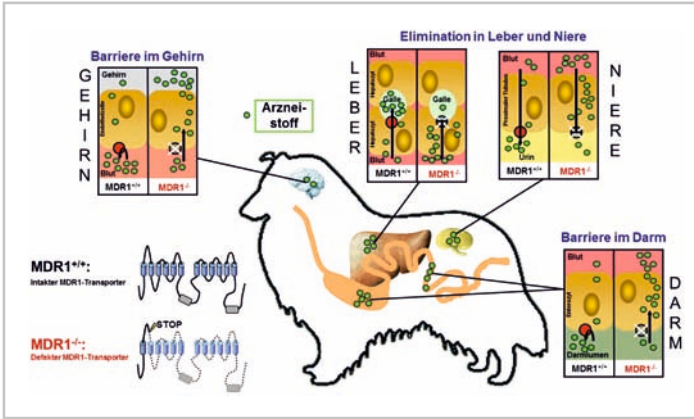
Justus-Liebig-Universität Gießen  
 Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Frankfurter Straße 107  
 35392 Gießen  
 E-Mail: [Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de](mailto:Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de)

### Weitere Informationen:

[www.uni-giessen.de/pharmtox](http://www.uni-giessen.de/pharmtox)





*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: 978-3-8359-6141-8

