

**NUTZUNG TRANSGENER TIERMODELLE MIT
TRANSPORTDEFEKTEN ZUR ANALYSE DER
HEPATOBIILIÄREN ELIMINATION UND
ORGANVERTEILUNG VON ARZNEISTOFFEN
UND TOXINEN**

OLGA GAVRILOVA



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

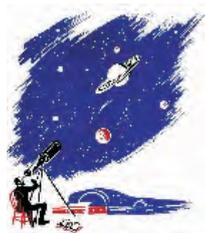
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

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.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Ernst Petzinger

**Nutzung transgener Tiermodelle mit Transportdefekten zur Analyse
der hepatobiliären Elimination und Organverteilung von
Arzneistoffen und Toxinen**

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

eingereicht von

Olga Gavrilova

Tierärztin aus Poltawa, Ukraine

Gießen 2008

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

Dekan: Prof. Dr. Dr.habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. E. Petzinger
Prof. Dr. G. Scheiner-Bobis

Tag der Disputation: 12. Juni 2008

Meinen Eltern und Christopher
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	8
Abbildungen	9
Tabellen	12
Vorwort	14
<u>1. Einleitung.....</u>	<u>15</u>
1.1. Membrantransportsysteme für Arzneistoffe.....	15
1.2. Die Familie der ATP-binding cassette (ABC) Transporter	16
1.2.1. ABC-Transporter im Arzneistofftransport	20
1.2.2. MDR1 (ABCB1), ein Multidrug Transporter.....	20
1.2.3. MRP2 und Arzneistofftransport	23
1.2.4. MRP3, ein ABC-Carrier der basolateralen Membran	25
1.2.5. BCRP, ein Effluxtransporter für besondere Aufgaben.....	26
1.3. Transportervermittelte hepatobiliäre Elimination von Arznei- und Fremdstoffen	28
1.4. Arzneistofftransport in der Niere	31
1.5. Arzneistofftransporter im Darm.....	32
1.6. Arzneistofftransport an der Blut-Hirn-Schranke.....	34
1.7. Untersuchte Substanzen mit Bezug zu Arzneistoff-transportern	38
1.7.1. Herzglykoside: Ouabain und Digoxin	38
1.7.2. Phalloidin	41
1.7.3. Makrozyklische Laktone: Ivermectin und Selamectin.....	41
1.8. Ziel dieser Arbeit	43
<u>2. Versuchstiere</u>	<u>44</u>
2.1. Ratten	44
2.2. Mäuse	45
2.3. Erforderliche Genehmigungen	46
<u>3. Material und Methoden</u>	<u>47</u>
3.1. Material.....	47
3.1.1. Chemikalien	47
3.1.2. Radioaktive Substanzen	47
3.1.3. Applikationslösungen für die <i>in situ</i> Galleausscheidung.....	48
3.1.4. Szintillationsflüssigkeit	49

3.1.5.	Dünnschichtchromatographie.....	49
3.2.	Methoden	50
3.2.1.	<i>In situ</i> Galleausscheidung bei der Maus	50
	Versuchsdurchführung.....	50
	Gallen- und Organproben nach Applikation von Testsubstanzen	51
3.2.2.	<i>In situ</i> Galleausscheidung bei der Ratte.....	51
	Versuchsdurchführung.....	51
	Gallen- und Organproben nach Applikation der Testsubstanz	52
3.2.3.	Harnblasenkatheterisierung	52
3.3.	Dünnschichtchromatographie der Gallenproben.....	54
3.4.	Pharmakokinetische Studien	54
3.4.1.	Applikation.....	54
3.4.2.	Gewinnung der Blutproben	55
3.4.3.	EDV-gestützte Auswertung	55
3.5.	Gewebeentnahme und Isolierung von Total-RNA	56
3.6.	cDNA-Synthese	57
3.7.	Quantitative real-time PCR	58
3.7.1.	Statistische Analyse	59
4.	<u>Ergebnisse</u>	<u>60</u>
4.1.	Gallefluss bei Ratten und Mäusen.....	60
4.1.1.	Gallefluss bei Ratten mit Gallengangsfistel.....	61
4.1.2.	Gallefluss bei Mäusen mit Gallenblasenfistel.....	61
4.2.	<i>In situ</i> Galleausscheidung von [³H]Taurocholat bei Mäusen mit Gallenblasenfistel.....	62
	Hepatobiliäre Ausscheidung von [³ H]Taurocholat.....	63
4.3.	<i>In situ</i> Galleausscheidung von [³H]DHEAS bei Mäusen mit Gallenblasenfistel.....	64
	Gallefluss nach Applikation von [³ H]DHEAS	64
	Hepatobiliäre Ausscheidung von [³ H]DHEAS	65
4.4.	Expression wichtiger Arzneistofftransportern in Leber, Niere und Gehirn von <i>mdr1a,b</i> (-/-) und <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Mäusen sowie TR(-) Ratten.	66
4.4.1.	Genotypisierung der <i>mdr1a,b</i> (-/-) und <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Mäuse.....	66
	Leber.....	66
	Niere	67
	Gehirn.....	67
4.4.2.	Genotypisierung der TR(-) Ratten	69

Leber.....	69
Niere	69
Gehirn.....	69
4.5. <i>In situ</i> Galleausscheidung, Pharmakokinetik und Gehirnpenetration	
von Arznei- und Fremdstoffen	72
4.5.1. <i>In situ</i> Galleausscheidung von Phalloidin	73
Gallefluss nach Applikation von [³ H]Demethylphalloin	73
Hepatobiliäre Ausscheidung von [³ H]Demethylphalloin bei der Maus	74
Hepatobiliäre Ausscheidung von [³ H]Demethylphalloin bei der Ratte	75
Demethylphalloin-Metabolite in der Galle von Ratte und Maus.....	77
Gewebekonzentrationen und Organverteilung von [³ H]DMP bei der Maus.....	77
Gewebekonzentrationen und Organverteilung von [³ H]DMP bei der Ratte	78
[³ H]Demethylphalloin-Elimination über Urin und Galle bei Maus und Ratte ...	79
4.5.2. Plasmakinetik und <i>in situ</i> Galleausscheidung von Ouabain	80
Plasmakinetik von Ouabain bei der TR(-) und Wistar-Ratte	80
<i>In situ</i> Galleausscheidung von Ouabain bei Ratten.....	81
Gewebekonzentrationen und Organverteilung von Ouabain bei der Ratte	83
Gewebekonzentrationen und Organverteilung von Ouabain bei der Maus.....	86
4.5.3. Ouabain Metabolite in der Galle bei Ratte und Maus.....	87
4.5.4. Plasmakinetik und <i>in situ</i> Galleausscheidung von Digoxin.....	88
4.5.5. <i>In situ</i> Galleausscheidung von Digoxin bei der Maus.....	88
Hepatobiliäre Elimination von Digoxin bei Mäusen.....	88
Digoxin-Metabolite in der Galle der Maus	91
Gewebekonzentrationen von Digoxin bei der Maus	92
Hepatobiliäre Elimination von Digoxin bei Ratten	92
Digoxin-Metabolite in der Galle bei der Ratte.....	94
Gewebekonzentrationen von Digoxin bei der Ratte.....	95
4.5.6. Makrozyklische Laktone: Ivermectin und Selamectin.....	96
Hepatobiliäre Elimination von Ivermectin bei der Maus	96
Hepatobiliäre Elimination von Ivermectin bei der Ratte	97
Pharmakokinetik von [³ H]Ivermectin bei Maus und Ratte.....	98
4.5.7. Pharmakokinetik und Gehirnpenetration von Ivermectin.....	99
Plasmakinetik von Ivermectin bei der Maus.....	99
Gewebekonzentrationen von Ivermectin bei der Maus.....	100
Gehirnkonzentrationen von Ivermectin bei der Maus.....	101
Plasmakinetik und Gewebekonzentrationen von Ivermectin bei der Ratte....	102
4.5.8. Pharmakokinetik und Gehirnpenetration von Selamectin.....	103
Plasmakinetik von Selamectin bei der Maus	103
Gewebekonzentrationen von Selamectin bei der Maus.....	105
Gehirnkonzentrationen von Selamectin bei der Maus.....	105
Plasmakinetik und Gewebekonzentrationen von Selamectin bei der Ratte ..	106
<u>5. Diskussion.....</u>	<u>108</u>
5.1. Tierversuche in der biomedizinischen Forschung.....	108

5.2. Kompensatorische Mechanismen auf Gen-Ebene bei Tieren mit Transportdefekten.....	110
<i>Mrp2</i> -defiziente TR(-) Ratten.....	110
<i>Mdr1a,b</i> (-/-) und <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Mäuse.....	112
Veränderungen im Metabolismus bei Tieren mit Transportdefekten.....	114
5.3. Organverteilung und Pharmakokinetik von Phalloidin bei Ratte und Maus	115
5.4. Organverteilung und Pharmakokinetik der Herzglykoside Ouabain und Digoxin bei Ratte und Maus	119
5.4.1. Pharmakokinetik und Organverteilung von Ouabain.....	119
Ratte.....	119
Maus.....	120
5.4.2. Pharmakokinetik und Organverteilung von Digoxin.....	121
Maus.....	122
Ratte.....	123
5.5. Organverteilung und Pharmakokinetik von makrozyklischen Laktone bei Ratte und Maus	124
5.5.1. Pharmakokinetik von Ivermectin bei Tieren mit Transportdefekten...	125
5.5.2. Pharmakokinetik von Selamectin bei Tieren mit Transportdefekten..	129
<u>6. Zusammenfassung</u>	<u>133</u>
<u>7. Summary.....</u>	<u>134</u>
<u>8. Literaturverzeichnis.....</u>	<u>135</u>
<u>9. Anhang.....</u>	<u>158</u>
Verwendete Versuchstiere.....	158
Tabellen zur <i>in situ</i> Galleausscheidung von Digoxin.....	163
Tabelle zur <i>in situ</i> Galleausscheidung von Ouabain.....	164
Tabellen zur <i>in situ</i> Galleausscheidung von [³ H]DMP.....	166
Tabellen zur Pharmakokinetik von Ivermectin.....	166
Tabellen zur Pharmakokinetik von Selamectin.....	168
<u>10. Danksagung.....</u>	<u>171</u>
<u>11. Erklärung.....</u>	<u>173</u>

Abkürzungen und Definitionen

%	Prozent
ABC	ATP-Bindung-Cassette
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under the Curve, Gesamtfläche unter der Kurve
BA	Bile Acid
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein (die Bezeichnung humaner Gene werden groß- und diejenige der Tiere Gene werden kleingeschrieben)
BSEP	Bile Salt Export Pump
cDNA	complementary DNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transductance Regulator
Ci	Curie
Chr.	Chromosom
C _{max}	Maximum der Plasmakonzentration
Cl	Clearance
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEAS	Dehydroepiandrostronsulfat
DMP	Demethylphalloin
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DSS	Dextran-Natriumsulfat
dpm	disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
E ₁ S	Estron-3-sulfat
GABA	Gammaaminobuttersäure
GSH	Gluthation
ISC	Ivermectin sensitiven Collies
IVC	isolated ventilated cages (isoliert belüftete Käfige)
IVM	Ivermectin
KG	Körpergewicht
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
MDR	Multidrug-resistance
MDR1	Multidrug-resistance Protein 1 (P-Glykoprotein)
ML	Makrozyklische Laktone
MRP	Multidrug-resistance related protein
MRP2	Multidrug resistance-associated Protein
MRT	Mean Residence Time
OAT	Organic Anion Transporters
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptides
OCT	Organic Cation Transporters
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	real-time PCR
SLC	Solute Carrier
SPF	Spezifiziert-Pathogen-Frei
T _{max}	Zeitpunkt des Spitzenspiegels der Plasmakonzentration

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1: Übersicht über Membrantransportsysteme in biologischen Membranen	15
Abb. 1.2: Membrantopologie von ABCB1 und ABCG2	17
Abb. 1.3. Mechanismus der Arzneistoffelimination in der Leber	29
Abb. 1.4: Expression von Arzneistofftransporter in der Leber bei Maus und Ratte	30
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Expression von Arzneistofftransportern im proximalen Tubulus der Niere von Ratte und Maus	32
Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Expression von Membrantransportern in der Bürstensaummembran des Dünndarms bei Maus und Ratte	33
Abb. 1.7: Lokalisation wichtiger Transportsysteme in den Endothelzellen der Gefäßkapillaren im Gehirn bei der FVB-Maus	37
Abb. 1.8: Unterschiede in der chemischen Struktur sowie Pharmakokinetik zwischen Ouabain und Digoxin beim Mensch	40
Abb. 1.9: Strukturformel von Ivermectin und Selamectin	43
Abb. 3.1: <i>In situ</i> Galleausscheidung bei der Maus	50
Abb. 4.1: Kontinuierlicher Gallefluss über die Gallenblasenfistel bei der Maus	61
Abb. 4.2: Kontinuierlicher und kumulativer Gallefluss bei Ratten über die Gallengangfistel	62
Abb. 4.3: Gallefluss über die Gallenblasenfistel nach Applikation von [³ H]Taurocholat	63
Abb. 4.4. Kumulative Galleausscheidung von [³ H]Taurocholat bei der Maus	63
Abb. 4.5: Kumulativer Gallefluss über 90 min nach eine intravenöse Applikation [³ H]DHAES	64
Abb. 4.6: Galleausscheidung von [³ H]DHEAS nach intravenöser Applikation über 90 min	65
Abb. 4.7: Relative Expression der verschiedenen Transporter in der Leber bei <i>mdr1a,b</i> (-/-), <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout- und FVB Wildtyp-Mäusen	67
Abb. 4.8: Relative Expression der verschiedenen Transporter in den Nieren bei <i>mdr1a,b</i> (-/-), <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout- und FVB Wildtyp-Mäusen	68
Abb. 4.9: Relative Expression der verschiedenen Transporter im Gehirn bei <i>mdr1a,b</i> (-/-), <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout- und FVB Wildtyp-Mäusen	68
Abb. 4.10: Relative Expression der verschiedenen Transporter in der Leber bei TR(-) und Wistar-Ratten	70
Abb. 4.11: Relative Expression der verschiedenen Transporter in den Nieren bei TR(-) und Wistar-Ratten	70
Abb. 4.12: Relative Expression der verschiedenen Transporter im Gehirn bei TR(-) und Wistar-Ratten	70
Abb. 4.13: Strukturformel von Phalloidin	73
Abb. 4.14: A: Gallefluss der Mausmodelle FVB-, <i>mdr1a,b</i> (-/-) und <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Mäuse ohne und nach i.v. Applikation von [³ H]-Demethylphalloin	74
Abb. 4.15. Galleausscheidung in fraktioneller und kumulativer Darstellung nach der i.v. Applikation von [³ H]-DMP im Mausmodell	75
Abb. 4.16: Galleausscheidung in fraktioneller und kumulativer Darstellung nach der i.v. Applikation von [³ H]-DMP im Rattenmodell	76
Abb. 4.17: Dünnschichtchromatographie der Galleproben von Wistar- und TR(-)-Ratten	

zum Zeitpunkt „60 min“	77
Abb. 4.18: Gewebekonzentrationen von [³ H]-DMP in der Leber und Niere bei den Mäuse- und Rattenstämmen	78
Abb. 4.19: Urinkonzentrationen von [³ H]-DMP 90 bzw. 120 min nach der i.v. Applikation von 0,03 mg/kg KG [³ H]-DMP bei den Mäuse- bzw. Rattenstämmen	79
Abb. 4.20: Plasmakonzentrationen von Ouabain bei TR(-) und Wistar-Ratten über 120 min	80
Abb. 4.21: Fraktionelle Darstellung der Galleausscheidung von Ouabain bei Ratten	82
Abb. 4.22: Kumulative Darstellung der Galleausscheidung von Ouabain bei Ratten	82
Abb. 4.23: Gewebekonzentration von [³ H]Ouabain bei den Ratten	83
Abb. 4.24: Galleausscheidung von [³ H]Ouabain über 60 min nach intravenöser Applikation von Ouabain bei der Maus	84
Abb. 4.25: Kumulative Ausscheidung von Ouabain in die Galle über 60 min im Mausmodell	85
Abb. 4.26: Gewebekonzentration von [³ H]Ouabain 60 min nach i.v. Applikation bei der Maus	86
Abb. 4.27: Dünnschichtchromatogramm der Galleproben von Wistar- und TR(-)-Ratten, FVB-Mäusen, <i>mdr1a,b</i> (-/-) und <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Mäusen zum Zeitpunkt 60 min der <i>in situ</i> Galleausscheidung nach i.v. Injektion von Ouabain	87
Abb. 4.28: Fraktionelle Darstellung der Galleausscheidung von Digoxin nach i.v. Applikation über 90 min im Mausmodell	89
Abb. 4.29: Kumulative Darstellung der Ausscheidung von Digoxin in die Galle über 90 min bei der Maus	89
Abb. 4.30: Digoxinkonzentration und Digoxin-Menge im Urin bei Mäusen	91
Abb. 4.31: Dünnschichtchromatogramm der Galleproben von FVB- und <i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Mäusen zum Zeitpunkt „60 min“ nach i.v. Injektion von Digoxin	91
Abb. 4.32: Digoxin-Gewebekonzentrationen 90 min nach i.v. Applikation bei der Maus	92
Abb. 4.33: Radiativ gemessen Galleausscheidung von Digoxin bei Wistar- und TR(-) Ratten nach i.v. Applikation über einen Zeitraum von 120 min	93
Abb. 4.34: Kumulative Ausscheidung von Digoxin in die Galle von Wistar-.Ratten in Vergleich zu TR(-) Ratten über einen Zeitraum von 120 min	93
Abb. 4.35: Dünnschicht Chromatographie der Galleproben von Wistar- und TR(-) Ratten	94
Abb. 4.36: Digoxin-Gewebekonzentrationen von Wistar- und TR(-) Ratten im Vergleich 120 min nach i.v. Applikation	95
Abb. 4.37: Kumulative Ausscheidung von [³ H]Ivermectin in die Galle über 120 min im Mausmodell	96
Abb. 4.38: Galleausscheidung von [³ H]Ivermectin nach intravenöser Applikation von 0,3 µg/kg KG über 120 min im Rattenmodell	97
Abb. 4.39: Kumulative Ausscheidung von [³ H]Ivermectin in die Galle über 120 min bei den Ratten	98
Abb. 4.40: Plasmakonzentrationen von Ivermectin bei den FVB-Wildtyp, <i>mdr1a,b</i> (-/-)	99
Abb. 4.41: Gehirnkonzentrationen von Ivermectin bei den FVB Wildtyp und <i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Mäusen nach i.v., oraler und Spot-on Applikation sowie bei <i>bcrp1</i> (-/-) und <i>mrp1</i> (-/-) Knockout-Mäusen nach oraler Applikation von Ivermectin	

in einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG	102
Abb. 4.42: Plasmakonzentrationen von Ivermectin bei den Wistar und TR(-) Ratten nach intravenöse Applikation von Ivermectin	103
Abb. 4.43: Plasmakonzentrationen von Selamectin bei den FVB Wildtyp, <i>mdr1a,b</i> (-/-) und <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Mäusen	104
Abb. 4.44: Gehirnkonzentrationen von Selamectin bei den FVB Wildtyp und <i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Mäusen nach i.v., oraler und Spot-on Applikation sowie <i>bcrp1</i> (-/-) und <i>mrp1</i> (-/-) Knockout-Mäusen nach oraler Applikation von Selamectin in einer Dosierung von 12 mg/kg KG	106
Abb. 4.45: Vergleich der Plasmakonzentrationen von Selamectin bei den Wistar und TR(-) Ratten nach intravenöse Applikation von Selamectin bei einer Dosierung von 12 mg/kg KG	107
Abb. 5.1. Korrelation zwischen Aufnahme von DNP-SG (2,4-dinitrophenyl-S-glutathion) in CMVs <i>in vitro</i> und biliäre Clearance von Temocaprilat <i>in vivo</i> [Ishizuka et al. 1999]	109
Abb. 5.2. Schematische Darstellung möglicher Kompensationsmechismen in der Leber bei Fehlen von Mrp2	111
Abb. 5.3. Schematische Darstellung möglicher Kompensationsroute des Phalloidins bei der TR(-) Ratte	118
Abb. 5.4. Schematische Darstellung des Carrier-vermittelte Transports von Ouabain in der Leber	120
Abb. 5.5. Abhängigkeit der Struktur von makrozyklischen Laktonen auf die Wirksamkeit gegen Flöhe (modifiziert nach Banks et al. 2000) und Würmer (modifiziert nach Michael et al. 2001)	131

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.1: Gene humaner ABC-Proteine mit bekannter oder vermuteter Funktion und ihre Expression	18
Tab. 1.2: Substrate von MDR1 (ABCB1) mit entsprechenden Referenzen	22
Tab. 1.3: Substrate von MRP2 (ABCC2) mit entsprechenden Referenzen	24
Tab. 1.4: Substrate von MRP3 (ABCC3) mit entsprechenden Referenzen	26
Tab. 1.5: Substrate von BCRP (ABCG2) mit entsprechenden Referenzen	27
Tab. 1.6: Vermehrte Gehirngängigkeit zahlreicher Arzneistoffe bei Fehlen von Mdr1 in der Blut-Hirn-Schranke	35
Tab. 2.1: Physiologische Parameter der Ratten	44
Tab. 2.2: Physiologische Parameter der Mäuse	46
Tab. 3.1: Radioaktiv markierte Substanzen	47
Tab. 3.2: TaqMan Assays von Maus und Ratte für die quantitative Real-Time PCR	58
Tab. 4.1: Pharmakokinetische Parameter von Ouabain im Plasma bei Ratten	81
Tab. 4.2: Pharmakokinetische Parameter der <i>in situ</i> Galleausscheidung von Ouabain bei Ratten	83
Tab. 4.3: Pharmakokinetische Parameter der <i>in situ</i> Galleausscheidung von Ouabain bei der Maus	86
Tab. 4.4: Pharmakokinetische Parameter der <i>in situ</i> Galleausscheidung von Digoxin bei Mäusen	90
Tab. 4.5: Pharmakokinetische Parameter der <i>in situ</i> Galleausscheidung von Digoxin bei Ratten	94
Tab. 4.6: Pharmakokinetische Parameter der <i>in situ</i> Galleausscheidungsdaten von [³ H]IVM im Maus- und Rattenmodell	98
Tab. 4.7: Pharmakokinetische Parameter der Plasmakinetikdaten von Ivermectin (0,2 mg/kg KG) bei FVB Wildtyp, <i>mdr1a,b</i> (-/-) und <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	100
Tab. 4.8: Pharmakokinetische Parameter der Plasmakinetikdaten von Ivermectin bei den Wistar und TR(-) Ratten	103
Tab. 4.9: Pharmakokinetische Daten von Selamectin (12 mg/kg KG) bei FVB-Wildtyp, <i>mdr1a,b</i> (-/-) und <i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	104
Tab. 4.10: Pharmakokinetische Daten von Selamectin bei den Wistar und TR(-) Ratten	107
Tab. 5 1: Genotypisierung von Transporter-defekten Tiermodellen: Übersicht über die Expression von verschiedenen Arzneistofftransportern	113
Tab. 5.2: Genotypisierung von <i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Mäusen: Expression von P450 Enzymen in der Leber	114
Tab. 5.3: Übersicht von Literaturangaben und eigene Daten der Gewebekonzentrationen von Ivermectin im Gehirn	127
Tab. 5.4: Transport von Selamectin und Ivermectin in Caco-2 Monolayers	129
Tab. 9.1: <i>In situ</i> Galleausscheidungsversuche und Genotypisierung bei Ratten	158
Tab. 9.2: <i>In situ</i> Galleausscheidungsversuche und Genotypisierung bei Mäusen	159
Tab. 9.3: Gewebekonzentration nach 90 min <i>in situ</i> Galleausscheidung	

von Digoxin bei Mäusen	163
Tab. 9.4: Gewebekonzentrationen nach 120 min i.v. Applikation von Digoxin bei Ratten	163
Tab. 9.5: Dünnschichtchromatographie der Galleproben von <i>in situ</i> Galleausscheidungs- Versuchen mit [³ H]Digoxin bei Ratten	164
Tab. 9.6: Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie der Gallenprobe von <i>in situ</i> Galleausscheidung von Digoxin bei den Wistar- und TR(-) Ratten	164
Tab. 9.7: Organverteilung von Ouabain bei Mäusen nach 60 min <i>in situ</i> Galleausscheidung bei den Mäusen	164
Tab. 9.8.: Gewebekonzentrationen von [³ H]Ouabain bei den FVB Wildtyp, <i>mdr1a,b (-/-), bcrp1 (-/-)</i> Knockout-Maus	165
Tab. 9.9: Gewebekonzentrationen von [³ H]Ouabain bei Wistar- und TR(-) Ratten nach 120 min <i>in situ</i> Galleausscheidung von Ouabain	165
Tab. 9.10: Gewebekonzentrationen von [³ H]-DMP bei den FVB Wildtyp, <i>mdr1a,b (-/-), bcrp1 (-/-)</i> Knockout-Maus und bei den Wistar und TR(-) Ratten	166
Tab. 9.11: Gewebekonzentrationen von Ivermectin nach 8 Stunden nach der i.v. Applikation von Ivermectin mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp und <i>mdr1a,b (-/-)</i> Knockout-Mäusen	166
Tab. 9.12: Gewebekonzentrationen von Ivermectin nach 24 Stunden nach oraler Applikation von Ivermectin mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp, <i>mdr1a,b (-/-)</i> und <i>bcrp1 (-/-)</i> Knockout-Mäusen	167
Tab. 9.13: Gewebekonzentrationen von Ivermectin nach 72 Stunden nach Spot-on Applikation von Ivermectin mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp und <i>mdr1a,b (-/-)</i> Knockout-Mäusen	167
Tab. 9.14: Gewebekonzentrationen von Ivermectin nach 8 Stunden nach intravenöse Applikation von Ivermectin mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG bei den Wistar und TR(-) Ratten	168
Tab. 9.15: Gewebekonzentrationen von Selamectin nach 8 Stunden nach intravenöse Applikation von Selamectin mit einer Dosierung von 12 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp und <i>mdr1a,b (-/-)</i> Knockout-Mäusen	168
Tab. 9.16: Gewebekonzentrationen von Selamectin nach 24 Stunden nach oraler Applikation von Selamectin mit einer Dosierung von 12 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp, <i>mdr1a,b (-/-)</i> und <i>bcrp1 (-/-)</i> Knockout-Mäusen	169
Tab. 9.17: Gewebekonzentrationen von Selamectin nach 72 Stunden nach Spot-on Applikation von Selamectin mit einer Dosierung von 12 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp und <i>mdr1a,b (-/-)</i> Knockout-Mäusen	169
Tab. 9.18: Gewebekonzentrationen von Selamectin nach 8 Stunden nach intravenöse Applikation von Selamectin mit einer Dosierung von 12 mg/kg KG bei den Wistar und TR(-) Ratten	170

Vorwort

Seit Jahrzehnten ist in der Humanmedizin bekannt, dass Arzneistoffe zum Teil erhebliche interindividuelle Unterschiede ihrer therapeutischen Wirkung und ihrer Nebenwirkungen aufweisen, die nicht mit bekannten Einflussfaktoren wie Alter, Körpermasse, Geschlecht, Nieren- oder Leberfunktion erklärt werden können. In der Veterinärmedizin muss man außer innerartlichen, rassedisponierten, individuellen Unterschieden bei Arzneistoffwirkungen auch erhebliche Speziesunterschiede berücksichtigen, welche durch Unterschiede im Arzneistofftransport, Stoffwechsel und der Rezeptorausstattung sowie durch anatomische Besonderheiten entstehen. Im Jahre 1959 wurde von Friedrich Vogel der Begriff Pharmakogenetik geprägt, um die Abhängigkeit zwischen genetischen Anlagen und Arzneimitteltherapie zu beschreiben [Motulsky 2002]. Die genetischen Ursachen für Unterschiede in Pharmakokinetik und Metabolismus von Arzneistoffen stellen ein wichtiges Anwendungsgebiet der Pharmakogenetik dar. So wurden in den letzten 40 Jahren zahlreiche Fälle dokumentiert, bei welchen genetische Unterschiede beim Metabolismus oder der Elimination von Arzneistoffen für unerwünschte Wirkungen verantwortlich gemacht wurden. Im Gegensatz dazu ist die Bedeutung von Arzneistofftransportern in der Pharmakogenetik ein relativ junges Forschungsgebiet [Evans WE, Relling 2004, Hunag 2007].

Ziel der Pharmakogenetik ist es, die individuelle Anwendung von Medikamenten zu verbessern und die Entwicklung von sicheren, zielgerichteten und individualisierten Medikamenten zu ermöglichen bzw. zu unterstützen. Die Notwendigkeit dafür ergibt sich aus der Tatsache, dass die meisten Medikamente nur eine Wirksamkeit zwischen 30% und 60% besitzen. Das heißt, dass ca. die Hälfte aller verabreichten Medikamente überflüssig oder gar gefährlich ist. In den USA werden jedes Jahr fast 2 Mio. unerwünschte Wirkungen von Medikamenten verzeichnet, die in über 100.000 Fällen tödlich verlaufen [Spear et al. 2001]. Durch pharmakogenetische Untersuchungen am Patienten können aber unerwünschte Nebeneffekte der Arzneitherapie vermindert sowie eine bessere Einschätzung der Verträglichkeit und Wirksamkeit von Medikamenten erreicht werden.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die Einflüsse genetischer Defekte in Arzneistofftransportern auf die Pharmakokinetik und Organverteilung von verschiedenen Gruppen von Medikamenten (Herzglykoside und makrozyklische Laktone) und Toxinen (Phalloidin) zu untersuchen.

1. Einleitung

1.1. Membrantransportsysteme für Arzneistoffe

Die Wirksamkeit vieler Arzneistoffe hängt von ihrer Fähigkeit ab, zelluläre Barrieren überwinden zu können, um an ihren Wirkort zu gelangen. Dies kann zum Einen mittels passiver physikalischer Diffusion geschehen. Dabei bestimmen die physikochemischen Eigenschaften wie Größe, Ladung, Lipidlöslichkeit und Konzentration des Moleküls über die Passage durch die Zellmembran. Den kleinen, lipophilen Pharmaka gelingt es, diese Membranbarriere schneller zu überwinden. Hydrophile, große und geladene Moleküle können dagegen nur mit Hilfe spezifischer Transportmechanismen in eine aus einer Zelle permeieren. Membrantransportsysteme lassen sich nach verschiedenen Gesichtspunkten in mehrere Gruppen einteilen (Abb. 1.1). Diese unterscheiden sich wesentlich in ihrer Energetisierung (aktiver oder passiver Transport), dem Transportmechanismus (Uniporter, Symport, Antiport) und dem Substratspektrum [Petzinger und Geyer 2006].

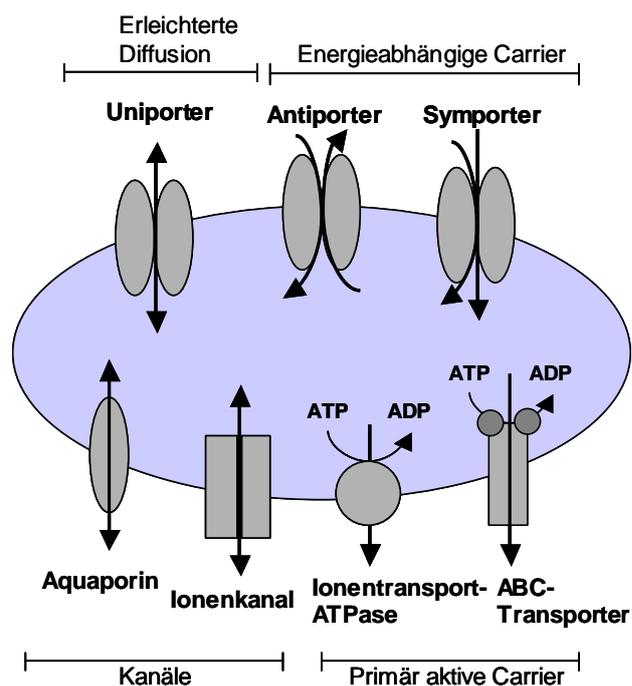


Abb. 1.1: Übersicht über Membrantransportsysteme in biologischen Membranen. Die Transportergruppen unterscheiden sich hinsichtlich Energetisierung, Transportmechanismus und Substratspektrum. Abbildung modifiziert nach Petzinger und Geyer 2006.

In der Form der Energetisierung lässt sich ein passiver Transport von einem aktiven oder energieabhängigen Transport abgrenzen, welcher auch gegen einen Konzentrationsgradienten arbeiten kann. Hierbei ist der Transport oftmals direkt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt und wird daher als primär aktiv bezeichnet. Zu den primär energieabhängigen Transportern

gehört die Familie der ABC Transporter (ATP-binding-cassette) [Borst und Elferink 2002] sowie die Ionen-transport-ATPasen [Lingrel und Kuntzweiler 1994, Blanco und Mercer 1998]. Weitere aktive Transportprozesse nutzen den durch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase aufgebauten physiologischen Na^+ -Gradienten für einen Na^+ /Substrat-Cotransport in die Zelle (Symporter). In analoger Weise können auch Protonen (H^+)-Gradienten zum Antrieb des Stofftransports verwendet werden. Hierbei spricht man von einem sekundär aktiven Transportprozess, da die ATP-Hydrolyse nur indirekt an den Transportprozess gekoppelt ist. Eine weitere Form der Energetisierung ergibt sich durch den Antiport mit einem intrazellulären Substrat, welches sein Konzentrationsgefälle zum Gegentransport mit einem zweiten Substrat nutzt.

1.2. Die Familie der ATP-binding cassette (ABC) Transporter

ABC-Transporter bilden eine der größten Proteinfamilien des Menschen mit derzeit 49 bekannten Mitgliedern [Huang 2007]. Mehr als 30 ABC-Gene sind bei Hefen und mehr als 70 bei Bakterien bekannt. Die Bezeichnung „ABC-Transporter“ wurde 1992 in einem Review von Chris Higgins eingeführt [Higgins 1992] und beschreibt die sogenannten *ATP-Binding-Cassette*-Transporter, eine sehr divergente Gruppe von Membrantransportern, welche die Hydrolyse von ATP energetisch an den Transport von Substanzen durch die biologische Membran koppeln. Mitglieder dieser Familie vermitteln eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen, darunter die Aufnahme von Nährstoffen, Signaltransduktion, Sekretion von Proteinen, Resistenz gegen Pharmaka und Antibiotika oder die Präsentation von Antigenen [Borst und Elferink 2002].

ABC-Transporter bestehen aus vier Teilen: Zwei Membrandomänen (MD) mit jeweils sechs transmembranären Segmenten, welche die Substratspezifität bestimmen, und zwei zytosolischen ATP-hydrolysierenden Domänen, welche als *ATP-binding cassette* (ABC)-Domänen oder Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD) bezeichnet werden [Schneider und Hunke 1998]. Die ABC-Domänen enthalten zwei Sequenzmotive (Walker A- und Walker B-Motiv), die maßgeblich an der Bindung und Hydrolyse von ATP beteiligt sind und welche durch etwa 90-120 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Ein weiteres Sequenzmotiv, welches stromaufwärts des Walker B-Motivs lokalisiert ist, ist hoch konserviert zwischen allen ABC-Proteinen und wird daher als ABC-Signatur {LSGGQ(Q/R/K)QR} bezeichnet [Dean et al. 2001, Borst und Elferink 2002]. Bei Eukaryoten werden diese Module meist auf einem einzigen Gen kodiert und bilden so eine zusammenhängende Peptidkette (z.B. bei MDR1, MRP1) (Abb. 1.2, A). Seltener sind sogenannte Halbtransporter, welche nur aus einer

Membrandomäne und einer Nukleotid-Bindungsdomäne bestehen (z.B. ABCB2, ABCB3, ABCG2) (Abb. 1.2, B) [Schneider und Hunke 1998]. Bakterielle ABC-Transporter werden dagegen immer auf mehr als einem Gen kodiert und setzen sich aus mehreren unterschiedlichen Domänen zu Homodimeren, Heterodimeren oder sogar Heterotetrameren zusammen [Putman et al. 2000, Dean et al. 2001, Borst und Elferink 2002, Solbach et al. 2006]. Wichtige Mitglieder der ABC-Familie sind die ehemals als *Multidrug Resistance* (MDR), *MDR Related Proteins* (MRP) oder *BCRP Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) bezeichneten Carrier, welche die Resistenz gegen Chemotherapeutika in Krebszellen vermitteln und u.a. an der Ausscheidung von konjugierten Endo- und Xenobiotika aus dem Organismus beteiligt sind [Cole und Deeley 1998]. Weitere Gene werden zwar phylogenetisch in die Familie der ABC-Transporter eingeordnet, kodieren aber *per definitionem* (siehe Tab. 1.1) nicht für Membrantransporter. So ist der *Cystic Fibrosis Transductance Regulator* CFTR (ABCC7) beispielsweise ein durch cAMP regulierter Chloridkanal, welcher bei Mutation (am häufigsten ist $\Delta F508$) das Krankheitsbild der Cystischen Fibrose (Mucoviscidose) verursacht. Auch die Sulfonylharnstoff-Rezeptoren SUR1 und SUR2 (ABCC8, ABCC9) gehören zwar in die Familie der ABC-Transporter, sind aber keine eigentlichen Transporter. Vielmehr bilden sie die ATP-sensitiven Untereinheiten komplexer K^+ -Kanäle im Herz und in den β -Zellen des Pankreas [Borst und Elferink 2002].

An den im Folgenden beschriebenen Prozessen des Arzneistofftransports in Leber, Niere und der Blut-Hirn-Schranke sind insbesondere die ABC-Transporter MDR1 (ABCB1), MRP2 (ABCC2), MRP3 (ABCC3) und BCRP (ABCG2) beteiligt. Deshalb sollen nur diese hier besprochen werden.

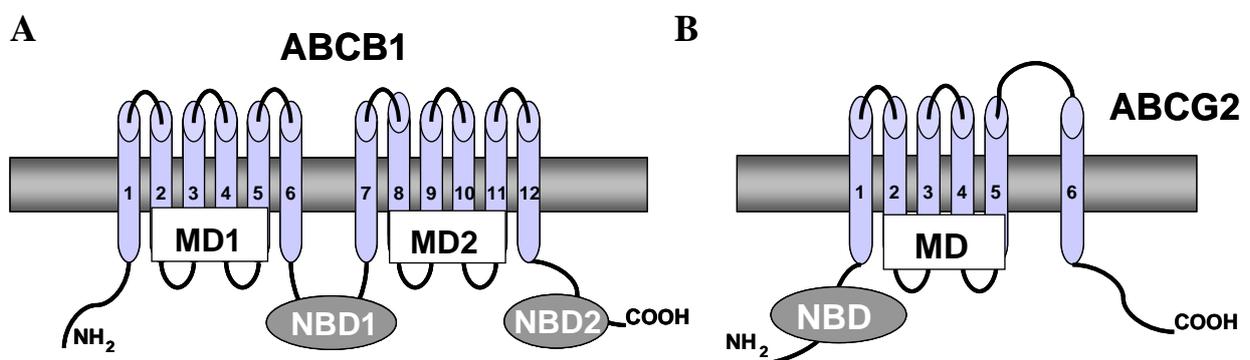


Abb. 1.2: Membrantopologie von ABCB1 (A) und ABCG2 (B). ABCB1 besteht aus zwei Membrandomänen (MD) und zwei Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD). Der Halbtransporter ABCG2 besteht dagegen aus nur einer MD und einer NBD, welche sich zu einem Dimer zusammenlagern.

Tab. 1.1: Gene humaner ABC-Proteine mit bekannter oder vermuteter Funktion und ihre Expression. Auf Grundlage phylogenetischer Untersuchungen werden sieben Subfamilien unterschieden, welche mit ABCA bis ABCG bezeichnet werden [Dean et al. 2001].

Sub-familie	Symbol	Name (alt)	Funktion	Expression	Literatur	
A	ABCA1	ABC1	Efflux von Cholesterin in HDL, Lipid-Transport zwischen innerer und äußerer Membran	Im ganzen Organismus: Makrophagen, Golgi, Lysosomen	Lawn et al. 1999, Orsó et al. 2000	
	ABCA2	ABC2	Efflux von Arzneistoffen (Multidrug-Resistenz) und Lipid-Metabolismus	Gehirn, Niere, Lunge, Herz	Vulevic et al. 2001, Kaminski et al. 2001	
	ABCA3	ANC3, ABCC	Sekretion von Surfactant	Pneumozyten (alveolar Typ II)	Yamano et al. 2001	
	ABCA4	ABCR	Efflux von N-Retinyldiene-PE	Retina	Allikmets et al. 1997a, Allikmets et al. 1997	
	ABCA8	ABCA8	Transport von lipophilen Arzneistoffen und organische Anionen	Leber, Herz, Muskel und Niere (nur bei Mäusen), Eierstock (nur beim Menschen)	Broccardo et al. 1999, Tsuruoka et al. 2002, Wakaumi et al. 2005	
	ABCA12	ABCA12	Lipid-Transport in Keratinozyten	Plazenta, Hoden, Haut und Gehirn	Annilo et al. 2002	
	B	ABCB1	PGY1, MDR1	Efflux von Arzneistoffen (Multidrug-Resistenz)	Leber (kanalikuläre Hepatozytenmembran), Nierentubulus und Dünndarm (apikale Bürstensaummembran), Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (luminale Membran), Plazenta (apikal in Synzytiotrophoblasten), Magen, Eierstock, Lunge, Prostata, Milz, Herz, Choroid Plexus, Hoden, Lymphozyten	Cordon-Cardo et al. 1989, Fojo et al. 1987a, Thiebaut et al. 1987, Merkel et al. 1989, Fojo et al. 1987b, Gatmaitan und Arias 1993, Meissner et al. 2002, Lazarowski et al. 2005, Atkinson et al. 2003, Rao et al. 1999
		ABCB2	TAP1	Peptid-Transport, Antigen-Präsentation	Zellen des Immunsystems, bzw. dendritischen Zellen und Lymphozyten	Sootornmalai et al. 2006, Melaine et al. 2002 Jackson et al. 1993
		ABCB3	TAP2	Peptid-Transport, Antigen-Präsentation	Zellen des Immunsystems, bzw. dendritischen Zellen und Lymphozyten	Pamer and Cresswell 1998, Abele and Tampé 1999, Hewitt and Lehner 2003
		ABCB4	PGY3	Transport von Phosphatidylcholin	Leber, Herz, Muskel, B-Zellen	Smit et al. 1993, Van Helvoort et al. 1996
ABCB6		MTABC3	Transport von Eisen	Mitochondrien	Allikmets et al. 1999, Mitsuhashi et al. 2000	
ABCB7		ABC7	Transport von Fe/S-Clustern	Leber, Herz, Gehirn, Mitochondrien	Savary et al. 1997, Kispal et al. 1997	
ABCB11		SPGP, BSEP	Efflux von Gallensäuren	Leber (kanalikulär), erstes Schwangerschaftstrimester in Plazenta	Gerloff et al. 1998, Meier und Stieger 2002, Micheline et al. 2002, Patel et al. 2003	

C	ABCC1	MRP1	Efflux von Arzneistoffen (Multidrug-Resistenz)	Breite Gewebeverteilung (basolaterale Membran und Endosomen), hoch exprimiert in Lunge (Bronchialepithel) und Hoden (haploide Spermatoiden), Muskel, Herz, Plazenta, Gefäßendothelien im Gehirn basolateral (Maus) und apikal (Mensch), Choroid Plexus. Stärkste Expression in Eierstöcken und Plazenta.	Cole et al. 1992, Flens et al. 1996, St-Pierre et al. 2000, Soontormmalai et al. 2006, Nies et al. 2004, Maher et al. 2005
	ABCC2	MRP2	Efflux von organischen Anionen insbesondere Arzneistoffkonjugaten	Leber (kanalikuläre Hepatozytenmembran), Duodenum, Jejunum und Niere (apikale Membran), Gehirn (apikal in Endothelzellen bei Mensch und intrazellulär bei Maus), Plazenta (apikal in Synzytiotrophoblasten), Choroid Plexus. Am stärksten exprimiert in Darm, Leber und Niere.	Paulusma et al. 1996/1999, Evers et al. 1998, Fromm et al. 2000, Kertenbeck et al. 1996, Kawabe et al. 1999, Schaub et al. 1997 und 1999, Nies et al. 2004, Soontormmalai et al. 2006, St-Pierre et al. 2000, Maher et al. 2005
	ABCC3	MRP3	Efflux von Arzneistoffen (Multidrug-Resistenz)	Niere, Darm, Gallengang, Leber (basolaterale Membran), Nebennierenrinde, Pankreas, Prostata, Plazenta, Choroid Plexus. Am stärksten exprimiert im Dickdarm.	Kool et al. 1997, Belinsky et al. 1998, Kuichi et al. 1998, König et al. 1999, Scheffer et al. 2002, Rost et al. 2002, St-Pierre et al. 2000, Soontormmalai et al. 2006, Maher et al. 2005
	ABCC4	MRP4	Transport von Nukleosiden	Prostata, Leber, Niere (apikal), Dünndarm, Lunge, Gallenblase, Gehirn. Am stärksten exprimiert in der Niere.	Lee et al. 2000, Kool et al. 1997, Taipalensuu et al. 2001, van Aubele et al. 2002, Zhang et al. 2000, Nies et al. 2004, Maher et al. 2005
	ABCC5	MRP5	Transport von Nukleosiden	Dickdarm, Leber, Niere, Muskel und Gehirn (apikal). Am stärksten exprimiert im Gehirn.	Kool et al. 1997, McAleer et al. 1999, Zhang et al. 2000, Nies et al. 2004, Soontormmalai et al. 2006, Maher et al. 2005
	ABCC6	MRP6	Transport von natürlichen Zytotoxinen, Arzneistofftransport	Dünn- und Dickdarm, Leber, Speicheldrüse, Gehirn. Am stärksten exprimiert in der Leber.	Kool et al. 1997, Scheffer et al. 2002, Zhang et al. 2000, Maher et al. 2005
	ABCC7	CFTR	Chlorid-Kanal	Leber, Niere, Cholangiozyten, Darm, Pankreas, Lunge	Treize and Buchwald 1991, Crawford et al. 1991, Engelhardt et al. 1992
	ABCC8	SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor	Pankreas, Herz	Shi et al. 2005, Morrissey et al. 2005
	ABCC9	SUR2	Kalium-Kanal Regulator	Herz, Muskel	Chutkow et al. 1996, Morrissey et al. 2005
	ABCD1	ALD	Regulation des Fettsäuretransports	Peroxisomen	Mosser et al. 1993
G	ABCG1	ABC8	Cholesterintransport	Makrophagen, Hepatozyten, Darmmucosazellen	Dean et al. 2001, Schmitz et al. 2001
	ABCG2	ABCP, BCRP, MXR	Efflux von Toxinen (Multidrug-Resistenz)	Darm (apikal in den Epithelzellen), Leber (in der kanalikulären Membran), Plazenta, Brustdrüse; Endothelzellen im Hoden (apikal), proximaler Tubulus der Nieren (apikal) nur bei Nagern, Herz	Doyle et al. 1998, Allikmets et al. 1998, Maliepaard et al. 2001, van Herwaarden et al. 2003, Bart et al. 2004, Maliepaard et al. 2001, Cooray et al. 2002, Meissner et al. 2006
	ABCG5	White3	Transport von Sterolen	Leber, Darm	Berge et al. 2000, Lee et al. 2001
	ABCG8		Transport von Sterolen	Leber, Darm	Berge et al. 2000, Lee et al. 2001

1.2.1. ABC-Transporter im Arzneistofftransport

Seit dem erstmaligen Gebrauch von Nitrogen Mustard (sog. „Senfgas“, auch Mechlorethamin oder Mustargen) zur Behandlung bösartiger Tumore Mitte der vierziger Jahre [Rhoads et al. 1946], konnten zahlreiche andere chemotherapeutische Wirkstoffe Einzug in die klinische Anwendung finden. Wenn allerdings eukaryotische Zellen der Wirkung zytotoxischer Substanzen ausgesetzt sind, kann es durch eine Verminderung der zellulären Aufnahme, eine erhöhte Detoxifikation oder eine vermehrte Exkretion dieser Substanzen zu vielschichtigen Resistenzphänomenen kommen. Sehr häufig sind an diesem Prozess Effluxtransporter beteiligt, welche nicht nur die Resistenz gegen die ursprüngliche Substanz, sondern eine Resistenz gegen eine große Vielzahl strukturell unterschiedlicher Substanzen vermitteln. Für dieses Phänomen wurde der Begriff der *Multi-Drug-Resistance* (MDR) geprägt. MDR-Transporter werden außer in Krebszellen, wo sie die Therapierbarkeit mit verschiedenen Chemotherapeutika erheblich einschränken, auch in Bakterien exprimiert, wo sie die Resistenz gegen eine Vielzahl von Antibiotika vermitteln.

Auf der Suche nach Proteinen, welche diese Resistenzphänomene in humanen Krebszelllinien vermitteln, wurde bereits Mitte der 70er Jahre MDR1 (ABCB1) als erster humaner ABC-Transporter isoliert [Juliano und Ling 1976]. MDR1 vermittelt eine Resistenz gegenüber großen amphipathischen Molekülen wie Taxanen, Anthracyclinen, Vincaalkaloiden, Podophyllotoxinen oder Actinomycinen [Ambudkar et al. 1999]. Mit der Expression von MDR1 konnte die *Multi-Drug-Resistance* zahlreicher Krebszelllinien erklärt werden. Allerdings zeigten auch einige Zelllinien eine Resistenz, obwohl hier die Expression von MDR1 nicht nachgewiesen werden konnte. Dies führte zu der Hypothese, dass an diesen Resistenzen Effluxtransporter ungleich MDR1 beteiligt sind. Tatsächlich wurden in den Folgejahren mit MRP1 (ABCC1) und BCRP (ABCG2) zwei weitere ABC-Transporter identifiziert, welche ebenfalls eine *Multi-Drug-Resistance* vermitteln können [Allen et al. 1999, Dean et al. 2001].

1.2.2. MDR1 (ABCB1), ein Multidrug Transporter

ABCB1 ist das zuerst entdeckte und bisher am besten charakterisierte Mitglied der ABCB Subfamilie. Es ist besser bekannt als MDR1. Das Genprodukt wurde als P-Glycoprotein (Pgp) bezeichnet. MDR1 codiert für einen ABC-Transporter der typischen MD-NBD-MD-NBD Struktur. Das Substratspektrum von MDR1 ist sehr breit. Es beinhaltet vor allem große hydrophobe oder amphipathische Moleküle, welche neutral oder schwach basisch sind [Bain et

al. 1997, Seelig 1998, Ambudkar et al. 1999]. Zu den Substraten zählen neben den bereits erwähnten Zytostatika auch Lipide, Steroide, Peptide und zahlreiche Xenobiotika [Ambudkar et al. 1999, Gottesman et al. 2002]. Da außer endogenen Steroiden bisher kein weiteres physiologisches Substrat identifiziert werden konnte, wird heute generell akzeptiert, dass die Hauptfunktion von MDR1 im Schutz des Organismus vor amphipathischen xenotoxischen Verbindungen liegt: Im Darm verhindert MDR1 den Eintritt der Toxine in den Organismus; in der Blut-Hirn-Schranke, den Trophoblasten der Plazenta und den Testes schützt es wichtige Organe und in der Niere und Leber vermittelt es die Exkretion seiner Substrate aus dem Organismus (Tab. 1.1). Eine weitere wichtige Schutzfunktion übernimmt MDR1 in hämatopoetischen Stammzellen. Hier ist Mdr1 hoch exprimiert und schützt auch diese Zellen vor dem Eindringen toxischer und kanzerogener Verbindungen [Chaudhary und Roninson 1991, Schinkel et al. 1997].

Die Identifizierung von MDR1-Substraten ist methodisch schwierig und erfolgte hauptsächlich mit Hilfe transfizierter Zellen im *transwell*-Verfahren und an Vesikelpräparationen transfizierter Zellen (inside-out Vesikel). Erst die Generierung der transgenen *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus brachte einen Durchbruch. Sie erlaubt eine funktionelle Untersuchung von Mdr1 *in vivo* im Vergleich zwischen Knockout-Maus und Wildtyp-Maus [Schinkel et al. 1994, Schinkel et al. 1997]. Im Gegensatz zum humanen MDR1 hat die Maus zwei homologe Gene, Mdr1a (früher auch Mdr3 genannt) und Mdr1b (früher auch Mdr1 genannt), welche gemeinsam die Funktion des humanen MDR1 erfüllen. Da Mdr1a im Darm und an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert wird, wurde die *mdr1a* (-/-) Maus insbesondere genutzt, die Rolle von Mdr1 bei der enteralen Absorption und dem Übertritt von Arzneistoffen in das Gehirn zu untersuchen. Die *mdr1b* (-/-) Maus ist bis heute nur wenig charakterisiert, da bald nach ihrer Generierung die *mdr1a,b* (-/-) Doppelknockout-Maus verfügbar war [Wijnbolds et al. 2000, Johnson et al. 2001]. Die *mdr1* Knockout-Mäuse zeigen kaum phänotypische Auffälligkeiten. Sie sind vital und fertil, solange sie nicht mit Arzneistoffen behandelt werden. Jedoch besitzen sie eine hohe Empfindlichkeit gegenüber neurotoxischen Verbindungen wie beispielsweise Ivermectin [Schinkel et al. 1994, Schinkel et al. 1997], was die wichtige Schutzfunktion des MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke deutlich macht. Entgegen der allgemeinen Annahme gibt es derzeit keinerlei Hinweise auf eine kompensatorische Hochregulation anderer Transportergene in den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen. Allerdings wurden bisher auch nur wenige Gene untersucht [Borst und Elferink 2002].

Während beim Menschen kein MDR1-Nullallel bekannt ist, kommt bei bestimmten Hunderassen ein natürlicher Gendefekt vor. Dieser Defekt stellt eine 4-Basenpaar-

Deletion dar und führt bereits bei Aminosäure 91 zum Kettenabbruch durch ein vorzeitiges Stop-Codon [Mealey et al. 2001, Roulet et al. 2003, Geyer et al. 2005a]. Die betroffenen Hunde reagieren, wie die *mdr1a(-/-)* Knockout-Maus, mit starken neurotoxischen Symptomen auf die Therapie mit Ivermectin, wobei es sogar zu Todesfällen kommen kann. Folgende Hunderassen sind mit abnehmender Häufigkeit von diesem MDR1-Gendefekt betroffen: Collie, Shetland Sheepdog, Australian Shepherd, Longhaired Whippet, Weißer Schweizer Schäferhund, Wäller, Silken Windhound, McNab, English Shepherd, Old English Sheepdog und Border Collie [Neff et al. 2004, Geyer et al. 2005, Geyer et al. 2007]. Neben Ivermectin sind auch zahlreiche weitere MDR1-Pharmaka problematisch in der Therapie betroffener Hunde im Hinblick auf unerwartete Nebenwirkungen. In der Literatur sind derartige Therapiezwischenfälle bisher für Ivermectin, Doramectin, Moxidectin, Milbemycin-oxim, Loperamid, Vincristin, Vinblastin, Digoxin und Doxorubicin beschrieben worden [Paul et al. 1987, Mealey et al. 2001, Mealey et al. 2003, Roulet et al. 2003, Geyer et al. 2005, Sartor et al. 2004, Geyer et al. 2007]. In Tabelle 1.2 ist eine Auswahl an MDR1-Substraten gezeigt.

Tab. 1.2. Substrate des MDR1 Transporters.

Amitriptylin [Uhr et al. 2000]
Aldosteron und Cortisol [Uhr et al. 2002, Doran et al. 2005]
Bisantren [Zhang et al. 1994]
Calcein-AM [Holló et al. 1994]
Celiprolol [Karlsson et al. 1993]
Cerivastatin [Kivistö et al. 2004]
Cimetidin und Ranitidin [Collett et al. 1999]
Colchicin, Erythromycin [Takano et al. 1998]
Corticosteron, Cortisol, Aldosteron, Progesteron [Uhr et al. 2000]
Cyclosporin A [Saeki et al. 1993]
Dactinomycin, Mitomycin C [Takara et al. 2002]
Dexamethason [Schinkel et al. 1996, Uhr et al. 2002]
Docetaxel [Doyle et al. 1998]
Doxorubicin und Daunorubicin [Kartner et al. 1983, Doyle et al. 1998]
Digoxin [Tanigawara et al. 1992, Mayer et al. 1997]
Domperidon, Phenytoin, Ondansetron, Chinidin [Schinkel et al. 1996, Kusuhara et al. 1997, Fromm et al. 1999]
Estron, Estriol, Ethinylestradiol [Kim et al. 2004]
Estradiol-17 β -glucuronid [Huang et al. 1998]
Etoposid, Teniposid [Gosland et al. 1989]
Grepafloxacin [Tamai et al. 2000]
Ivermectin, Loperamid, Morphin [Cavet et al. 1996, Schinkel et al. 1994/1995/1996]
Indinavir, Saquinavir [Kim et al. 1998, Jones et al. 2001]
Levofloxacin [Yamaguchi et al. 2000]
Mitoxantron [Peters und Roelofs 1992, Doyle et al. 1998]
Methotrexat [De Graaf et al. 1996, Bain et al. 1997, Seelig 1998, Ambudkar et al. 1999]
Nortriptylin, Paroxetin [Uhr et al. 2000]
Rhodamin-123 [Eytan et al. 1997]
Selamectin [Griffin et al. 2005]
Sparfloxacin [De Lange et al. 2000]
Verapamil und Nifedipin [Hunter et al. 1991]
Vincristin [Doyle et al. 1998]
Vinblastin [Horio et al. 1988]
Tacrolimus (FK506) [Saeki et al. 1993]
Talinol [Gramatte und Oertel 1999]
Taxane: Paclitaxel [Sparreboom et al. 1997]
Topotecan [Hendricks et al. 1992]

1.2.3. MRP2 und Arzneistofftransport

Die ABCC-Subfamilie enthält 13 ABC-Proteine mit einem großen Spektrum unterschiedlicher Funktionen. Neben dem Chloridkanal CFTR (ABCC7) und den Sulfonylharnstoff-Rezeptoren SUR1 (ABCC8) und SUR2 (ABCC9) wird der Großteil dieser Subfamilie durch die sog. *Multidrug Resistance (MDR)-Related Proteins* (MRPs) gebildet. Die MRP-Carrier MRP1-MRP3 (ABCC1-ABCC3) vermitteln alle einen unidirektionalen ATP-abhängigen Transport organischer Anionen. Sie unterscheiden sich aber in ihrer Substratspezifität, Gewebeverteilung und zellulären Lokalisation. MRP1, MRP2 und MRP3 werden wie die meisten anderen ABC-Transporter aus zwei Membrandomänen und zwei Nukleotid-Bindungsdomänen gebildet, besitzen aber im Gegensatz zu MDR1 eine zusätzliche N-terminale Membrandomäne mit fünf transmembranären Helices. Insgesamt bilden MRP1-3 also 17 Transmembransegmente. Damit sind MRP1 (1531 Aminosäuren), MRP2 (1545 Aminosäuren) und MRP3 (1527 Aminosäuren) am N-Terminus um etwa 250 Aminosäuren länger als MDR1 (1279 Aminosäuren) [König et al. 1999, Dean et al. 2001, Borst und Elferink 2002].

Das wichtigste MRP2-Expressionsorgan ist die Leber. Aufgrund der Expression in der kanalikulären Hepatozytenmembran ist MRP2 (*Multidrug resistance-associated Protein*) hauptverantwortlich für die Exkretion wasserlöslicher endogener und exogener Metabolite wie z.B. Bilirubin-Glucuronid, Arzneistoff-Glucuronide, -Sulfate und -Glutathionkonjugate in die Galle [Mayer et al. 1995, Buchler et al. 1996, Borst et al. 2000]. Weiterhin wird MRP2 an der apikalen Membranseite der Nierentubuli [Schaub et al. 1997], in der apikalen Membranseite von Enterozyten [Fromm et al. 2000b, Gotoh et al. 2000, Mottino et al. 2000], in der luminalen Membran der Gefäßendothelien im Gehirn [Potschka et al. 2003, Nies et al. 2004, Soontornmalai et al. 2006], in der Plazenta [St-Pierre et al. 2000] und im Plexus choroideus [Soontornmalai et al. 2006] exprimiert (siehe Tab. 1.1). Eine Auswahl von MRP2-Substraten ist in Tabelle 1.2 aufgelistet.

Die physiologisch und pharmakologisch wichtigen Funktionen des MRP2 wurden erstmals in mutierten Rattenstämmen erkannt, welche einen Defekt in der hepatobiliären Elimination von konjugiertem Bilirubin und organischen Anionen zeigten [Keppler und Kartenbeck 1996, Paulusma et al. 1996]. Sie wurden als Groningen-Yellow Ratten (GY) [Kuipers et al. 1988], Transportdefizient Ratten TR(-) [Jansen et al. 1985] und als Eisai Hyperbilirubinämie Ratten (EHBR) [Hosokawa et al. 1992] beschrieben. Während GY- und TR(-)-Ratte von der Wistar-Ratte abstammen, entstand die EHBR-Ratte aus einer Sprague-Dawley (SD) Linie. Die cDNA-Sequenzen für das intakte Mrp2 von Wistar- und SD-Ratte sind identisch (*GenBank L49379, D86086*). Die drei genannten Rattenstämme weisen eine Mutation im Mrp2 auf, welche

die Bildung eines funktionellen Proteins verhindert [Buchler et al. 1996, Paulusma et al. 1996]. Bei der EHBR-Ratte liegt der genetische Defekt in einem 1-Basenpaar-Austausch bei Nukleotid 2564 (G→A), welcher ein vorzeitiges Stop-Codon bei Aminosäure 855 erzeugt [Ito et al. 1997]. Bei der TR(-)-Ratte kommt es dagegen zu einer 1-Basenpaar-Deletion, welche ebenfalls zu einem vorzeitigen Stop-Codon bei Aminosäure 401 führt [Paulusma et al. 1996]. Durch das Fehlen von Mrp2 in der kanalikulären Hepatozytenmembran kommt es zu einem biliären Ausscheidungsdefekt von Bilirubin-konjugaten und damit zur Hyperbilirubinämie und zum Ikterus. Auch bei genetischen Untersuchungen von Human-Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom, welche ebenfalls eine Einschränkung der hepatobiliären Ausscheidung von organischen Anionen besitzen, wurden 13 verschiedene Mutationen im MRP2-Gen gefunden [Wada et al. 1998, Toh et al. 1999]. Diese führen ebenfalls zu einer Bilirubinämie, wobei Bilirubin in konjugierter Form im Blut zirkuliert. Wie bei der TR(-)- und EHBR-Ratte lässt sich auch bei Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom kein funktionelles MRP2-Protein in der kanalikulären Hepatozytenmembran nachweisen [Paulusma

et al. 1996, Kusuhara et al. 1998]. Weiterhin wurden bei beiden Ratten-Stämmen, EHBR und TR(-), wegen des Mrp2-Defektes auch ein verminderter Gallefluss gemessen [Paulusma et al. 1999, Lischka et al. 2003, Hirouchi et al. 2005, Gavrilova et al. 2007].

Tab. 1.3. Substrate des MRP2-Transporters.

Acetaminophen- und Diclofenac-Glucuronid [Xiong et al. 2002, Seitz et al. 1998]
Arsen-Glucuronide [Kala et al. 2000]
Anthracycline, Mitoxantron, MTX [Hooijberg et al. 1999, Cui et al. 1999]
Benzo[a]pyren-Glucuronid [Srivastava et al. 2002]
Bilirubin-Glucuronid [Kamisako et al. 1999],
BQ-123 [Shin et al. 1997]
BQ-485 und BQ-518 [Akhteruzzaman et al. 1999]
BSP [Cui et al. 2001]
BSP-SG, LTC ₄ [Ito et al. 1997, Cui et al. 1999]
CDFDA [Zamek-Gliszczynski et al. 2002]
Cholecystokinineptid (CCK-8) [Letschert et al. 2005]
Cisplatin [Cui et al. 1999]
CPT11 (Irinotecan) [Horikawa et al. 2002]
Chlorambucil, Cyclophosphamid [Smitherman et al. 2004]
E ₁ S [Kopplow et al. 2005]
DHEAS [Spears et al. 2005]
DNP-SG [Ito et al. 1997, Evers et al. 1998]
DPDPE [Hoffmaster et al. 2004]
Doxorubicin [Cui et al. 1999]
Flavopiridol [Jäger et al. 2003]
E ₂ 17βG, Grepafloxacin-Glucuronid [Sasabe et al. 1998]
E3040-Glucuronid [Niinuma et al. 1997]
Etoposid [Chen et al. 1999]
Genipin [Shoda et al. 2004]
Glucuronosyl-Nafenopin [Jedlitschky et al. 1994]
Glycyrrhizin, SN38-Glucuronid [Chu et al. 1997]
Monogluthathionyl-Chlorambucil [Smitherman et al. 2004]
Ochratoxin A [Leier et al. 2000]
PhIP [Dietrich et al. 2001]
PEITC [Ji und Morris 2005]
Pravastatin [Yamazaki et al. 1997, Kivistö et al. 2005]
Probenecid, Indomethacin [Payen et al. 2000]
SN38 [Chu et al. 1997]
Temocaprilat [Ishizuka et al. 1997] TLC-sulfat, GLC-3-sulfat, TCDC-3-sulfat [Akita et al. 2001] Vinblastin [Evers et al. 1998] Vincaalkaloide (Vincristin [Cui et al. 1999]

Abkürzungen Tab. 1.3: BSP, Bromsulphthalein; MTX, Methotrexat; LTC₄, Leukotrien C₄; DNP-SG, S-Dinitrophenyl-Glutathion; E₂17βG, Estradiol-17β-glucuronid; E₁S, Estron-3-sulfat; E3040, 6-Hydroxy-5,7-dimethyl-2-(Methylamino)-4-(3-Pyridylmethyl)benzothiazol; TLC, Tauroolithocholat; GLC, Glycolithocholat; TCDC, Taurochenodeoxychololat; TC, Taurochololat; GC, Glyocholat; SLTC, Sulfolithotaurochololat; DHEAS, Dehydroepiandrosteronsulfat; DPDPE, Opioidpeptid [D-Penicillamin^{2,5}]enkephalin; PhlP 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridin; PEITC, phenylethylisothiocyanat; CDFDA, 5(und 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein

Aber nicht nur diese Rattenstämme weisen Mrp2-Defekt auf. So wurde im Jahr 2006 von zwei Arbeitsgruppen die Generierung einer *mrp2* (-/-) Knockout-Maus beschrieben [Chu et al. 2006, Vlaming et al. 2006]. Im Unterschied zur Ratte wurde bei der *mrp2* (-/-) Knockout-Maus keine erhöhte Expression von Mrp3 in der Leber nachgewiesen, diese kompensiert statt dessen den fehlenden Mrp2 Transporter durch Hochregulation von Mrp4 in Leber und Niere. Wie die TR(-)-Ratte, so zeigt auch die *mrp2* (-/-) Knockout-Maus eine Verminderung des Galleflusses (~80% des Wildtyps) [Chu et al. 2006]. Die *mrp2* (-/-) Knockout-Maus, welche in der Arbeitsgruppe von A. Schinkel generiert wurde [Vlaming et al. 2006], weist kaum Unterschiede zu den TR(-) und EHBR Ratten. Hier wurde ebenfalls eine Hochregulation von Mrp3 in der Leber und von Mrp4 in den Nieren detektiert. Der Gallefluss ist auf etwa 50% des Wildtyps reduziert.

1.2.4. MRP3, ein ABC-Carrier der basolateralen Membran

Die Identifizierung von MRP3 (ABCC3) erfolgte über Sequenzanalysen von EST-Datenbanken, gefolgt von einer Klonierung der entsprechenden cDNA-Sequenz [Allikmets et al. 1996]. MRP3 zeigt eine ähnliche Gewebeverteilung wie MRP2 mit hoher Expression in Nebenniere, Niere, Darm, Pankreas, Plazenta, Prostata, Gallenblase und Leber (Tab. 1.1). Allerdings ist MRP3 in der Leber, im Darm und in der Niere, im Unterschied zu MRP2, in der basolateralen Membran lokalisiert [Kool et al. 1997, Scheffer et al. 2002]. Wie bereits schon erwähnt wurde, ergibt ein Vergleich der Mrp3-Expression in der Leber gesunder Ratten und von TR(-)/EHBR-Ratten bzw. cholestatischen Ratten eine sehr schwache Expression in der normalen Leber, aber eine deutliche Hochregulation der Mrp3-Expression bei Fehlen von Mrp2 [Ogawa et al. 2000, Soroka et al. 2001]. Eine Hochregulation der MRP3-Expression konnte auch bei Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom und anderen cholestatischen Erkrankungen gezeigt werden [Kiuchi et al. 1998, Stockel et al. 2000, Scheffer et al. 2002]. Da MRP3 neben anionischen Konjugaten auch Gallensäuren wie TC, GC und Gallensäure-Sulfate wie TCDC-Sulfat oder Sulfolithotaurochololat transportieren kann [Hirohashi et al. 2000b], übernimmt MRP3 in der Leber die Funktion eines „Überlauf-Systems“, welches den Export von Konjugaten und

Gallensäuren über die basolaterale Membran vermittelt, wenn die kanalikuläre Sekretion in die Galle über MRP2 beeinträchtigt ist [König et al. 1999, Elferink und Groen 2002]. Da MRP3 auch stark in der Nebennierenrinde exprimiert wird [Scheffer et al. 2002] und Steroidkonjugate wie z.B. E₂17βG zu den hochaffinen Substraten des MRP3 gehören [Hirohashi et al. 1999, Hirohashi et al. 2000, Zeng et al. 2000], hat MRP3 in der Nebenniere möglicherweise eine physiologische Funktion im Transport endogener Steroidkonjugate. In der Leber und im Darm spielt MRP3 sowohl in der enterohepatischen Zirkulation von Gallensäuren als auch in der Ausscheidung von endogenen und exogenen Komponenten nach Biotransformation eine Rolle [Borst et al. 2006]. Eine Studie zur Analyse der *in vivo* Funktion von Mrp3 an *mrp3* (-/-) Knockout-Mäusen ergab, dass die Aufgabe von Mrp3 unter cholestatischen Bedingungen darin liegt, eine alternative

Route für den Export von Gallensäuren und Glucuroniden in das Blut zu ermöglichen [Belinsky et al. 2005]. Neben Mrp3 wurde auch Mrp4 eine ähnliche Funktion zugesprochen [Belinsky et al. 2005]. Die *mrp3* (-/-) Knockout-Maus ist lebensfähig und fertil, besondere Krankheitssymptome wurden nicht beobachtet [Borst und Elferink 2002].

Tab. 1.4. Substrate des MRP3-Transporters.

Acetaminophen-Glucuronid [Xiong et al. 2002]
CDFDA [Zamek-Gliszczynski et al 2002]
Ethinylestradiol-Glucuronid [Zelcer et al. 2001]
E3040-Glucuronid [Hirohashi et al. 1999]
Etoposid-Glucuronid [Zelcer et al. 2001]
DPDPE [Hoffmaster et al. 2004],
Gallensäuren (TC, GC, SLTC), E ₂ 17βG, Bilirubin-Glucuronid, DNP-SG, LTC ₄ [Hirohashi et al. 1999/2000, Keppler und König 2000, Zelcer 2003/2006]
Gemfibrozil [Kim MS et al. 2003]
Hyocholate-Glucuronid. Hyodeoxycholate-Glucuronid [Zelcer et al. 2005]
Morphin-3-Glucuronid [Zelcer et al. 2005]
Pravastatin [Kivisto et al. 2005]
Teniposid und Cisplatin [Kool et al. 1999]
MTX, Vincristin und Etoposid [Zeng et al. 1999, Zelcer et al. 2001],
Teniposid [Zelcer et al. 2001]

Abkürzungen Tab. 1.4: MTX, Methotrexat; LTC₄, Leukotrien-C₄; DNP-SG, S-Dinitrophenyl-Glutathion; E₂17βG, Estradiol-17β-glucuronid; TLC, Tauroolithocholat; GLC, Glycolithocholat; TCDC, Taurochenodeoxycholat; TC, Taurocholat; GC, Glyocholat; SLTC, Sulfolithotauracholat; DPDPE, Opioidpeptid [D-Penicillamin^{2,5}]enkephalin; CDFDA, 5(und 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein

1.2.5. BCRP, ein Effluxtransporter für besondere Aufgaben

ABCG2 wurde parallel von drei Arbeitsgruppen kloniert: Doyle et al. benannten 1998 den in einer Brustkrebszelllinie (MCF7) hoch exprimierten Transporter zunächst *Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)*, während Allikmets et al. 1998 den Namen *ABCP* aufgrund der

hohen Expression des Transporters in der Plazenta vergaben und Miyake et al 1999 [de Bruin et al. 1999] ihn *Mitoxantrone-Resistance Protein (MXR)* aufgrund der hohen Expression in den Mitoxantron-resistenten Zellen. Neben Daunorubicin, Doxorubicin, Etoposid, Topotecan, Bisantren und Flavopiridol vermittelt ABCG2, im Unterschied zu MDR1 und MRP1, auch eine Resistenz gegenüber Mitoxantrone [Allen et al. 1999, Maliepaard et al. 1999, Maliepaard et al. 2001, Robey et al. 2001] (Tab. 1.5). BCRP ist ein Efflux-Transporter und spielt eine wichtige Rolle bei der Absorption von Arzneistoffen, Toxinen und Steroidhormonen (Tab. 1.5) aus dem Darm sowie bei deren Elimination über Leber und Niere. Darüberhinaus übernimmt BCRP auch eine Schutzfunktion in der Blut-Hirn-Schranke und in der Plazenta (Tab. 1.1). Außerdem wurde die Expression von BCRP in Stammzellen [Zhou et al. 2002] und in der Milchdrüse nachgewiesen [Jonker et al. 2005, Merino et al. 2005, Pulido et al. 2006]. In der Milchdrüse ist BCRP an der aktiven Exkretion von Xenotoxinen wie PhIP, Topotecan, Antibiotika und Benzimidazol beteiligt (Tab. 1.5).

Tab. 1.5. Substrate des BCRP-Transporters.

Aza-Anthracycline (BBR 3390) [Hazlehurst et al. 1999, Rabindran et al. 2000]
AZT, AZT 5'-monophosphate und Lamivudine (3TC) [Wang et al. 2003/2004]
9-Aminocamptothecin [Rajendra et al. 2003]
Benzimidazol (Albendazol, Fenbendazol) [Merino et al. 2005]
Bisantren [Litman et al. 2000]
Cisplatin und Paclitaxel [Allen und Schinkel 2002]
Daunorubicin, Doxorubicin [Allen et al. 1999, Litman et al. 2000, Robey et al. 2003]
Diflomotecan [Sparreboom et al. 2004]
DNP-SG [Chen et al. 2003], DHEAS [Susuki et al. 2003, Lee et al. 2005]
Etoposid [Nakagawa et al. 1992, Allen et al. 2003]
E ₂ 17βG [Chen et al. 2003, Susuki et al. 2003]
ErbB1 Tyrosinkinase-Inhibitor (CI1033) [Erlichman et al. 2001]
E ₁ S [Susuki et al. 2003, Imai et al. 2003]
Epirubicin [Brangi et al. 1999, Litman et al. 2000]
Flavopiridol [Maliepaard et al. 1999]
Genistein [Imai et al. 2004]
GV196771 [Polli et al. 2004]
Höchst 33342 [Scharenberg et al. 2002]
Idolocarbozole [Nakagawa et al. 2002]
Imatinibmesylat (STI571) [Burger et al. 2004, Breedveld et al. 2005]
Irinotecan [Rabindran et al. 1998, Maliepaard et al. 2001]
Mitoxantrone [Allen et al. 1999, Maliepaard et al. 1999, Maliepaard et al. 2001, Robey et al. 2001/2003, Litman et al. 2000]
MTX [Volk et al. 2003, Chen et al. 2003]
MTX-Glu ₂ und MTX-Glu ₃ [Chen et al. 2003, Volk 2003]
4-MUS, E3040S, TLC-S und E3040G [Susuki et al. 2003]
Nitrofurantoin [Merino et al. 2005]
Pantoprazol [Breedveld et al. 2004]
Pheophorbid α [Jonker et al. 2002, Robey et al. 2004]
PhIP [van Herwaarden et al. 2003]
Rhodamin 123, LysoTracker Green [Robey et al. 2001/2003]
Phosphatidylserin [Woehlecke et al. 2003]
Photoporphyrin IX [Jonker et al. 2002]
Pitavastatin [Hirano et al. 2005]
Prazosin [Litman et al. 2000]
Quercetin [Sesink et al. 2005]
SN 38 [Nakatomi et al. 2001]
Topotecan [Allen et al. 1999, Jonker et al. 2000, Litman et al. 2000]
Teniposid [Allen et al. 2003]

Abkürzungen Tab. 1.5: MTX, Methotrexat; DNP-SG, S-Dinitrophenyl-Glutathion; GSSG, Glutathion-Disulfid; E₂17βG, Estradiol-17β-glucuronid; E₁S, Estron-3-sulfat; E3040, 6-Hydroxy-5,7-dimethyl-2-(Methylamino)-4-(3-Pyridylmethyl)benzothiazol; DHEAS, Dehydroepiandrosteronsulfat; TLC, Tauroolithocholat; GLC, Glycolithocholat; PhIP, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridin.

BCRP transportiert organische Substrate wie hydrophobe, basische und anionische Stoffe, insbesondere Glucuronid-, Sulfat-, Glutathion-Konjugate von endogenen und exogenen Molekülen (Tab. 1.5). BCRP hat ein teilweise überlappendes Substratspektrum mit MRP2, MDR1 und MRP1. Als Beispiel kann man hier den Transport von Methotrexat, Doxorubicin und Topotecan nennen, welche auch von MRP2 und MDR1 transportiert werden. Die Forschung zur Funktion von BCRP wurde erst mit der Generierung der *bcrp1(-/-)* Knockout-Maus in der Arbeitsgruppe von A. Schinkel (Amsterdam) im Jahr 2002 ermöglicht. So konnte man die Veränderung in der Pharmakokinetik von BCRP-Substraten (z.B. PhIP, Pitavastatin, siehe Tab. 1.5) bei den Knockout-Mäusen verfolgen. In den letzten Jahren wurde aufgeklärt, dass BCRP für den Transport von Xenotoxinen sowie Antibiotika in die Milch verantwortlich ist [Merino et al. 2005].

1.3. Transportervermittelte hepatobiliäre Elimination von Arznei- und Fremdstoffen

Neue Erkenntnisse über Transportprozesse für Arzneistoffe sowohl in der Leber als auch in extrahepatischen Geweben haben die klassische Vorstellung über Arzneistoffmetabolismus und Arzneistoffelimination bedeutend verändert. Petzinger und Geyer präsentierten 2006 ein neues Konzept, nach welchem statt dem klassischen 2-Phasenmodell ein 5-phasiges Modell der hepatobiliären Arzneistoffelimination beschrieben wird. Dabei wurde „das alte Modell“, welches die Oxidation (Phase 1) und Konjugation (Phase 2) von Arzneistoffen beschreibt, durch die transportvermittelten Phasen 0 und 4 für Aufnahme und Exkretion von Arzneistoffen über die basolaterale und kanalikuläre Hepatozytenmembran sowie den intrazellulären Transport von Arzneistoffen (Phase 3) ergänzt (Abb. 1.3).

Die Aufnahme von Arzneistoffen (Phase 0) wird in der Leber vor allem durch die Mitglieder der OATP/Oatp-Familie vermittelt. Diese transportieren ein breites Spektrum strukturell verschiedenartiger Arzneistoffe wie z.B. Digoxin, aber auch endogene Verbindungen wie Gallensalze, Bilirubin, Hormone und Eikosanoide. Sie werden charakteristischerweise in der basolateralen Hepatozytenmembran exprimiert. In der hepatischen Expression der OATP-Carrier zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Mensch und Ratte. Während nämlich in der Leber der Ratte *Oatp1a1*, *Oatp1a4* und *Oatp1b2* [Hagenbuch und Meier 1996, Reichel et al. 1999, Cattori et al. 2000] exprimiert werden, sind dies beim Menschen OATP2B1, OATP1B1 und OATP1B3 [König et al. 2000, Kullak-Ublick et al. 2001, Sasaki et al. 2001]. Hierbei ist bemerkenswert, dass die Mitglieder der Subfamilie OATP1B/Oatp1b (OATP1B1, Oatp1b2, OATP1B3)

weitgehend leberspezifisch exprimiert werden. In der kanalikulären Hepatozytenmembran sind die ABC-Transporter MDR1, MRP2 und BCRP [Maliapaard et al. 2001, Sasaki et al. 2001, Borst und Elferink 2002] exprimiert. Diese Carrier übernehmen den Export von Arzneistoffen aus der Leber (Phase 4). Alle drei Efflux-Transporter zeigen ein sehr breites und teilweise überlappendes Substratspektrum und bilden durch die direkte Kopplung ihres Transportes an die ATP-Hydrolyse eine wichtige treibende Kraft für die transzellulären Exkretion von Arzneistoffen.

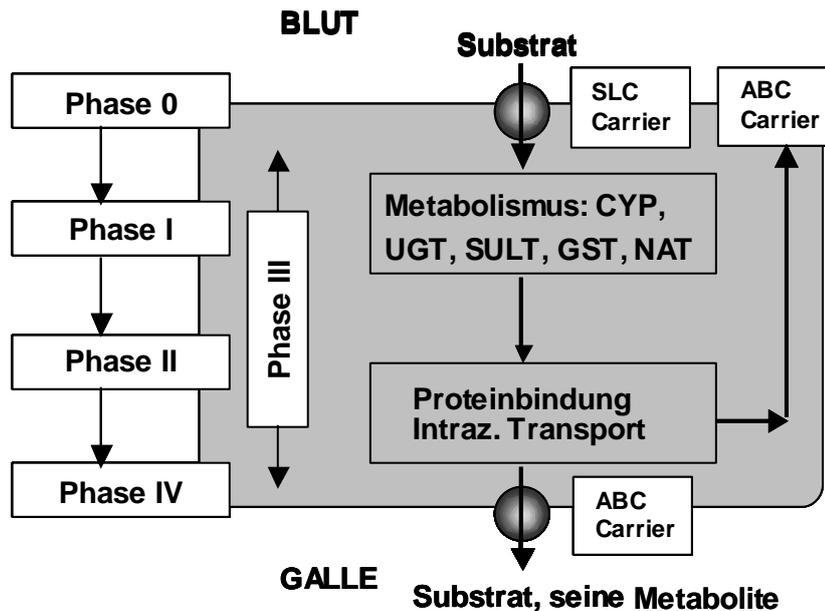


Abb. 1.3. Mechanismus der Arzneistoffelimination in der Leber. Pharmaka werden über die sinusoidale Membran der Hepatozyten über Transportsysteme und/oder durch passive physikalische Diffusion aufgenommen (Phase 0), dann intrazellulär durch Oxidation und Konjugationsprozesse metabolisiert (Phase 1 und 2) und weiter in die Galle ausgeschieden oder wieder zurück in der Blutbahn befördert (Phase 4). Die Phase 3 bezeichnet den intrazellulären Transport von Arzneistoffen und deren Metaboliten (modifiziert nach Petzinger und Geyer 2006).

Durch die Interaktionen verschiedener Pharmaka an derselben Substratbindungsstelle eines hepatischen Arzneistofftransporters kann es zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Transportaktivität und damit zu einer Beeinträchtigung der hepatobiliären Elimination kommen (*Drug-Drug-Interaktion*) [Eckhardt et al. 1996, Mizuno et al. 2003]. Dieser Prozess spielt auch eine Rolle in der Pharmakokinetik des Phalloidins, eines Giftes des Knollenblätterpilzes. Das zur Vergiftungstherapie eingesetzte Silymarin blockiert die Aufnahme von Phalloidin in Leberzellen und vermindert dadurch die Hepatotoxizität des Phalloidins [Petzinger 1994].

Genetische Defekte in einzelnen Lebertransportern können erhebliche Auswirkungen haben. So wird z.B. konjugiertes Bilirubin normalerweise über MRP2 an der kanalikulären Hepatozytenmembran in die Galle ausgeschieden [Kamisako et al. 2000]. Ist diese biliäre

Exkretion, wie bei der TR(-)- und EHBR-Ratte sowie bei Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom durch das Fehlen von MRP2 blockiert, werden die gebildeten Bilirubinkonjugate über das basolateral exprimierte MRP3 wieder zurück in die Blutzirkulation transportiert und bewirken damit eine ausgeprägte Hyperbilirubinämie konjugierten Bilirubins [Ogawa et al. 2000]. Doch nicht nur die genetischen Defekte im MRP2, sondern auch Interaktionen an den Transportsystemen in der basolateralen Hepatozytenmembran können eine Hyperbilirubinämie verursachen. In diesem Fall steigt die Konzentration von unkonjugiertem Bilirubin im Blut an. Eine derartige Interaktion ist beispielsweise für die Antibiotika Rifamycin SV und Rifampicin bekannt, welche potente Inhibitoren der hepatischen Aufnahmecarrier der OATP/Oatp-Familie wie Oatp1a1, Oatp1a4, OATP2B1, OATP1B1 und OATP1B3 darstellen. Neben dem Anstieg von Bilirubin im Blut kommt es dabei auch zu einer verminderten hepatobiliären Elimination anderer OATP-Substrate wie beispielsweise Bromosulfophtalein (BSP) [Fattinger et al. 2000, Vavricka et al. 2002].

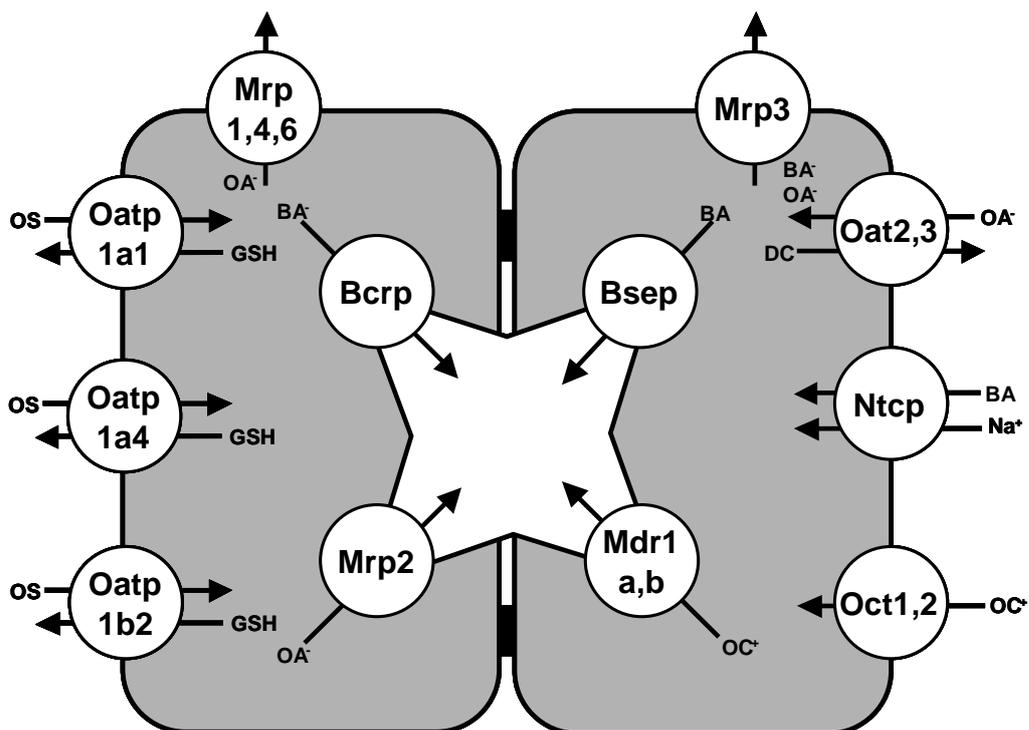


Abb. 1.4: Expression von Arzneistofftransporter in der Leber bei Maus und Ratte. Es sind zwei Hepatozyten dargestellt, welche ein Gallenkanälchen bilden. BA⁻ = Gallensäure, OA⁻ = organisches Anion, OC⁺ = organisches Kation, DC⁻ = Dicarboxylat, GSH = Glutathion, OS = organische Substrate. Modifiziert nach Shitara et al. 2005.

1.4. Arzneistofftransport in der Niere

An den Arzneistofftransportprozessen in der Niere sind ähnlich wie in der Leber zahlreiche Membrantransporter beteiligt. Diese gehören vor allem in die Gruppe der OAT-, OCT- und ABC-Transporter. Zahlreiche klinisch wichtige Arzneistoffe sind Substrate dieser Transporter. Zu diesen zählen Antibiotika, Chemotherapeutika, Diuretika, ACE-Inhibitoren und Zytostatika. Wie an der Leber kann es über *Arzneistoffinteraktionen* an den renalen Transportsystemen zu Veränderungen in der Pharmakokinetik, einer verminderten Elimination und erhöhten Toxizität einzelner Substanzen kommen.

Der erste Schritt in der renalen Sekretion von Arzneistoffen ist der selektive Transport über die basolaterale Membran der Epithelzellen im proximalen Tubulus. Dieser Transport wird vor allem durch zwei Mitglieder der Oat-Familie, Oat1 und Oat3, vermittelt, welche ein breites Substratspektrum zeigen und beispielweise lipophile organische Anionen, Steroidsulfate (E_1S), Methotrexat und Cimetidin transportieren [Cha et al. 2000/2001, Jung et al. 2001]. Beide Carrier konnten sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte in der basolateralen Membran lokalisiert werden [Hosoyamada et al. 1999, Tojo et al. 1999, Kojima et al. 2002]. Weitere Transporter der basolateralen Membran sind Oct1 und Oct2 [Gorboulev et al. 1997, Koepsell et al. 1999], die ebenfalls für die Aufnahme von bestimmten organischen Kationen verantwortlich sind. Auf der basolateralen Membran wird zusätzlich Oatp4c1 exprimiert [Mikkaichi et al. 2004]. Dieser Carrier transportiert das Herzglykosid Digoxin ($K_m = 7,8 \mu M$) und das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin ($K_m = 5,9 \mu M$).

Als Effluxsysteme in der luminalen Membran des proximalen Tubulus wurden MRP2, MRP4 und MDR1 sowie Bcrp (bei Nagern) identifiziert [Schaub et al. 1997, van Aubel et al. 2002, Thiebaut et al. 1987, Jonker et al. 2002]. Weiterhin kommen bei Nagern Oatp1a1 [Bergwerk et al. 1996], Oatp1a3 [Masuda et al. 1997, Masuda et al. 1999b], Oatp1a5 [Choudhuri et al. 2000] und Oatp1a6 [Masereeuw et al. 2005] in der apikalen Bürstensaummembran des proximalen Tubulus vor. Da der Transport dieser Carrier als bidirektional beschrieben wird, sind diese sowohl an Prozessen der apikalen Sekretion als auch der Reabsorption organischer Substanzen aus dem tubulären Lumen beteiligt. Obwohl MDR1 in der apikalen (luminalen) Membranen der proximalen Tubuli der Niere exprimiert wird, ist seine Rolle bei der renalen Clearance von Arznei- und Fremdstoffen nicht eindeutig geklärt. Eigentlich sollte MDR1 zur Exkretion von Substraten aus dem Blutplasma in den Urin beitragen. Die meisten pharmakologischen Untersuchungen an *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen ergaben jedoch keine eindeutigen Belege für diese Funktion. In einigen Studien [Mayer et al. 1996] führte die Abwesenheit von MDR1 sogar zu einer verstärkten renalen Exkretion und Clearance von Arzneistoffen, über dessen

Ursachen bisher nur spekuliert wird. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung dieser Frage notwendig.

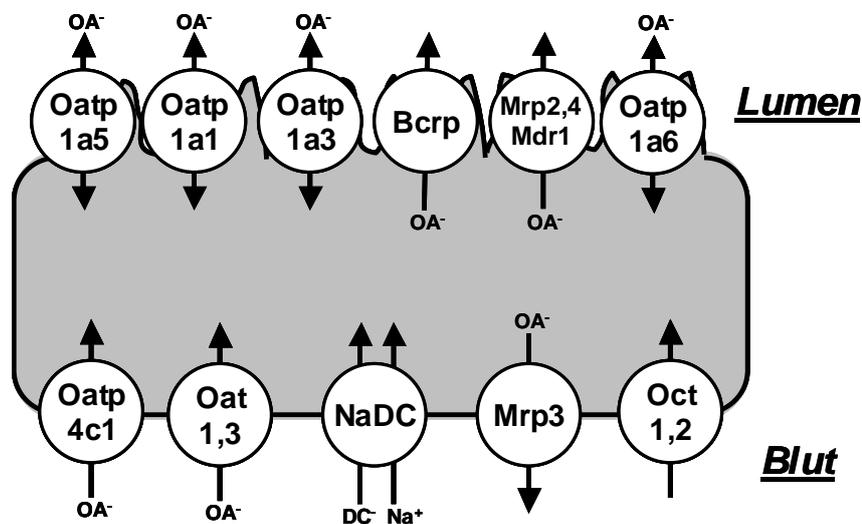


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Expression von Arzneistofftransportern im proximalen Tubulus der Niere von Ratte und Maus. OA⁻ = organisches Anion, DC⁻ = Dicarboxylat. Modifiziert nach Shitara et al. 2005

Im Unterschied zu MDR1, MRP2 und MRP1 konnte die Expression von BCRP auf mRNA Ebene nicht in der humanen Nieren detektiert werden [Allikmets et al. 1998, Doyle et al. 1998, Maliepaard et al. 2001]. Allerdings wurde eine starke Expression von Bcrp in den Nieren bei Maus und Ratte nachgewiesen. Bcrp hat hier vermutlich eine wichtige Rolle in der Urinexkretion von bestimmten Sulfatkonjugaten bei der Maus [Jonker et al. 2000, Mizuno et al. 2004, Shimano et al. 2003].

In den letzten Jahren wurde auch vermehrt die Rolle von MRP4 im Arzneistofftransport der Niere erforscht. So weisen aktuelle Arbeiten auf eine Bedeutung von MRP4 für die renale Sekretion von Antibiotika wie Cefazolin oder Cefprozim [Ci et al. 2007] aber auch von Diuretika wie Furosemid und Hydrochlorothiazid hin [Hasegawa et al. 2007].

1.5. Arzneistofftransporter im Darm

In den Epithelzellen der Darmschleimhaut sind verschiedene Carriersysteme gefunden worden, welche für eine effiziente Absorption von Nährstoffen, Vitaminen und einigen endogenen Verbindungen, aber auch von zahlreichen Arzneistoffen verantwortlich sind. Aus der Familie der OATP/Oatp-Carrier konnte bisher allerdings lediglich die Expression von Oatp1a5 in der apikalen Bürstensaummembran nachgewiesen werden [Walters et al. 2000]. Oatp1a5 vermittelt hier nicht nur die natriumunabhängige Resorption von Gallensäuren aus

dem Darmlumen, sondern auch den ersten Schritt der enteralen Absorption von Arzneistoffen wie BQ-123, DPDPE, Digoxin, Fexofenadin oder Rocuronium [Cattori et al. 2001]. Weiterhin werden die primär aktiven Effluxtransporter MDR1, MRP2 und BCRP in der apikalen Membran der Enterozyten exprimiert. Diese Carrier haben hier eine Bedeutung für die enterale Sekretion von Xenobiotika und begrenzen deren Absorption im Rahmen ihrer Substratspektren [Gotoh et al. 2000, Hirohashi et al. 2000, Taipalensuu et al. 2001, Wachter et al. 2001, Zhang und Benet 2001]. So korreliert beispielsweise die Expressionsrate von MDR1 im Darm mit der Bioverfügbarkeit von Digoxin nach oraler Applikation [Greiner et al. 1999]. Damit bestimmt MDR1 im Darmlumen entscheidend die Plasmakonzentration und die pharmakologische Wirksamkeit einer oralen Digoxingabe. Im Gegenzug kann durch den gezielten Einsatz von Inhibitoren die enterale Absorption einzelner Arzneistoffe deutlich verbessert werden. So wurde die enterale Bioverfügbarkeit von Topotecan, einem BCRP-Substrat, durch Kombination mit dem BCRP-Inhibitor GF120918 um das 6-fache bei *mdr1a,b* (-/-) Mäusen gesteigert werden. An diesen war der Effekt besonders stark, da Topotecan auch von MDR1 als Substrat erkannt wird [Jonker et al. 2000]. Da BCRP aber auch in der kanalikulären Hepatozytenmembran exprimiert wird [Maliapaard et al. 2001], ergibt sich aus der Hemmung von BCRP durch GF120918 nicht nur eine Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit wegen des Wegfalls von *Mdr1*, sondern auch eine Verminderung der hepatobiliären Elimination und damit eine Reduzierung der Plasmaclearance für Topotecan [Jonker et al. 2000].

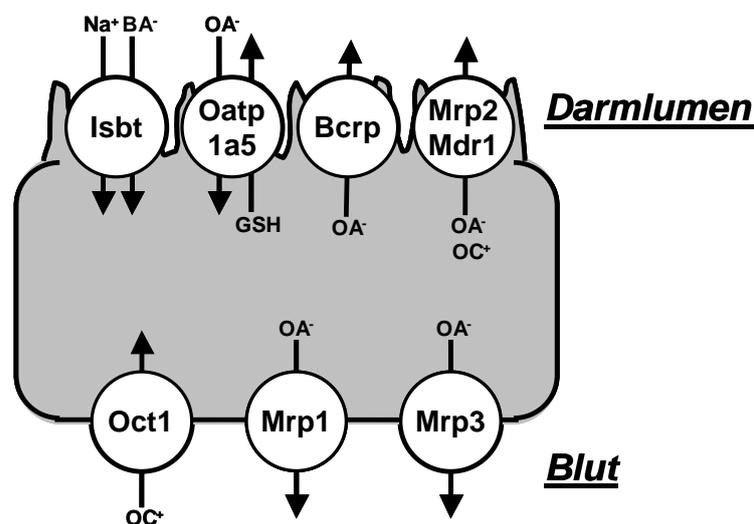


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Expression von Membrantransportern in der Bürstensaummembran des Dünndarms bei Maus und Ratte. BA^- = Gallensäure, OA^- = organisches Anion, OC^+ = organisches Kation.

Der MRP1 Effluxtransporter wird in der basolateralen Membran der Enterozyten von Dünndarm und Dickdarm exprimiert [Flens et al. 1996]. Bemerkenswert ist, dass bei *mdr1a* (-/-)

und *mrp1* (-/-) Knockout-Mäusen vermehrt das Auftreten entzündlicher Darmerkrankungen beobachtet wurden. Diese ließen sich durch Behandlung mit Antibiotika verhindern [Panwala et al. 1998]. Die *mrp1* (-/-) Knockout-Mäuse waren auch empfindlicher gegenüber einer Dextran-Natriumsulfat (DSS)-induzierten Kolitis als Wildtyp-Tiere. Als Ursache wurde vermutet, dass Mrp1 für die direkte Entgiftung von DSS und/oder oxidativen Metaboliten wichtig ist [ten Hove et al. 2002].

1.6. Arzneistofftransport an der Blut-Hirn-Schranke

Das Nervengewebe des Gehirns ist bezüglich Nahrungs- und Arzneistoffversorgung von der Blutzirkulation durch die sogenannte Blut-Hirn-Schranke abgetrennt. Diese Barriere besteht aus drei Schichten (von innen nach außen): dem Endothel der Kapillaren, der Basalmembran und einer Hülle von Astrozyten. Die Endothelzellen, welche die feinen Gehirnkapillaren von innen auskleiden, sind über *tight junctions* fest miteinander verbunden. Dadurch entsteht eine selektive Barriere für den Übertritt von Endo- und Xenobiotika aus der Blutzirkulation ins Gehirn und in umgekehrter Richtung für den Export überflüssiger Stoffwechselprodukte oder Metabolite aus dem Gehirn in das Blut. Diese Barriere wird durch verschiedene Effluxtransporter in der luminalen Membran der Endothelzellen funktionell aufrechterhalten, welche Arzneistoffe aus dem Gehirn ausschleusen oder die Passage aus der Blutzirkulation über die Endothelzellen ins Gehirn verhindern können. Hauptverantwortlich für diesen Effekt ist MDR1, welches eine starke Expression in der Blut-Hirn-Schranke aufweist [Kusuhara und Sugiyama 2002, Mizuno et al. 2003].

Sowohl bei der *mdr1a* (-/-) und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus als auch bei Hunden mit homozygot defektem MDR1-Gen zeigt sich, wie wertvoll die Expression von MDR1 zum Schutz des Gehirns vor neurotoxischen Wirkungen von Arzneistoffen sein kann. So ist der Übertritt von Ivermectin ins Gehirn bei *mdr1a* (-/-) Knockout-Mäusen 87-fach höher als bei Wildtyp-Mäusen, was die Knockout-Tiere 100-fach empfindlicher gegenüber den neurotoxischen Effekten des Ivermectins macht [Schinkel et al. 1994]. Auch zahlreiche andere Arzneistoffe wie Cyclosporin A, Digoxin, Indinavir, Loperamid, Nelfinavir, Chinidin, Verapamil, Vinblastin, Vincristin, Doxorubicin, Paclitaxel, Ondansetron oder Domperidon gehen bei fehlendem MDR1 vermehrt ins Nervengewebe über. Die Zunahme der Gehirngängigkeit wird dabei insbesondere durch die Größe des Gehirn/Plasma-Konzentrationsgradienten deutlich (Tab. 1.6).

Aus diesem Grund kann es bei der Therapie von Hunden mit defektem MDR1-Gen zu starken und unerwarteten neurotoxischen Nebenwirkungen durch betreffende Arzneistoffe kommen, was im Falle des Ivermectins sogar zum Tod geführt hat. Grundsätzlich ist die Therapierbarkeit betroffener Hunde erheblich eingeschränkt [Geyer et al. 2005, Geyer et al. 2005].

Tab. 1.6: Vermehrte Gehirngängigkeit zahlreicher Arzneistoffe bei Fehlen von Mdr1 in der Blut-Hirn-Schranke. Die gezeigten Pharmaka wurden Wildtyp-Mäusen bzw. *mdr1a* (-/-) (*mdr1a,b* (-/-)) Knockout-Mäusen intravenös (subkutan) appliziert und die Organverteilung nach 10 min bis 24 h untersucht.

Konzentrationsgradienten				
Arzneistoff	Gehirn / Plasma <i>mdr1a</i> (+/+)	Gehirn / Plasma <i>mdr1a</i> (-/-)	Ratio <i>mdr1a</i> (-/-) / <i>mdr1a</i> (+/+)	Literatur
Loperamid ¹	0,08	2,61	43,0	Summerfield et al. 2006
Chinidin ³	0,28	10	36	Doran et al. 2005
Nelfinavir	0,09	2,65	31	Kim et al. 1998
Chinidin	0,17	4,64	28	Kusuhara et al. 1997
Digoxin ¹	0,05	1,4	28	Summerfield et al. 2006
Ivermectin ²	0,09	2,52	26,9	Schinkel et al. 1994
Amiodaron ³	0,080	1,7	21	Doran et al. 2005
Risperidon ¹	0,44	5,52	21,0	Summerfield et al. 2006
Digoxin	0,08	1,5	19	Schinkel et al. 1995
9-OH-Risperidon ³	0,060	1,0	17	Doran et al. 2005
Verapamil ³	0,34	5,6	17	Doran et al. 2005
Nelfinavir ¹	0,92	14,88	16,2	Salama et al. 2005
Cyclosporin	0,28	3,3	12	Schinkel et al. 1995
Vinblastin	1,7	18,7	11	Schinkel et al. 1994
Indinavir	0,08	0,81	10	Kim et al. 1998
Risperidon ³	0,78	8,0	10	Doran et al. 2005
Asimadolin ¹	0,31	2,94	9,56	Jonker et al. 1999
Loperamid ³	0,55	5,1	9,3	Doran et al. 2005
Carebastin	0,04	0,32	7,9	Tamai und Tsuji 2000
Verapamil	0,42	3,3	7,9	Hendrikse et al. 1998
HSR903	0,38	2,85	7,5	Murata et al. 1999
Ebastin	0,11	0,85	7,4	Tamai und Tsuji 2000
Azasetron	0,12	0,83	7,0	Tamai und Tsuji 2000
Loperamid ²	0,31	2,1	6,7	Schinkel et al. 1996
Saquinavir	0,13	0,88	6,67	Kim et al. 1998
Metoclopramid ³	1,2	7,9	6,6	Doran et al. 2005
Tacrolimus	2,73	16,4	6,1	Yokogawa et al. 1999
Rhodamin-123	0,21	0,99	4,66	De Lange et al. 1998
Ondansetron	0,46	1,92	4,2	Schinkel et al. 1996
Sparfloxacin ¹	0,14	0,54	3,9	Tamai et al. 2000
Citalopram ⁴	4,6	15,7	3,4	Uhr und Grauer 2003
Cortisol ¹	0,18	0,61	3,4	Uhr et al. 2002
Doxorubicin	0,0008	0,003	3,2	Mizuno et al. 2003
Cerivistatin ^{1,2}	0,576	1,79	3,1	Kivistö et al. 2004
Prednisolon	0,216	0,673	3,1	Karssen et al. 2002
Grepafloxacin ¹	0,34	1	2,9	Tamai et al. 2000
Propoxyphen ³	2,9	7,6	2,6	Doran et al. 2005
Grepafloxacin ¹	0,561	1,42	2,53	Sasabe et al. 2004
Dexamethason	0,28	0,7	2,5	Schinkel et al. 1995
Vincristin	0,027	0,066	2,4	Tamai und Tsuji 2000
Grepafloxacin	0,561	1,32	2,35	Sasabe et al. 2004
Prednison ³	0,12	0,28	2,3	Doran et al. 2005
Fluvoxamin ³	6,1	14	2,3	Doran et al. 2005
Paroxetin ³	3,3	7,1	2,2	Doran et al. 2005

Hydrocodon ³	2,1	4,5	2,1	Doran et al. 2005
Dextromethorphan ¹	6,4	13,5	2,1	Uhr et al. 2004
Valspodar	0,6	1,2	2	Desrayaud et al. 1998
Prazosin ³	0,22	0,44	2,0	Doran et al. 2005
Loratadin ³	0,54	1,0	1,9	Doran et al. 2005
Citalopram ³	5,1	9,7	1,9	Doran et al. 2005
Sulpiride ³	0,078	0,15	1,9	Doran et al. 2005
Daunomycin	0,91	1,63	1,8	Adachi et al. 2001
Nortriptylin ³	11	20	1,8	Doran et al. 2005
Venlafaxine ³	4,2	7,7	1,8	Doran et al. 2005
Cortikosteron ¹	0,31	0,55	1,8	Uhr et al. 2002
Meprobamata ³	0,42	0,70	1,7	Doran et al. 2005
Morphin ³	0,46	0,76	1,7	Doran et al. 2005
Clozapin ³	4,1	6,6	1,6	Doran et al. 2005
Methylphenidat ³	12	19	1,6	Doran et al. 2005
Fluoxetin ³	12	18	1,5	Doran et al. 2005
Northryptilin ⁵	4,8	7,3	1,5	Uhr et al. 2007
Morphin	0,49	0,72	1,48	Schinkel et al. 1995
Cyclobenzaprin ³	12	16	1,4	Doran et al. 2005
Haloperidol ³	13	18	1,4	Doran et al. 2005
Zolpidem ³	0,29	0,40	1,4	Doran et al. 2005
Trimipramine ⁴	7,0	9,7	1,4	Uhr und Grauer 2003
Aldosteron ¹	0,3	0,43	1,4	Uhr et al. 2002
Amithryptilin ⁵	11,7	16,0	1,4	Uhr et al. 2007
Buspirone ³	1,6	2,0	1,3	Doran et al. 2005
Chlorpromazin ³	23	29	1,3	Doran et al. 2005
Carisoprodol ³	0,66	0,81	1,2	Doran et al. 2005
Ritonavir ³	0,015	0,018	1,2	Doran et al. 2005
Diazepam ³	2,0	2,3	1,2	Doran et al. 2005
Phenytoin ³	0,63	0,78	1,2	Doran et al. 2005
Thiopental ³	0,36	0,44	1,2	Doran et al. 2005
Coffein ³	1,0	1,1	1,1	Doran et al. 2005
Carbamazepin ³	0,76	0,81	1,1	Doran et al. 2005
Pitavastatin ¹	0,15	0,17	1,1	Fujino et al. 2002
Diazepam	3,35	3,24	0,9	Adachi et al. 2001
Progesteron	1,45	1,34	0,9	Adachi et al. 2001

¹Es wurden *mdr1a,b* (-/-) Doppelknockout-Mäuse verwendet

²Arzneistoff wurde oral, nicht intravenös verabreicht

³Pharmaka wurden Wildtyp-Mäusen bzw. *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Mäusen subkutan appliziert und die Plasma- und Gehirnkonzentration nach 4 h untersucht.

⁴Arzneistoff wurde Wildtyp-Mäusen bzw. *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Mäusen subkutan appliziert und die Plasma- und Gehirnkonzentration nach 1 h untersucht.

⁵Arzneistoff wurde Wildtyp-Mäusen bzw. *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Mäusen subkutan appliziert und die Plasma- und Gehirnkonzentration nach 2 h untersucht.

Neben den Effluxtransportern in der luminalen Membran werden in den Endothelzellen der Gehirnkapillaren auch einige SLC-Carrier exprimiert. Der Oatp1a4 der Ratte wurde sowohl in der luminalen als auch in der basolaterale Membran nachgewiesen [Gao et al. 1999]. Da für Oatp1a4 ein bidirektionaler Transportmechanismus beschrieben wurde, ist dieser Carrier vermutlich am Effluxtransport von Metaboliten wie Glucuronsäure-, GSH- oder Sulfat-Konjugaten über die Blut-Hirn-Schranke beteiligt [Sugiyama et al. 2001, Asaba et al. 2000]. Dies bestätigen beispielsweise Versuche, in welchen der Efflux von Estradiol-17 β -glucuronid aus dem Gehirn durch Digoxin hemmbar war. Da sowohl Digoxin als auch Estradiol-17 β -

glucuronid hochaffine Substrate des Oatp1a4 darstellen, kommt dieser Effekt vermutlich durch Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle im Oatp1a4 zu Stande [Sugiyama et al. 2002].

BCRP wird ebenso wie Mdr1 in der apikalen Membran der Endothelzellen der Gehirnkapillaren exprimiert [Cooray et al. 2002], es scheint aber *in vivo* weniger für den Arzneistofftransport in der Blut-Hirn-Schranke von Bedeutung zu sein, als vielmehr für die Exkretion von Arzneistoffen und Toxinen über die Brustdrüse [Merino et al. 2005].

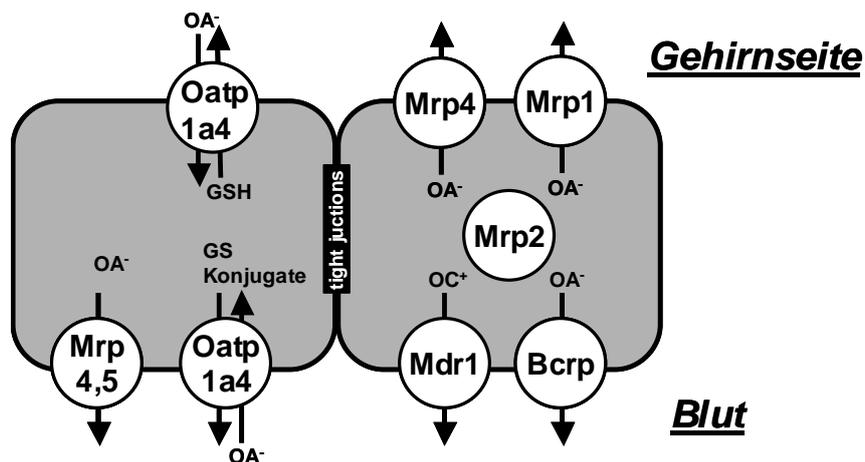


Abb. 1.7: Lokalisation wichtiger Transportsysteme in den Endothelzellen der Gefäßkapillaren im Gehirn bei der FVB-Maus. Die Endothelzellen sind über *tight junctions* eng miteinander verbunden und bilden die sog. Blut-Hirn-Schranke, welche eine selektive Diffusionsbarriere zwischen der Blutzirkulation und dem Gehirngewebe darstellt.

In der Expression von MRP2 in der Blut-Hirn-Schranke zeigen sich große Speziesunterschiede. So wurde MRP2 bisher nicht im Gehirn von Rindern [Zhang et al, 2000] oder Menschen [Aronica et al. 2004, Nies et al. 2004] nachgewiesen, wohl aber im Gehirn der Ratte [Miller et al. 2000]. Allerdings wurde bei Humanpatienten eine Hochregulation dieses Transporters bei epileptischen Erkrankungen beobachtet [Aronica et al. 2004, Vogelgesang et al. 2004]. Darüberhinaus ergeben sich Unterschiede in der Lokalisation des Mrp2 Proteins in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke bei verschiedenen Mäusestämmen [Soontornmalai et al. 2006]. So wurde Mrp2 bei FVB-Mäusen intrazellulär gefunden, bei C57Bl/6 Mäusen dagegen apikal [Soontornmalai et al. 2006]. Bemerkenswert ist dabei, dass diese stammspezifischen Unterschiede nicht für die Expression von Mrp2 in Leber und Niere gefunden wurden [Soontornmalai et al. 2006].

1.7. Untersuchte Substanzen mit Bezug zu Arzneistofftransportern

Die forschenden Arzneimittelhersteller investieren derzeit in erheblichem Umfang in die Forschung auf dem Gebiet der Pharmakogenetik, um neue Medikamente mit besserem Nutzen-Risiko-Verhältnis zu entwickeln. Auf Grundlage dieser Forschung ist es bereits heute möglich, unter Beachtung von spezifischen genetischen Markern die Wirksamkeit und / oder Verträglichkeit eines Arzneimittels bei einem bestimmten Patienten präziser voraussagen zu können. Ein aktuelles Beispiel bildet ein pharmakogenetischer Test zur Dosisfestlegung des Blutverdünners Warfarin, welcher Ende 2007 durch die FDA zugelassen wurde [Rost et al. 2004].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Arzneimitteltransporter MDR1, MRP2 und BCRP für die Pharmakokinetik und Organverteilung der Herzglykoside Ouabain und Digoxin, die makrozyklischen Laktone Ivermectin und Selamectin sowie das Pilztoxin Phalloidin untersucht. Hierfür wurden transgene Tiere (sog. Knockout-Tiere) eingesetzt, welchen einzelne Transportsysteme fehlen. An diesen wurden Organverteilungs- und Ausscheidungskinetiken mit radioaktiv markierten Substanzen ermittelt und mit analogen Kinetiken an Tiere mit intakten Transportsystemen verglichen. Da der Ausfall eines (wichtigen) Transportsystems oft mit einer kompensatorischen Hochregulation eines oder mehrerer anderer Systeme verbunden sein kann, wurden, soweit möglich, zusätzlich die Expressionsprofile möglicher kompensatorischer Systeme analysiert.

1.7.1. Herzglykoside: Ouabain und Digoxin

Der Begriff Herzglykosid steht für herzwirksame chemische Substanzen, deren gemeinsames Strukturmerkmal ein Aglycon (Genin) und eine oder mehrere Zuckermoleküle darstellt. Die verschiedenen Herzglykoside unterscheiden sich beträchtlich in Hinblick auf ihre Wasser- und Fettlöslichkeit, was ihre unterschiedliche Resorbierbarkeit nach oraler Gabe erklärt.

Es sind etwa 200 Herzglykoside bekannt. Man findet sie als sog. Cardenolide und Bufadienolide in verschiedenen Pflanzen, aber auch bei Wirbeltieren wie z.B. Schlangen und Kröten. Das *g*-Strophantin (syn. Ouabain) kommt vor allem in den Samen von *Strophanthus gratus* vor, aber auch in Blüten, Früchten, Blättern, Wurzeln und der Rinde des Ouabaio-Baumes. 1859 wurde die Herzwirkung des Strophanthus-Samens entdeckt, als während der Livingstone-Expedition in Afrika die Zahnbürste des Biologen Dr. Kirk unbemerkt in Kontakt mit dem Strophanthus-Pfeilgift kam und unmittelbar darauf dessen Herzbeschwerden

der Herzmuskulatur deutlich zu steigern (positive inotrope Wirkung), wobei dieser therapeutische Effekt nur deutlich am insuffizienten Herzmuskel, nicht jedoch am gesunden Herz eintritt. Die beiden Substanzen Digoxin und Ouabain sind strukturell sehr ähnlich (Abb. 1.8). Allerdings hat Ouabain im Vergleich zu Digoxin fünf statt zwei hydrophile OH-Gruppen im Steroidgerüst und 1 Zuckerrest statt 3 bei Digoxin, was die unterschiedliche Wasserlöslichkeit sowie Pharmakokinetik beider Substanzen erklärt.

Ouabain hat physikochemische Eigenschaften, welche eigentlich typisch für eine renale Ausscheidung sind; das Molekül ist ungeladen und sehr hydrophil. Tatsächlich ist die renale Ausscheidung für Mensch und Hund charakteristisch. Bei Nagern wird Ouabain dagegen hauptsächlich über die Galle ausgeschieden. Aufgrund dieser Besonderheiten wurden in den zurückliegenden 30 Jahren zahlreiche Versuche zur hepatobiliären Elimination von Ouabain durchgeführt. Diese erfolgten mittels Leberperfusion [Graf und Peterlik 1976, Meijer und van Motfoort 2002], an Leberschnitten [Kupferberg und Schankl 1968] oder frisch isolierten Hepatozyten [Schwenk et al. 1981, Petzinger und Fischer 1985, Eaton und Richards 1986]. Dabei etablierte sich Ouabain als Modellsubstrat für die hepatobiliäre Ausscheidung, da es eine gute Wasserlöslichkeit und geringe Plasmaproteinbindung aufweist [Kolenda et al. 1971/1971], eine hohe Plasmaclearance und rasche Ausscheidung über die Leber zeigt und in der Leber nicht biotransformiert wird [Cox und Wridht 1959, Kupferberg und Schankl 1968, Russell und Klaassen 1972, Meijer und van Montvort 2002]. Eaton und Klaassen sprechen 1978 erstmals von einem carriervermittelten Transportprozess. Wenig später prägen Petzinger und Fischer für den Ouabaintransporter in der Rattenleber den Begriff des „multispezifischen Gallensäuretransporters“ [Petzinger und Fischer 1985]. Mit der Klonierung der *Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATP) und den ABC-Transporter kann der Ouabaintransport an der Leber heute auch auf molekularer Ebene erklärt werden. Geyer et al. 2005 berichteten über ein biliäres Ausscheidungsdefizit für Ouabain bei *mrp2*-defizienten TR(-) Ratten, was auf eine Beteiligung von Mrp2 am hepatobiliären Efflux von Ouabain hindeutete. Dieses Ergebnis war durchaus überraschend, da andere Herzglykoside wie z.B. Digoxin als typische MDR1 Substrate gelten [de Lannoy und Silvermann 1992, Cavet et al. 1996, Schinkel et al. 1995, Keppler und Arias 1997, Stieger und Meier 1998, Schinkel et al. 1996, Mayer et al. 1996, Kawahara et al. 1999].

Digoxin ist ein Herzglykosid, das zur Behandlung von kongestiver Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen eingesetzt wird. Herzglykoside hemmen die membrangebundene Na⁺/K⁺-ATPase, was zu einem einem intrazytosolischen Calcium-Anstieg führt und damit zu einer Steigerung der Kontraktionskraft des Herzmuskels. Aber nicht nur Ouabain, sondern auch Digoxin wurde aus menschlichem Urin Anfang der 90er Jahre isoliert [Goto et al. 1990] und als endogene Substanz identifiziert. Später wurde Digoxin auch aus den Nebennieren von

Rindern isoliert [Qazzaz et al. 1996]. Die Synthese des endogenen Digoxins erfolgt dort aus Cholesterol bzw. Pregnenolon [Schoner et al. 2005]. Im Gegensatz zum endogenen Ouabain kann endogenes Digoxin keinen Bluthochdruck erzeugen und unterdrückt im Gehirn die sympathomimetische Blutdrucksteigerung [Huang et al. 1999].

Trotz der offensichtlich dominanten Bedeutung der Effluxtransporter MDR1 und MRP2 für die hepatobiliäre Elimination von Herzglykosiden fehlen bisher systematische Untersuchungen zur Bedeutung von MRP2 und BCRP an der Digoxin-Ausscheidung bzw. von MDR1 und BCRP an der Ouabain-Ausscheidung. Weiterhin ist es unbekannt, wie sich die Pharmakokinetik beider Herzglykoside verändert, wenn einer dieser Effluxtransporter fehlt.

1.7.2. Phalloidin

Phalloidin, eine der Komponenten des Giftes des Grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, bewirkt vor allem eine akute hämorrhagische Dystrophie der Leber und ist als selektives Lebergift bekannt. Die toxische Wirkung von Phalloidin basiert auf einer Bindung an polymeres Actin. Dies führt zur Stabilisierung der Actinfilamente und zu Strukturveränderungen in der Actin-assoziierten Plasmamembran, und schließlich zur Zerstörung der Zellen. Für eine Phalloidinvergiftung ist die akute Leberdystrophie mit ihren biochemischen und histologischen Veränderungen sowie Cholestase typisch. Sie äußert sich in einem Abfall von Glykogen, ATP und Glutathion und einer gleichzeitigen verminderten Synthese von Glykogen, Protein, Glutathion und Harnstoff. Anfang der 80-er Jahre postulierte Petzinger et al. (1979 und 1982), dass dieses zyklische Peptid Phalloidin durch einen Gallensäuretransporter, der nur in der Leber vorkommt, von Leberzellen aufgenommen wird. Fünfzehn Jahre später wurde gezeigt, dass Oatp1b2 der Ratte sowie OATP1B1 und OATP1B3 des Menschen, die nur an der basolateralen Membran der Hepatozyten vorhanden sind [Cattori et al. 2001, König et al. 2000/2000], den Transport von Phalloidin mit einem K_m von 5,7-39 μM vermitteln [Fehrenbach et al. 2003, Meier-Abt et al. 2004]. Des Weiteren deuten *in vitro* Daten daraufhin, dass Mrp2 möglicherweise einen kanalikulären Efflux von Phalloidin aus den Leberzellen vermitteln kann [Fehrenbach et al. 2003]. Allerdings wurde dies bisher nicht *in vivo* bestätigt.

1.7.3. Makrozyklische Laktone: Ivermectin und Selamectin

Ivermectin ist ein makrozyklisches Laktone und gehört zur Gruppe der Avermectine. Avermectine sind die Fermentationsprodukte des im Boden lebenden Strahlenpilzes

Streptomyces avermitilis [Campbell et al. 1984, Paradis 1998]. Der Name „Ivermectin“ steht für die vermizide und ektoparasitizide Wirkung des Stoffes [Campbell et al. 1984]. Substanzen dieser Klasse verursachen eine schlaffe Paralyse der Nematoden und Arthropoden durch Störung der Reizübertragung im Nervensystem [Campbell et al. 1983]. Der Wirkmechanismus beruht auf der Erhöhung der Membranpermeabilität für Chlorid-Ionen von Nerven- und Muskelzellen an Glutamat- und GABA-gesteuerten Chloridkanälen [Turner et al. 1989]. Dadurch kommt es zur Hyperpolarisation der Zellmembran und somit zur Blockierung der Erregungsüberleitung. Bei Konzentrationen oberhalb der chemotherapeutisch relevanten Bereiche findet zusätzlich eine Bindung an GABA (γ -Aminobuttersäure)-abhängige Rezeptoren statt. An GABA-gesteuerten Chloridkanälen kommt es durch die Avermectine zur Potenzierung der Wirkung des Liganden. Da GABA auch im Gehirn von Säugetieren vorkommt, wird die Bindung an GABA-Rezeptoren auch als Ursache für die neurotoxische Wirkung der Avermectine angesehen [Kane et al. 2000]. Die Problematik einer starken Neurotoxizität makrozyklischer Laktone bzw. des Ivermectins bei Fehlen von MDR1 in der Blut-Hirn-Schranke wurde bereits in den Kapitel 1.2.2 und 1.6 erwähnt. Ivermectin ist in der üblichen therapeutischen Dosierung von 0,2 mg/kg Körpergewicht für Hunde nicht zugelassen und wird nur in einer Dosierung von 6 μ g/kg KG zur Herzwurmprophylaxe eingesetzt. Zugelassen ist allerdings ein anderer Arzneistoff aus der Gruppe der Avermectine, das Selamectin (Stronghold®). Ivermectin und Selamectin sind strukturell sehr ähnlich (Abb. 1.9) und wurden *in vitro* als äquivalente MDR1-Substrate identifiziert [Griffin et al. 2005]. Dennoch hat das Selamectin-Präparat Stronghold bei Hunden mit MDR1-Defekt eine wesentlich höhere therapeutische Sicherheit als Ivermectin [Bishop et al. 2000, Sarasola et al 2002].

Für die neurotoxische Wirkung makrozyklischer Laktonen sind drei Parameter entscheidend: Dosierung, Applikationsart und die jeweilige Einzelsubstanz.

1. Bei einer Dosis von 60 μ g/kg Ivermectin p.o. bleibt ein Hund mit MDR1-Defekt ohne klinische Symptomatik [Fassler et al. 1991], während bereits ab 100 μ g/kg gravierende neurotoxische Symptome wie Ataxie, Tremor, Hypersalivation und Erbrechen auftreten. Ab 200 μ g Ivermectin kommt es zu komatösen Zuständen und meist zum Tod der MDR1-defekten Hunde [Paul et al. 1987, Tranquilli et al. 1989, Vaughn et al. 1989]. Die therapeutische Breite von Ivermectin ist somit bei MDR1-defekten Hunden nach oraler Applikation sehr schmal.
2. Dagegen treten nach transdormaler (Spot-on) Applikation selbst bei einer Dosis von 1000 μ g/kg Körpergewicht keine Vergiftungszeichen bei diesen Hunden auf [Paul et al. 2004].

3. Im Gegensatz zu Ivermectin ruft die Gabe von Selamectin sogar in 4- bzw. 2-facher therapeutischer Dosierung nach Spot-on bzw. oraler Applikation keine neurotoxischen Symptome bei Hunden mit MDR1-Defekt hervor [Bishop et al. 2000, Novotny et al. 2000]. Daher kann das für Hunde zugelassene Präparat Stronghold auch bei Hunden mit MDR1-Defekt eingesetzt werden.

Allerdings ist unbekannt, wie stark sich Selamectin im Gehirn anreichert, wenn MDR1 fehlt. Weiterhin gibt es keine Angaben, welchen Einfluss die Applikationsart (oral oder Spot-on) auf die Gehirnkonzentrationen von Ivermectin und Selamectin hat. Weiterhin ist unbekannt, ob neben MDR1 andere Efflux-Transporter wie BCRP und MRP die Passage von Ivermectin und Selamectin über die Blut-Hirn-Schranke verhindern können.

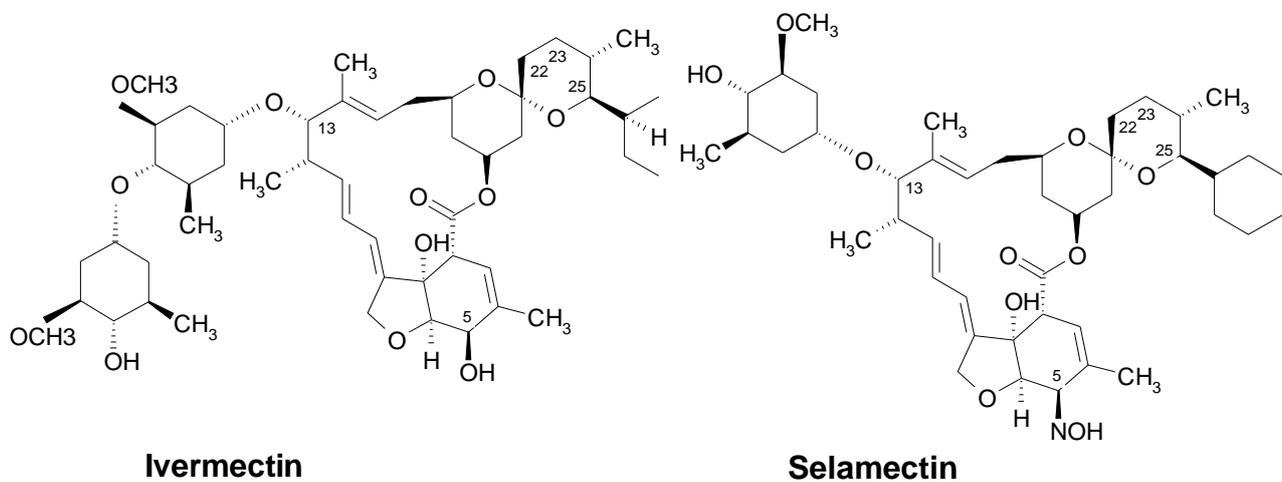


Abb. 1.9: Strukturformel von Ivermectin und Selamectin. Die Ziffern zeigen die unterschiedliche Stellen der zwei Moleküle an.

1.8. Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es, die Bedeutung der Arzneistofftransporter MDR1, BCRP und MRP2 für die Pharmakokinetik und Gehirngängigkeit der Herzglykoside Ouabain und Digoxin, der makrozyklischen Laktone Ivermectin und Selamectin sowie des Pilzgifts Phalloidin an Tieren mit Transporterdefekten zu untersuchen. Im Vordergrund steht dabei die Frage, wie der Ausfall eines bestimmten Arzneistofftransporters die hepatische und renale Elimination sowie die Organverteilung der untersuchten Stoffe beim Versuchstier beeinflusst.

2. Versuchstiere

2.1. Ratten

Als Versuchstiere dienten erwachsene Wistar-Albinoratten (Genehmigung zur Tierzucht vom 10.06.1991, Az. Züchtungsgenehmigung 19c) und eine genetische Defektmutante der Wistar-Ratte, die TR(-) Ratte, aus eigener Zucht. TR(-) Ratten fehlt das Transportsystem Mrp2 für die Ausschleusung von Arzneistoffen (TR(-) = Transport minus). Die TR(-) Ratten stammen ursprünglich aus dem Labor von Prof. Dr. Jansen, Groningen, Holland. Sie wurden in Gießen gezüchtet. Der Transportdefekt der TR(-) Ratte entspricht vergleichbaren Mutationen des MRP2-Carriers beim Menschen mit Dubin-Johnson-Syndrom. Ratten gelten als Standardversuchstiere für Messungen von hepatobiliären Ausscheidungskinetiken in der pharmakologischen Forschung.

Die Tiere wurden in Macrodex® Standardkäfigen (Fa. Ehret, Freiburg, Deutschland) bei konstanter Temperatur von 22,5°C, 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus und 50% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Freier Zugang zu Leitungswasser und Standard-Nagerfutter (Altromin 1320, 4% NaCl, Fa. Altromin, Lage, Deutschland) war gewährleistet. Eine Liste aller verwendeter Versuchstiere sowie der applizierten Testsubstanzen ist in Tabelle 9.1 des Anhangs enthalten. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über wichtige physiologische Parameter der Ratten.

Tab. 2.1.: Physiologische Parameter der Ratten [Institut für Labortierkunde, Universität Zürich]

Physiologische Parameter	
Gewicht adult	
Männchen (g)	300 – 500
Weibchen (g)	250 – 400
Herzfrequenz (/min)	300 – 500
Blutdruck (mmHg)	
systolisch	90 – 180
diastolisch	60 – 140
Blutvolumen (ml/100g)	
Plasma	4,05
Total	6,40
Herzausstoß (ml/Herzschlag)	50
Minutenvolumen (ml/min)	100 – 200
Körpertemperatur (°C)	37,7
Urin (ml/Tag)	1 – 1,5
Blutvolumen (ml/kg)	50 – 70
Geschlechtsreife (Wochen)	
Männchen	8 – 10
Weibchen	7 – 8

2.2. Mäuse

Für *in situ* Galleausscheidungsversuche wurden *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse, *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse sowie FVB Wildtyp-Mäuse verwendet.

Bei den *mdr1a,b*(-/-) Doppelknockout-Mäusen wurden die Gene *abcb1a* (*Pgy3*) und *abcb1b* (*Pgy1*) ausgeschaltet. Das Mdr1a-Protein wird im Darm sowie in der Blut-Hirn- und Blut-Hoden-Schranke exprimiert. Die Expression des mdr1b-Proteins wurde in der Nebennieren, in der trächtigen Gebärmutter und in den Eierstöcken nachgewiesen. Die *mdr1a,b*(-/-) Mäuse wurden im Labor von Dr. Alfred Schinkel (Niederlande) auf Basis der embryonalen Stammzelllinie 129/Ola E14 hergestellt. Die *bcrp1*(-/-), *mrp1* (-/-) sowie *mdr1a,b/bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse wurden 2002 / 1997 / 2005 ebenfalls von Dr. Alfred Schinkel mit der embryonalen Maus-Stammzelllinie E14 129/OlaHsd hergestellt [Jonker et al 2002; Wijnolds et al 1997; Jonker et al. 2005]. Die in dieser Arbeit verwendeten Knockout-Mäuse entsprechen den publizierten Ursprungstämmen, wurden aber von der Firma Taconic (Taconic Europe A/S, Bomholtvej 10, DK 8680 Ry, Hauptsitz Germantown, NY, USA) kommerziell bezogen.

Als Wildtyp-Tiere wurden FVB-Mäuse benutzt, welche den genetischen Hintergrund der verwendeten Knockout-Mäuse bilden. Um in den durchgeführten Versuchen eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Knockout- und Wildtyp-Mäusen zu gewährleisten, wurden für ausgewählte Versuche FVB-Wildtyp-Mäuse ebenfalls von Taconic bezogen und nicht aus der institutseigenen Zucht entnommen.

Die Haltung der Knockout-Mäuse erfolgte unter SPF-Bedingungen (*Spezifiziert-Pathogen-Freie Bedingungen*) in IVC-(einzeln belüftete Käfigsysteme) oder Filterdeckel-Macrolon-Käfigen der Firma „Tecniplast“ bei freiem Zugang zu Wasser und Futter. Es herrschte ein Tag/Nacht-Rhythmus von 12 / 12 Stunden bei einer Raumtemperatur von 20 - 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 - 80 %. Käfige mitsamt Einstreu und Futter wurden vor dem Einsetzen der Mäuse autoklaviert (20 min, 121 °C), ebenso das Trinkwasser. Es wurde Futter der Firma SSNIFF (MZ15, autoklavierbar) und deionisiertes Wasser verwendet.

FVB-Mäuse aus eigener Zucht wurden aus konventioneller Tierhaltung in den Versuch genommen. Die Tiere wurden in Macrodex® Standardkäfigen (Fa. Ehret, Freiburg, Deutschland) bei konstanter Temperatur von 22,5°C, 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus und 50% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Freier Zugang zu Leitungswasser und Standard-Nagerfutter (Altromin 1320, 4% NaCl, Fa. Altromin, Lage, Deutschland) war gewährleistet.

Eine Liste aller verwendeter Versuchstiere sowie der applizierten Testsubstanzen ist in Tabelle 9.2 des Anhangs enthalten. Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über wichtige physiologische Parameter der Mäuse.

Tab. 2.2.: Physiologische Parameter der Mäuse [Fox et al. 1984]

Physiologische Parameter	
Gewicht adult	
Männchen (g)	20 – 46
Weibchen (g)	18 – 35
Herzfrequenz (/min)	310 – 840
Blutdruck (mmHg)	
systolisch	133 – 160
diastolisch	102 – 110
Blutvolumen (ml/100g)	
Plasma	3,15
Total	5,85
Herzausstoß (ml/Herzschlag)	1,3 – 2,0
Minutenvolumen (ml/min)	24 (11 – 36)
Körpertemperatur (°C)	37,1 – 37,4
Geschlechtsreife (Tage)	
Männchen	28 – 49
Weibchen	28 – 49

2.3. Erforderliche Genehmigungen

Die Tierversuchsanträge Nr.V54-19c 20-15(1) GI 18/11 Nr.02.2004 „Hepatobiliäre Ausscheidung von Arzneistoffen bei Mäusen mit Transportdefekten“, Kurbezeichnung „Mäusegalle“ sowie Nr. V54-19c 20-15(1) GI 18/11 Nr.03.2006 „Hepatobiliäre Ausscheidung von Steroidhormonen, Arzneistoffen und Toxinen an transportdefekten Tiermodellen“, Kurzbezeichnung „Galleausscheidung“, waren nach dem Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 17.02.1993 (BGBl. S. 254) genehmigungspflichtig. Die Genehmigungen wurden durch das Regierungspräsidium Gießen per Bescheid am 4. März 2004 und am 9. März 2006 erteilt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Digoxin	Roth, Karlsruhe
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Dehydroepiandrosteronsulfat	Sigma, Staeinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ketamin	Medistar®, Holzwickede
Xylazin	Medistar®, Holzwickede
Kieselgelplatte 60F-254	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Ouabain	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PEG 400	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Propanol	Merck, Darmstadt
Taurocholat	Roth, Karlsruhe
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Urethan	Sigma, Deisenhofen

3.1.2. Radioaktive Substanzen

Tab. 3.1.: Radioaktiv markierte Substanzen

Substanz	Molekulargewicht	Spezifische Aktivität	Stoffmenge/dpm	Lieferanten
[³ H]Ivermectin	875,09 g/mol	1,0 mCi/ml, 20,0 Ci/mmol	0,0227275 fmol	American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, USA
[³ H]Selamectin	769,97 g/mol	1,0 mCi/ml, 33,0 Ci/mmol	0,013774242	Pfizer Animal Health (Sandwich, UK)
[³ H]Digoxin	780,9 g/mol	1,0 mCi/ml, 17,0 Ci/mmol	0,01742 fmol	NEN, Boston, MA, USA
[³ H]DHEAS	390,5 g/mol	1,0 mCi/ml, 74,0 Ci/mmol	0,0061426 fmol	NEN, Boston, MA, USA
[³ H]Ouabain	584,7 g/mol	1,0 mCi/ml, 22,5 Ci/mmol	0,020202 fmol	NEN, Boston, MA, USA
[³ H]Taurocholat	515,7 g/mol	1,0 mCi/ml, 2,0 Ci/mmol	0,22728 fmol	NEN, Boston, MA, USA
[³ H]-DMP	774,9 g/mol	0,33 mCi/ml, 2,0 Ci/mmol	0,71693086 fmol	Prof. Dr. H. Faulstich, Heidelberg

3.1.3. Applikationslösungen für die *in situ* Galleausscheidung

Applikationslösung für die [³H]Ouabain, [³H]DHEAS, [³H]Taurocholat und [³H]-DMP

Für die *in situ* Galleausscheidungsversuche von [³H]Ouabain, [³H]DHEAS, [³H]Taurocholat und [³H]DMP wurde als Lösungsmittel PBS Puffer verwendet. Die in Ethanol gelösten radioaktiv-markierten Substanz wurde mit N₂ eingedampft und weiter in PBS gelöst.

Applikationslösung für [³H]Ivermectin und [³H]Selamectin (i.v. Applikation)

Diese Substanzen wurden bei ca. 50 C in PEG 400 (Verhältnis PEG 400 / PBS 70 : 30) gelöst, dann mit PBS weiter verdünnt. Die Ivermectin- und Selamectin-Applikationslösungen wurden lichtgeschützt aufbewahrt. Pro Tier wurde etwa 2 – 2,5 µCi Ivermectin oder Selamectin eingesetzt. Um eine entsprechende Dosierung zu erreichen, wurde eine entsprechende Menge nicht radioaktiv-markierter Substanz zu der Applikationslösung gegeben.

Applikationslösung für [³H]Ivermectin und [³H]Selamectin (orale Applikation)

Pro Tier wurden etwa 2 – 2,5 µCi eingesetzt. Um eine entsprechende Dosierung zu erreichen, wurde eine entsprechende Menge nicht radioaktiv-markierter Substanz zu der Applikationslösung gegeben. Die nicht radioaktiv-markierte Substanzen wurden in 30 µl Ethanol gelöst und in Sesamöl verdünnt. Die radioaktiv-markierten Substanzen wurden mit N₂ abgedampft, und weiter in der entsprechenden Sesamöl-Lösung gelöst.

Applikationslösung für [³H]Ivermectin und [³H]Selamectin (Spot-on Applikation)

Pro Tier wurden etwa 6 µCi eingesetzt. Um eine entsprechende Dosierung zu erreichen wurden die jeweils nicht radioaktiv-markierten Substanzen zugegeben. Die kalten Substanzen wurden in Isopropylalkohol gelöst. Die radioaktiv-markierten Substanzen wurden mit N₂ abgedampft, und weiter in der entsprechenden Isopropylalkohol-Lösung mit der Tritium-markierten Substanz gelöst.

Applikationslösung für [³H]Digoxin

3,5 g 1,2-Propylenglycol wurden mit 1,5 g Ethanol (96%), 0,0015 g Essigsäure (99%) und 10 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. HCl auf 5,9 eingestellt. Radioaktiv- und nicht radioaktiv-markiertes Digoxin wurden mit N₂ abgedampft und weiter

in dem oben genannten Puffer gelöst. Der Anteil Tritium-markierten Digoxins betrug etwa 13% bei den Mäuse-Versuchen und 4,4% bei den Ratten-Versuchen.

Alle Applikationslösungen wurden direkt vor Gebrauch hergestellt. Ein Aliquot jeder Applikationslösung (5 µl) wurde vor Applikation im Szintillationscounter gemessen und daran die tatsächlich applizierte Dosis ermittelt.

3.1.4. Szintillationsflüssigkeit

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

Nach der Zusammensetzung wurden die oben genannten Komponenten vermischt.

3.1.5. Dünnschichtchromatographie

Platte:	Kieselgel 60F-254, MERCK
Laufmittel:	Chloroform/ Dichlormethan, Methanol, Aqua bidest., Essigsäure Digoxin: Dichlormethan / Methanol / Aqua bidest. / Essigsäure im Verhältnis 80 / 18 / 2 / 1 Ouabain: Chloroform / Methanol / Aqua bidest. /Essigsäure im Verhältnis 65 / 30 / 5 / 1 Demethylphalloin: Chloroform / Methanol / Aqua bidest. /Essigsäure im Verhältnis 48 / 48 / 4 / 1
Puffer:	Phosphatpuffer 50 mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
Scanner:	Isomess IM-3000 Radio-Dünnschicht-Analysator

3.2. Methoden

3.2.1. *In situ* Galleausscheidung bei der Maus

Versuchsdurchführung

Die Mäuse wurden mit 30 µl Ketamin und 20 µl Xylazin i.p. narkotisiert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurde das Operationsfeld vorbereitet. Dann wurde die Bauchhöhle mit einem 1,5 cm langen Schnitt caudal des Processus xiphoideus in der Linea alba geöffnet. Der Gallengang wurde nahe des Duodenums ligiert. Die Gallenblase wurde mit einem PTFE-Schlauch katheterisiert. Der Katheter wurde dabei mit einem Faden an der Gallenblase fixiert. Die erste Galleportion (0-Portion), welche vor der Applikation der Testsubstanz in dem Reaktionsgefäß gesammelt wurde, wurde nicht für die Eliminationskinetiken berücksichtigt. Die radioaktiv-markierten Testsubstanzen wurden in eine Schwanzvene injiziert. Die Spritze mit Applikationslösung wurde vor und nach der Injektion der Testsubstanzen abgewogen um die applizierte Menge exakt zu bestimmen. Die Bauchhöhle wurde mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung aufgefeuchtet und die Versuchstiere in einen temperierten Kasten (37°C) überführt.

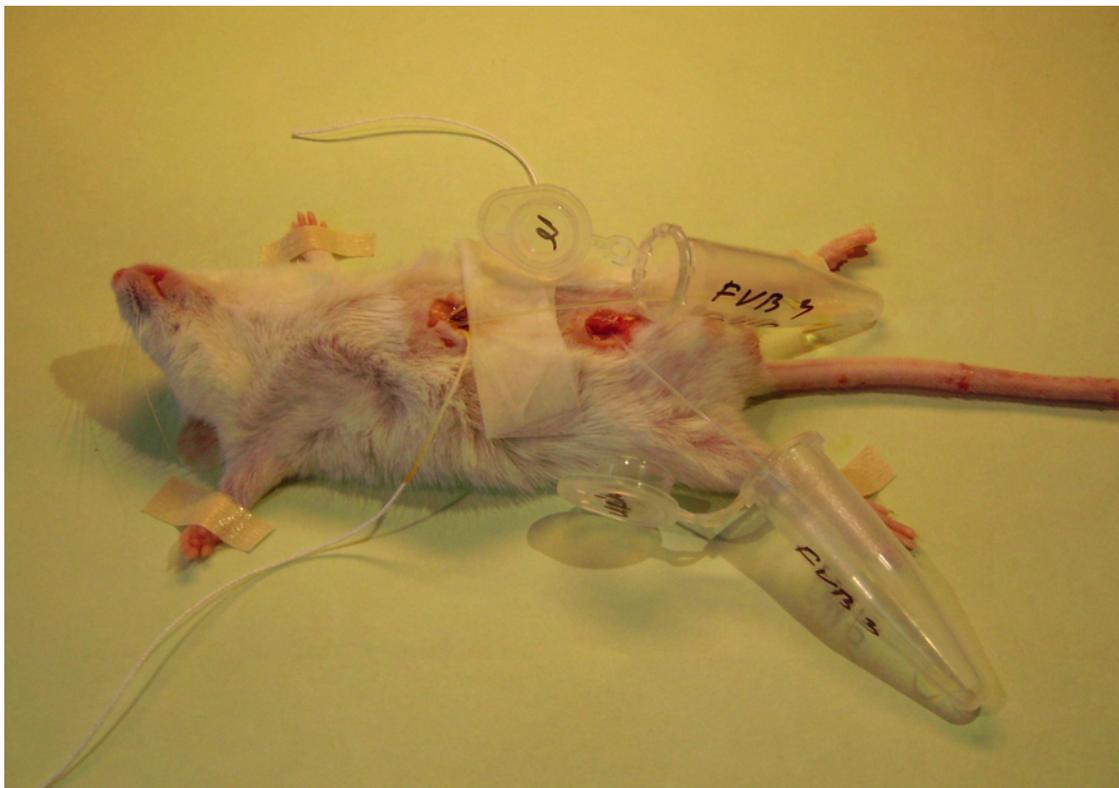


Abb. 3.1 *In situ* Galleausscheidung bei der Maus.

Gallen- und Organproben nach Applikation von Testsubstanzen

Die Galleflüssigkeit wurde über den Gallenblasekatheter aufgefangen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (tariert) gesammelt. Die Versuchsdauer betrug je nach Testsubstanz von 60 min bis 300 min. Im Zeitraum $t = 0$ bis $t = 20$ min wurden alle 4 min Galleproben gesammelt, von $t = 20$ bis $t = 60$ min in 5-Minuten-Intervallen, von $t = 60$ bis $t = 120$ in 10-Minuten-Intervallen und von $t = 120$ bis $t = 300$ in 15-Minuten-Intervallen. Die Gallenproben wurden gewogen. Von jeder Probe wurde ein Aliquot (1,5 μ l) entnommen, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, eine Stunde bei 37°C inkubiert, gevortext und die enthaltene Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Bei Versuchsende wurden die Tiere durch Entbluten getötet. Es wurden Blut, Urin und folgende Organe entnommen: abdominales Fett, Leber, Nebennieren, Niere, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Magen, Hoden, Nebenhoden, Herz, Lunge, Haut, Muskel, Gehirn. Blut (etwa 0,5 ml) wurde mittels Herzpunktion entnommen und in ein Heparinröhrchen überführt. Danach wurde das Blut 5 min bei 14000 U/min zentrifugiert und Überstand zur Analyse entnommen. Die Urinproben wurden während der gesamten Versuchsdauer mit Hilfe eines Harnblasenkatheters gesammelt. Die Organe wurden abgewogen (tarierte Alu-Folien) und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 μ l 3M Kalilauge versetzt und über Nacht bei 40°C lysiert. Anschließend wurden die Lysate homogenisiert und von jeder Probe ein Aliquot von 100 μ l, vermischt in 2 ml Szintillationsflüssigkeit, gemessen.

3.2.2. *In situ* Galleausscheidung bei der Ratte

Versuchsdurchführung

Die Tiere wurden unter Betäubung mit Urethan (1,2 g/kg; 20%ige wässrige Lösung intraperitoneal) laparotomiert. Der Vorteil der Urethannarkose bei der Ratte liegt in der langen Narkosedauer und dem Fehlen eines Exzitationsstadiums.

Nach Eintreten der Narkose (Toleranzstadium) wurden die Tiere auf einem Kleintier-OP-Tisch in eine auf 37 °C beheizbare Inkubationskammer gebracht. Die Bauchhöhle wurde mit einem 2 cm langen Schnitt caudal des Processus xiphoideus in der Linea alba eröffnet. Der zwischen den Duodenumschlingen verlaufende Gallengang wurde in der Nähe des Dünndarms ligiert und mit einer Augenschere in etwa 0,5 cm vor der Ligatur in Richtung Leber angeschnitten und mit einem PTFE-Schlauch katheterisiert. Die in den ersten 10 min gebildete Galleflüssigkeit wurde als Kontrollwert („Prägalle“) in die Versuchsauswertung mit eingezogen. Anschließend wurde die Testsubstanz intravenös in die Vena femoralis injiziert.

Die Spritze mit der Testsubstanzen wurde vor und nach der Applikation abgewogen, um die applizierte Menge genau zu bestimmen.

Gallen- und Organproben nach Applikation der Testsubstanz

Die Gallenflüssigkeit wurde über einen Zeitraum von 120 min fraktioniert gesammelt. Im Zeitraum $t = 0$ bis $t = 20$ min wurden alle 4 min Galleproben gesammelt, von $t = 20$ bis $t = 60$ min in 5-Minuten-Intervallen, von $t = 60$ bis $t = 120$ in 10-Minuten-Intervallen. Die Bauchdecke blieb während dieser Zeit geöffnet; sie wurde mit 37°C warmer Pufferlösung befeuchtet und mit Zellstoff abgedeckt. Bei Versuchsende wurden die Tiere durch Entbluten in Narkose getötet.

Nach Versuchsende wurde die Bauchhöhle bis zur Regio pubis eröffnet und zwei seitliche Entlastungsschnitte angebracht. Die Blutentnahme von etwa 2 ml und Urinproben sowie ihre weitere Verarbeitung erfolgte wie bereits für Mäusen beschrieben. Folgende Organe und Gewebe wurden entnommen: abdominales Fett, Leber, Nebennieren, Niere, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Magen, Hoden, Nebenhoden, Herz, Lunge, Haut, Muskel, Gehirn. Alle Organe wurden in der tariertes Reaktionsgefäß (15 ml) überführt, abgewogen und mit folgenden Volumina 3M Kalilauge versetzt: Leber = 6 ml; Darm, Magen, Hoden und Uterus, Niere und Lunge = 2 ml, Nebenhoden, Eierstöcke, Nebennieren, Milz, Haut, Fett- und Muskelproben, Herz und Gehirn = 0,5 ml. Die Proben wurden über Nacht bei 40°C lysiert. Anderntags wurden die Lysate wie oben beschrieben bearbeiten.

3.2.3. Harnblasenkatheterisierung

Zur Katheterisierung der Harnblase der Ratte wurde ein suprapubischer, etwa 0,2 cm langer Hautschnitt durchgeführt. Die Abdominalmuskulatur und das Peritoneum entlang der Linea alba wurden vorsichtig gespalten. Die Harnblase wurde aus dem Peritonealraum herausluxiert und mit einer Klemme fixiert. Zwei Fadenschlingen wurden um die Blase vorgelegt, die Blase möglichst weit kranial ohne Verletzung der Blasengefäße punktiert, der Blasenkatheter eingebracht und mit den vorgelegten Schlingen fixiert. Anschließend wurde die Blase wieder in der Bauchhöhle versenkt. Ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) wurde unter den Blasenkatheter gestellt, um den Urin zu sammeln.

Für die Katheterisierung der Harnblase der Maus wurde ein medianer Hautschnitt 5 mm kranial der Peniswurzel gesetzt. Die Muskelfaszien wurden entlang der Linea alba durchtrennt. Nach Durchtrennung der Abdominalmuskulatur wurde die Harnblase

herausluxiert und eine Schlinge vorgelegt. Die Harnblase wurde punktiert und ein PE-Katheter (Außendurchmesser 0,96 mm) eingebracht und mit den vorgelegten Fadenschlingen fixiert. Nach Reposition wurde die Wunde verschlossen. Der Urin wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt.

Auswertung der Applikationsversuche

I. Berechnung der ausgeschiedenen Substanzmenge

Im Anschluss an die Radioaktivitätsbestimmung der einzelnen Galleproben wurde die ausgeschiedene Substanzmenge pro Zeiteinheit nach folgender Formel berechnet:

$$\text{ausgeschiedene Substanzmenge} = \frac{\text{dpm pro } \mu\text{l Galle} \times \mu\text{l Galle pro ZI} \times \text{UF}}{\text{Zeitintervall in Minuten} \times \text{g Körpergewicht}}$$

in pmol / min / g KG

ZI: Zeitintervall = 4 min oder 5 min oder 10 min

UF: Umrechnungsfaktor =

$$1 \text{ dpm} = \frac{4,5455 \times 10^{-13} \text{ Ci}}{\text{Spezifische Aktivität (Ci/mmol)}}$$

(Umrechnungsfaktoren siehe in Tabelle 3.1)

II. Berechnung der im Blut enthaltenen Substanzmenge

Das Blutvolumen einer Ratte und Maus beträgt etwa 6,7 ml pro 100 g Körpermasse oder 6,7% der Körpermasse [Hagemann & Schmidt 1960].

$$\text{Substanzmenge im Blut} = \frac{\text{dpm der Serumprobe} \times \text{Blutvolumen des Tieres} \times \text{UF}}{\text{Volumen der Serumprobe in } \mu\text{l}}$$

in pmol

Blutvolumen der Ratte in μl = Körpermasse der Ratte in g x (6,4 ml/100 g)

Blutvolumen der Maus in μl = Körpermasse der Maus in g x (5,85 ml/100 g)

III. Berechnung der in jedem Organ enthaltenen Substanzmenge:

$$\text{Substanzmenge pro Organ} = \frac{\text{dpm der Organprobe} \times (\text{Gesamtgewicht des Organs} + \text{ml KOH}) \times \text{UF}}{\text{Gewicht der lysierten Organprobe (mg)}}$$

in pmol

Gewicht der lysierten Organprobe (mg) war immer 0,1mg

3.3. Dünnschichtchromatographie der Gallenproben

Mittels Dünnschichtchromatographie wurden mögliche Metaboliten der applizierten Testsubstanz in Gallenproben untersucht. Diese Methode wurde für [³H]Digoxin, [³H]Ouabain, [³H]Demethylphalloin eingesetzt.

Auf eine 60F-254-Dünnschicht-Kieselgelplatte (Merck®, Darmstadt) wurden etwa 50000 dpm der radioaktiv-markierten Testsubstanz allein, sowie Galleproben mit vergleichbarer Aktivität (50000 dpm) aufgetragen. Außerdem wurde die radioaktive Substanz in Prägalleproben (s.o.) gelöst und ebenfalls auf die DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographie wurde in einer gesättigten Laufmittelatmosphäre durchgeführt. Die mobile Phase bestand aus Dichlormethan (Chloroform)/ Methanol / Aqua bidest. in wechselnden Verhältnissen. Nachdem die Laufmittelfront den oberen Rand der DC-Platte fast erreicht hatte, wurde die Platte an der Luft getrocknet und mittels eines Isomess-IM-3000-Radio-Dünnschicht-Analysators vermessen. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Übertragung von ionisierenden Strahlenteilchen in elektrische Signale über ein Zählrohr, in dem sich ein Methan/Argon-Gemisch befindet. Wenn die applizierte Substanz in der Leber nicht metabolisiert wurde, war in dem Chromatogramm der untersuchten Gallenproben nur ein einziger Radioaktivitätspeak sichtbar, welcher mit der Ursprungssubstanz identisch war. Mit Hilfe einer UV-Lampe konnten die kalten Testsubstanzen aufgrund ihrer Fluoreszenz auf der Platte lokalisiert werden.

Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie:

Digoxin: Dichlormethan / Methanol / Wasser bidest. im Verhältnis 80 / 18 / 2

Ouabain: Chloroform / Methanol / Wasser bidest. im Verhältnis 65 / 30 / 5

Demethylphalloin: Chloroform / Methanol / Wasser bidest. im Verhältnis 48 / 48 / 4

3.4. Pharmakokinetische Studien

3.4.1. Applikation

Die intravenöse Applikation erfolgte bei Mäusen ohne Narkose in die Schwanzvene. Die orale Applikation wurde mittels Schlundsonde (Durchmesser 1,25 mm) durchgeführt. 12 Stunden vor oraler Applikation wurden die Tiere ohne Futter gehalten und 3 h nach der Applikation stand Futter wieder ad libitum zur Verfügung. Pro Tier wurden etwa 200 µl Lösung per os appliziert. Die Spritze mit der Schlundsonde wurde nach der Applikation immer rückgewogen, um die genaue Applikationsmenge zu bestimmen. Für die Spot-on

Applikation wurde dorsal im Bereich der lumbalen Wirbelsäule eine Stelle von 6 x 6 mm freigeschoren. Die entsprechende Applikationslösung wurde sehr langsam aufgetragen. Pro Tier wurde jeweils 10 µl Lösung appliziert.

3.4.2. Gewinnung der Blutproben

Für die Gewinnung von Blutproben wurde die Schwanzvene punktiert und bis zu 100 µl Blut (je nach Spezies) in eine Microvette® CB 300 (Saarstedt, Nürbrecht) aufgenommen. Zur weiteren Analyse wurden 20 µl Plasma verwendet und wie oben beschrieben im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

3.4.3. EDV-gestützte Auswertung

Daten zur Plasma- und Gallekonzentration wurden mittels nicht-kompartimentaler Analyse mit Hilfe des Computerprogramms WinNonlin Professional Edition Version 2.1.0 (Pharsight, Mountain View, CA, USA) berechnet. Die pharmakokinetischen Parameter (AUC_{last} , totale Clearance Cl_{tot}) wurden für jedes einzelne Tier mittels nicht-kompartimentaler Modell-Analyse nach intravenöser Applikation (intravaskulär) oder entsprechend nach oraler und Spot-on Applikation (extravaskulär) berechnet. Die maximalen Plasma- und Gallekonzentrationen (C_{max}) und deren Zeitpunkte (T_{max}) wurden aus den Konzentrations-Zeit-Kurven jedes einzelnen Tieres abgeleitet und anschließend gemittelt. Die AUC_{last} (*area under the plasma (bile) concentration time curve*) Werte wurden vom Zeitpunkt $t = 0$ bis zur letzten detektierten Plasma/Galle- Konzentration berechnet. Die biliäre Clearance wurde nach folgender Formel bestimmt [Derendorf et al. 2002]:

$$Cl_{bile} = \frac{\Delta A e_{bile} / \Delta t}{C_p}$$

$\Delta A e_{bile} / \Delta t$ ist die pro Zeiteinheit mit der Galle ausgeschiedene Menge des Arzneistoffes. Dieser biliäre Abfluss ergibt sich aus Gallenvolumen (ΔV_{bile}), Gallekonzentration (C_{bile}) und Sammelperiode (Δt) nach :

$$\Delta A e_{bile} / \Delta t = \frac{\Delta V_{bile} \times C_{bile}}{\Delta t}$$

Aus den beiden Gleichungen ergibt sich für die Berechnung der biliären Clearance:

$$Cl_{bile} = \frac{\Delta V_{bile} \times C_{bile}}{\Delta t \times C_p}$$

C_p ist hier die Plasmakonzentration.

Die orale (F) und topische (F*) Bioverfügbarkeit von Selamectin und Ivermectin wurden nach folgenden Formeln errechnet:

$$F_{oral} = \frac{Dosis_{i.v.} \times AUC_{oral\ t=8\ h}}{Dosis_{oral} \times AUC_{i.v.\ t=8\ h}} \times 100\%$$

$$F_{Spot-on} = \frac{Dosis_{oral} \times AUC_{Spot-on\ t=24\ h}}{Dosis_{Spot-on} \times AUC_{oral\ t=24\ h}} \times 100\%$$

Diese Normalisierung war für die Berechnung der Bioverfügbarkeit nach oraler und Spot-on Applikation wegen der unterschiedlichen Zeiträume der Plasmakinetikversuche (8 h nach i.v. Applikation, 24 h nach oraler und 72 h nach Spot-on Applikation) notwendig.

3.5. Gewebeentnahme und Isolierung von Total-RNA

Nach der Tötung der Tiere durch CO₂ wurden Leber, Niere und Gehirn entnommen, zerkleinert, in ein 2 ml vorgewogenes Reaktionsgefäß überführt und schnell in flüssigen Stickstoff gestellt. Die Reaktionsgefäße mit den Gewebe wurden nachgewogen, um die Gewebemenge zu bestimmen, und bei -80°C zur späteren Analyse gelagert. Für die Isolierung von Total-RNA wurde die peqGOLD RNAPure[®]-Methode (peqLab) benutzt. Da das peqGOLD-Reagenz in einer einphasiger Lösung Guanidinisothiocyanat und Phenol enthält, erzielt man eine erhebliche Vereinfachung und Verkürzung der Präparationen („Single-Reagent-Methodik“). Am Tag der RNA-Isolierung wurden die Gewebe aus dem Tiefkühlschrank (-80°C) genommen und in flüssigen Stickstoff überführt. Das Gewebe wurde in peqGOLD (Verhältnis: 1ml peqGOLD pro 50-100 mg Gewebe) gelegt und mit Hilfe eines Rotor-Stator-Homogenisators homogenisiert. Das Salz Guanidinisothiocyanat wirkt als chaotropes Agens, das Zellen lysieren und zugleich RNAsen inaktivieren kann. Das Probenvolumen sollte nicht mehr als 10% des verwendeten peqGOLD-Volumens betragen. Das Homogenisat wurde danach als 1 ml Aliquots in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform je eingesetztem Milliliter peqGOLD zugegeben und für 15 sec kräftig geschüttelt. Anschließend wurde für weitere 3 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben für 5 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Zugabe von Chloroform und der Zentrifugationsschritt führen zu einer Phasentrennung, bei der die RNA in der oberen wässrigen Phase enthalten ist. Die DNA und Proteine verbleiben dagegen in der unteren

organischen Phase und in der Interphase. Die obere Phase wurde abgezogen und in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 500 µl Isopropanol pro eingesetztem Milliliter peqGOLD zugegeben. Die Proben wurden für 5 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie für 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat sollte von gelartiger Konsistenz sein und an der unteren Seite des Röhrchens liegen. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol durch Zentrifugation (10 Minuten) gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in RNase-freiem Wasser gelöst und auf Eis für 30 min resuspendiert. Aliquots eines Gewebes wurden gepoolt und die Konzentration der RNA im Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt. 2 µl der zu messenden Proben wurden in 198 µl ddH₂O verdünnt. Als Leerwert wurden 198 µl ddH₂O plus 2 µl RNase freies Wasser verwendet. Die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) sollte zwischen 0,1 und 1 liegen und der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ größer als 1,8 sein. Die RNA-Proben wurden dann aliquotiert (2 x 5 µl und Rest) und bei -80°C gelagert. Die mit dieser Methode erhaltenen RNA-Proben wurden für die cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR, verwendet.

3.6. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des *Advantage RT-for-PCR* Kits (Clontech). Hierfür wurde Total-RNA aus Geweben (Leber, Niere, Gehirn) von Mäusen und Ratten verwendet. Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT, MMLV: *Moloney-Murine Leukemia Virus*) wurde die proteincodierende mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Primer für die cDNA-Synthese dienten Oligo (dT)₁₈ Primer.

cDNA-Synthese-Ansatz. In einem 0,5 Reaktionsgefäß (*PCR-cups*) wurden 0,2-1 µg Total-RNA mit DEPC-Wasser (wenn nötig) auf ein Volumen von 12,5 µl verdünnt und gemischt. Anschließend wurden die Oligo(dT)₁₈ Primer (1,0 µl) zugegeben. Dieser Ansatz wurde zuerst bei 70°C für 2 min erhitzt. Währenddessen wurden die anderen Synthese-Reagenzien wie folgt zusammengefügt.

cDNA-Synthese-Ansatz (Master-Mix)

5 X Reaction Buffer	4,0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl
Recombinant RNase Inhibitor	0,5 µl
MMLV Reverse Transcriptase	1,0 µl

Danach wurden die Proben mit dem Master-Mix gemischt und weiter inkubiert.

cDNA-Synthese-Verlauf.

Synthese	42°C	60 min
Stoppen der Reaktion	94°C	5 min

Die Proben wurden mit 80 µl DEPC-Wasser auf 100 µl verdünnt, in 10 µl Aliquots aufgeteilt und bei -70°C gelagert.

3.7. Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR wurde mittels des Applied Biosystems PRISM 7300 Real-Time PCR Systems mit TaqMan Gene Expression Assays (s. Tab. 3.2) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als endogene Kontrolle diente β -Actin. Die Expression jedes Gens wurde pro Gewebe in Dreifachbestimmung in 96-well Platten untersucht. Pro Ansatz wurden 5 µl cDNA, 1,25 µl TaqMan Gene Expression Assay, 12,5 µl von TaqMan Universal PCR Master Mix und 6,25 µl von ddH₂O verwendet (25 µl Volumen pro Reaktion). Die PCR-Reaktion lief über 40 Zyklen mit einem 2-Temperaturschema von 95°C x 15 sec und 60°C x 60 sec. Zur relativen Quantifizierung der Genexpression wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode [Livak & Schmittgen 2001, Geyer et al. 2007] verwendet.

Tab. 3.2. TaqMan Assays von Maus und Ratte für die quantitative real-time PCR

TaqMan Assay	Maus-Gen		TaqMan Assay	Ratten-Gen	
	ABI Nr	systematisch alias		ABI Nr	systematisch alias
Mm01344332_m1	Abcc1	Mrp1	Rn01465702_m1	Abcc4	Mrp4
Mm01226387_m1	Abcc4	Mrp4	Rn00561753_m1	Abcb1	Mdr1
Mm00457295_m1	Slc22a2	Oct2	Rn00710585_m1	Abcg2	Bcrp
Mm00440736_m1	Abcb1b	Mdr1b	Rn00562250_m1	Slc22a1	Oct1
Mm00440761_m1	Abcb1a	Mdr1a	Rn00580893_m1	Slc22a2	Oct2
Mm00453126_m1	Slco1a4	Oatp2 (Oatp1a4)	Rn00582179_m1	Abcb11	Bsep
Mm00551550_m1	Abcc3	Mrp3	Rn01427754_m1	Slco4c1	Oatp4c1
Mm00496899_m1	Abcc2	Mrp2	Rn00568143_m1	Slc22a6	Oat1
Mm00649796_m1	Slco1a1	Oatp1 (Oatp1a1)	Rn00580082_m1	Slc22a8	Oat3
Mm00496364_m1	Abcg2	Bcrp	Rn00667869_m1	β -actin	β -actin
Mm00456303_m1	Slc22a1	Oct1	Rn00581304_m1	Slco1a4	(Oatp4) Oatp1b2
Mm00445168_m1	Abcb11	Bsep	Rn00589786_m1	Abcc3	Mrp3
Mm00451514_m1	Slco1b2	Oatp4 (Oatp1b2)			
Mm00607939_s1	β actin	β -actin			

3.7.1. Statistische Analyse

Signifikanzen wurden mit dem Computerprogramm GraphPad Prism Version 4.0 (GraphPad Software Inc., San. Diego CA, 2003) berechnet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

Die Verwendung von TR(-) Ratten in der biomedizinischen Forschung zur Untersuchung der hepatobiliären Elimination und Metabolisierung von Arznei- und Fremdstoffen ist als gut etabliert anzusehen (siehe Einleitung). Mit Hilfe dieses MRP2-defizienten Tiermodelles kann jedoch nur die Interaktion von Arzneistoffen bzw. Arzneistoffmetaboliten mit dem MRP2 Transportsystem untersucht werden. Da es sich bei der TR(-) Ratte aber um einen natürlich aufgetretenen Mutationsstamm der Wistar Ratte handelt, steht dieses Tiermodell schon seit vielen Jahren zur Verfügung. Die erst in jüngerer Vergangenheit generierten Knockout-Mäuse *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) bieten die Möglichkeit nun auch die Rolle der Effluxtransporter MDR1 und BCRP für die hepatobiliäre Elimination von Arznei- und Fremdstoffen zu untersuchen. Allerdings lässt sich die Technik der Gallegewinnung, welche bei der Ratte über eine Gallengangsfistel erfolgt, nicht direkt auf die Maus übertragen, da diese eine Gallenblase trägt. Das erste Ziel dieser Arbeit war es daher eine Operationstechnik zu entwickeln, mit welcher es möglich ist, die Arzneistoffelimination in die Galle auch bei der Maus zu messen. In den anschließenden Vorversuchen wurden dann drei wesentliche Fragen aufgegriffen, welche für die Eignung der *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse für entsprechende Versuche zur Galleausscheidung entscheidend sind: (I) Ist der Gallefluss zwischen den Knockout- und den Wildtyp-Mäusen vergleichbar (siehe 4.1)? (II) Werden, abgesehen von dem ausgeschalteten Effluxtransporter, die übrigen ABC-Transporter in der kanalikulären Membran der Hepatozyten funktionell exprimiert bzw. lässt sich deren Transportleistung funktionell messen (siehe 4.2 und 4.3)? Und (III), kommt es durch die Target-Ausschaltung zur kompensatorischen Veränderung in der Expression anderer Arzneistofftransporter in Leber, Niere und Gehirn, welche die Versuchsergebnisse verfälschen könnten (siehe 4.4)?

4.1. Gallefluss bei Ratten und Mäusen

Unter den angegebenen experimentellen Bedingungen war es möglich, einen kontinuierlichen Gallefluss über einen Zeitraum von mehr als 2 Stunden bei Ratten und mehr als 90 min bei Mäusen zu messen. Die gesammelten Einzelproben hatten bei den Ratten ein wesentlich konstanteres Volumen als bei den Mäusen (Abb. 4.2 und 4.1). Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Ratte direkt der Gallengang kanuliert wurde und damit eine kontinuierlicher Gallefluss gemessen werden konnte, während bei den Mäusen operativ die Gallenblase punktiert wurde (Einzelheiten unter 3.2).

4.1.1. Gallefluss bei Ratten mit Gallengangsfistel

Wie bereits aus der Literatur bekannt war [Paulusma et al. 1999, Lischka et al. 2003], zeigten sich zwischen Wistar- und TR(-)-Ratten erhebliche Unterschiede im Gallefluss. Während bei den Wistar-Ratten nach 120 min ein kumulatives Gallenvolumen von $1092 \pm 23 \mu\text{l}$ zu messen war, betrug dieses für die TR(-)-Ratte nur etwa die Hälfte mit $690 \pm 53 \mu\text{l}$ (Abb. 4.1B). Die Geschwindigkeit des Galleflusses lag für die Wistar-Ratten bei $13 \pm 3,3 \mu\text{l}/\text{min}$ und für die TR(-)-Ratten bei $6 \pm 1,8 \mu\text{l}/\text{min}$ (Abb. 4.1A).

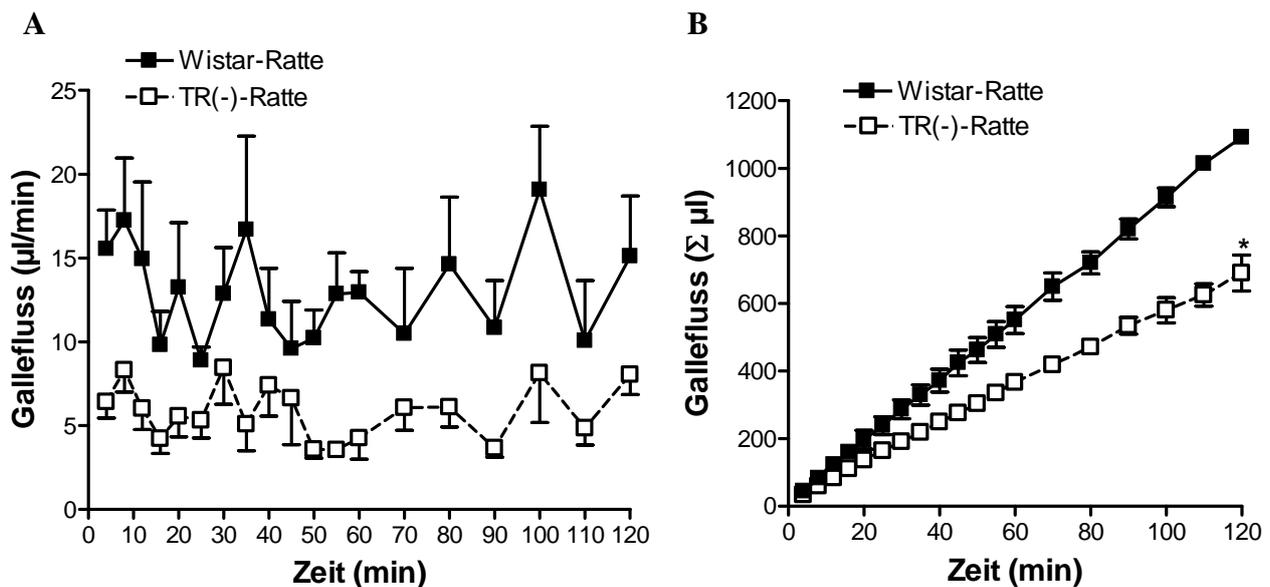


Abb. 4.1: **A**, Kontinuierlicher Gallefluss bei Ratten über die Gallengangsfistel. Im Zeitraum $t = 0$ bis $t = 20$ min wurden alle 4 min Galleproben gesammelt, von $t = 20$ bis $t = 60$ min in 5-Minuten-Intervallen, von $t = 60$ bis $t = 120$ in 10-Minuten-Intervallen. **B**, Kumulativer Gallefluss über 120 min. Bis zum Versuchsende nach 120 min wurden von den TR(-)-Ratten durchschnittlich $690 \mu\text{l}$ Galle und von den Wistar-Ratten $1092 \mu\text{l}$ Galle ausgeschieden und gesammelt. * $p < 0,001$

4.1.2. Gallefluss bei Mäusen mit Gallenblasenfistel

Der Gallefluss war bei den Mäusen über 90 min kontinuierlich messbar. Dabei traten keine Unterschiede im Gallefluss zwischen den *bcrp1* (-/-) Knockout-, *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen und FVB Wildtyp-Mäusen auf (Abb. 4.2A,B). Die Geschwindigkeit des Galleflusses lag für die *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse bei $1,87 \pm 0,33 \mu\text{l}/\text{min}$, für die *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse bei $1,74 \pm 0,29 \mu\text{l}/\text{min}$ und für die Wildtyp-Mäuse bei $1,84 \pm 0,23 \mu\text{l}/\text{min}$. Der Variationskoeffizient (COV) lag für diese Versuche bei 17% für die Knockout-Tiere und bei 11% für die Wildtyp-Mäuse. Der kumulative Gallefluss betrug durchschnittlich $152 \mu\text{l}$ bei den Knockout-Mäusen und $157 \mu\text{l}$ bei den Wildtyp-Mäusen (Abb. 4.1B).

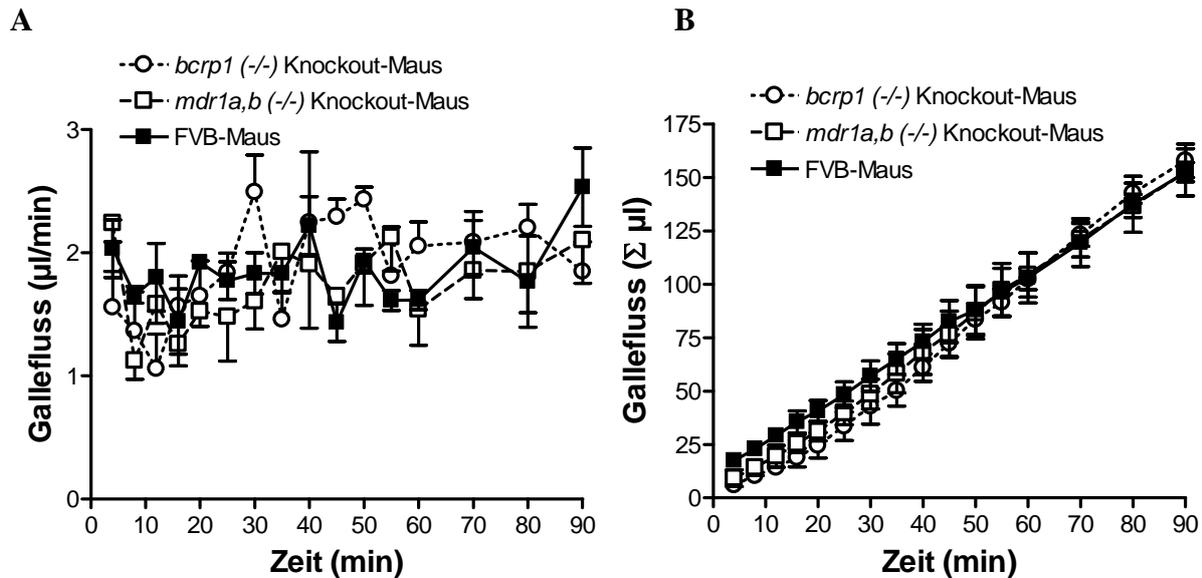


Abb. 4.2: **A**, Kontinuierlicher Gallefluss über die Gallenblasenfistel bei der Maus. Im Zeitraum $t = 0$ bis $t = 20$ min wurden alle 4 min Galleproben gesammelt, von $t = 20$ bis $t = 60$ min in 5-Minuten-Intervallen, von $t = 60$ bis $t = 90$ in 10-Minuten-Intervallen. **B**, Kumulativer Gallefluss über 90 min. Bis zum Versuchsende nach 90 min wurden durchschnittlich 152 µl Galle von den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen, 157 µl Galle von den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen und 152 µl Galle von den Wildtyp-Mäusen ausgeschieden und gesammelt.

4.2. *In situ* Galleausscheidung von [³H]Taurocholat bei Mäusen mit Gallenblasenfistel

Der Transport von Gallensäuren wie Taurocholat an der kanalikulären Membran der Hepatozyten erfolgt hauptsächlich über die *bile salt export pump* Bsep. Zur Klärung, ob in der Leber der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse Bsep noch funktionell exprimiert wird, wurden nach Applikation von [³H]Taurocholat Galleproben genommen und analysiert und schließlich die Ausscheidung von [³H]Taurocholat in die Galle im Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen untersucht.

Gallefluss nach Applikation von [³H]Taurocholat

Der Gallefluss war in beiden Tiermodellen über 90 min kontinuierlich messbar (Abb. 4.3 A). Die Geschwindigkeit des Galleflusses betrug $2,12 \pm 0,52$ µl/min bei den Wildtyp FVB-Mäusen und $1,99 \pm 0,70$ µl/min bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen. In der kumulativen Darstellung dieser Daten ergaben sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen (Abb. 4.3 B). Während des gesamten 90-minütigen Versuchs war die Summe der ausgeschiedenen Gallenmenge mit 182 ± 32 µl bei den Knockout-Mäusen und 191 ± 23 µl bei den FVB-Mäusen vergleichbar (Abb. 4.3 B). Die Gallebildung war nach Applikation von

Taurocholeat aufgrund des Gallensäure-abhängigen Galleflusses erwartungsgemäß größer als bei den Kontrolltieren (siehe Abb. 4.2).

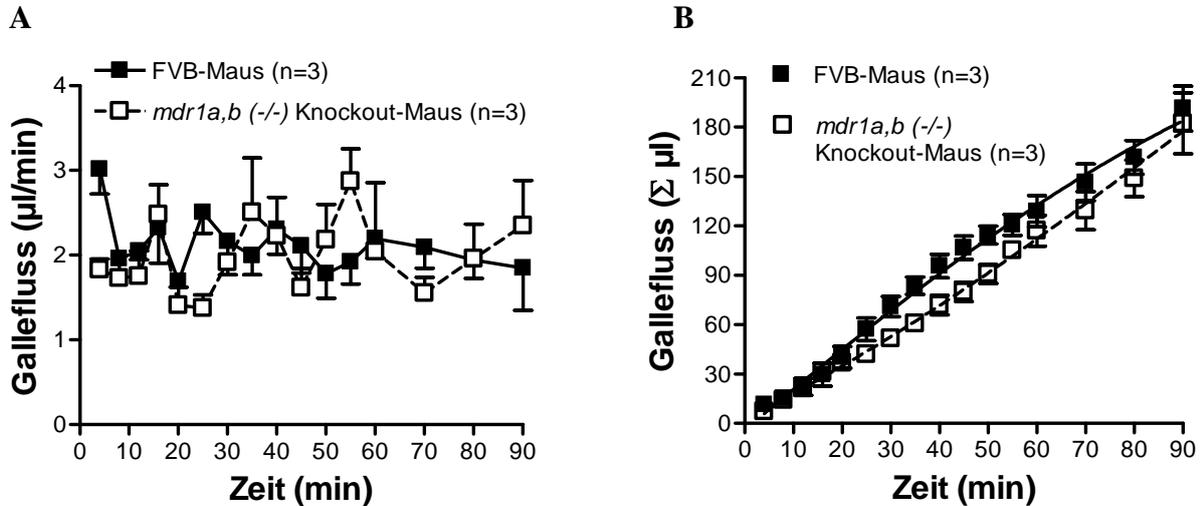


Abb. 4.3: **A**, Kontinuierlicher Gallefluss über die Gallenblasenfistel nach Applikation von [^3H]Taurocholeat. Im Zeitraum $t = 0$ bis $t = 20$ min wurden alle 4 min Galleproben gesammelt, von $t = 20$ bis $t = 60$ min in 5-Minuten-Intervallen, von $t = 60$ bis $t = 90$ in 10-Minuten-Intervallen. **B**, Kumulativer Gallefluss über 90 min. Bis zum Versuchsende nach 90 min wurden von den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen durchschnittlich 182 µl Galle und von den FVB Wildtyp-Mäusen 191 µl Galle ausgeschieden und gesammelt.

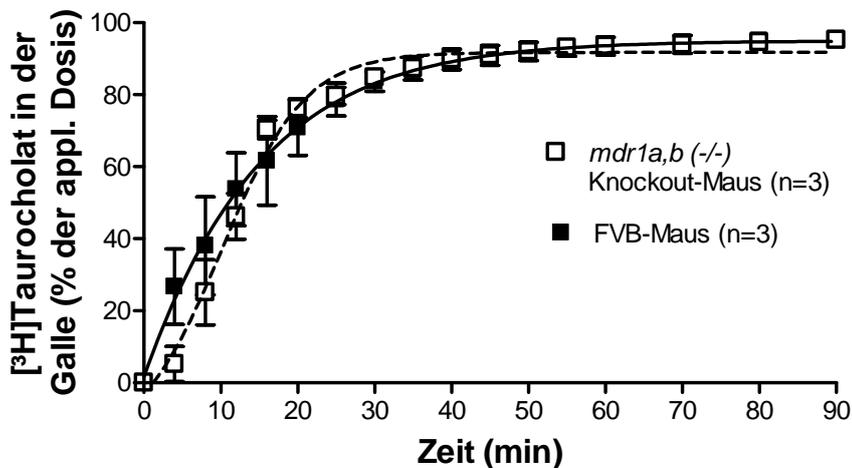


Abb. 4.4: Kumulative Galleausscheidung von [^3H]Taurocholeat nach i.v. Applikation bei FVB-Mäusen und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen.

Hepatobiliäre Ausscheidung von [^3H]Taurocholeat

[^3H]Taurocholeat wurde in den gesammelten Galleproben mittels Flüssigszintillationszähler bestimmt. Bereits 4 min nach Applikation konnte die Substanz in großen Mengen sowohl bei Wildtyp- als auch bei Knockout-Tieren in der Galle nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Galleausscheidung von [^3H]Taurocholeat keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Mausstämmen (Abb. 4.4). Etwa 45 min nach der i.v. Applikation von [^3H]Taurocholeat wurden bereits über 95% der applizierten Dosis [^3H]Taurocholeat mit der Galle ausgeschieden.

Aus diesem Versuch kann gefolgert werden, dass Bsep in der Leber der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus funktionell exprimiert wird.

4.3. *In situ* Galleausscheidung von [³H]DHEAS bei Mäusen mit Gallenblasenfistel

Neben Bsep wird die Effluxtransporter Mrp2 in der kanalikulären Membran der Hepatozyten exprimiert; dieses Transportsystem ist an der hepatobiliären Elimination von Arznei- und Fremdstoffen beteiligt. Eine endogene Substanz, welche von Mrp2 Efflux-Pumpe als Substrat erkannt wird, ist DHEAS. Analog zu den Ausscheidungsversuchen mit [³H]Taurocholat sollte diese Substanz zur Überprüfung der funktionellen Expression von Mrp2 in der Leber der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse sowie von Mdr1 und Mrp2 in der Leber der *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse dienen.

Gallefluss nach Applikation von [³H]DHEAS

Der Gallefluss war nach Applikation von DHEAS mit $171 \pm 4,8 \mu\text{l}$ bei den FVB-Mäusen und $184 \pm 37,6 \mu\text{l}$ bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen sowie $158 \pm 13,8 \mu\text{l}$ bei den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen vergleichbar (Abb. 4.8).

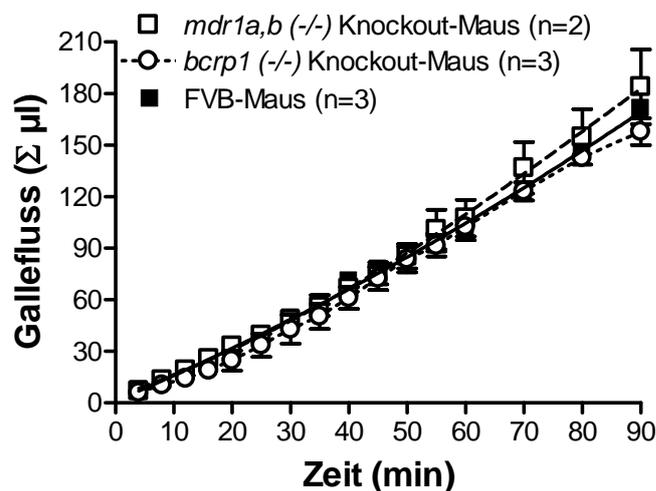


Abb. 4.5: Kumulativer Gallefluss über 90 min nach intravenöser Applikation von $0,2 \mu\text{g/kg}$ [³H]DHEAS. Bis zum Versuchsende nach 90 min wurden von den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen durchschnittlich $184 \mu\text{l}$ Galle, von den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen $158 \mu\text{l}$ und von den FVB-Mäusen $171 \mu\text{l}$ Galle ausgeschieden.

Hepatobiliäre Ausscheidung von [³H]DHEAS

Das [³H]-markierte DHEAS wurde mit einer Dosierung von 0,2 µg/kg Körpergewicht in die Schwanzvene appliziert. Die Ausscheidungskurven aller Mausstämme zeigten keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4.6 A). Die maximalen Ausscheidungen lagen für die FVB-Maus bei 3,74 fmol/min/g KG sowie für die *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus bei 4,95 fmol/min/g KG in der 40. Minute, für die *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus bei 4,30 fmol/min/g KG in der 55. Minute. Bei Betrachtung der kumulativen Datendarstellung fällt auf, dass bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen nach 90 min 41% der applizierte Radioaktivität in der Galle detektiert wurde, bei den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen waren dies 39% und bei den Wildtyp-Mäusen 34% (Abb. 4.6).

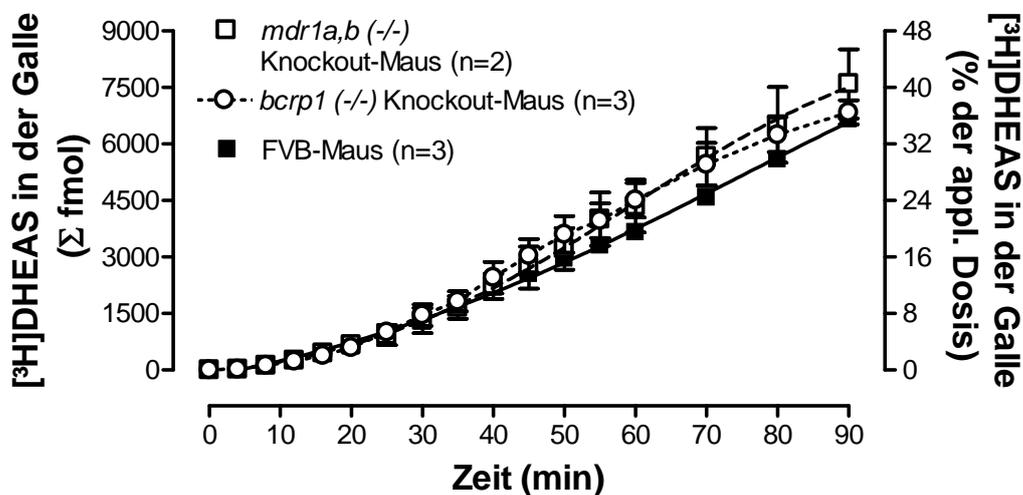


Abb. 4.6: Galleausscheidung von [³H]DHEAS nach intravenöser Applikation von 0,2 µg/kg über 90 Minuten bei Wildtyp sowie *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen in kumulativer Darstellungen.

Aufgrund der vorliegenden Daten wird deutlich, dass die *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus eine hepatobiliäre Elimination von Taurocholat und DHEAS aufweist, welche mit der der FVB Wildtyp-Maus equivalent ist. Dies deutet auf eine funktionell gleichwertige Expression der Effluxtransporter Mrp2, Bcrp und Bsep in der Leber beider Mausstämme hin. Eine kompensatorische Verschiebung der funktionellen Eliminationsfähigkeit nach dem Ausfall des Mdr1a/b Transportsystems in der Leber kommt damit entweder nicht zum Tragen oder hat für die verwendeten Markersubstrate Taurocholat und DHEAS keine Bedeutung. Auch die hepatobiliäre Elimination bei den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen von DHEAS zeigt keine Unterschiede zur Wildtyp-Tieren, was auf eine funktionell gleichwertige Expression der Effluxtransporter Mrp2 in der Leber beider Mäusestämme hindeutet. Da diese Schlussfolgerung allein auf der Analyse der funktionellen Ausscheidungskinetiken basiert,

wurde in einem nächsten Schritt eine systematische Genotypisierung der wichtigsten Arznei- und Fremdstofftransporter bei beiden Mausstämmen durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob es bei der *mdr1a,b* (-/-) oder der *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus auf Ebene der proteinkodierenden RNA durch die zielgerichtete Deletion der entsprechenden Gene zu einer kompensatorischen Up- oder Downregulation der Expression anderer Transportsysteme gekommen ist.

4.4. Expression wichtiger Arzneistofftransportern in Leber, Niere und Gehirn von *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen sowie TR(-) Ratten

Die Expressionsprofile der wichtigsten Arzneistofftransporter bei den *mdr1a, b*(-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen sind bisher kaum charakterisiert oder in der Literatur widersprüchlich dargestellt (siehe Kapitel 2 und 5). Deswegen sollte das Expressionsmuster der Phase 0 Transporter Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2, Oct1 und Oct2 sowie der Phase IV Transporter Mrp1, Mrp2, Mrp3, Mrp4, Mdr1a, Mdr1b, Bcrp und Bsep bei beiden Knockout-Linien mit Hilfe der Real-time PCR systematisch untersucht werden. Das relative Expressionsniveau dieser Transporter wurde wie folgt bewertet:

- $\leq 0,5$ Downregulation des Zielgens bei der Knockout-Maus
- $0,5 < 2,0$ vergleichbare Expression des Zielgens wie bei der Wildtyp-Maus
- $\geq 2,0$ Upregulation des Zielgens bei der Knockout-Maus
- $\geq 5,0$ deutliche Überexpression des Zielgens bei der Knockout-Maus

4.4.1. Genotypisierung der *mdr1a,b*(-/-) und *bcrp1*(-/-) Knockout-Mäuse

Leber

Generell wurden auf Ebene der mRNA bei beiden untersuchten Knockout-Mäusen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Arzneistofftransporter gefunden (Abb. 4.7). Die stärkste Expression zeigten in der Mausleber die Oatp-Carrier Oatp1b2, Oatp1a1, Oatp1a4 und Oct1 sowie die ABC-Carrier Mrp2, Mrp3, Bcrp und Bsep. Mdr1a, Mdr1b, Mrp1 und Mrp4 wurden dagegen relativ schwach in der Leber exprimiert (Abb. 4.7).

Niere

Auch in den Nieren wurden keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression der wichtigsten Arzneistofftransporter zwischen den beiden Knockout-Mausstämmen und FVB Wildtyp-Mäusen festgestellt (Abb. 4.8). In der Mausniere werden Oct1, Oct2, Oatp1a1 und Bcrp am stärksten exprimiert (Abb. 4.8). Die Carrier aus der Gruppe der ABC-Transporter sind mit Ausnahme von Bcrp und Mrp2 in der Niere der Maus relativ schwach exprimiert. Die schwächste Expression wurde für Oatp1a4 beobachtet.

Gehirn

Im Gehirn wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Expression der wichtigsten Arzneistofftransporter, welche an der Ausprägung der funktionellen Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, festgestellt (Abb. 4.9), allerdings mit Ausnahme der Expression des Bcrp Transporters: Bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout Maus ergab sich eine 2,3-fach signifikant erhöhte Expression. Im Unterschied zur Leber und zu den Nieren zeigten im Gehirn Mdr1a, Mrp1, Bcrp und Mrp4 die stärkste Expression. Oatp1a4 ist im Gehirn der am stärksten exprimierte Aufnahme-Carrier, gefolgt von Oct2. Oct1 wird im Gehirn bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus um den Faktor 9 schwächer als bei der Wildtyp-Maus exprimiert (Abb. 4.9). Der am schwächsten exprimierte Transporter im Gehirn bei der Maus ist Oatp1a1.

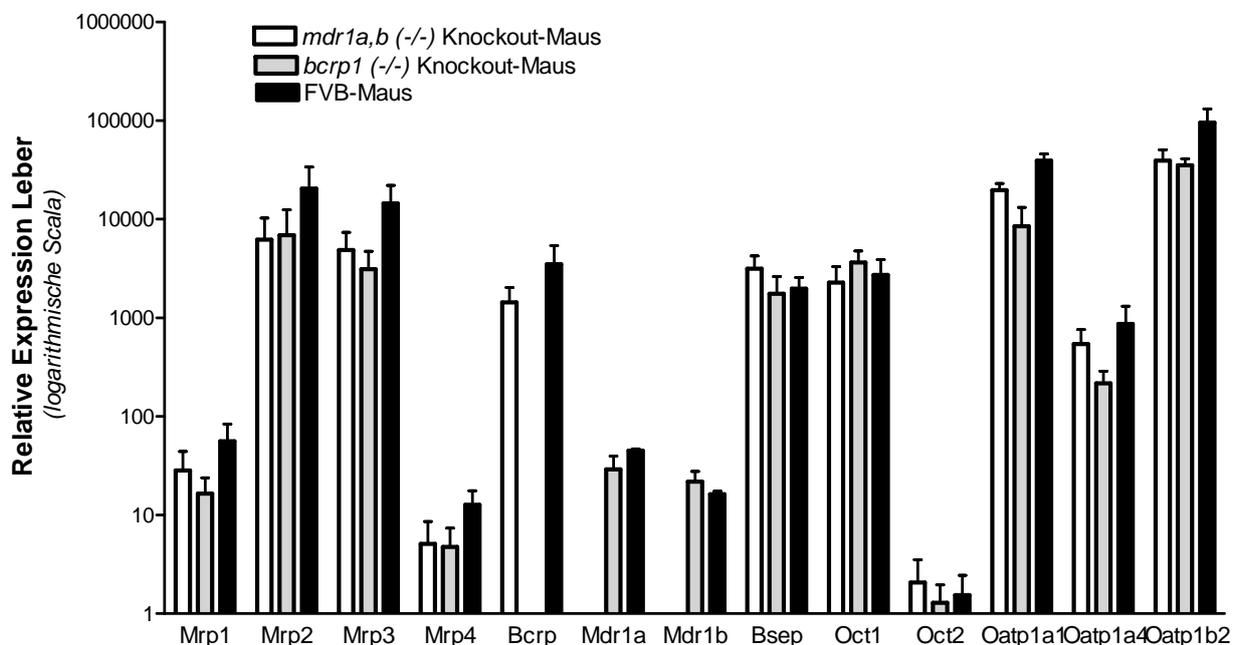


Abb. 4.7: Relative Expression von Arznei- und Fremdstofftransportern in der Leber bei *mdr1a,b* (-/-), *bcrp1* (-/-) Knockout- und FVB Wildtyp-Mäusen. Calibrator für die relative Expression war der am schwächsten exprimierte Transporter (Oct2). Die Expression der untersuchten Transporter wurde ins Verhältnis zur Expression des Housekeepers β -Actin gesetzt. Für die Auswertung wurden 3 Tiere pro Gruppe eingesetzt.

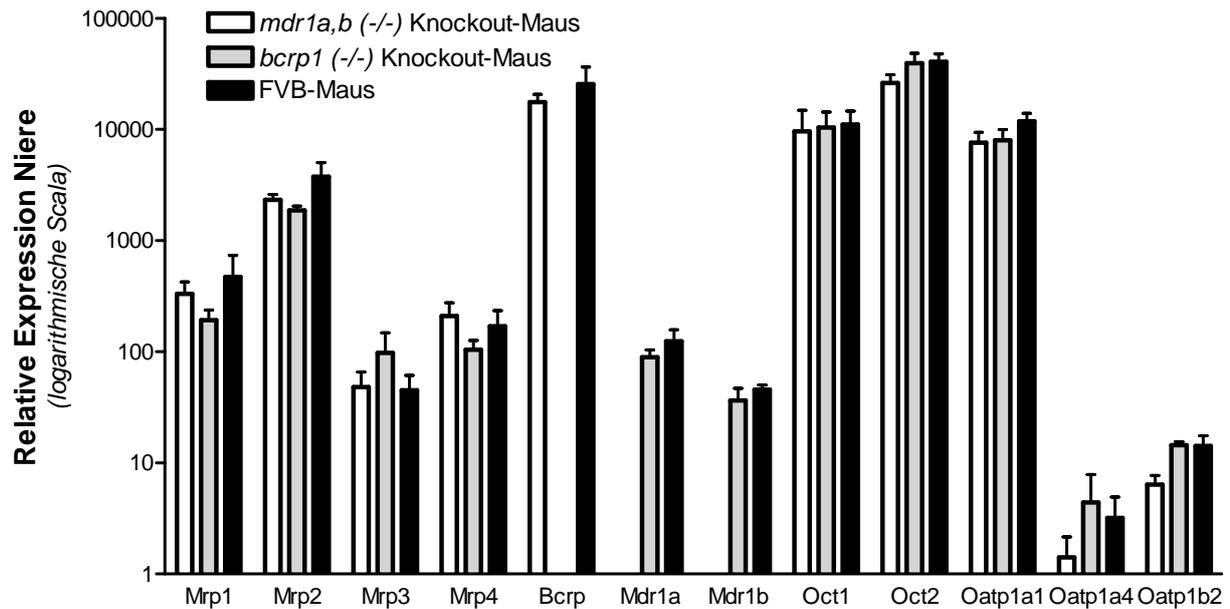


Abb. 4.8: Relative Expression von Arznei- und Fremdstofftransportern in den Nieren bei *mdr1a,b* (-/-), *bcrp1* (-/-) Knockout- und FVB Wildtyp-Mäusen. Calibrator für die relative Expression war der am schwächsten exprimierte Transporter (Oatp1a4). Die Expression der untersuchten Transporter wurde ins Verhältnis zur Expression des Housekeepers β -Actin gesetzt. Für die Auswertung wurden 3 Tiere pro Gruppe eingesetzt.

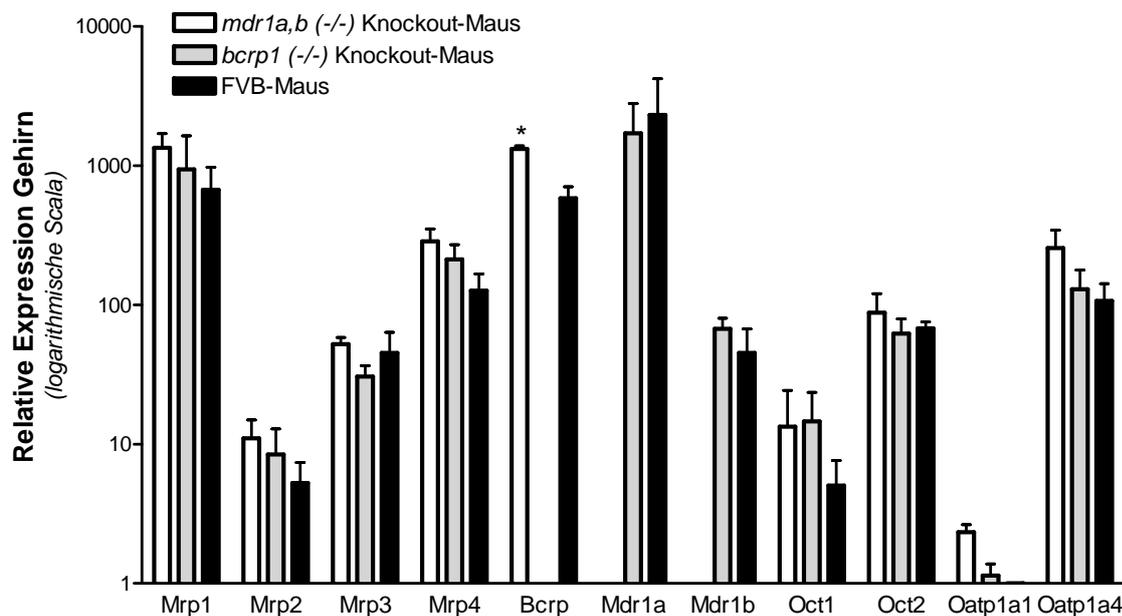


Abb. 4.9: Relative Expression von Arznei- und Fremdstofftransportern im Gehirn bei den *mdr1a,b* (-/-), *bcrp1* (-/-) Knockout- und FVB Wildtyp-Mäusen. Calibrator für die relative Expression war der am schwächsten exprimierte Transporter (Oatp1a1). Die Expression der untersuchten Transporter wurde ins Verhältnis zur Expression des Housekeepers β -Actin gesetzt. Für die Auswertung wurden 3 Tiere pro Gruppe eingesetzt. * $p < 0,01$ *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus vs. FVB-Maus.

4.4.2. Genotypisierung der TR(-) Ratten

Leber

In der Leber der TR(-) Ratte wurde eine signifikante Hochregulation der Transporter Mrp3 und Mrp4 beobachtet: Mrp3 wird bei der TR(-) Ratte 23-fach und Mrp4 5-fach höher exprimiert im Vergleich zu den Wildtyp Wistar-Ratten (Abb. 4.10). Andere Arzneistofftransporter wie Mdr1, Bcrp, Bsep, Oatp1a4, Oatp1b2, Oct1 und Oct2 wiesen dagegen keine Unterschiede in der Expression zwischen den beiden Rattenstämmen auf (Abb. 4.10).

Die stärkste Expression in der Leber zeigten bei beiden Rattenstämmen Bsep, gefolgt von Oatp1b2, Oct1 und Oatp1a4 (Abb. 4.10). Die Efflux-Carrier Bcrp, Mrp4, Mrp3 und Mdr1 zeigten dagegen eine relativ schwache Expression in der Leber. Am schwächsten ist Oct2 exprimiert. Da analog auch in der Leber der Maus Oct2 äußerst schwach vorkommt, hat dieser Carrier bei den murinen Spezies vermutlich keine große Bedeutung für die hepatogene Elimination von Arzneistoffen. Statt dessen wird Oct2 in der Niere stark exprimiert.

Niere

In den Nieren wurden für die Carrierexpression keine signifikanten Unterschiede zwischen TR(-) Ratten und Wistar-Ratten festgestellt (Abb. 4.11). Im Gegensatz zur Leber zeigten in den Rattennieren Oct2, Oct1, Oat1 und Oat3 die stärkste Expression. Die Oat-Carrier wurden allerdings bis zu 3-fach höher bei den Wistar-Ratten im Vergleich zu den TR(-) Ratten exprimiert (Abb. 4.11). Bei den Oatp-Transportern wurde die stärkere Expression für Oatp4c1 gemessen. Insgesamt zeigten die ABC-Transporter in den Nieren eine schwächere Expression als die Aufnahme-carrier (Abb. 4.11). Von allen ABC-Carriern werden in der Niere Bcrp und Mrp4 am stärksten exprimiert.

Gehirn

Auch im Gehirn wurde für die meisten Transporter keine Dysregulation in der Expression bei der TR(-) Ratte im Vergleich zu der Wistar-Ratte beobachtet (Abb. 4.12). Allerdings werden Oct1 und Oct2 bei der TR(-) Ratte signifikant höher (bis zu 8-fach) im Vergleich zum Wildtyp exprimiert (Abb. 4.12). Am stärksten waren im Gehirn der Ratten Oatp1a4, Mrp4 und Bcrp exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigte der Mdr1 Transporter bei der Ratte eine sehr

schwache Expression, welche zudem deutlich unter der Mdr1 Expression im Gehirn der Maus liegt.

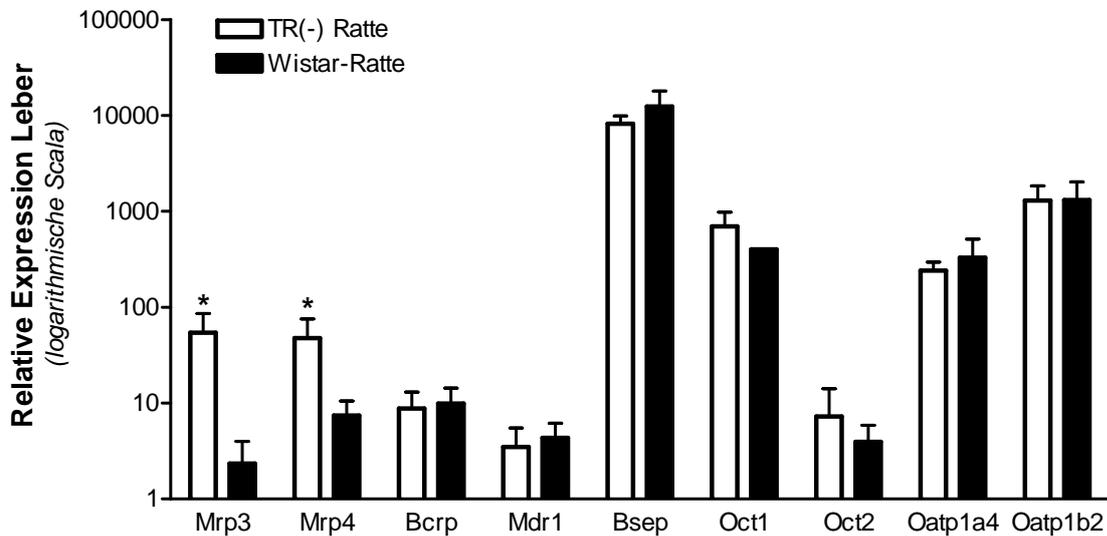


Abb. 4.10: Relative Expression von Arznei- und Fremdstofftransportern in der Leber bei TR(-) und Wistar-Ratten. Calibrator für die relative Expression war der am schwächsten exprimierte Transporter (Oct2). Die Expression der untersuchten Transporter wurde ins Verhältnis zur Expression von β -Actin gesetzt. Für die Auswertung wurden 3 Tiere pro Gruppe eingesetzt. * $p < 0,01$ Wistar-Ratte vs. TR(-) Ratte.

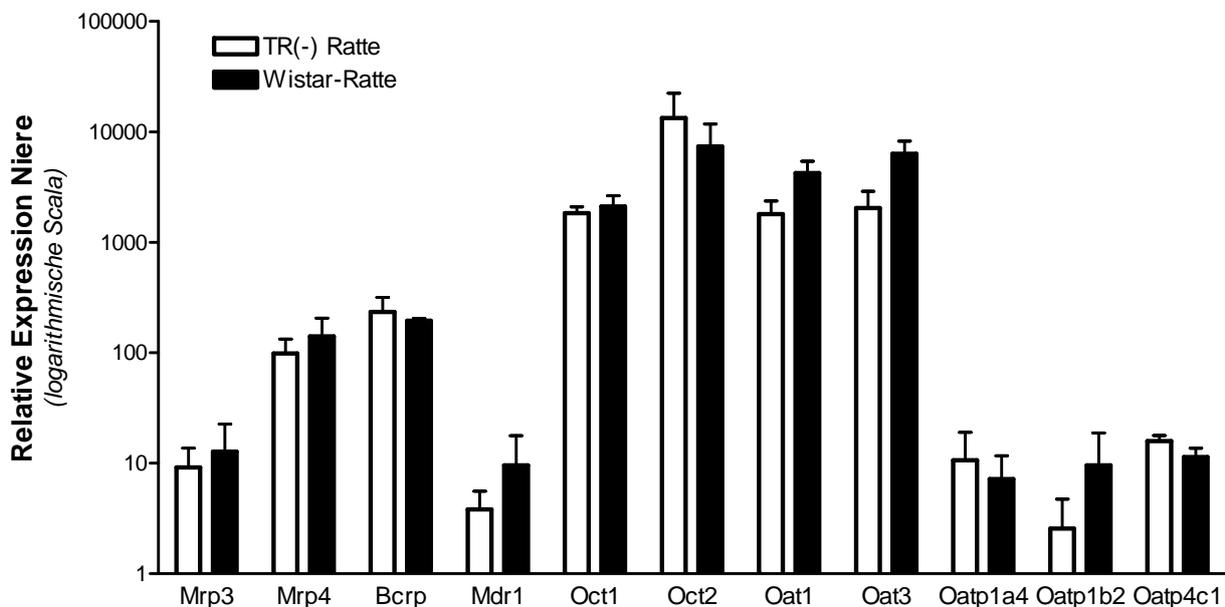


Abb. 4.11: Relative Expression von Arznei- und Fremdstofftransportern in den Nieren bei TR(-) und Wistar-Ratten. Calibrator für die relative Expression war der am schwächsten exprimierte Transporter (Oatp1b2). Die Expression der untersuchten Transporter wurde ins Verhältnis zur Expression von β -Actin gesetzt. Für die Auswertung wurden 3 Tiere pro Gruppe eingesetzt.

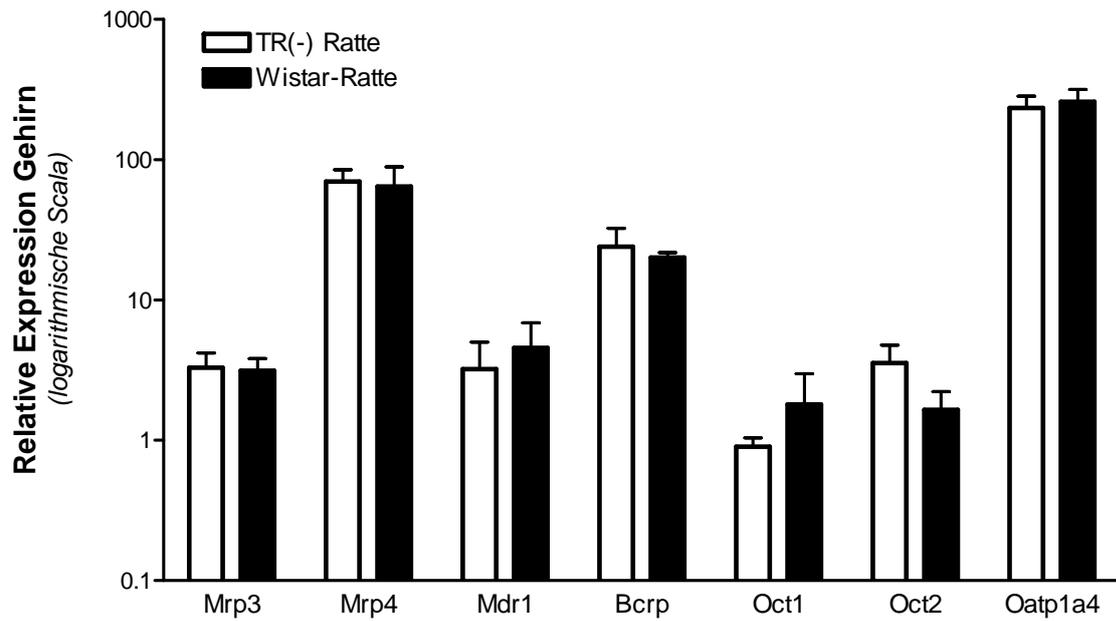


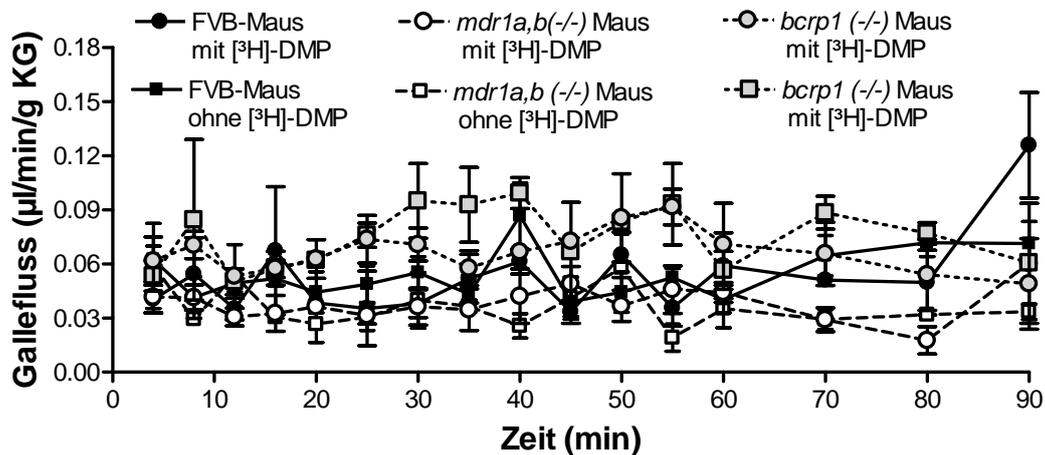
Abb. 4.12: Relative Expression von Arznei- und Fremdstofftransportern im Gehirn bei TR(-) und Wistar-Ratten. Calibrator für die relative Expression waren der am schwächsten exprimierte Transporter (Oct1). Die Expression der untersuchten Transporter wurde ins Verhältnis zur Expression von β -Actin gesetzt. Für die Auswertung wurden 3 Tiere pro Gruppe eingesetzt.

4.5. *In situ* Galleausscheidung, Pharmakokinetik und Gehirnpenetration von Arznei- und Fremdstoffen

Nach der Etablierung und funktionellen Überprüfung der *in situ* Gallegewinnung bei der Maus wurden in einem zweiten Schritt Galleausscheidungsexperimente mit Versuchssubstanzen durchgeführt. Dabei handelte es sich zunächst um das Pilztoxin Phalloidin und den Arzneistoff Ouabain. Für beide Substanzen gab es bisher keinen experimentellen Beweis dafür, welches Transportsystem in der kanalikulären Membran der Hepatozyten an der hepatobiliären Elimination beteiligt ist. Im Falle des Phalloidins existieren aber bereits Hinweise aus *in vitro* Versuchen, welche auf einen Transport durch Mrp2 hindeuten. Für beide Substanzen zeigte sich ein hoch signifikanter Abfall in der Galleausscheidung bei Fehlen des Mrp2-Transportsystems bei der TR(-) Ratte, während bei Galleausscheidungsversuchen an den *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden konnte. Diese Versuche unterstreichen die wichtige Rolle des Mrp2-Systems für die hepatobiliäre Elimination von Arznei- und Fremdstoffen und zeigen zudem erstmals, dass Mdr1 und Bcrp *in vivo* nicht am Transport von Phalloidin und Ouabain beteiligt sind. Unter Verwendung eines klassischen Mdr1-Substrates, Digoxin, sollte dann geklärt werden, welche Rolle dem Mdr1-System überhaupt für den Arzneistofftransport in der Leber zukommt. Mdr1 zeigt nämlich in der Leber, verglichen mit Mrp2, eine vergleichsweise niedrige Expressionrate bei Ratte und Maus. Im Gegensatz dazu ist Mdr1 aber, zumindest bei der Maus, der dominante Effluxtransporter im Gehirn. Wie erwartet zeigte sich bei diesen Versuchen, dass bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus die hepatobiliäre Elimination tatsächlich niedriger ausfällt als bei der Wildtyp-Maus. Weitaus deutlichere Unterschiede in der Pharmakokinetik des Digoxin ergaben sich zwischen beiden Genotypen aber in der Gehirnpenetration. So kam es bei der *mdr1a,b* (-/-) zu einer signifikanten Anreicherung von Digoxin im ZNS. Diese Versuche belegen, dass Mdr1, anders als Mrp2, weniger eine Bedeutung für die hepatobiliäre Elimination von Arznei- und Fremdstoffen hat, dafür aber einen entscheidenden Faktor für die Penetration der Blut-Hirn-Schranke darstellt. Deutlicher als beim Digoxin wurde dieser Zusammenhang noch bei der Untersuchung des MDR1-Substrates Ivermectin, welches sich in seiner Galleausscheidung kaum zwischen den Genotypen *mdr1a,b* (-/-) und dem Wildtyp unterscheidet, das Fehlen von Mdr1 in der Blut-Hirn-Schranke aber zu einer dramatischen Anreicherung der Substanz im Gehirn führt.

Gallefluss nach $[^3\text{H}]$ -DMP Applikation im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden, sodass eine DMP-induzierte Cholestase bei der verwendeten niedrigen Dosierung ausgeschlossen werden kann (Abb. 4.14 A, B).

A



B

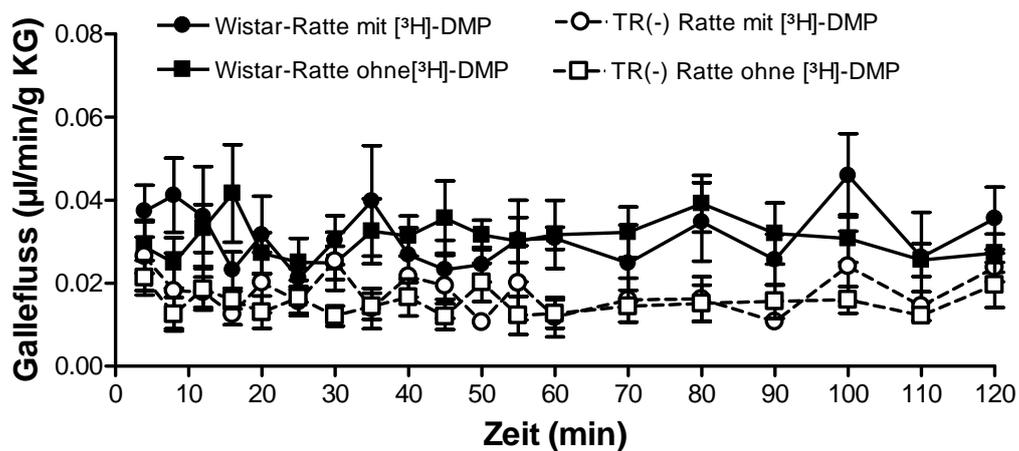


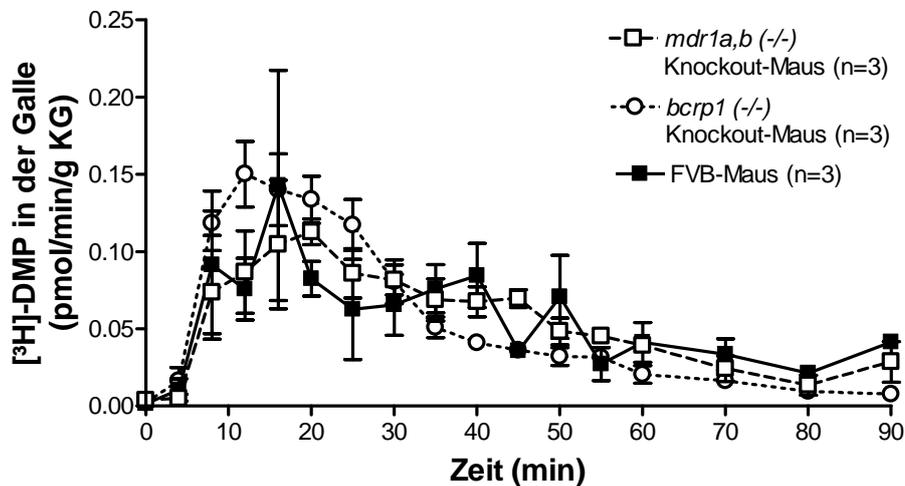
Abb. 4.14: **A**, Gallefluss der FVB Wildtyp-Mäuse, *mdr1a,b*(-/-) und *bcrp1*(-/-) Knockout-Mäuse mit und ohne i.v. Applikation von $[^3\text{H}]$ -Demethylphalloin ($[^3\text{H}]$ -DMP). **B**, Gallefluss bei Wistar- und TR(-) Ratten mit und ohne i.v. Applikation von $[^3\text{H}]$ -DMP.

Hepatobiliäre Ausscheidung von $[^3\text{H}]$ Demethylphalloin bei der Maus

Das in die Leber anflutende $[^3\text{H}]$ -DMP wurde bei allen untersuchten Tieren bereits nach 8 min in großer Menge mit der Galle ausgeschieden. Das Maximum der biliären Ausscheidung von $[^3\text{H}]$ -DMP liegt bei den FVB-Mäusen in Minute 16 mit 0,14 pmol/min/g KG, bei den *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Mäusen in Minute 20 mit 0,11 pmol/min/g KG und bei den *bcrp1*(-/-) Knockout-Mäusen bei 12 min mit 0,15 pmol/min/g KG. Die Galleausscheidung von $[^3\text{H}]$ -DMP zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Mäusestämmen (Abb. 4.15 A).

Nach 90 min wurde bei den Wildtyp FVB-Mäusen $11,8 \pm 0,8\%$ der applizierten Dosis [^3H]-DMP in der Galle detektiert, dieser Wert betrug für die *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse $10,4 \pm 1,5\%$ und für die *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse $11,8 \pm 1,22\%$ (Abb. 4.15 B).

A



B

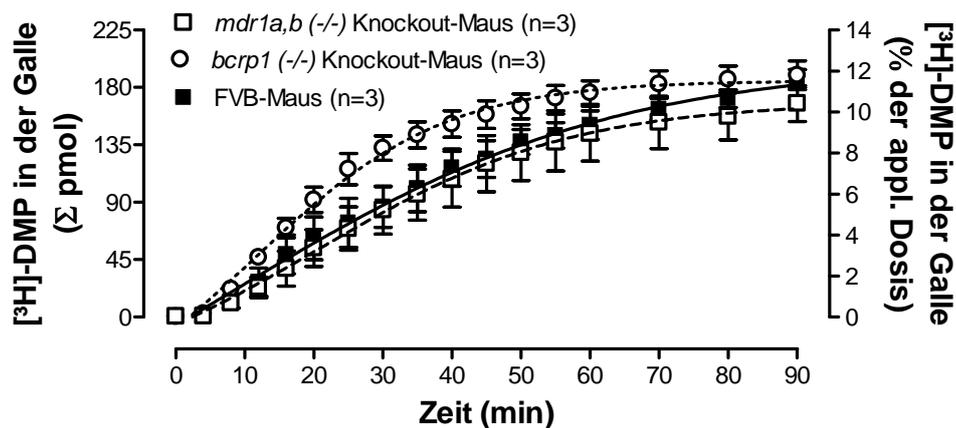
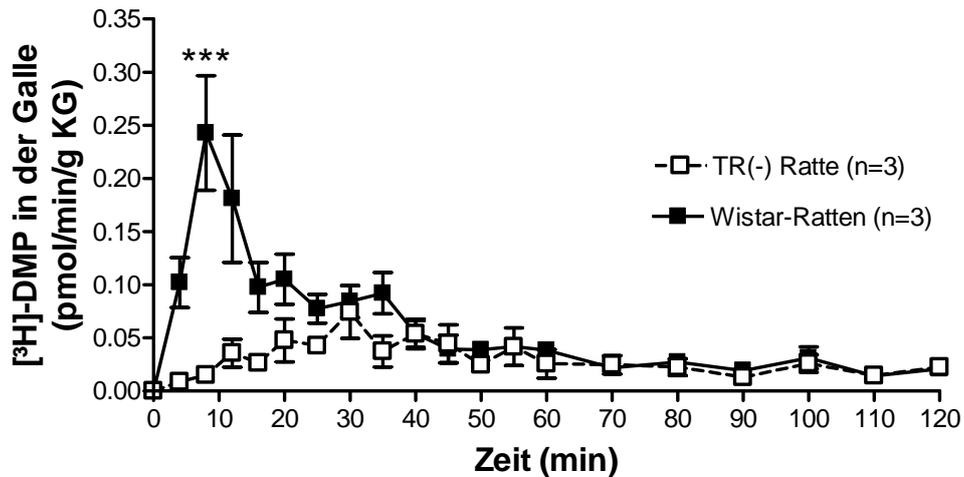


Abb. 4.15. Galleausscheidung in fraktioneller Darstellung (A) nach der i.v. Applikation von [^3H]-DMP mit einer Dosierung von $0,03 \text{ mg/kg}$ Körpergewicht bei FVB Wildtyp-Mäusen sowie *mdr1a,b*(-/-) und *bcrp1*(-/-) Knockout-Mäusen. B, Kumulative Darstellung der Galleausscheidung von [^3H]-DMP bei der Maus. Die Galle wurde über 90 min gesammelt.

Hepatobiliäre Ausscheidung von [^3H]Demethylphalloin bei der Ratte

Im Vergleich zu den Mäusen stellte sich bei den Ratten die Galleausscheidung von [^3H]-DMP anders dar. Das Maximum der biliären Ausscheidung bei Wistar-Ratten liegt mit $0,24 \text{ pmol/min/g KG}$ schon bei 8 min und fällt dann kontinuierlich bis zur 45. Minute ab. Die *mrp2*-defiziente TR(-) Ratte zeigt dagegen ein deutliches Ausscheidungsdefizit von [^3H]-DMP im Vergleich zur Wildtyp Ratte (Abb. 4.16 A). Die Ausscheidungskurve verläuft über den ganzen Versuch in einem Bereich von $0,01$ bis $0,07 \text{ pmol/min/g KG}$. Ein deutliches Ausscheidungsmaximum fehlt bei der TR(-) Ratte.

A



B

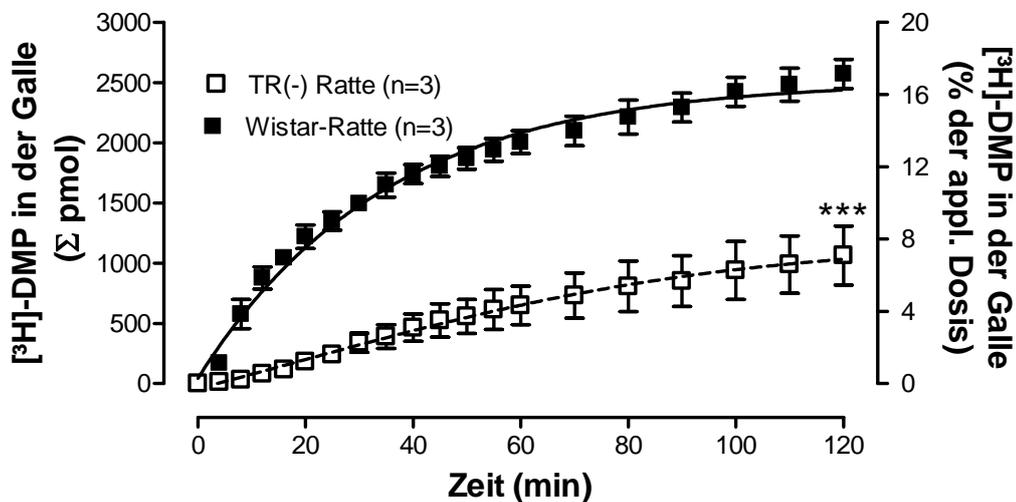


Abb. 4.16: **A**, Galleausscheidung in fraktioneller Darstellung nach i.v. Applikation von $[^3\text{H}]\text{-DMP}$ mit einer Dosierung von 0,03 mg/kg Körpergewicht bei Wistar-, und TR(-) Ratten. **B**, kumulative Darstellung der Galleausscheidung von $[^3\text{H}]\text{Demethylphalloin}$. *** $p < 0,0001$ Wistar-Ratte vs. TR(-) Ratte.

Besonders deutlich zeigt sich das Ausscheidungsdefizit der TR(-) Ratte in der kumulativen Darstellung der Galleausscheidung (Abb. 4.16 B). Nach 120 min wurde in der Galle der Wistar-Ratten $17,6 \pm 1,4\%$ der applizierten Menge $[^3\text{H}]\text{-DMP}$ nachgewiesen. Dagegen wurden von der *mnp2*-defizient TR(-) Ratten nach 120 min nur $7,9 \pm 3,1\%$ des applizierten $[^3\text{H}]\text{-DMP}$ detektiert (Abb. 4.16 B). Dieser Unterschied in der Galleausscheidung von Phalloidin ist zwischen beiden Rattenstämmen hoch signifikant mit $p < 0,0001$.

Demethylphalloin-Metabolite in der Galle von Ratte und Maus

Die Frage nach der Metabolisierung der untersuchten Substanz kann in einem *in vivo* Versuch gut untersucht werden. Zur Klärung, ob Demethylphalloin in unveränderter Form in die Galle ausgeschieden wird oder ob eventuell Metabolite über das Mrp2-Efflux-System eliminiert werden, wurde eine Dünnschichtchromatographie mit den in der Galleausscheidung gewonnenen Galleproben durchgeführt. Die Galleproben wurden zum Zeitpunkt 0 min (Prägalle), 8, 12, 20, 40, 60 und 90 min nach der Applikation des Demethylphalloins gesammelt. Als Kontrolle wurde die Prägalle mit der in den Proben gemessenen Konzentration von [³H]-DMP gesetzt. Die Dünnschichtchromatographie der Rattengalle zeigt zum Zeitpunkt t = 60 min für beide Rattenstämme einen identischen Peak (Abb. 4.17). Die in die Galle ausgeschiedene Substanz war mit dem applizierten Demethylphalloin identisch, sodass im Rahmen der Genauigkeit der Nachweismethode eine Metabolisierung ausgeschlossen werden konnte.

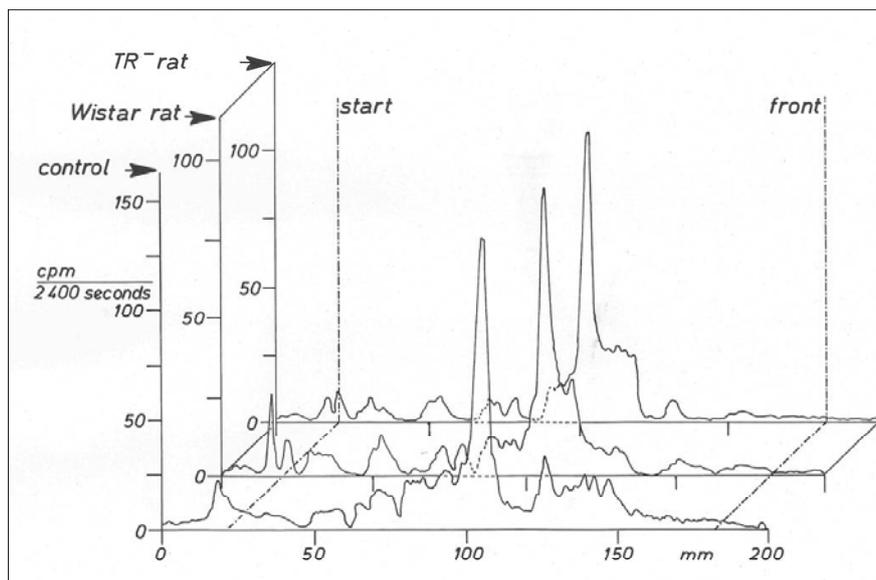


Abb. 4.17: Dünnschichtchromatographie der Galleproben von Wistar- und TR(-)-Ratten zum Zeitpunkt t = 60 min. Die identischen Peaks von Kontrolle und beiden Rattenstämmen deuten darauf hin, dass das Demethylphalloin in der Rattenleber nicht metabolisiert wurde.

Gewebekonzentrationen und Organverteilung von [³H]DMP bei der Maus

Zum Nachweis der Organverteilung wurde im Anschluss an die *in situ* Galleausscheidung (Zeitpunkt t = 90 min) die [³H]-DMP Konzentration in Leber, Niere und Urin bei den Mäusen bestimmt. Hierzu wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen und die in ihnen enthaltene Radioaktivität bestimmt (Abb. 4.18 und Tab. 9.10 im Anhang). Bei den FVB Wildtyp-Mäusen wurden in der Leber 16,5%, in den Nieren 5,3% und im Urin 16,7% der

applizierten Dosis [^3H]-DMP wiedergefunden. Bei den beiden Knockout-Mäusen waren die Ergebnisse ähnlich. So wurden in der Leber der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus $17,2 \pm 5,5\%$, in den Nieren $4,1\%$ und im Urin $11,2\%$ des [^3H]-DMP gemessen. Bei den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen entspricht dies folgenden Daten: Leber $20,9\%$, Niere $5,1\%$, Urin $9,7\%$ (Tab. 9.10 Anhang). Die Plasmakonzentration betrug bei Versuchsende sowohl für die Wildtyp- als auch für die Knockout-Mäuse $0,02 \text{ pmol/ml}$. Die sonstigen Gewebekonzentrationen von [^3H]-DMP nach 90 min zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen (Abb. 4.18 und Tab. 9.10 im Anhang).

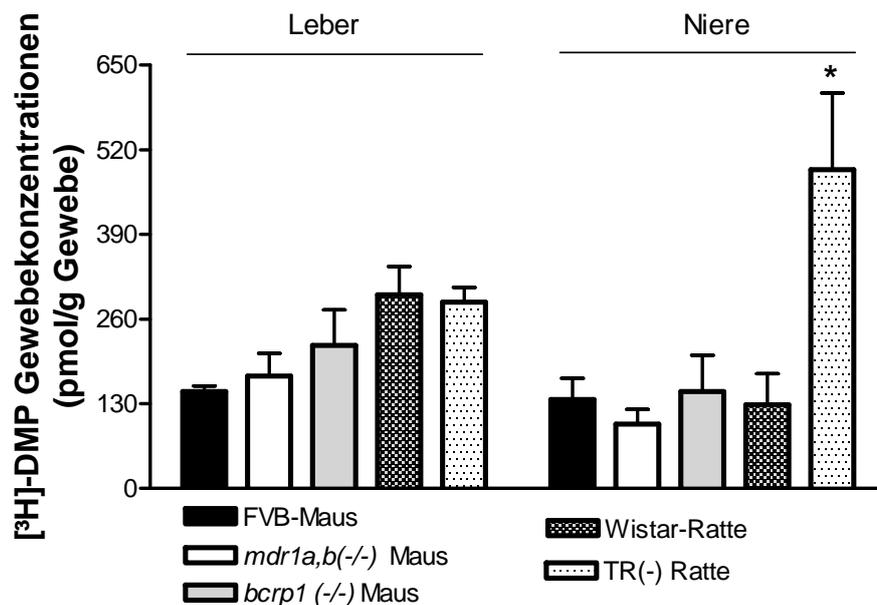


Abb. 4.18: Gewebekonzentrationen von [^3H]-DMP in Leber und Niere bei Mäusen/Ratten, 90 / 120 min nach i.v. Applikation von $0,03 \text{ mg/kg}$ [^3H]-DMP. * $p < 0,05$ Wistar-Ratte vs. TR(-) Ratte.

Gewebekonzentrationen und Organverteilung von [^3H]DMP bei der Ratte

Auch bei den beiden Rattenstämmen wurde die Organverteilung in Leber und Niere bestimmt, allerdings im Vergleich zu den Mäusen erst nach 120 min. Vergleicht man die Wistar- und TR(-) Ratte, ergibt sich eine gleich hohe Akkumulation von [^3H]-DMP in der Leber nach 120 min. Diese beträgt für die Wistar-Ratte $28,8 \pm 4,6\%$ und für die TR(-) Ratte $25,3 \pm 7,2\%$ der applizierten Dosis. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich dagegen in den Nieren. Hier akkumuliert [^3H]-DMP bei der TR(-) Ratte mit $9,9 \pm 3,1\%$ viel stärker als bei der Wistar-Ratte mit $2,9 \pm 1,8\%$. Die sonstigen Gewebekonzentrationen (Tab. 9.10 Anhang) von [^3H]-DMP sind im Allgemeinen bei den TR(-) Ratten im Vergleich zu den Wildtyp-Ratten

mit Ausnahme der Leber erhöht (Abb. 4.18 und Tab. 9.10 Anhang). Bei Versuchsende war der Plasmaspiegel der *mrp2*-defizienten TR(-) Ratte aufgrund des hepatobiliären Ausscheidungsdefizits 1,8-fach höher als bei der Wistar-Ratte (Tab. 9.10 Anhang).

[³H]Demethylphalloin-Elimination über Urin und Galle bei Maus und Ratte

Alle Mäuse-Stämme konnten gut [³H]DMP sowohl über die Galle (11% der applizierten Dosis) als auch über den Urin (9-16% der applizierten Dosis) ausscheiden, wobei kein Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen festzustellen war (s. Abb. 4.19). Bei den Ratten ergab sich jedoch ein gravierender Unterschied: So schied der Wildtyp [³H]-DMP nur über die Leber aus, sodass kaum (0,01% der applizierten Dosis) im Urin nachgewiesen wurden. Dagegen konnten die TR(-) Ratten ihre verminderte Galleausscheidung von [³H]-DMP gut über eine gesteigerte Urinelimination kompensieren (Abb. 4.19).

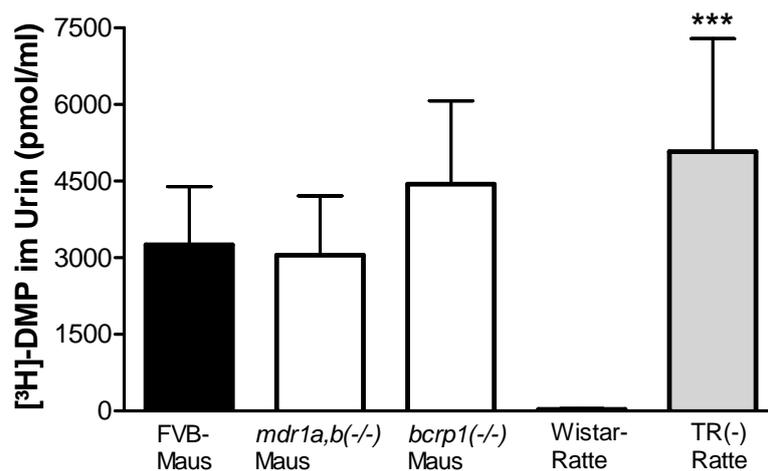


Abb. 4.19: Urinkonzentrationen von [³H]-DMP 90 min bzw. 120 min nach i.v. Applikation von 0,03 mg/kg [³H]-DMP. *** $p < 0,001$ Wistar-Ratte vs. TR(-) Ratte.

4.5.2. Plasmakinetik und *in situ* Galleausscheidung von Ouabain

Das Herzglykosid Ouabain ist im Unterschied zu Digoxin ein Substrat des *Mrp2*-Transporters. Dies wurde von Geyer et al. (2005) beschrieben. Allerdings fehlten bisher Daten zur Plasmakinetik von Ouabain bei *mrp2*-defizienten TR(-) Ratten, welche einen Aufschluss über die Bedeutung des hepatobiliären Ausscheidungsdefizits auf die Gesamtpfarmakokinetik erwarten lassen. Des Weiteren ließen vorangegangene Versuche zur Ausscheidung von Ouabain vermuten [Geyer et al. 2005], dass neben *Mrp2* noch weitere Effluxsysteme an der hepatobiliären Elimination von Ouabain beteiligt sind. Um zu klären, ob eventuell *Mdr1* oder *Bcrp* am Ouabaintransport in der Leber beteiligt sind, wurden auch *in situ* Galleausscheidungsversuche an *mdr1a,b* (-/-)- und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen durchgeführt.

Plasmakinetik von Ouabain bei der TR(-) und Wistar-Ratte

Ouabain wurde in einer Mischung von radioaktiv markierter und nicht markierter Substanz in einer Dosierung von 26 µg/kg Körpergewicht in die *V. femoralis* der Ratten appliziert und die entsprechenden Galle- und Blutproben entnommen.

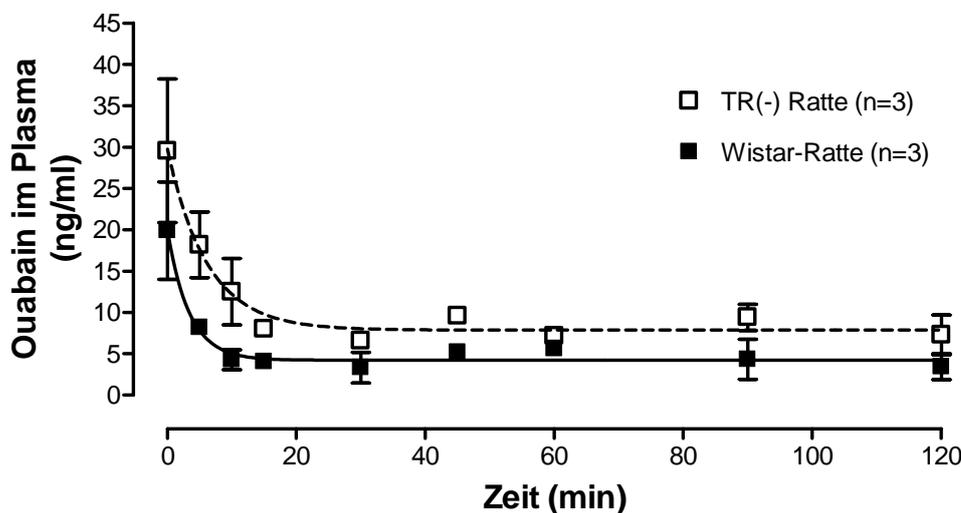


Abb. 4.20: Plasmakonzentrationen von Ouabain bei TR(-) und Wistar-Ratten über 120 min. Ouabain wurde in einer Dosierung von 26 µg/kg KG in die *V. femoralis* appliziert.

Der steady-state Ouabainplasmaspiegel wurde bei den Wistar-Ratten schon 15 min nach Applikation bei etwa 4 ng/ml erreicht und blieb auf konstantem Niveau bis zum Versuchsende (Abb. 4.20, schwarze Quadrate). Dagegen wird der steady-state Level bei den

TR(-) Ratten (Abb. 4.20, weiße Quadrate) ab der 30. Minute erreicht. Dieser liegt mit 6,6 ng/ml aber insgesamt höher als bei der Wistar-Ratte. Interessant ist bei dieser Plasmakinetik, dass die sehr schnelle Eliminationsphase (α) von einer sehr langen konstanten Plateauphase (β) gefolgt wird. Es ist denkbar, dass dies auf eine enterohepatische Zirkulation der applizierten Substanz zurückzuführen ist. Insgesamt betrachtet, waren die Plasmawerte von Ouabain bei den TR(-) Ratten höher als beim Wildtyp, das Signifikanzniveau wurde hierbei allerdings nicht erreicht. Diese Tendenz konnte man auch bei den pharmakokinetischen Parametern AUC und totale Clearance erkennen (Tab. 4.1). Die AUC-Plasmawerte bei den TR(-) Ratte sind um den Faktor 1,9 höher als beim Wildtyp. Auch die niedrigere totale Clearance bei den TR(-) Ratten (336,27 im Vergleich zu 808,78 ml/h) deuten auf ein Ausscheidungsdefizit von Ouabain hin. So kann die Wistar-Ratte Ouabain um den Faktor 2,4 schneller ausscheiden als die TR(-) Ratte.

Tab. 4.1: Pharmakokinetische Parameter von Ouabain im Plasma.

Spezies	C_{\max} (ng/ml)	AUC_{last} (hr*ng/ml)	Cl_{total} (ml/hr)	MRT_{last} (hr)
Wistar-Ratte	19,89 ± 10,23	9,22 ± 1,61	808,78 ± 249,41	0,82 ± 0,08
TR(-) Ratte	29,55 ± 15,07	17,51 ± 1,47	336,27 ± 101,92	0,89 ± 0,11

***In situ* Galleausscheidung von Ouabain bei Ratten**

Das Maximum der biliären Ausscheidung von Ouabain liegt bei den Wistar-Ratten mit 18,9 pmol/min/g KG in den 12. Minute nach Applikation und fällt dann rasch auf 7,2 pmol/min/g KG in der 30. Minute ab (Abb. 4.21). Ab diesem Zeitpunkt wurde bei den Wistar-Ratten ein langsamer kontinuierlicher Abfall des Ouabains in der Galle bis zur 70. Minute beobachtet, der am Ende eine Konzentration von 3,1 pmol/min/g KG erreichte, was bis zum Versuche bei den Wildtyp-Ratten beibehalten wurde (Abb. 4.21). Anders stellte sich dagegen die Galleausscheidung von Ouabain bei den TR(-) Ratten dar. Hier wurde initial kein Ausscheidungsmaximum von Ouabain über die Galle beobachtet und die Ausscheidungskurve verlief über den ganzen Versuch in einem Bereich von 1 pmol/min/g KG bis 4 pmol/min/g KG (Abb. 4.21). Dieses Ausscheidungsdefizit von Ouabain bei den TR(-) Ratten wird noch deutlicher in der kumulativen Darstellung. Nach 120 min wurde hier nur 27,4% der applizierten Dosis gemessen, während dieser Wert bei den Wistar-Ratten mit 56% doppelt so groß war (Abb. 4.22). Dieser Unterschied in der Galleausscheidung ist zwischen beiden Ratten-Stämmen mit $p < 0,0001$ hoch signifikant.

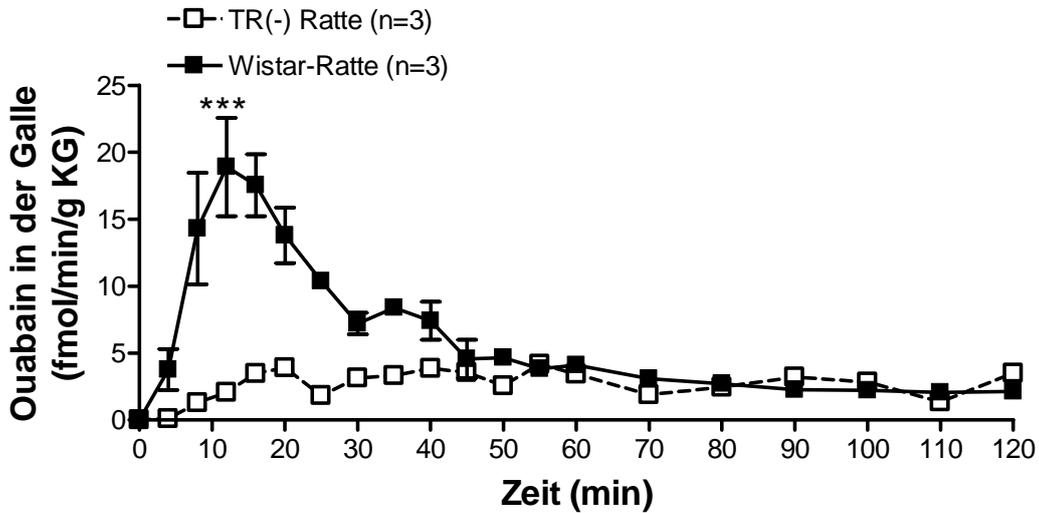


Abb. 4.21. Fraktionelle Darstellung der Galleausscheidung von Ouabain nach i.v. Applikation von 26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG über 120 min bei Ratten. *** $p < 0,0001$ Wistar-Ratte vs. TR(-) Ratte.

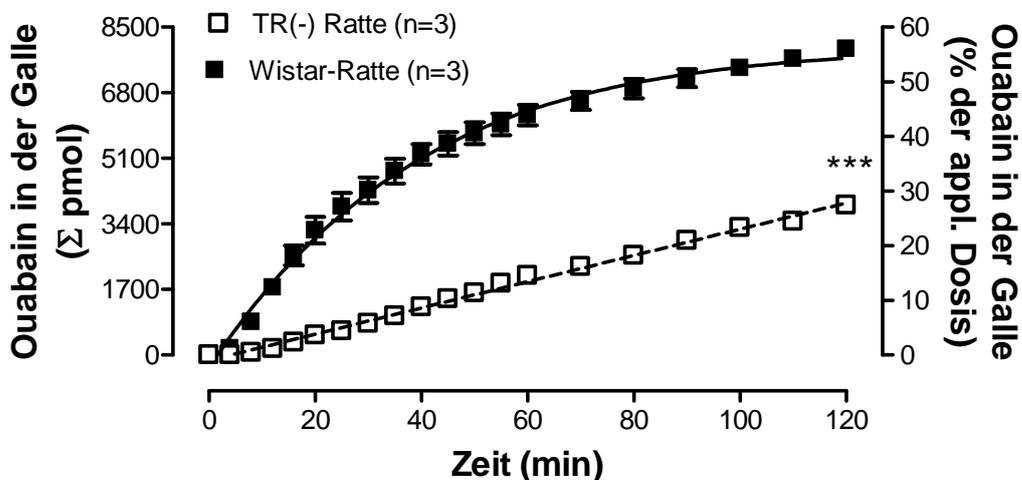


Abb. 4.22: Kumulative Darstellung der Galleausscheidung von Ouabain nach i.v. Applikation von 26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG über 120 min bei Ratten. *** $p < 0,001$ Wistar-Ratte vs. TR(-) Ratte

Die pharmakokinetischen Parameter der *in situ* Galleausscheidung von Ouabain zeigen höhere AUC-Werte und eine niedrigere biliäre Clearance bei den TR(-) Ratten im Vergleich zu den Wistar-Ratten (Tab. 4.2), was ebenfalls auf das hepatobiliäre Ausscheidungsdefizit der TR(-) Ratte für Ouabain hinweist. Die Maxima der biliären Ouabainkonzentration (C_{max}) waren bei beiden Rattenstämmen vergleichbar, allerdings wurde dieser Wert bei den Wistar-Ratten früher erreicht (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Pharmakokinetische Parameter der *in situ* Galleausscheidung von Ouabain bei Ratten.

Spezies	C _{max} bile (ng/ml)	T _{max} (hr)	AUC _{last} bile (hr*ng/ml)	Cl _{bile} (ml/hr)
Wistar-Ratte	189,4 ± 183,5	0,20 ± 0,1	123,33 ± 24,58	64,88 ± 14,83
TR(-) Ratte	188,14 ± 35,81	0,42 ± 0,24	154,71 ± 9,00	49,39 ± 3,65

Gewebekonzentrationen und Organverteilung von Ouabain bei der Ratte

Nach 120 min *in situ* Galleausscheidung bei den Ratten wurden die Konzentrationen von Ouabain in verschiedenen Geweben gemessen (Abb. 4.23, Tab. 9.9 im Anhang). Bedingt durch die reduzierte Ausscheidung der Substanz über die Galle wurde tendenziell eine höhere Gewebekonzentration von Ouabain bei den TR(-) Ratten gemessen, jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (Abb. 4.23, Tab. 9.9 im Anhang). Die Ouabainkonzentrationen stiegen um den Faktor 2,7 in der Leber, Faktor 2,1 im Plasma, Faktor 4,4 im Urin und Faktor 2,9 in den Nebennieren bei den TR(-) Ratten an (Abb. 4.23). Auffällig ist der Befund, dass der Ouabaingehalt in den Nieren bei den Wistar-Ratten um den Faktor 2,1 im Vergleich mit der TR(-) Ratte höher war, während umgekehrt die Konzentration im Urin der TR(-) Ratte mehr als doppelt so hoch war. Dieser Befund weist auf einen kompensatorischen Mechanismus bei der TR(-) Ratte hin, indem Ouabain über die Niere und damit über den Urin ausgeschieden wird.

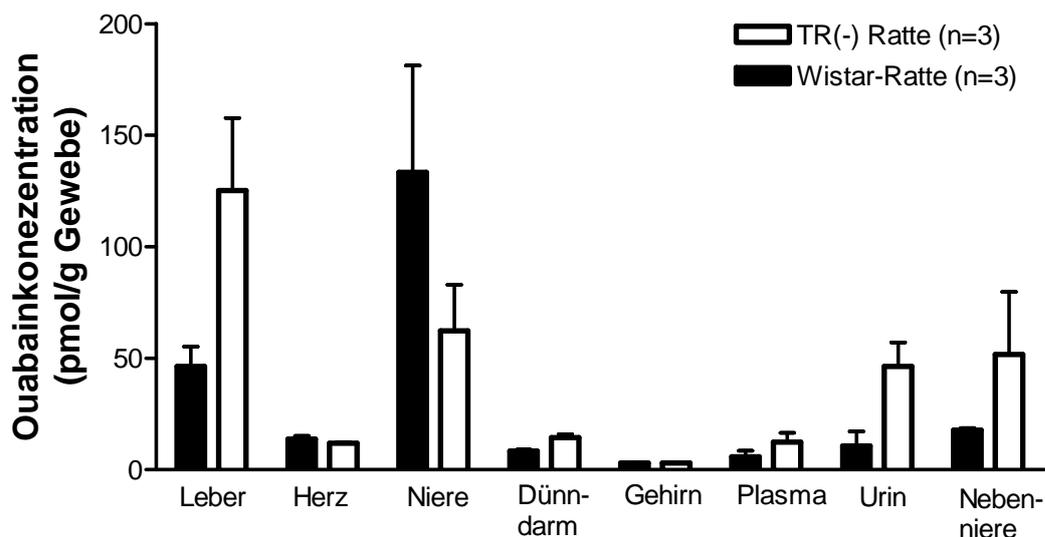


Abb. 4.23: Gewebekonzentration von [³H]Ouabain 120 min nach i.v. Applikation bei den Ratten. Blut und Organe wurden nach 120 min entnommen und die enthaltene Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Die applizierte Dosis lag bei 26 µg/kg.

In situ Galleausscheidung von [³H]Ouabain bei der Maus

Wie in Abb. 4.22 deutlich zu erkennen ist, kann die TR(-) Ratte trotz des deutlichen Ausscheidungsdefizits im Vergleich zur Wistar-Ratte immer noch etwa 30% der applizierten Ouabaindosis innerhalb von 120 min in die Galle ausscheiden. Daher sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob neben Mrp2 auch die Arzneistofftransporter Mdr1 und Bcrp am kanalikulären Transport von Ouabain in der Leber beteiligt sind. Hierzu wurde den entsprechenden Knockout-Mäusen Ouabain in einer Dosierung von 0,8 µg/kg KG über die Schwanzvene injiziert. Alle drei Mausstämme zeigten generell eine vergleichbare Ausscheidung von Ouabain in die Galle über 90 min (Abb. 4.24 und 4.25). Lediglich zum Zeitpunkt t = 20 min hat die Wildtyp-Maus einen deutlich größeren Ausscheidungsflux als die beiden Knockout-Mausstämme. In der kumulativen Darstellung lässt sich jedoch ein leichtes Ausscheidungsdefizit für Ouabain bei der *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus erkennen (Abb. 4.25). Diese scheidet innerhalb von 90 min lediglich 38% der applizierten Substanzmenge in die Galle aus, während bei der Wildtyp-Maus und der *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Maus Werte von 48% und 49% bestimmt wurden.

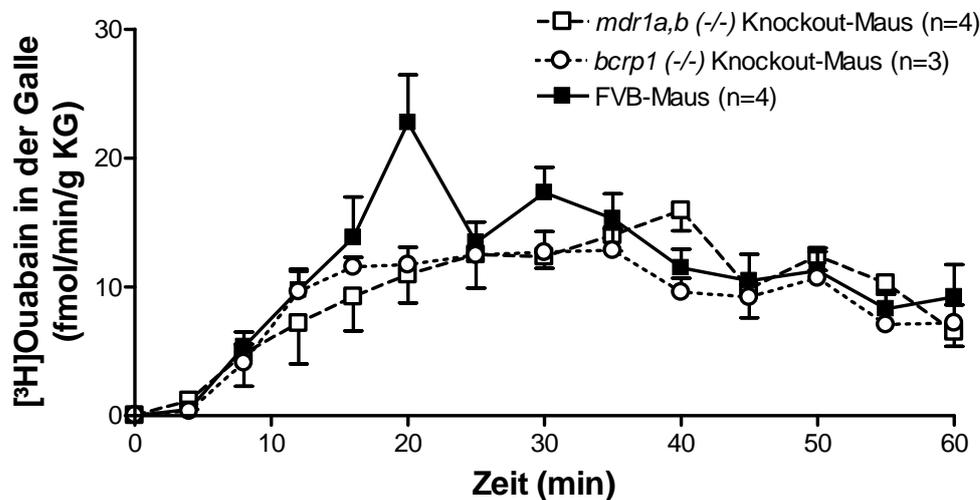


Abb. 4.24: Galleausscheidung von [³H]Ouabain über 60 min nach i.v. Applikation von 42 pmol [³H]Ouabain. Zu 14 verschiedenen Zeitpunkten wurden Galleproben genommen. Diese wurden mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Flüssigszintillationszähler gemessen. Die Darstellung bezieht sich auf die Menge des ausgeschiedenen Ouabains in fmol pro Minute pro g Körpergewicht.

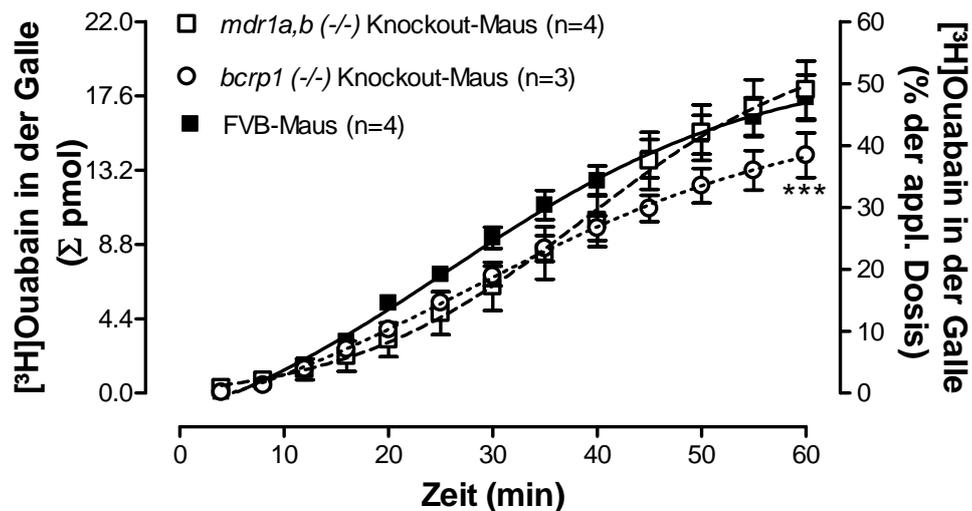


Abb. 4.25: Kumulative Ausscheidung von Ouabain in die Galle über 60 min. Es wurden 0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Ouabain in die Schwanzvene appliziert. Nach 60 min wurde von den FVB-Mäusen etwa 48% der applizierten Dosis in die Galle ausgeschieden. Bei den *mdr1a,b*(-/-) und *bcrp1*(-/-) Knockout-Mäusen waren dies 49% und 38% der applizierten Dosis. *** $p < 0,001$ FVB-Maus vs. *bcrp1*(-/-) Knockout-Maus.

Auch die *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Maus zeigt in der kumulativen Galleausscheidung von $t = 0$ bis $t = 45$ ein Ausscheidungsdefizit entsprechend der *bcrp1*(-/-)-Knockout-Maus. Ab der 40. Minute steigt die kumulative Ausscheidung aber sprunghaft an, bis sie auf dem Niveau der Wildtyp-Mäuse ist. Am Ende des 60-minütigen Versuches konnte die *mdr1a,b* (-/-) Maus ihr anfängliches Ausscheidungsdefizit somit kompensieren.

Die pharmakokinetischen Parameter der *in situ* Galleausscheidung von Ouabain bei den Wildtyp- und Knockout-Mäusen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Genotypen (Tab. 4.3). So kann man das Maximum der biliären Ouabainkonzentration (C_{max}) bei der *bcrp1*(-/-) Knockout-Maus mit 172,72 ng/ml gut mit den C_{max} -Werten bei der Wildtyp-Maus (172,34 ng/ml) vergleichen. Obwohl nach 90 min bei den *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Mäusen genauso viel Ouabain in die Galle ausgeschieden wurde wie beim Wildtyp, lag allerdings der C_{max} Wert mit 115,94 ng/ml entsprechend niedriger als bei den FVB-Mäusen. Die T_{max} und AUC-Werte sind bei allen Genotypen gut vergleichbar, allerdings weist die biliäre Clearance auf ein Ausscheidungsdefizit von Ouabain bei der *bcrp1*(-/-) Knockout-Maus (62,1 ml/h) gegenüber den anderen Genotypen (102,7 und 91,8 ml/h, Tab. 4.3) hin. Die entsprechenden Unterschiede erreichen aber nicht das Signifikanzniveau, wofür ursächlich die große Standardabweichung zwischen den einzelnen Tieren verantwortlich ist.

Tab. 4.3. Pharmakokinetische Parameter der *in situ* Galleausscheidung von Ouabain bei der Maus.

Spezies	C _{max bile} (ng/ml)	T _{max} (hr)	AUC _{last bile} (hr*ng/ml)	Cl _{bile} (ml/hr)
FVB-Maus	172,34 ± 31,50	0,42 ± 0,13	111,85 ± 23,31	102,74 ± 38,11
<i>mdr1a,b</i> (-/-) Maus	115,94 ± 27,07	0,50 ± 0,18	120,49 ± 73,25	91,80 ± 46,84
<i>bcrp1</i> (-/-) Maus	172,72 ± 26,44	0,42 ± 0,13	120,50 ± 22,18	62,08 ± 13,70

Gewebekonzentrationen und Organverteilung von Ouabain bei der Maus

Nach der *in situ* Galleausscheidung über 60 min sind kaum Unterschiede in der Gewebekonzentration von Ouabain bei den drei Genotypen der Maus zu finden. In Leber, Nebennieren und Herz wurden aber höhere Konzentrationen in den Organen der Knockout-Mäuse gemessen (Abb. 4.26, Tab. 9.8 Anhang). Für die *bcrp1* (-/-) Mäuse ist dieser Unterschied im Vergleich zu den FVB-Mäusen signifikant. Ebenso signifikant ist die erhöhte Ouabainkonzentration in der Leber der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse. Auch wurden nach 60 min 7% der applizierten Radioaktivität in den Nieren der *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse wiedergefunden (Tab. 9.7 im Anhang), wobei die höhere Ouabainkonzentration in den Nieren der *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse nicht signifikant im Vergleich zu dem Wildtyp war. Allerdings weist dieser Befund darauf hin, dass das biliäre Ausscheidungsdefizit bei den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen möglicherweise über eine gesteigerte renale Ausscheidung kompensiert wird. Leider war es während des Versuches nicht möglich, Urinproben zu gewinnen. Aus diesem Grund konnte nicht geklärt werden, ob eine erhöhte Konzentration in den Nieren mit einer erhöhten Ouabainsekretion einhergeht.

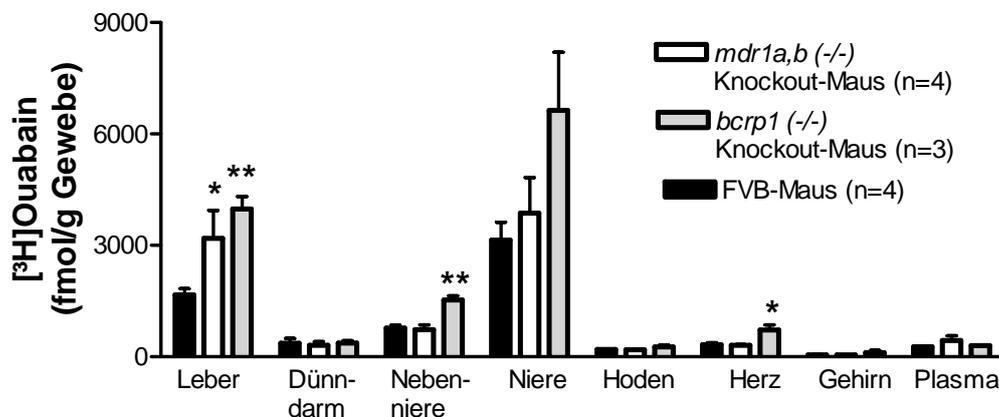


Abb. 4.26. Gewebekonzentration von [³H]Ouabain 60 min nach i.v. Applikation bei der Maus. Blut und Organe wurden nach 60 min entnommen und die enthaltene Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Die applizierte Dosis lag bei 0,8 µg/kg. ** $p < 0,01$, FVB-Maus vs. *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus; * $p < 0,05$, FVB-Maus vs. *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus; * $p < 0,05$, FVB-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus.

4.5.3. Ouabain Metabolite in der Galle bei Ratte und Maus

Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Konzentrationen von Ouabain könnte in einer Verstoffwechslung der applizierten Substanz liegen. Zwar wird nach Literaturangaben Ouabain bei Ratte und Maus in der Leber nicht metabolisiert und in unveränderter Form in die Galle ausgeschieden, allerdings wurde dies noch nicht an Galleproben von transportdefizienten Tiermodellen wie den *mrp2*-defizienten TR(-) Ratten sowie der *mdr1a,b*(-/-) und *bcrp1*(-/-) Knockout-Maus untersucht. Zum Nachweis von Metaboliten wurde eine Dünnschichtchromatographie mit Galleproben aus allen drei Tiermodellen im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Die Galle wurde zu den Zeitpunkten 0, 20 und 60 min genommen. Wie aus Abb. 4.27 zu entnehmen ist, zeigte das Dünnschichtchromatogramm bei allen untersuchten Galleproben nur einen einzigen Peak, der mit Ouabain identisch war. Damit wurde eine Metabolisierung von Ouabain ausgeschlossen.

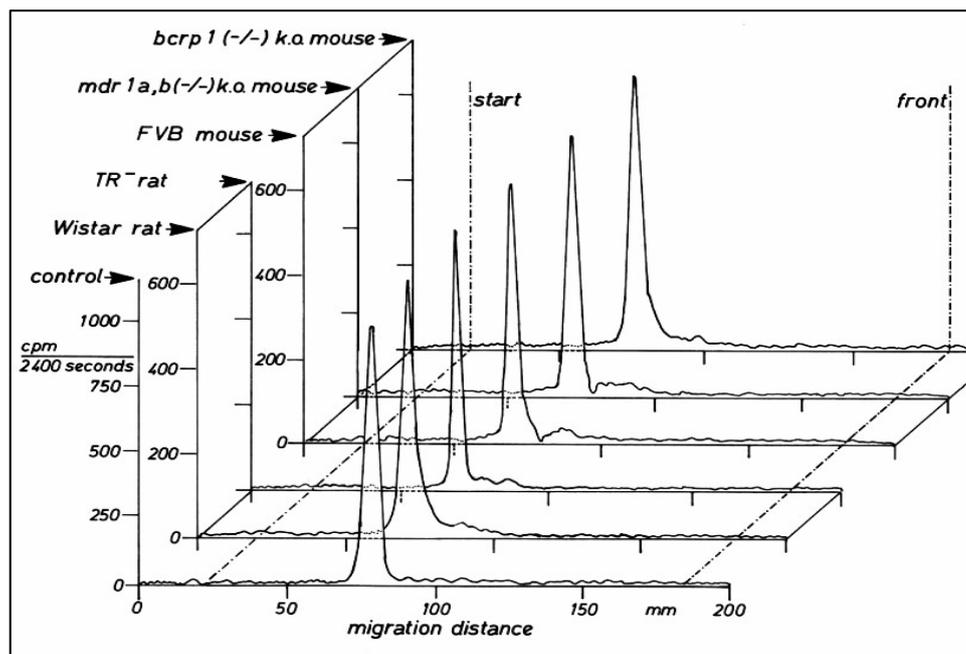


Abb. 4.27. Dünnschichtchromatogramm den Galleproben von Wistar Ratten, TR(-) Ratten, FVB Wildtyp-Mäusen, *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Mäusen und *bcrp1*(-/-) Knockout-Mäusen zum Zeitpunkt $t = 60$ min nach i.v. Injektion von $[^3\text{H}]$ Ouabain.

4.5.4. Plasmakinetik und *in situ* Galleausscheidung von Digoxin

Wie schon in der Einleitung erläutert wurde, gibt es zahlreiche Daten über den Transport von Digoxin *in vitro* und *in vivo*. Digoxin ist ein pflanzliches Herzglykosid und gilt als typisches Mdr1 Substrat. Diese Erkenntnis wurde vor allem an Zellkulturuntersuchungen gewonnen, in welchen gezeigt wurde, dass Digoxin bei Überexpression von Mdr1 vermehrt aus der Zelle ausgeschleust wird. *In vivo* Untersuchungen an der *mdr1a* (-/-) Knockout-Maus zeigten dann, dass es bei Fehlen von Mdr1 P-gp in der Blut-Hirn- und Blut-Testes-Schranke zu höheren Konzentration von Digoxin in den entsprechenden Organen kommt (siehe Einleitung). Da das strukturell eng verwandte Ouabain aber *in vivo* vor allem durch das Mrp2-Transportsystem transportiert wird, stellt sich die Frage nach dem Transport von Digoxin durch Mrp2. Daher sollte in einer weiteren Versuchsserie auch für Digoxin systematisch die Interaktion mit Mdr1, Mrp2 und Bcrp im *in vivo* Modell vergleichend untersucht werden.

4.5.5. *In situ* Galleausscheidung von Digoxin bei der Maus

Zur Untersuchung der Galleausscheidung von Digoxin wurden neben den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen (Doppel-Knockout-Mäusen) auch die *mdr1a,b/bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen (Triple-Knockout-Mäusen) eingesetzt. Die *mdr1a,b/bcrp1* (-/-) Knockout-Maus ist erst seit kurzem verfügbar. Ihr fehlt neben den beiden Genvarianten Mdr1a und Mdr1b, auch die Expression eines funktionellen Bcrp Transporters. Aktive Transportmechanismen in der kanalikulären Hepatozytenmembran beschränken sich bei dieser Triple-Knockout-Maus also auf die Transportsysteme Mrp2 und Bsep.

Hepatobiliäre Elimination von Digoxin bei Mäusen

Bereits 4 min nach i.v. Injektion ist [³H]Digoxin in der Galle nachweisbar. Das Maximum der biliären Ausscheidung lag bei allen Mäusestämmen zwischen der achten und zwölften Minute mit 111,1 fmol/min/g KG für die FVB Wildtyp-Mäuse, 56,0 fmol/min/g KG für die Doppel-Knockout-Mäuse und 40,23 fmol/min/g KG für die Triple-Knockout-Mäuse. Im weiteren Verlauf fiel die Digoxin-Ausscheidung bei allen Mäusestämmen kontinuierlich ab und erreichte nach t = 70 min ein flaches Niveau, welches bis zum Ende des Versuchs nach 90 min gehalten wurde (Abb. 4.28). Sowohl in fraktioneller (Abb. 4.28) als auch in kumulativer Darstellung (Abb. 4.29) wird deutlich, dass die Knockout-Mäuse eine signifikant niedrigere Galleausscheidung zeigen als die Wildtyp-Mäuse. Weiterhin gibt es für die Triple-Knockout-Maus keinen additiven Effekt in diesem Ausscheidungsdefekt gegenüber der

Doppel-Knockout-Maus, was darauf hindeutet, dass Bcrp nicht am hepatobiliären Transport von Digoxin beteiligt ist.

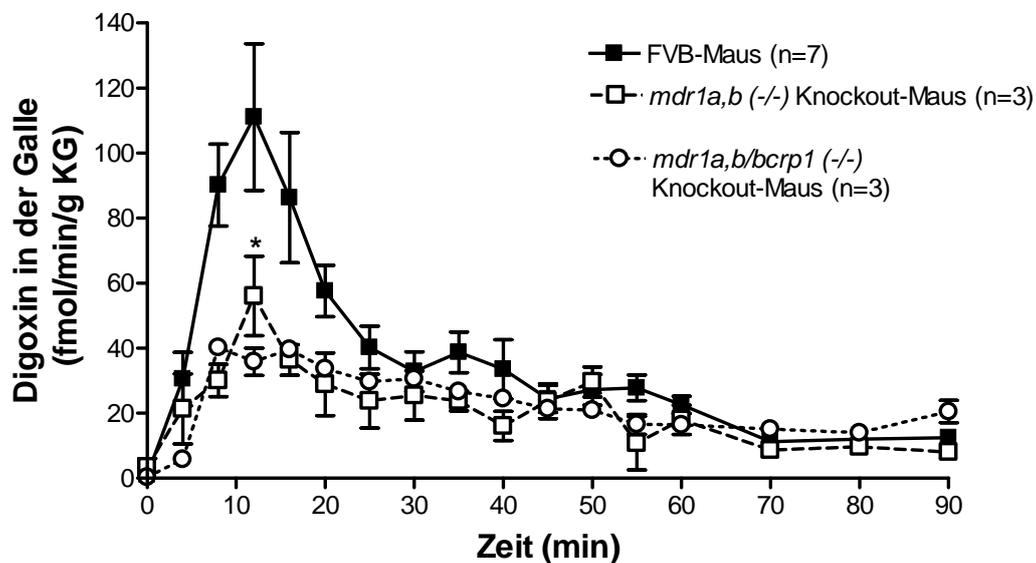


Abb. 4.28: Fraktionelle Darstellung der Galleausscheidung von Digoxin nach i.v. Applikation von 0,01 mg/kg KG über 90 min. * $p < 0,01$, FVB-Maus vs. *mdr1a,b*(-/-) und *mdr1a,b/bcrp1*(-/-) Knockout-Maus.

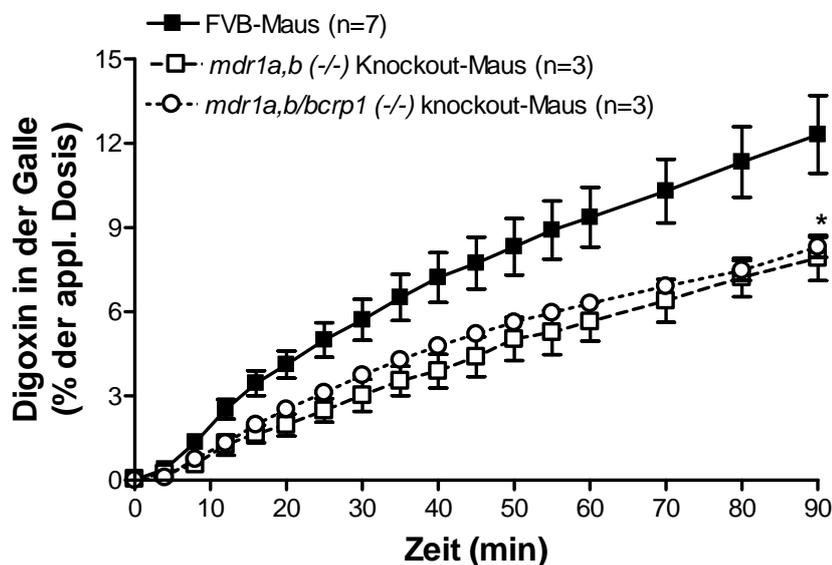


Abb. 4.29: Kumulative Darstellung der Ausscheidung von Digoxin in die Galle über 90 min. Es wurden 0,01 mg/kg KG Digoxin in die Schwanzvene appliziert. Nach 90 min wurde von den FVB Wildtyp-Mäusen etwa 12,3% der applizierten Dosis in die Galle ausgeschieden. Bei den *mdr1a,b*(-/-) und *mdr1a,b/bcrp1*(-/-) Knockout-Mäusen waren dies nur etwa 8% der applizierten Dosis. * $p < 0,01$, FVB-Maus vs. *mdr1a,b*(-/-) und *mdr1a,b/bcrp1*(-/-) Knockout-Maus.

Die pharmakokinetische Analyse der *in situ* Galleausscheidungsdaten bestätigte das Ausscheidungsdefizit von Digoxin bei den *mdr1a,b*(-/-) und *mdr1a,b/bcrp1*(-/-) Knockout-

Mäusen (Tab. 4.4). So ist das Maximum der biliären Konzentration (C_{\max}) von Digoxin bei den Wildtyp-Mäusen signifikant höher gegenüber C_{\max} bei den Knockout-Tieren. Die AUC-Werte der biliären Digoxinausscheidung waren bei den Knockout-Mäusen jedoch höher als beim Wildtyp, was durch den leicht verminderten Gallefluss bei den *mdr1a,b* (-/-) Mäusen erklärt werden kann. Die verminderte Ausscheidung von Digoxin bei den Knockout-Tieren bestätigt auch die biliäre Clearance, welche signifikant niedriger ist als beim Wildtyp. Die Tripelknockout-Mäuse konnten anscheinend die verminderte Digoxinausscheidung durch einen erhöhten Gallefluss kompensieren.

Tab. 4.4: Pharmakokinetische Parameter der *in situ* Galleausscheidung von Digoxin bei Mäusen.

Spezies	$C_{\max \text{ bile}}$ (ng/ml)	$T_{\max \text{ bile}}$ (hr)	$AUC_{\text{last bile}}$ (hr*ng/ml)	Cl_{bile} (ml/hr)
FVB-Maus	392,47 ± 98,40	0,12 ± 0,10	334,25 ± 127,23	2,71 ± 0,89
<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	309,79 ± 68,31	0,20 ± 0,14	351,99 ± 97,61	1,20 ± 0,49*
<i>mdr1a,b/bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	368,0 ± 33,22	0,12 ± 0,12	257,27 ± 2,25	2,20 ± 0,23

* $p < 0,05$ FVB-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

Das Ausscheidungsdefizit der *mdr1a,b* (-/-) und *mdr1a,b/bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse über die Galle scheint durch eine erhöhte Ausscheidung über den Urin kompensiert zu werden (Abb. 4.30 A). 90 min nach der Applikation von Digoxin beträgt die Menge des über den Urin ausgeschiedenen Digoxins bei den Wildtyp-Mäusen ca. 0,7% der applizierten Menge, wohingegen bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen die Ausscheidungsrate bei 2,9% und sogar 5,17% bei den Triple-Knockout-Mäusen lag (Abb. 4.30 B). Diese Daten stellen allerdings nur eine Tendenz dar, da die Sammlung des Urins in dieser kurzen Zeitperiode eine sehr variable Menge ergab. Zu Versuchsbeginn wurde die Harnblase entleert und der während des Versuches gebildete Urin über einen Blasenkateter aufgefangen und anschließend das Digoxin in der Sammelprobe detektiert. Dabei wurden für die Triple-Knockout-Mäuse viel größere Mengen Urin gewonnen, als für die beiden anderen Vergleichsgruppen. Dies könnte die etwas niedrigere Urinkonzentration von Digoxin bei der Triple-Knockout-Maus im Vergleich zu der Doppel-Knockout-Maus erklären. Da bei dieser Vorgehensweise nicht von jedem Tier eine Urinprobe gewonnen werden konnte, entsprechen die Probengrößen nicht denen der Galleausscheidungsversuche.

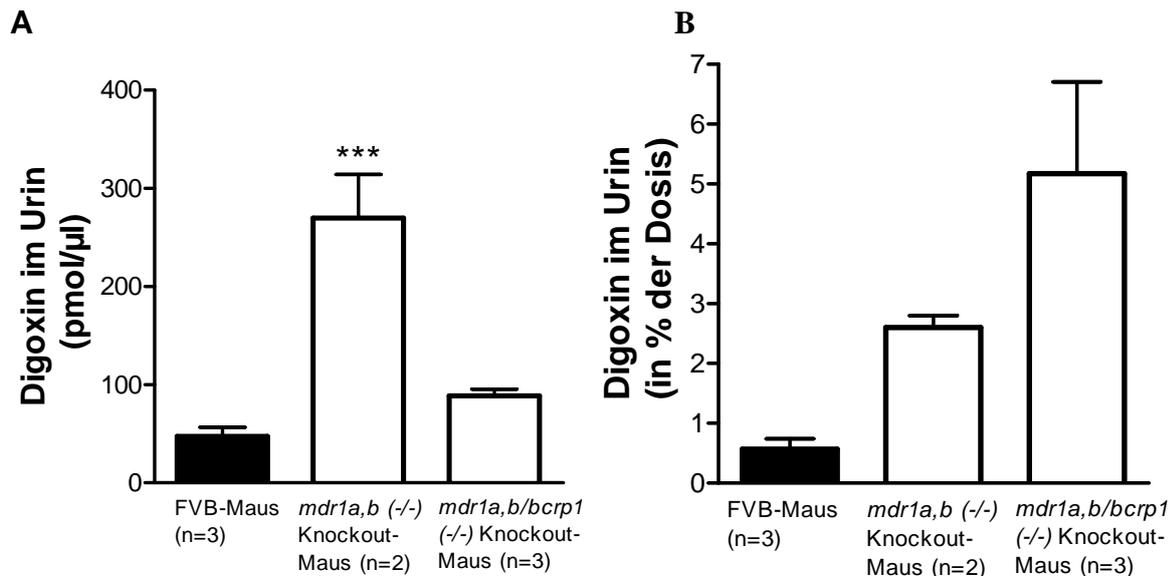


Abb. 4.30: **A**, Digoxinkonzentration und **B**, Digoxin-Menge im Urin bei Mäusen. Die Digoxinausscheidung (Konzentration) war bei den Knockout-Mäusen signifikant gesteigert (* $p < 0,001$).

Digoxin-Metabolite in der Galle der Maus

Wie bereits zuvor für die Versuche mit Ouabain, wurde auch für das Digoxin eine dünnschichtchromatographische Analyse der Galleproben vorgenommen. Es wurden Galleproben der Zeitpunkte $t = 0, 20$ und 60 min auf die DC-Platte aufgetragen, wobei jede Probe 50.000 dpm enthielt. Als Kontrolle wurde Prägalle, also Galle vor der *in situ* Galleausscheidung, mit der Applikationslösung versetzt. Bei allen untersuchten Proben wurden keine Digoxin-Metabolite gefunden. Es konnte jeweils nur ein Peak gemessen werden, welcher mit dem Peak der reinen Digoxinlösung identisch war und der bei allen untersuchten Galleproben 80% der aufgetragenen Radioaktivitätsmenge enthielt.

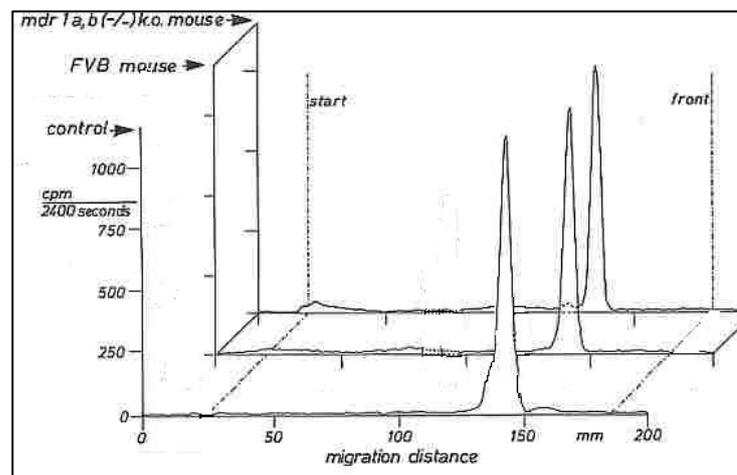


Abb. 4.31. Dünnschichtchromatogramm der Galleproben von Wildtyp- und *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Mäusen zum Zeitpunkt $t = 60$ min nach i.v. Injektion von $0,01$ mg/kg KG Digoxin.

Gewebekonzentrationen von Digoxin bei der Maus

Die Konzentrationen von Digoxin 90 min nach der Applikation (0,01 mg/kg KG) unterschieden sich in einigen Geweben zwischen beiden Tiermodellen. Die *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse schieden signifikant weniger Digoxin über den Dünn- und Dickdarm sowie über die Galle aus (s. Abb. 4.32 und 4.29), wobei keine ausreichende Kompensation über die Niere erfolgte (s. Abb. 4.30). Da sich die Plasmaspiegel zu den FVB-Mäusen nicht unterschieden, kam es zu einer Akkumulation in Leber, Nebennieren, Hoden und Gehirn (s. Abb. 4.32 und Tab. 9.3 Anhang).

Die Triple-Knockout-Maus konnte anscheinend besser als die *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus das Ausscheidungsdefizit von Digoxin in der Galle über die erhöhte Urinausscheidung kompensieren (Abb. 4.30). Deswegen wurde keine Differenz in den Gewebekonzentrationen (Leber und Blut) zwischen den Wildtyp- und Triple-Knockout-Mäusen beobachtet. Gleichzeitig gab es keine Unterschiede in den Digoxinkonzentrationen nach 90 min *in situ* Galleausscheidung zwischen Doppel- und Triple-Knockout-Mäusen in der Geweben mit guter *Mdr1*-Expression wie Darm, Nebenniere, Hoden und Gehirn (Abb. 4.32)

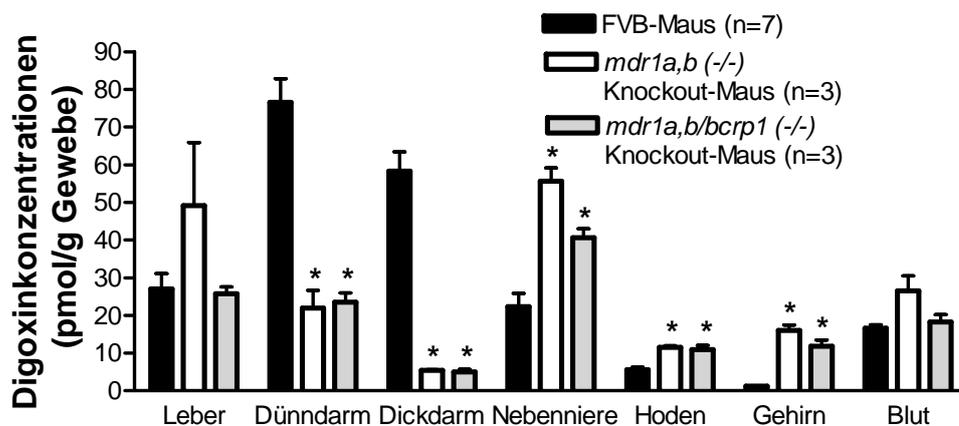


Abb. 4.32: Digoxin-Gewebekonzentrationen 90 min nach i.v. Applikation bei Mäusen. Blut und Organe wurden nach 90 min entnommen und die enthaltene Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Die applizierte Dosis entspricht 0,01 mg/kg KG. Dünndarm und Dickdarm wurden inklusive Darminhalt analysiert. Die Plasmawerte beziehen sich auf pmol/ml.

Hepatobiliäre Elimination von Digoxin bei Ratten

Es wurden 8 μCi [^3H] radioaktiv markiertes Digoxin – entsprechend 0,01 mg/kg KG - über die *Vena femoralis* in die Ratten injiziert. Die daraufhin erfolgende Digoxinausscheidung erfolgte bei beiden Ratten-Stämmen über die Leber sehr schnell, sodass bereits nach 4 min große Substanzmengen in der Galle detektiert wurden. Das Maximum der biliären Ausscheidung lag bei 12 min mit einer Menge von $49,4 \pm 21,5$ fmol/min/g KG bei den TR(-)

Ratten. Im weiteren Verlauf sank die Digoxinausscheidung kontinuierlich bis zur 50. Minute. Hier zeigte sich ein zweiter kleinerer Peak mit $42,9 \text{ fmol/min/g KG}$ (Abb. 4.33). Bei den Wistar-Ratten lag das Maximum der biliären Digoxinausscheidung etwas verzögert in der 16. Minute mit $71,0 \pm 29,3 \text{ fmol/min/g KG}$. Anschließend fiel die Ausscheidungskurve bis zur 20. Minute steil ab. Wie aus Abb. 4.33 zu entnehmen ist, scheidet die Wistar-Ratte Digoxin über die Galle etwas besser aus als die TR(-) Ratte. Das signifikante Ausscheidungsdefizit der TR(-)-Ratte für Digoxin (s. Abb. 4.34) wird in der kumulativen Darstellung dieser Daten noch deutlicher. Nach 120 min enthielt die Galle der Wistar-Ratte 40% der applizierten Digoxindosis während in der Galle der TR(-)-Ratte nur 31% detektiert wurden (Abb. 4.34, $p < 0,001$).

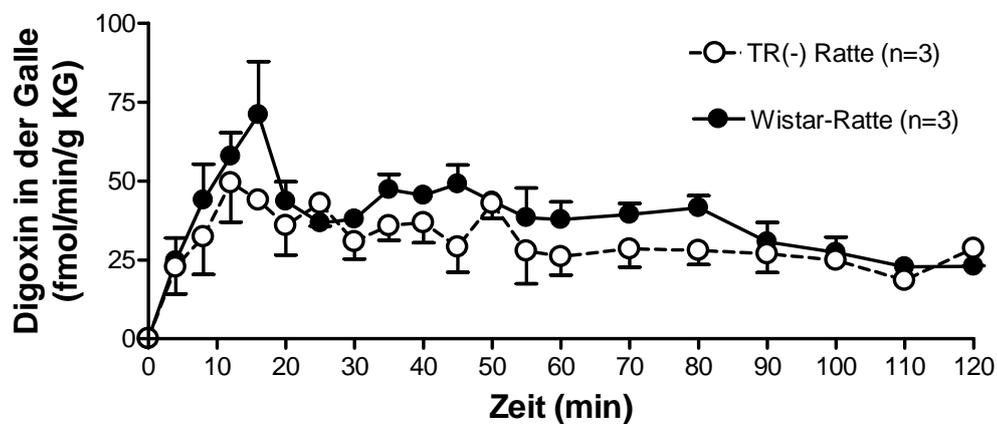


Abb. 4.33: Radioaktiv gemessene Galleausscheidung von Digoxin bei Wistar- und TR(-) Ratten nach i.v. Applikation von $0,01 \text{ mg/kg KG}$ über einen Zeitraum von 120 min. Die Wistar-Ratten zeigten eine signifikant gesteigerte Sekretion von Digoxin in die Galle.

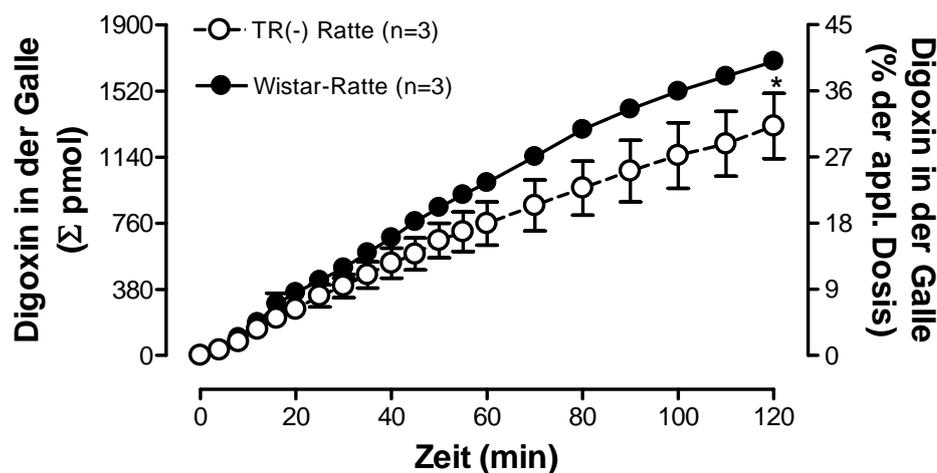


Abb. 4.34: Kumulative Ausscheidung von Digoxin in die Galle von Wistar-Ratten im Vergleich zu TR(-) Ratten über einen Zeitraum von 120 min. Es wurden $0,01 \text{ mg/kg KG}$ [^3H] radioaktiv markiertes Digoxin in die *Vena femoralis* injiziert. Nach 120 min wurde von den Wistar-Ratten etwa 40% der applizierten Dosis, entsprechend $1626,7 \pm 44,0 \text{ pmol}$ in die Galle ausgeschieden. Bei den TR(-) Ratten waren dies nur 31% der applizierten Dosis ($1274,7 \pm 314,3 \text{ pmol}$). * $p < 0,01$ Wistar-Ratte vs. TR(-) Ratte.

Die signifikant geringere Ausscheidung des Digoxins bei den TR (-) Ratten über die Galle ist nicht auf eine reduzierte Sekretionsleistung der Leber zurückzuführen, denn die biliäre Clearance ist zwischen Wistar- und TR(-) Ratten nicht signifikant erniedrigt (s. Tab. 4.5). Die höheren C_{\max} und AUC-Werte bei den TR(-) Ratten sind mit den Besonderheiten im Gallefluss (nämlich 50% weniger Gallefluss bei der TR(-) Ratte) zu erklären. Bemerkenswert ist, dass Digoxin bei beiden Rattenstämmen in dieser Dosierung im Unterschied zu anderen Spezies kaum mit dem Urin ausgeschieden wird.

Tab. 4.5: Pharmakokinetische Parameter der *in situ* Galleausscheidung von Digoxin bei Ratten.

Spezies	$C_{\max \text{ bile}}$ (ng/ml)	T_{\max} (hr)	$AUC_{\text{last bile}}$ (hr*ng/ml)	Cl_{bile} (ml/hr)
Wistar-Ratte	48,12 ± 26,50	0,13 ± 0,1	74,80 ± 9,18	33,40 ± 2,57
TR(-) Ratte	171,9 ± 138,42	0,33 ± 0,16	143,43 ± 102,85	24,12 ± 12,25

Digoxin-Metabolite in der Galle bei der Ratte.

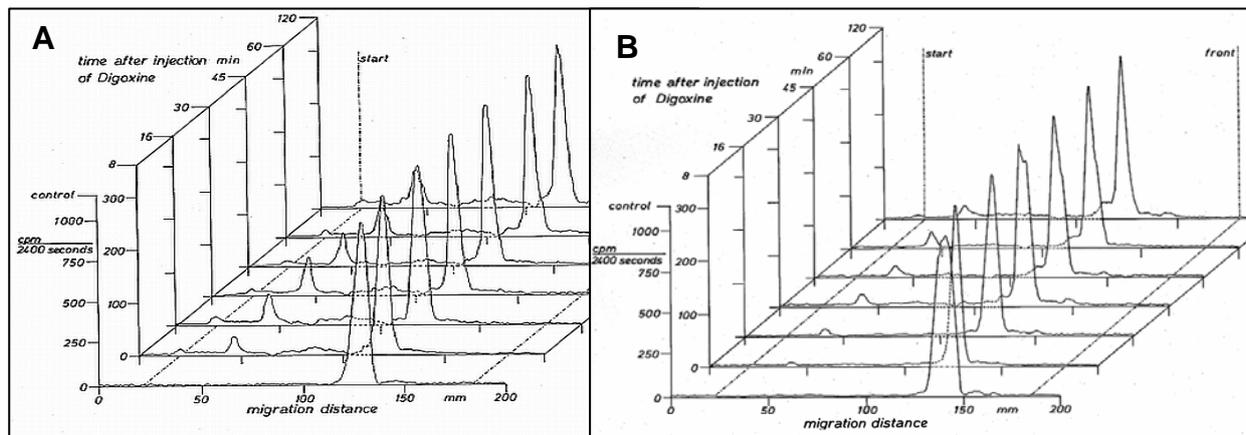


Abb. 4.35. Dünnschichtchromatographie der Galleproben von (A) Wistar- und (B) TR(-) Ratten zu den Zeitpunkten $t = 0, 16, 30, 45, 60$ und 120 min der *in situ* Galleausscheidung nach i.v. Injektion von Digoxin in einer Dosierung von $0,01$ mg/kg KG.

Zur Analyse einer möglichen Metabolitenbildung von Digoxin wurde wiederum eine dünnschichtchromatographische Analyse der Galleproben zu den Zeitpunkten $t = 0, 8, 16, 30, 40, 60$ und 120 min nach *in situ* Galleausscheidung von Digoxin durchgeführt. Für jede Probe wurden 50.000 dpm aufgetragen (Tab. 9.5 Anhang). Als Kontrolle diente wiederum Prägalle, die mit der Injektionslösung versetzt wurde. In der Galle beider Tiermodelle wurde neben dem Digoxinpeak ein weiterer Peak detektiert. Der Haupt-Peak, welcher dem Digoxin entsprach, enthält ca. 60% der aufgetragenen Radioaktivität bei beiden Rattenstämmen. Der

Metabolitenpeak beinhaltet dagegen 15% der gesamt aufgetragenen Radioaktivität bei den Wistar und 6,8% bei den TR(-) Ratten (Abb. 4.35 und Tab. 9.6 Anhang).

Gewebekonzentrationen von Digoxin bei der Ratte.

Die Gewebekonzentrationen beider Rattenstämme zeigten nach dem 120 minütigen Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede. Es zeigten sich bei den TR(-)-Ratten jedoch tendenziell erhöhte Digoxinkonzentrationen in der Leber, im Muskel und Fettgewebe und niedrigere Werte in Darm, Magen, Niere, Lunge und Gehirn (Abb. 4.36 und Tab. 9.4 Anhang). Auffallend bei den Gewebekonzentrationen waren die hohen Werte der Nebennieren in beiden Rattenstämmen, wobei bei den Wistar-Ratten tendenziell höhere Werte gemessen wurden (Abb. 4.36 und Tab. 9.4 Anhang). In Abbildung 4.36 sind Digoxinkonzentrationen nur in Geweben mit Expression von Mrp2 gezeigt.

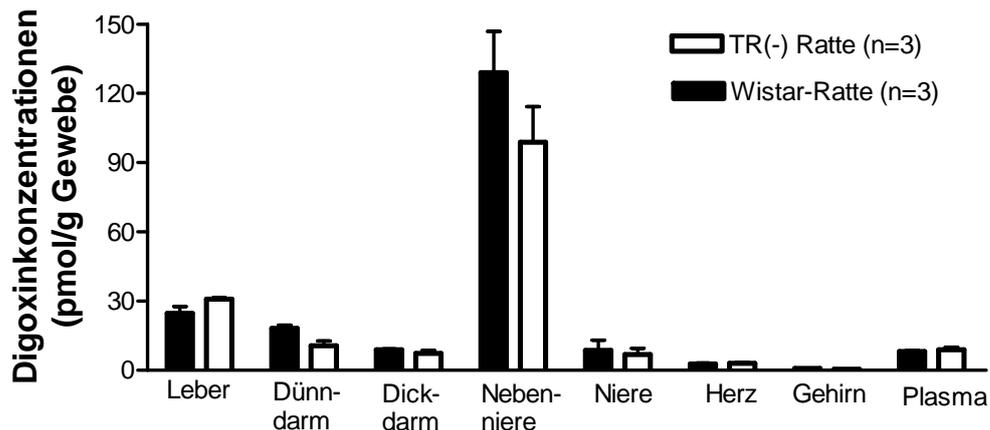


Abb. 4.36: Digoxin-Gewebekonzentrationen von Wistar- und TR(-) Ratten im Vergleich 120 min nach i.v. Applikation. Die applizierte Dosis von radioaktiv markiertem Digoxin entspricht 0,01 mg/kg KG. Dünndarm und Dickdarm wurden inklusive Darminhalt analysiert. Die Plasmawerte beziehen sich auf pmol/ml.

4.5.6. Makrozyklische Laktone: Ivermectin und Selamectin

In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass Ivermectin ein gutes Substrat des Mdr1-Transporters darstellt. *In vivo* hatte Mdr1 dabei vor allem eine Bedeutung für die Penetration von Ivermectin über das Darmepithel und die Blut-Hirn-Schranke. Allerdings wurde der hepatobiliäre Transport des Ivermectins bisher nicht *in vivo* untersucht. Um die Bedeutung des Mdr1-Transporters auch für den Lebertransport zu ermitteln, wurden daher *in situ* Galleausscheidungsversuche und Plasmakinetiken für Ivermectin und die nahe verwandte Substanz Selamectin an *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen und TR(-) Ratte im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Tieren durchgeführt.

Hepatobiliäre Elimination von Ivermectin bei der Maus

Um die hepatobiliäre Ausscheidung von Ivermectin zu messen, wurde [³H]Ivermectin in die Schwanzvene in einer Dosierung von 1,3 µg/kg Körpergewicht injiziert.

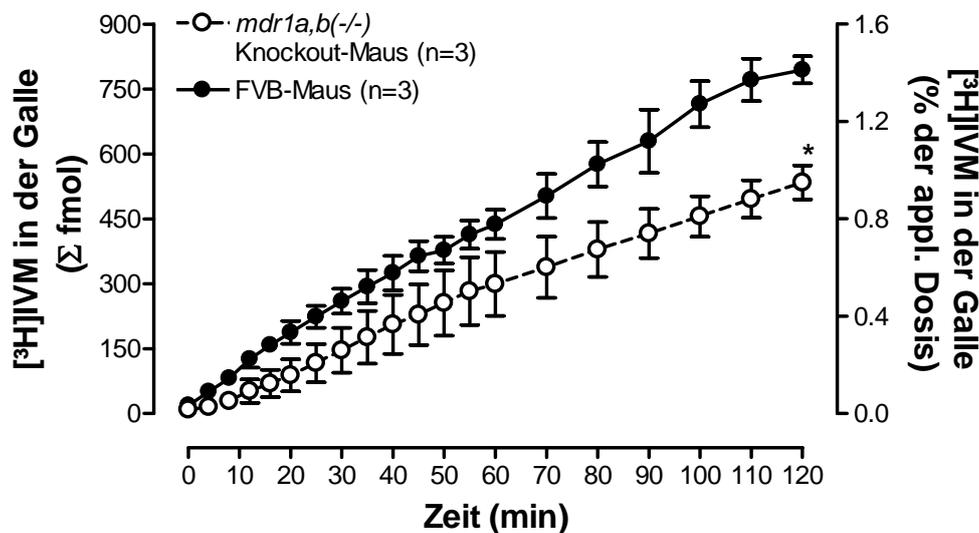


Abb. 4.37: Kumulative Ausscheidung von [³H]Ivermectin in die Galle über 120 min. Es wurden 1,2 µg/kg KG Ivermectin in die Schwanzvene appliziert. Nach 120 min wurde von den Wildtyp-Mäusen etwa 1,5% der applizierten Dosis (54,17 pmol) über die Galle ausgeschieden. Bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen waren dies etwa 1% der applizierten Dosis (51,87 pmol). *** $p < 0,001$ FVB-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus.

Ivermectin ist eine stark lipophile Substanz, die sehr langsam über die Leber ausgeschieden wird. Dies zeigte sich auch bei den *in situ* Galleausscheidungsversuchen (Abb. 4.37). Es zeigte sich, dass bei beiden Mausstämmen über die Galle nur ein sehr geringer Teil der applizierten Ivermectinmenge ausgeschieden wurde. In der kumulativen Darstellung wurde

aber eine signifikant niedrigere Galleausscheidung von Ivermectin bei den *mdr1a,b(-/-)* Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Abb. 4.37). In Zahlen ausgedrückt heißt dies: Nach 2 Stunden wurden bei den Wildtyp-Mäusen 1,5% der applizierten Dosis und bei den Knockout-Mäusen 1% mit der Galle ausgeschieden.

Hepatobiliäre Elimination von Ivermectin bei der Ratte

Obwohl Ivermectin als klassisches Mdr1 Substrat in der Literatur beschrieben ist, steht immer noch zur Diskussion, ob möglicherweise andere Transporter, z.B. Mrp2, an der Elimination von Ivermectin beteiligt sind. Um eine mögliche Rolle von Mrp2 nachzuweisen, wurden auch bei der TR(-) Ratte und der Wistar Ratte entsprechende Galleausscheidungsversuche mit [³H]Ivermectin durchgeführt. Die Dosis lag bei diesen Versuchen mit 0,3 µg/kg KG deutlich unterhalb der therapeutischen Dosierung (200 µg/kg KG).

Ivermectin wurde bei beiden Rattenstämmen schon nach 8 min in der Galle nachgewiesen, wobei sich für die TR(-)-Ratte und die Wistar-Ratte die gleichen initialen Ausscheidungskurven ergaben. Schon nach 12 min wird das Maximum der biliären Ausscheidung in beiden Rattenmodellen erreicht, welches bei der Wistar-Ratte 0,16 fmol/min/g KG und bei der TR(-) Ratte 0,18 fmol/min/g KG beträgt. Danach fällt die Ivermectinausscheidung bis zur siebzigsten Minute auf 0,1 fmol/min/g KG ab (Abb. 4.38).

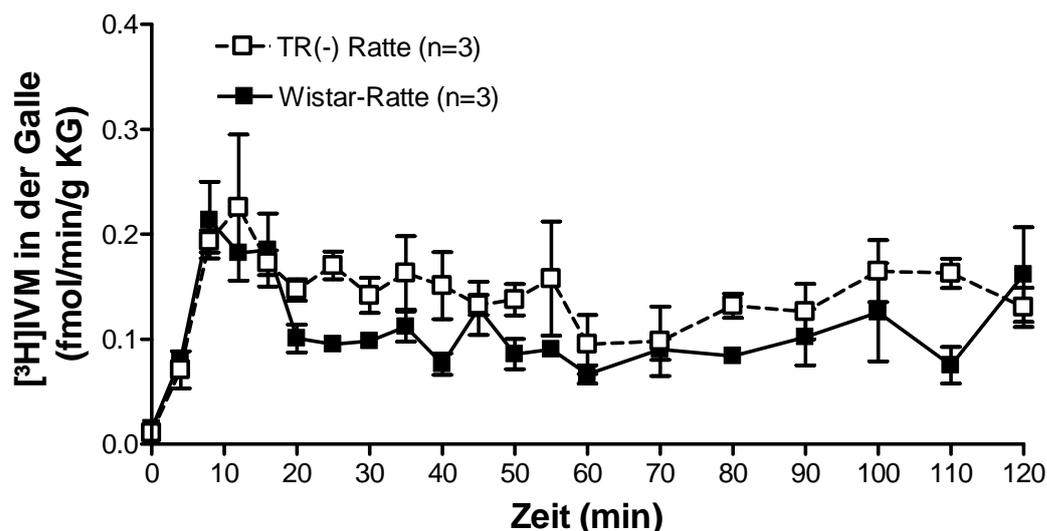


Abb. 4.38. Galleausscheidung von [³H]Ivermectin nach intravenöser Applikation von 0,3 µg/kg KG über 120 min. Im Zeitraum t = 0 bis t = 20 min wurden alle 4 min Galleproben gesammelt, von t = 20 bis t = 60 min in 5-Minuten-Intervallen, von t = 60 bis t = 120 in 10-Minuten-Intervallen.

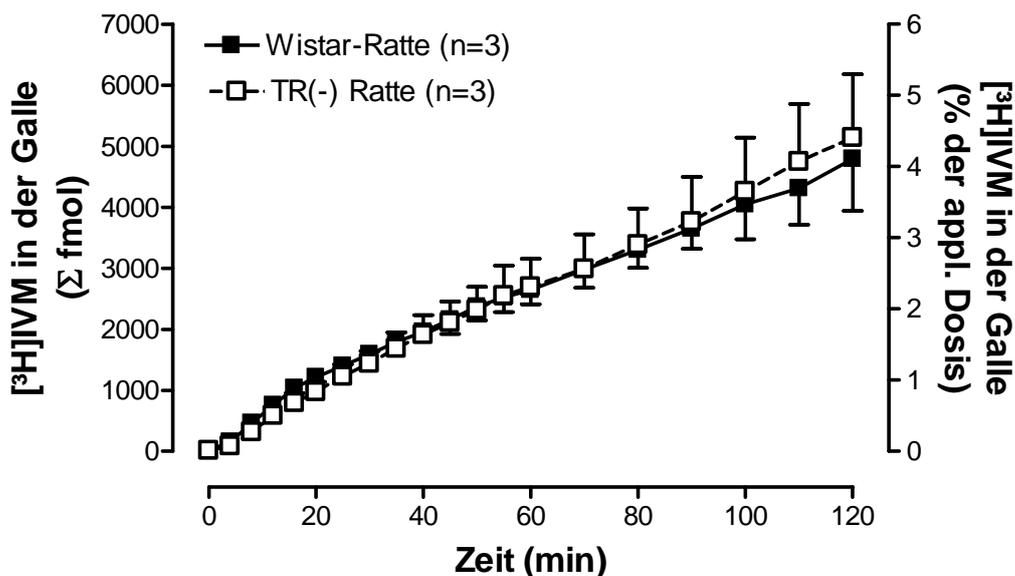


Abb. 4.39: Kumulative Ausscheidung von [³H]Ivermectin in die Galle über 120 min. Es wurden 0,3 µg/kg KG Ivermectin in die Schwanzvene appliziert. Nach 120 min wurde von den Wistar-Ratten etwa 4,4% der applizierten Dosis (118,7 pmol) über die Galle ausgeschieden. Bei den TR(-) Ratten waren dies etwa 4,2% der applizierten Dosis (142,4 pmol).

Pharmakokinetik von [³H]Ivermectin bei Maus und Ratte

Die pharmakokinetischen Parameter sowie die maximale Gallekonzentration (C_{\max}), AUC und biliäre Clearance von Ivermectin sind bei der *mdr1a,b(-/-)* Knockout-Maus tendenziell niedriger als für die Wildtyp-Maus, allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (Tab. 4.6).

Die Wistar-Ratten haben das [³H]Ivermectin tendenziell langsamer ausgeschieden als die *mrp2*-defizienten TR(-) Ratten. Deutlich wird dies in den Werten der Tabelle 4.6, wo die C_{\max} , AUC und biliäre Clearance-Daten der TR(-) Ratten generell größer sind. Allerdings wird auch hier das Signifikanzniveau gegenüber dem Wildtyp nicht erreicht.

Tab. 4.6: Pharmakokinetische Parameter der *in situ* Galleausscheidungsdaten von [³H]IVM (1,3 / 0,3 µg/kg KG) bei FVB Wildtyp- und *mdr1a,b(-/-)* Knockout-Maus sowie Wistar-Ratte und TR(-) Ratte.

Spezies	$C_{\max \text{ bile}}$ (ng/ml)	$AUC_{\text{last bile}}$ (hr*pg/ml)	Cl_{bile} (ml/h)
FVB Wildtyp-Maus	1,25 ± 1,08	1494,9 ± 45,4	1,43 ± 0,91
<i>mdr1a,b (-/-)</i> Maus	0,57 ± 0,59	510,9 ± 149,8	0,43 ± 0,12
Wistar-Ratte	0,11 ± 0,06	109,8 ± 88,5	3,81 ± 0,35
TR(-) Ratte	0,20 ± 0,00	409,9 ± 96,2	4,89 ± 0,50

4.5.7. Pharmakokinetik und Gehirnpenetration von Ivermectin

In der Literatur finden sich keine systematischen Angaben zu Veränderungen in der Pharmakokinetik des Ivermectins nach verschiedenen Applikationsformen bei Tieren mit defektem Mdr1-Transporter. Um diese Lücke zu schließen und erstmals Einblicke in die Plasmakinetik in Verbindung mit der Gewebepenetration des Ivermectin zu erhalten, wurden Applikationsstudien (i.v., p.o., spot-on) an *mdr1a,b* (-/-), *bcrp1* (-/-) und *mrp1* (-/-) Knockout-Mäusen mit [³H]Ivermectin durchgeführt. Die entsprechenden Bcrp und Mrp1 Knockout-Mäuse wurden in diese Versuche mit einbezogen, da aktuell diskutiert wird, ob Ivermectin möglicherweise auch von diesen Mdr1-verwandten Efflux-Transportern transportiert wird.

Plasmakinetik von Ivermectin bei der Maus

Die Plasmakinetikversuche von Ivermectin bei der Maus erfolgten in therapeutischer Dosierung mit 0,2 mg/kg Körpergewicht in allen drei Applikationsformen. Bei der Betrachtung der Plasmakonzentration von Ivermectin fällt auf, dass die entsprechende Kurve bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus tendenziell in allen drei Applikationsformen über der Kurve der Wildtyp-Maus liegt, allerdings wird keine Signifikanz erreicht (Abb. 4.40). Bemerkenswert ist, dass die Ivermectin Plasmakonzentrationen im steady state sowohl nach i.v. als auch nach p.o. Applikation im Bereich von 40 bis 60 ng/ml liegen.

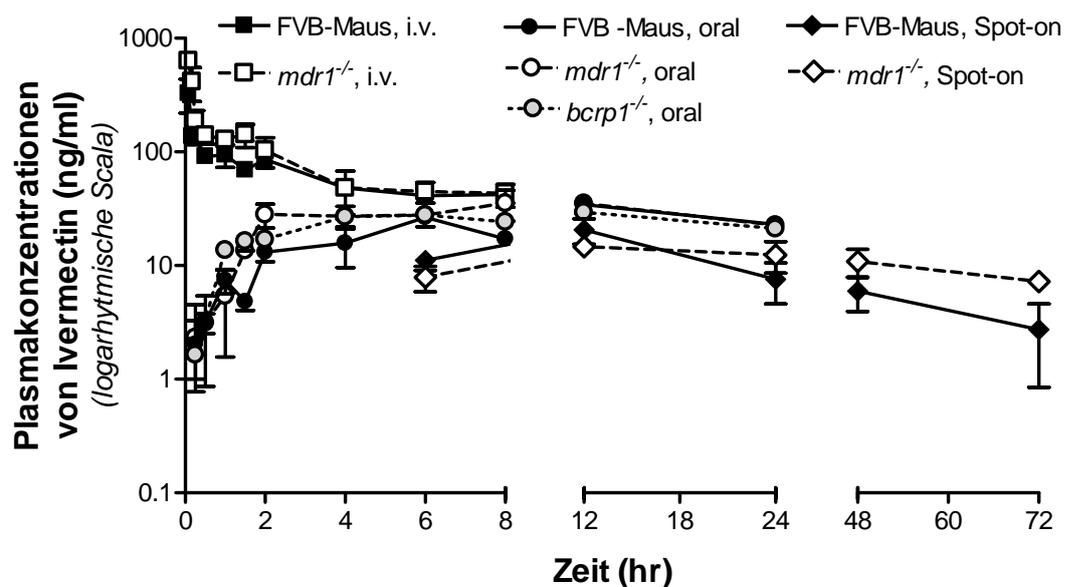


Abb. 4.40: Plasmakonzentrationen von Ivermectin bei den FVB-Wildtyp, *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen. Ivermectin wurden in einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG jeweils i.v., p.o. und Spot-on appliziert. Pro Applikationsart wurden je 3 –4 Tiere verwendet.

Tab. 4.7: Pharmakokinetische Daten zum Ivermectin (0,2 mg/kg KG) bei FVB Wildtyp-, *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen.

Spezies	Applikation	C_{\max}/C_0 i.v. (ng/ml)	T_{\max} (h)	AUC_{last} (hr*ng/ml)	$F\Delta 8h^1$ (%)
FVB Wildtyp- Maus	i.v (8 h)	642,3 ± 478,7		524,3 ± 76,1	100
	oral (24 h)	35,0 ± 9,3	9,3 ± 4,6	573,1 ± 104,7	26,5
	Spot-on (72 h)	20,6 ± 9,0	12,0 ± 0,0	582,0 ± 300,2	
<i>mdr1a,b</i> (-/-) Maus	i.v (8 h)	944,1 ± 365,7		693,3 ± 200,3	100
	oral (24 h)	42,0 ± 10,2	10,7 ± 2,3	670,6 ± 63,8	32,9
	Spot-on (72 h)	16,1 ± 5,3	16,0 ± 6,9	726,3 ± 268,0	
<i>bcrp1</i> (-/-) Maus	oral (24 h)	32,4 ± 3,0	10,0 ± 3,5	576,2 ± 47,9	

¹ $F\Delta 8h$: orale Bioverfügbarkeit von Ivermectin nach 8 Stunden (Intravenös/Oral)

In Tabelle 4.7 sind die pharmakokinetischen Parameter für Ivermectin nach i.v., p.o. und Spot-on Applikation dargestellt. Die C_{\max} , AUC und Bioverfügbarkeitswerte sind in einem Zeitraum von 8 Stunden nach oraler Applikation bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus tendenziell höher als bei dem Wildtyp. Die Unterschiede erreichen aber nicht das Signifikanzniveau. Die orale Bioverfügbarkeit nach 8 Stunden ($F\Delta 8h$) liegt bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus mit 32,9% erwartungsgemäß höher als bei der Wildtyp-Maus mit 26,5%. Im Gegensatz dazu sind die AUC-Werte sowie C_{\max} und T_{\max} bei den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen mit den Werten Wildtyp-Mäuse vergleichbar (Tab. 4.7). Das heißt, dass der Ausfall von Bcrp die Plasmakinetik nach oraler Aufnahme von Ivermectin nicht verändert hat. Die gesamte (totale) Clearance von Ivermectin war bei allen Genotypen nach i.v. Applikation identisch und betrug 7,8 ml/h bei den FVB Wildtyp- und 7,7 ml/h bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen.

Gewebekonzentrationen von Ivermectin bei der Maus

Die Gewebekonzentrationen von Ivermectin 8 h nach der i.v. Applikation zeigten, mit Ausnahme von Gehirn und Hoden, keine signifikanten Unterschiede zwischen FVB Wildtyp- und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus (Tab. 9.11, Anhang). Die Konzentration von Ivermectin war im Hoden bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus im Vergleich zu dem Wildtyp aber um den Faktor 2,3 erhöht ($p < 0,001$). Weiterhin wurden in den folgenden Geweben bei den Knockout-Mäusen erhöhte Ivermectinkonzentrationen gemessen (Faktoren in Klammern): Dünndarm (2,1), Magen (1,4), Muskelgewebe (1,3) und Leber (1,2) (Tab. 9.11, Anhang). Die Plasmakonzentrationen von Ivermectin 8 Stunden nach i.v. Applikation waren bei beiden

Genotypen aber gleich und betragen 48 ng/ml bzw. 49 ng/ml. Dies bedeutet, dass zum Zeitpunkt $t = 8$ h die Organelimination in der Knockout-Maus nicht mehr mit dem Plasmaspiegel in der gleichen Weise korreliert wie bei der Wildtyp-Maus.

Dieser Effekt kommt nach 24 h noch stärker zum Tragen. Hier sind die Konzentrationen von Ivermectin bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen in allen Geweben deutlich erhöht (Tab. 9.12, Anhang). Besonders hohe Gewebekonzentrationen wurden neben dem Gehirn (siehe unten) in folgenden Geweben beobachtet (Faktoren in Klammern): Leber (3,7), Hoden (3,2), Muskelgewebe (2,8) Fettgewebe (2,5), Niere (2,3) und Herz (2,3). Im Magen-Darm Trakt wurden - im Gegensatz zu den oben genannten Geweben - keine signifikant erhöhten Konzentrationen von Ivermectin bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren gemessen (Tab. 9.12, Anhang). Die *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus wies dagegen auch nach 24 h keine Unterschiede in den Gewebekonzentrationen von Ivermectin auf (Tab. 9.12, Anhang). Es ist somit festzustellen, dass insbesondere zu späteren Zeitpunkten erhebliche Konzentrationsunterschiede in den Organen zwischen *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus und Wildtyp-Maus zu messen sind, obwohl bei beiden Genotypen die Plasmaspiegel auf gleichem Niveau liegen (Tab. 9.12, Anhang).

Wegen der verzögerten Resorption nach lokaler Applikation auf die Haut wurden die Gewebekonzentrationen bei der Spot-on Auftragung von Ivermectin erst nach 72 h erhoben. Nach Spot-on Applikation von Ivermectin waren die Gewebekonzentrationen bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus generell erhöht, allerdings waren diese nur im Hodengewebe mit einem Faktor 3,5 (Tab. 9.13, Anhang) signifikant höher als bei der Wildtyp-Maus.

Gehirnkonzentrationen von Ivermectin bei der Maus

Die gravierendsten Unterschiede zwischen *mdr1a,b* (-/-) Knockout- und Wildtyp-Maus ergaben sich in der Gehirnpenetration von Ivermectin: In allen drei Applikationsformen reicherte sich Ivermectin um den Faktor 40-60 im Gehirn der *mdr1a,b* (-/-) Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen an (Abb. 4.41). Ein sehr wichtiger Befund ergab die Messung der Ivermectinkonzentrationen im Gehirn der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse nach Spot-on Applikation. Hier wurden nur vergleichsweise geringe Gehirnkonzentrationen erreicht, nämlich 27,17 ng/g gegenüber 127 ng/g und 144 ng/g Gehirn nach oraler bzw. i.v. Applikation. Im Unterschied zu den *mdr1a,b* (-/-) Mäusen wiesen die *bcrp1* (-/-) und *mrlp1* (-/-) Knockout-Mäuse keine erhöhte Gehirnakкумуляtion von Ivermectin auf (Abb. 4.41).

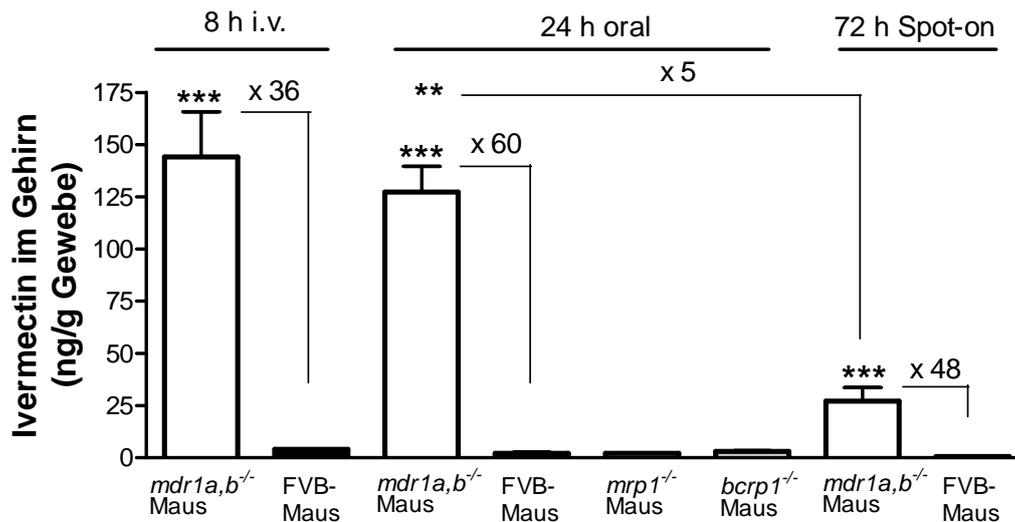


Abb. 4.41. Gehirnkonzentrationen von Ivermectin bei Wildtyp- und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen nach i.v., p.o. und Spot-on Applikation. Zusätzlich sind Daten für die *bcrp1* (-/-) und *mrp1* (-/-) Knockout-Mäusen nach p.o. Applikation von Ivermectin gezeigt. *** $p < 0,001$, FVB-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus; ** $p < 0,01$, FVB-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus; * $p < 0,05$, FVB-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus.

Plasmakinetik und Gewebekonzentrationen von Ivermectin bei der Ratte

Zur potenziellen Bedeutung des Mrp2-Transporters für die Ivermectin-Passage durch die Blut-Hirn-Schranke, wurden auch Applikationsstudien bei TR(-)- und Wistar-Ratten durchgeführt. Dafür wurde Ivermectin i.v. in einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG appliziert und zu bestimmten Zeitpunkten Blutproben entnommen. Die Plasmakonzentrationen zeigten dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Abb. 4.42).

Bei Betrachtung der pharmakokinetischen Parameter fällt aber auf, dass die TR(-)-Ratten tendenziell etwas schneller Ivermectin ausscheiden als die Wistar-Ratten. Dafür sprechen die höhere totale Clearance (95,9 ml/h vs. 67 ml/h) und die niedrigeren AUC-Werte (Tab. 4.8) sowie die bessere Galleausscheidung von Ivermectin bei der TR(-)-Ratte (Tab. 4.6). Andererseits wurden 8 Stunden nach Ivermectingabe keine Unterschiede in den Gewebekonzentrationen zwischen beiden Genotypen festgestellt (Tab. 9.14, Anhang). Einzige Ausnahmewar der Dünndarm, in welchem die Konzentration von Ivermectin um den Faktor 3,9 im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Insbesondere wurde bei den TR(-)-Ratten keine Gehirnakкумуляtion des Ivermectin registriert: Nach 8 Stunden lag die Ivermectinkonzentration bei 5,3 ng/g Gewebe bei beiden Rattenstämmen (Tab. 9.14, Anhang).

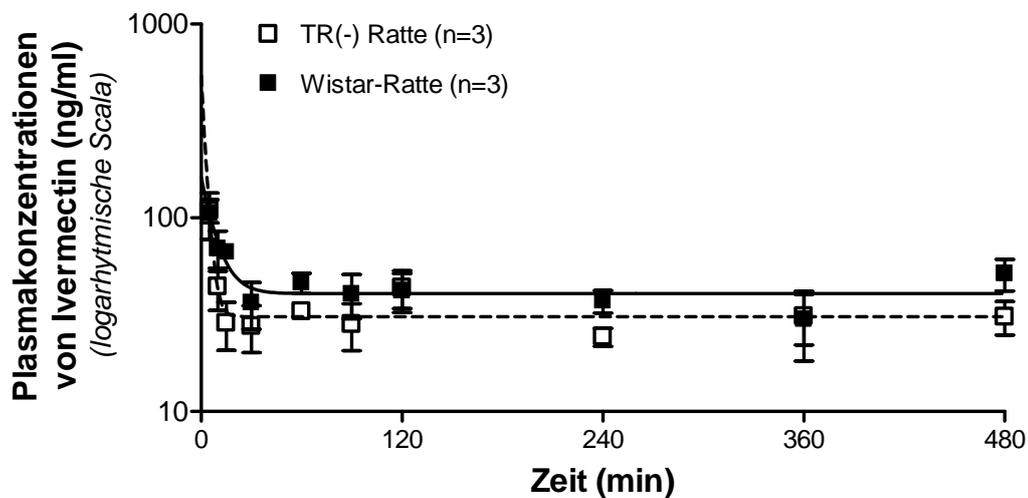


Abb. 4.42: Plasmakonzentrationen von Ivermectin bei Wistar- und TR(-)-Ratten nach i.v. Applikation von Ivermectin in einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG.

Tab. 4.8: Pharmakokinetische Parameter von Ivermectin bei den Wistar- und TR(-)-Ratten.

Spezies	C_{max} (ng/ml)	AUC_{last} (hr*ng/ml)	Cl_{total} (ml/h)
Wistar-Ratte	$227,7 \pm 51,3$	$317,1 \pm 24,2$	$67,0 \pm 26,1$
TR(-) Ratte	$212,3 \pm 74,5$	$250,7 \pm 44,3$	$95,9 \pm 44,3$

4.5.8. Pharmakokinetik und Gehirnpenetration von Selamectin

Plasmakinetik von Selamectin bei der Maus

Selamectin wurde in 3 verschiedenen Applikationsformen (i.v., p.o. und Spot-on) mit einer Dosierung von 12 mg/kg KG verabreicht. Die Plasmakonzentrationen von Selamectin lagen, vergleichbar mit Ivermectin, bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen in allen drei Applikationsformen tendenziell über denen der Wildtyp-Mäuse. Aber auch hier wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (Abb. 4.43). Deutlich wurde aber, dass die absoluten Plasmakonzentrationen von Selamectin nach oraler Applikation deutlich über denen nach Spot-on Applikation lagen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der pharmakokinetischen Analyse der Plasmakinetik von Selamectin: Hier wurden zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen vergleichbare Werte für C_{max} , AUC und orale

Bioverfügbarkeit berechnet (Tab. 4.9). Auch die *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus zeigte keine Unterschiede in der Plasmakinetik von Selamectin im Vergleich zur Wildtyp-Maus.

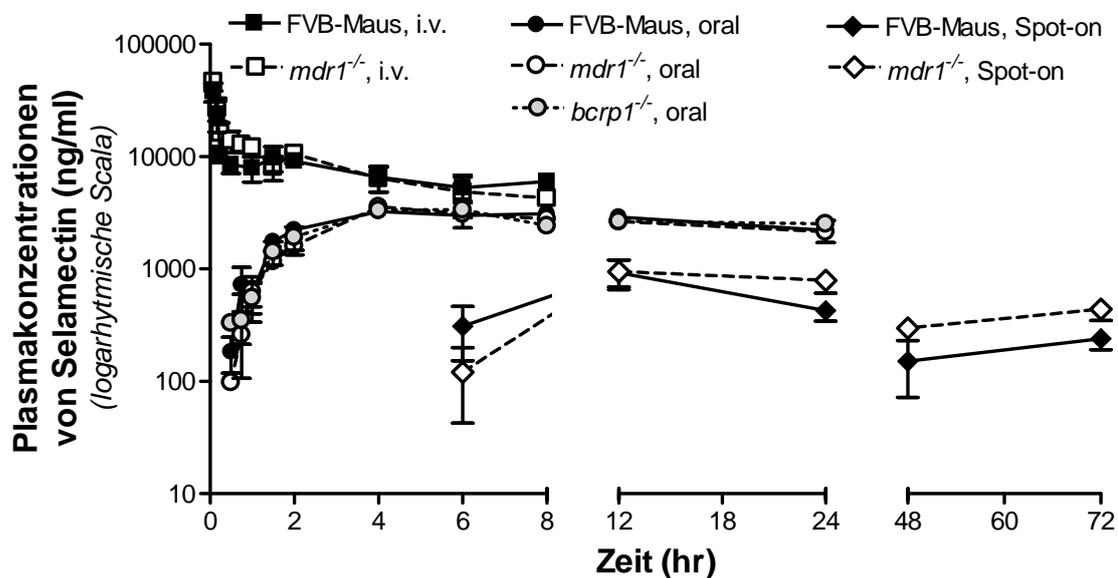


Abb. 4.43: Plasmakonzentrationen von Selamectin bei Wildtyp-, *mdr1a,b*(-/-) und *bcrp1*(-/-) Knockout-Mäusen. Selamectin wurde in einer Dosierung von 12 mg/kg KG i.v., p.o. und spot-on appliziert. Pro Applikationsart wurden je 3–4 Tiere verwendet.

Tab. 4.9: Pharmakokinetische Daten von Selamectin (12 mg/kg KG) bei FVB Wildtyp-, *mdr1a,b*(-/-) und *bcrp1*(-/-) Knockout-Mäusen.

Spezies	Applikation	C_{\max}/C_0 i.v. (ng/ml)	T_{\max} (h)	AUC_{last} (h*ng/ml)	$F\Delta 8h^1$ (%)	$F\Delta 24h^2$ (%)
FVB	i.v (8 h)	52558,2 ± 11409,5		58482,0 ± 14705,9	100	
Wildtyp-Maus	oral (24 h)	3714,0 ± 464,1	5,5 ± 4,4	62285,7 ± 7673,3	42,8	100
	Spot-on (72 h)	969,6 ± 403,5	10,0 ± 3,5	24799,0 ± 7530,8		23,7
<i>mdr1a,b</i> (-/-) Maus	i.v (8 h)	69038,7 ± 25028,5		56816,2 ± 27557,9	100	
	oral (24 h)	3839,0 ± 998,0	5,0 ± 1,2	58667,5 ± 7437,2	42,5	100
	Spot-on (72 h)	1052,5 ± 284,6	16,0 ± 6,9	35781,0 ± 11154,8		30,1
<i>bcrp1</i> (-/-) Maus	oral (24 h)	3989 ± 480	5,0 ± 1,2	60571,9 ± 10364,1		

¹ $F\Delta 8h$: orale Bioverfügbarkeit von Selamectin nach 8 Stunden (Intravenös/Oral)

² $F\Delta 24h$: relative Bioverfügbarkeit von Selamectin nach 24 Stunden nach eine Spot-on Applikation von Selamectin (Oral/Spot-on)

Die totale Plasmaclearance von Selamectin beträgt bei der Wildtyp-Maus nach i.v. Applikation 3,3 ml/h. Bei der *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Maus ist dieser Wert mit 4,5 ml/h etwas höher. Aus diesen Daten geht hervor, dass die Plasmaclearance von Selamectin weniger von

dem Genotyp der Mäuse als mehr von der Applikationsart abhängig ist. Die totale Clearance nach Spot-on Applikation ist andererseits bei der Wildtyp FVB-Maus mit 10,4 ml/h doppelt so hoch als bei der Knockout-Maus, bei welcher die totale Clearance nur 5,2 ml/h betrug.

Gewebekonzentrationen von Selamectin bei der Maus.

Die Gewebekonzentrationen von Selamectin 8 h nach i.v. Applikation zeigten außer bei Gehirn und Hoden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Genotypen (Tab. 9.15, Anhang). Im Hoden der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse wurde allerdings eine doppelt so hohe Selamectinkonzentrationen registriert wie beim Wildtyp und das trotz einer etwas niedrigeren totalen Plasmakonzentration bei der Knockout-Maus (4,26 µg/ml vs. 5,98 µg/ml).

Mit Ausnahme des Gehirns wurden 24 Stunden nach oraler Applikation keine Unterschiede bezüglich der Gewebekonzentrationen zwischen den beiden Genotypen gefunden. Die Gewebekonzentrationen lagen generell im Bereich von 2,1 bis 2,5 µg/ml (Tab. 9.16, Anhang). Betrachtet man allerdings die Konzentrationen von Selamectin 72 h nach Spot-on Applikation, so wurden in allen Geweben um den Faktor 1,9-2,9 höhere Werte bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen gemessen (Tab. 9.17, Anhang). Insbesondere in Dünndarm und Hoden wurden signifikant höhere Selamectinkonzentrationen detektiert. Auch war die Plasmakonzentration von Selamectin mit 0,44 µg/ml bei den Knockout-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen mit 0,24 µg/ml um den Faktor 1,8 höher.

Gehirnkonzentrationen von Selamectin bei der Maus

Da Selamectin wie Ivermectin in hohen Konzentrationen neurotoxische Symptome verursachen kann, war eine zentrale Frage dieser Untersuchungen, wie hoch die Gehirnpenetration dieser Substanz bei der *mdr1a,b* (-/-) Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus einzuschätzen ist, insbesondere im Vergleich zu Ivermectin. Wie in der Abbildung 4.44 deutlich wird, stieg die Gehirngängigkeit des Selamectins bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus in allen drei Applikationsformen deutlich an. Im Vergleich zu Ivermectin fiel diese Steigerung jedoch deutlich geringer aus. Während die Quotienten-Werte, welche den Unterschied in der Gehirnkonzentration zum Wildtyp angeben, bei Selamectin 5 bis 10-fach höher lagen, erreichten diese Wert bei Fehlen von Mdr1 für Ivermectin das 40 bis 60-fache (siehe Abb. 4.41). Dies bedeutet, dass sich Selamectin in geringerem Maße im Gehirn anreichert als Ivermectin. Bemerkenswert ist, dass die absoluten Gehirnkonzentrationen von Selamectin 72 Stunden nach Spot-on Applikation bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus mit 1,12 µg/g gut vergleichbar waren mit den Gehirnkonzentrationen von Selamectin 24 Stunden

nach oraler Applikation bei dem Wildtyp mit 0,70 µg/g, was von praktischer Bedeutung ist. Im Gegensatz zur *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus wiesen die beiden anderen Knockout-Mausstämme, *bcrp1* (-/-) und *mrp1* (-/-), keine Gehirnakkumulationen von Selamectin auf (Abb. 4.44). Dies bedeutet, dass ebenso wie beim Ivermectin, diese beiden Efflux-Pumpen *in vivo* keine Transportfunktion für Selamectin an der Blut-Hirn-Schranke haben.

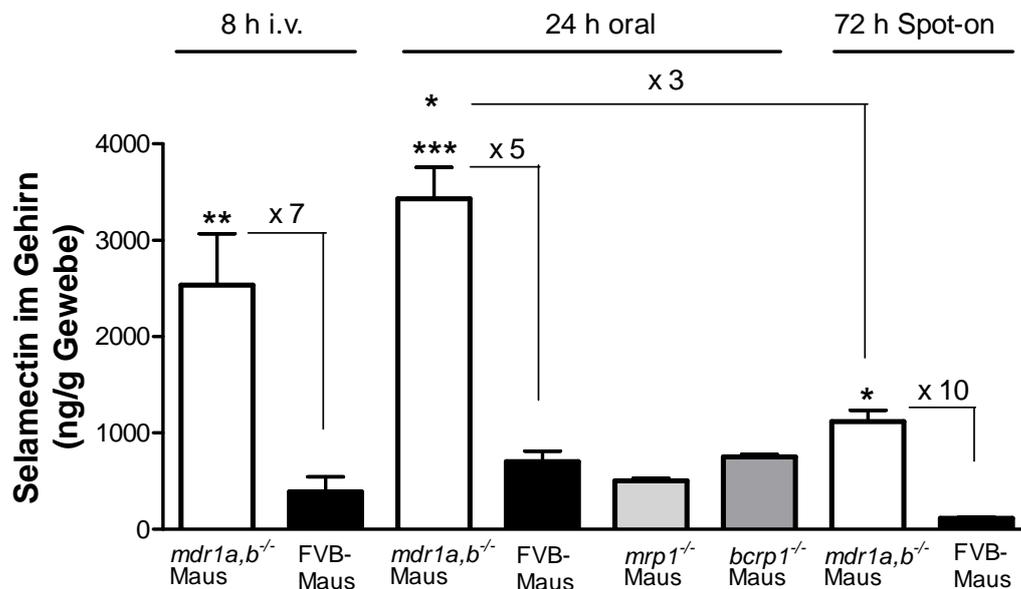


Abb. 4.44. Gehirnkonzentrationen von Selamectin bei Wildtyp- und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen nach i.v., p.o. und Spot-on Applikation. Zusätzlich werden Daten für die *bcrp1* (-/-) und *mrp1* (-/-) Knockout-Mäuse gezeigt. Selamectin wurde in einer Dosierung von 12 mg/kg KG appliziert. *** $p < 0,001$, FVB-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus; ** $p < 0,01$, FVB-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus; * $p < 0,05$, FVB-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus.

Plasmakinetik und Gewebekonzentrationen von Selamectin bei der Ratte

Die Versuche zur Bestimmung der Plasmakinetik von Selamectin wurden bei Ratten ebenfalls mit einer Dosierung von 12 mg/kg Körpergewicht durchgeführt. Die Plasmakonzentrationen von Selamectin ergaben nach i.v. Applikation keine Unterschiede zwischen Wistar und TR(-) Ratten (Abb. 4.45): Etwa 60 min nach i.v. Applikation wurden bei beiden Genotypen Plasmakonzentrationen von 3 µg/ml gemessen, die bis zum Versuchsende nach 8 h konstant blieben. Vergleichbar mit Ivermectin wird Selamectin bei TR(-) Ratten im Vergleich zu Wistar-Ratten tendenziell etwas schneller ausgeschieden, was bei der Analyse der pharmakokinetischen Parameter deutlich wurde (Tab. 4.10).

Vergleicht man die Gewebekonzentrationen von Selamectin bei beiden Rattenstämmen, so treten, mit Ausnahme des Dünndarms, keine signifikanten Unterschiede auf (Tab. 9.18, Anhang). Einzig im Dünndarm war die Konzentration der Substanz bei den TR(-) Ratten um den Faktor 3,9 im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Dieser Effekt wurde bereits für das

Ivermectin gefunden. Bei der TR(-)-Ratte wurde im Vergleich zur Wistar-Ratte insbesondere keine Zunahme der Gehirnkonzentration beobachtet. Demnach hat Mrp2 in der Blut-Hirn-Schranke keine praktische Bedeutung für den Transport von Selamectin.

Tab. 4.10: Pharmakokinetische Daten von Selamectin bei Wistar und TR(-) Ratten.

Spezies	C_{\max} (ng/ml)	AUC_{last} (hr*ng/ml)	Cl_{total} (ml/h)
Wistar-Ratte	10458,1 ± 1248,8	27133,9 ± 8407,3	58,88 ± 5,57
TR(-) Ratte	30756,5 ± 19815,9	22675,8 ± 1605,2	74,51 ± 24,92

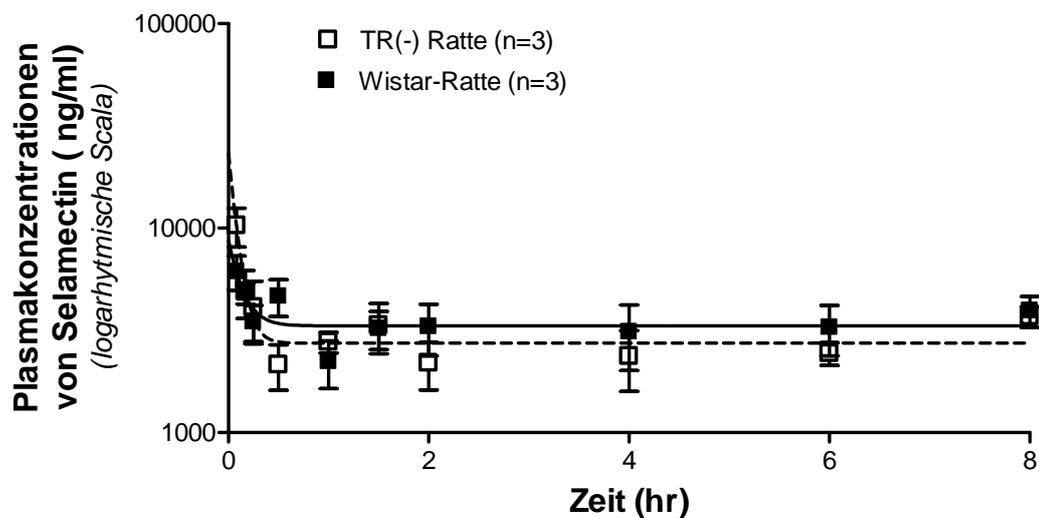


Abb. 4.45: Vergleich der Plasmakonzentrationen von Selamectin bei den Wistar- und TR(-) Ratten nach intravenöser Applikation von Selamectin bei einer Dosierung von 12 mg/kg KG.

5. Diskussion

5.1. Tierversuche in der biomedizinischen Forschung

Tierversuche spielten von Beginn an eine bedeutende Rolle in der Entwicklung neuer Arzneistoffe. Tierversuche sind dann erforderlich, wenn komplexe Pharmakokinetiken wie Aufnahme, Metabolismus und Elimination von Entwicklungssubstanzen zeitgleich untersucht werden sollen. Aus Studien an Transporter-exprimierenden Zellkulturen, kann man zwar Erkenntnisse über die Transporteigenschaften der exprimierten Transporter gewinnen, sie sind aber oft in ihrer Aussage für eine *in vivo* Situation begrenzt. Zellversuche werden aber gerne für die Identifizierung von Transportsubstanzen verwendet. Inzwischen bieten sich auch dafür *in vivo* Modelle an. Durch den seit relativ kurzer Zeit möglichen Einsatz von Knockout-Tieren mit einem Ausfall definierter Transportsysteme können wichtige Erkenntnisse hinsichtlich des Substanzspektrums und der Organverteilung eines Arzneistoffs gewonnen werden.

Ob die Ergebnisse aus Tierversuchen an Mäusen und Ratten auf andere Tierarten sowie auf den Mensch übertragbar sind, war stets Gegenstand kontroverser Diskussionen. Ratten sind die am häufigsten eingesetzten Labortiere für pharmakokinetische Untersuchungen. In einer Studie von Ishizuka et al. (1999), in welcher der hepatobiliäre Transport von Temocaprilat (ein Mrp2 Substrat) und Taurocholat (ein Bsep Substrat) zwischen Ratten, Mäusen, Kaninchen, Meerschweinchen und Hunden *in vivo* und *in vitro* verglichen wurden (Abb. 5.1), zeigte sich, dass Ratten deutlich höhere Transportaktivitäten in der Leber aufweisen als die anderen Labortiere. Bei ihnen ist der Quotient aus Transportkapazität V_{\max} bei einer gegebenen Affinität des Substrates zum Transport (K_m) zwischen allen untersuchten Spezies am größten. Die molekulare Ursache dieses Phänomens ist nicht klar. Seit dem ersten Bericht über wissenschaftliche Versuche mit Mäusen im Jahre 1664, damals studierte Robert Hooke die Eigenschaften von Luft, hat die Bedeutung der Maus in der biomedizinische Forschung kontinuierlich zugenommen. Heute sind mehr als 90% aller in der Forschung verwendeten Säugetiere Mäuse [Malakoff, 2000]. Das Genom der Maus ist zu mehr als 90% mit dem des Menschen homolog. Jedoch existieren viele Unterschiede z.B. im Arzneistoffmetabolismus und Arzneistofftransport im Vergleich zum Menschen. Insbesondere für die pharmakologische Forschung liefert die Maus als Modelltier jedoch recht gut übertragbare Daten bezüglich Dosierung, Verabreichungsintervall, Wirksamkeit und unerwünschten Wirkungen [Newell et al., 1999].

Es ist nicht zu bestreiten, dass mit der Generierung von Knockout-Mäusen die Anzahl von Mäusen als Versuchstiere deutlich zugenommen hat. Diese Entwicklung hat jedoch ganz entscheidend zu einem besseren Verständnis menschlicher Erkrankungen beigetragen. Da für Ratten bisher keine Stammzelllinien etabliert sind, existieren bis heute keine entsprechenden Knockout-Ratten. Jedoch existieren Rattenstämme mit bestimmten natürlichen Mutationen, wie z.B. ZDF Ratten¹, TR(-)² und EHBR³ Ratten sowie Gunn-Ratten⁴. Für die Maus wurden weltweit bisher etwa 6917 der 62.000 Gene gezielt ausgeschaltet [Homepage der MGI (*Mouse Genome Informatics*), Stand Dezember 2005]. Nach letzten Schätzungen wurden inzwischen über 10.000 transgene Mausmodelle generiert.

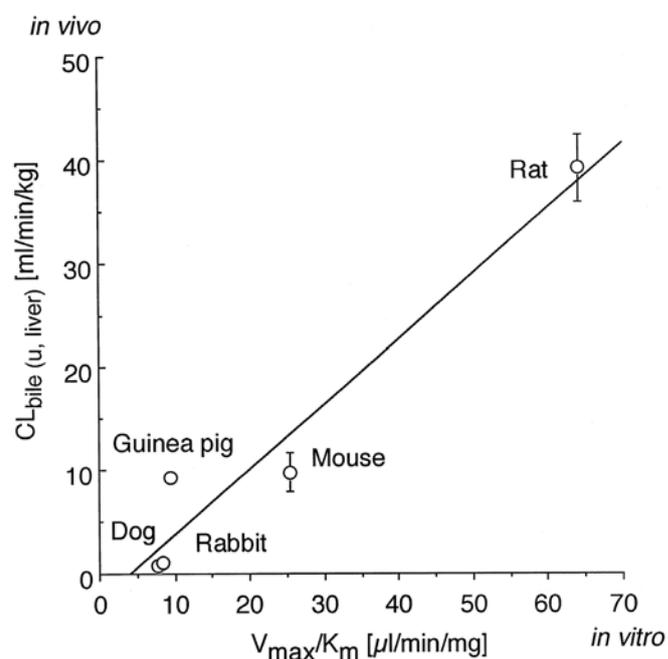


Abb. 5.1. Korrelation zwischen der Aufnahme von DNP-SG (2,4-dinitrophenyl-S-glutathion) in CMVs (canalicular membrane vesicles) *in vitro* und biliärer Clearance von ungebundenem Temocaprilat *in vivo* in der Leber [Ishizuka et al. 1999].

In dieser Doktorarbeit wurde als ein neues pharmakokinetisches Modell die Untersuchung der hepatobiliären Ausscheidung von Xenobiotika bei Mäusen mit Transportdefekten etabliert. Das Modell erlaubt die Zuordnung eines Arzneistoffs als neues Substrat zu einem bestimmten Arzneistofftransporter. Für die Etablierung dieses Modells mussten zunächst zwei wichtige Fragen beantwortet werden: (1) liegt eine Veränderung der Genexpression von anderen Arzneistofftransportern bei den Knockout-Mäusen vor (siehe Kapitel 5.2) und (2) welche

¹ Zucker-diabetic fatty Ratten, spontane Entwicklung des Typ 2 Diabetes

² Transport-defiziente Ratten (TR-), Defekt im Mrp2-Transportersystem der Leber, Abstammung Wistar-Ratte

³ Eisai Hyperbilirubinämie Ratte (EHBR), Defekt im Mrp2-Transportersystem der Leber, Abstammung Sprague-Dawley Ratte

⁴ Defekt der Glucuronyl-Transferase-Aktivität

Funktionalität besitzen die nicht ausgeschalteten Arzneistofftransporter. In den folgenden Kapitel (5.3 – 5.5) wird die Anwendung der erarbeiteten Methoden anhand ausgewählter Substanzen diskutiert und mit der bestehenden Literatur in Verbindung gebracht.

5.2. Kompensatorische Mechanismen auf Gen-Ebene bei Tieren mit Transportdefekten

Ein wichtiger Aspekt in der Auswertungen und Interpretation der im Tierversuch gewonnenen Daten ist die Berücksichtigung möglicher kompensatorischer Mechanismen der Genexpression und einer daraus resultierenden Anpassung insbesondere der hepatischen Elimination bei den entsprechenden Knockout-Tieren. Für diese Untersuchungen wurden folgende Maus- und Rattentiermodelle gewählt, bei denen die oben genannten Transporter fehlten: *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse sowie *mrp2*-defiziente TR(-) Ratten.

***Mrp2*-defiziente TR(-) Ratten**

Seit der Entdeckung der *mrp2*-defizienten Rattenstämmen TR(-) und EHBR Ratten [Dijkstra et al. 1997, Rost et al 1999, Dietrich et al. 2001, Kivistö et al. 2005] und seit der Verfügbarkeit der *mrp2* (-/-) Knockout-Maus [Vlaming et al. 2006, Nezasa et al. 2006, Lagas et al. 2006, Kruh et al. 2007] wurde intensiv an der Pharmakokinetik potentieller Mrp2-Substrate geforscht (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.3 Tab 1.3). Problematisch ist bei diesen Tieren, dass es beim Fehlen von Mrp2 zu einer kompensatorischen Hochregulation von Mrp3 und Mrp4 in Leber und Niere kommt (Tab. 5.1). Da diese Transporter in der Leber in der basolateralen Membran und in der Niere in der apikalen Membran lokalisiert sind, wird die Substanz nicht mehr durch Mrp2 in die Galle ausgeschieden, sondern kann über Mrp3 aus der Leber zurück in das Blut gelangen und somit vermehrt renal ausgeschieden werden. Eine Hochregulation von Mrp3 in der basolateralen Membran der Hepatozyten von TR(-) Ratte wurde bereits mehrfach beschrieben [Ogawa et al. 2000, Soroka et al. 2001, Hirouchi et al. 2005, Johnson et al. 2006]. Auch *mrp2* (-/-) Knockout-Mäuse aus dem Labor von A. Schinkel zeigten eine erhöhte Expression von Mrp3 in der Leber in Kombination mit einem verminderten Gallefluss [Vlaming et al. 2006], ein Effekt, der auch an den *mrp2*-defizienten TR(-) Ratten [Paulusma et al. 1999] eine Rolle spielt. Im Gegensatz zu den eben beschriebenen Ergebnissen wurde bei *mrp2* (-/-) Knockout-Mäusen der Firma Deltagen Inc. keine Hochregulation von Mrp3 in der Leber gefunden [Chu

et al. 2006]. Bei letzteren Knockout-Mäusen fand man jedoch eine vermehrte Expression von Mrp4 in der Leber [Chu et al. 2006].

Weitere Studien an TR(-) Ratten ergaben eine organabhängige Veränderung in der Expression von Transportern auf Proteinebene. So wurden keine Unterschiede in der Genexpression von verschiedenen Arzneistofftransportern im Vergleich zum Wildtyp in der Leber (ausgenommen Mrp3), Darm und Gehirn [Johnson et al. 2006, Ogihara et al. 2006] gefunden (Tab 5.1), wohl aber in der Niere, in der eine 2-fach höhere Expression von Mrp4 [Chen et al. 2005] und 3,5-fach höhere Expression von Mrp3 beobachtet wurde [Johnson et al. 2006]. Auch im Dickdarm (Colon) wurde bei den TR(-) Ratten eine höhere Expression von Mrp3 und Mrp4 festgestellt [Johnson et al. 2006].

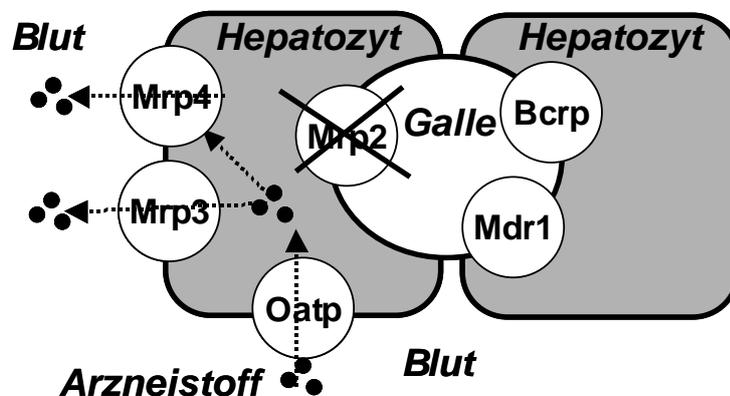


Abb. 5.2. Schematische Darstellung möglicher Kompensationsmechanismen in der Leber bei Fehlen von Mrp2. Durch das Fehlen des kanalikulären Efflux über Mrp2 könnte die Substanz über alternative Wege (Mrp3 und Mrp4) ins Blut gelangen und anschließend über die Niere ausgeschieden werden. Eine Hochregulation von Mrp3 und Mrp4 wurde für die TR(-) Ratte beschrieben.

Weiterhin wurde für den Mdr1-Transporter eine Hochregulation der Expression auf mRNA- und Proteinebene in der Leber und im Dünndarm der TR(-) Ratten beschrieben, während eine Downregulation im Dickdarm erfolgte [Oswald et al. 2006]. Diese Literaturdaten stehen im Widerspruch zu anderen Ergebnissen in der Literatur [Johnson et al. 2006] und auch zu den in dieser Arbeit präsentierten Daten, bei denen kein Unterschied in der Expression von Mdr1 in Leber, Niere und Gehirn zwischen TR(-)- und Wistar-Ratte gefunden wurde (Tab. 5.1). Widersprüchliche Ergebnisse gibt es auch hinsichtlich der Gehirnexpression von Arzneistofftransportern: Publierte Daten [Johnson et al. 2006] (auf Protein-Ebene) und die in dieser Arbeit präsentierten Daten (auf mRNA-Ebene) beschreiben keine Änderung der Expression von Mdr1 und Bcrp im Gehirn, während eine neue Studie von Hoffmann und Löscher (2007) auf Grundlage von immunohistochemischen Daten eine erhöhte Expression von Mdr1 in der Blut-Hirn-Schranke bei der TR(-) Ratte im Vergleich zur Wistar-Ratte beschreibt.

Ebenso sind Unterschiede in der Expression der Aufnahme-Carrier in der Leber festzustellen, welche ebenfalls zu einem Kompensationsmechanismus bei dem Ausfall eines Efflux-Systems dienen können. Eine Studie von Kuroda et al. (2004) zeigte zum Beispiel, dass die Expression der hepatischen Oatp-Carrier Oatp1a1 und Oatp1a4 in der Leber der TR(-) Ratte um etwa 50% auf Protein- und etwa 30% auf mRNA-Ebene reduziert ist. Diese Aussage wird jedoch in einer Studie von Oswald et al. (2006) (auf mRNA-Ebene) widerlegt, welche zeigt, dass die Transporter Oatp1a1, Oatp1a4 und Oatp1b2 bei der TR(-) Ratte im Vergleich zu der Wistar-Ratte nicht unterschiedlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Expressionsdaten für Oatp4c1, Oat1, Oat3, Oct1 und Oct2 in der Leber und Niere bei TR(-) Ratten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren erhoben. Hierbei wurden keine Unterschiede in der Genexpression dieser Arzneistofftransporter gefunden.

Zusammengefasst ist festzustellen, dass die Daten über die Expression von Arzneistofftransportern in verschiedenen Geweben der TR(-) Ratte sehr widersprüchlich sind, was möglicherweise auch durch unterschiedliche Zuchtlinien und Haltungsbedingungen verursacht wird. Daher war die Untersuchung der eigenen Tiere hinsichtlich ihrer Expressionsprofile eine notwendige Voraussetzung für deren Verwendung für pharmakokinetische Studien.

***Mdr1a,b (-/-)* und *bcrp1 (-/-)* Knockout-Mäuse**

Der Kenntnisstand zur Expression von Arzneistofftransportern bei *mdr1a,b (-/-)* und *bcrp1 (-/-)* Knockout-Mäusen in der Leber ist im Vergleich zu den TR(-) Ratten geringer. Bei den Knockout-Mäusen wurde bisher vor allem die Blut-Hirn-Schranke untersucht (Tab. 5.1). Für Bcrp und Mdr1 wurden weder bei den *mdr1a,b (-/-)* [Soontornmalai et al. 2006] noch bei den *bcrp1 (-/-)* Knockout-Mäusen [Lee et al. 2005] gegenseitige Veränderungen in der Expression von Arzneistofftransportern beschrieben (Tab. 5.1). Diese Ergebnisse wurden durch die Expressionsanalyse in dieser Arbeit bestätigt. Auch funktionell konnten keine Veränderungen zwischen *mdr1a,b (-/-)* Knockout- und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Dies haben die Galleausscheidungsversuche mit Taurocholat und DHEAS ergeben, welche auf eine funktionelle Expression von Bsep, Mrp2 und Bcrp in der Leber der *mdr1a,b (-/-)* Knockout-Maus schließen ließen. Weiterhin muss erwähnt werden, dass gerade hinsichtlich der Niere der Kenntnisstand über die Genexpression von Mdr1, Bcrp und Mrp2 bei den verwendeten Knockout-Mäusen sehr gering ist. In den eigenen Untersuchungen wurden aber keine Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp FVB-Mäusen gefunden. Eine Hochregulation

eines weiteren Transportsystems, Mrp5, an der Blut-Hirn-Schranke der *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus ist beschrieben wurden [Soontornmalai et al. 2006]. In eigenen Untersuchungen wurden für die Transportsysteme Mrp4, Mrp3 und Mrp1, Oct1, Oct2 und Oatp1a4 bei *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen keine Unterschiede in der Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Insbesondere für die Expression der Oct/Oat-Transporter lagen in der Literatur bisher überhaupt keine Daten vor.

Insgesamt lässt sich sagen, dass sowohl die aus der Literatur gewonnenen Daten als auch die eigenen Untersuchungen darauf schließen lassen, dass die *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäuse keine nennenswerte kompensatorische Up- oder Downregulation anderer Membrantransporter in Leber, Niere, Dünndarm und Gehirn aufweisen.

Tab.5 1: Genotypisierung von Transporter-defekten Tiermodellen: Übersicht über die Expression von verschiedenen Arzneistofftransportern. Daten aus Literatur und eigene Daten.

Gen	Leber			Dünndarm			Niere			Gehirn		
	<i>mdr1a,b</i> KO Maus	<i>bcrp1</i> KO Maus	TR(-) Ratte	<i>mdr1a,b</i> KO Maus	<i>bcrp1</i> KO Maus	TR(-) Ratte	<i>mdr1a,b</i> KO Maus	<i>bcrp1</i> KO Maus	TR(-) Ratte	<i>mdr1a,b</i> KO Maus	<i>bcrp1</i> KO Maus	TR(-) Ratte
Mdr1	nd.	↔ ^{5,10}	↑ ⁸ ↔ ^{1,7,10}	nd.	?	↑ ⁸	nd.	↔ ¹⁰	↔ ¹	nd.	↔ ^{2,10}	↑↑↑ ⁹ ↔ ^{1,10}
Mrp2	↔ ^{4,10}	?	nd.	↔ ⁴	?	nd.	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	nd.	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	nd.
Bcrp	↔ ^{4,10}	nd.	↔ ^{1,7,10}	↔ ⁴	nd.	?	↔ ¹⁰	nd.	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	nd.	↔ ^{1,10}
Mrp1	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	?	?	?	?	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	nd.	↔ ^{3,10}	↔ ^{2,10}	?
Mrp3	↔ ¹⁰	↔ ^{5,10}	↑↑↑ ^{1,7,10}	?	?	↔ ¹	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↑↑↑ ¹	↔ ^{3,10}	↔ ¹⁰	↔ ^{1,10}
Mrp4	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↔ ^{1,7,10}	?	?	↔ ¹	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↑↑↑ ⁶ ↔ ^{1,10}	↔ ¹⁰	↔ ^{2,10}	↔ ^{1,10}
Oatp1a4	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↔ ^{1,7,10}	?	?	?	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↔ ^{1,10}	↔ ¹⁰	↔ ^{2,10}	↔ ^{1,10}
Oatp1a1	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↔ ^{1,7,10}	?	?	?	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↔ ^{1,10}	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰
Oatp1b2	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↔ ^{8,10}	?	?	?	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	↔ ¹⁰	-	-	-

↔ identische oder nur geringe (bis zu Faktor 1,5, keinen signifikanten Anstieg) Unterschiede in der Expression von Transportern im Vergleich zum Wildtyp

↑ signifikanter Anstieg die Genexpression (Faktor ≥ 1,5 – 3,9)

↑↑↑ Hochregulation von Transportern (Faktor ≥ 4 und höher)

¹ Johnson et al 2006

² Lee et al. 2005

³ Soontornmalai et al. 2006

⁴ Ogihara et al. 2006

⁵ Nezasa et al. 2006

⁶ Chen et al. 2005

⁷ Hoffmaster et al. 2005

⁸ Oswald et al. 2006

⁹ Hoffmann und Löscher 2007

¹⁰ eigene Daten

Veränderungen im Metabolismus bei Tieren mit Transportdefekten

Neben kompensatorischer Veränderung in der Expression von Transportproteinen können auch Veränderungen im Metabolismus die Studien zur Pharmakokinetik und hepatobiliären Elimination bei den eingesetzten Knockout-Mäusen beeinflussen. Die Frage, ob diese Knockout-Tiere sich wirklich nur in der Expression eines einzigen, nämlich des ausgeschalteten Gens unterscheiden, läßt sich bezüglich Metabolismus nur mit einer groß angelegten Transkriptionsanalyse annähernd beantworten. Da die in dieser Arbeit eingesetzten Substanzen nicht (Ouabain) oder nur in sehr geringem Umfang z.B. durch CYP3A4 (Ivermectin, Selamectin und Digoxin) metabolisiert werden [Harrison und Gibaldi 1976, Schmoltdt und Ahsendorf 1980, Rodin und Johnson 1988, Lau et al. 2004, Zeng et al 1998], wurden Unterschiede im Metabolismus zwischen den Knockout- und Wildtyp-Tieren zunächst außer Acht gelassen. Die wenigen in der Literatur zu diesem Thema verfügbaren Daten sollen aber im Folgenden diskutiert werden.

Eine Studie aus der Arbeitsgruppe von A. Schinkel [Schuetz et al. 2000] analysierte die Expression von P450 Enzymen bei zwei *mdr1a,b* (-/-) Knockout Zuchtlinien, nämlich (1) von Taconic Farms, Inc., Germantown, NY, USA (diese Mäusen wurden auch in dieser Arbeit verwendet) und (2) aus Amsterdam (BMI, Helmond, The Netherlands). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine leichte, jedoch keine signifikante Downregulation von P450 Enzymen in der Leber in der Taconic-Zuchtlinie (Tab. 5.2), jedoch eine bis zu 11-fach erhöhte Expression dieser Enzyme im Vergleich zum Wildtyp in der Zuchtlinie aus Amsterdam. Eine weitere Studie von Ogihara et al. (2006) fand keinen Unterschied in der Expression von CYP3A11 in Leber, Dünn- und Dickdarm bei *mdr1a,b*(-/-) Knockout-Mäusen der Taconic-Zuchtlinie im Vergleich zu den Wildtyptieren.

Tab. 5.2. Genotypisierung von *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen: Expression von P450 Enzymen in der Leber [Schuetz et al. 2000]. Die Daten wurden vom Immunoblot aus der Intensität der Banden abgeleitet.

Cytochrome	<i>mdr1a,b</i> (+/+)	<i>mdr1a,b</i> (-/-)
CYP3A	1,0 ± 0,18	0,79 ± 0,25
CYP1A	1,0 ± 0,23	0,72 ± 0,80
CYP2B	1,0 ± 0,12	0,95 ± 0,10

Deutlichere Unterschiede als bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus wurden bei *mrp2*-defizienten TR(-) Ratten gefunden, bei welcher die Expression fast aller hepatischen Cytochrom P450-Enzyme sowie der NADPH-Cytochrom P450 Reduktaseaktivität im

Vergleich zur Wistar-Ratte signifikant verändert waren [Newton et al. 2005, Silva et al. 2005]. Silva et al. (2005) berichtet zum Beispiel über eine 3-fach erhöhte Expression von CYP2E1 bei der TR(-) Ratte. Diese Ergebnisse stehen jedoch teilweise im Widerspruch zu einer früheren Studie von Jager et al. (1998), in welcher eine signifikant verminderte Expression von CYP2B1/2 und CYP3A/2, jedoch keine Unterschiede in der Expression von CYP2A, CYP2D und CYP2E1 bei der TR(-) Ratte gefunden wurden. In der Studie von Newton et al. (2005) wurde bei TR(-) Ratten eine signifikant höhere Aktivität von CYP1A2, CYP2C11, CYP2A1, CYP3A1/2 und CYP2B1/2 gemessen.

Aus dem Bereich des Phase II-Metabolismus wurden Daten für die UDP-Glucuronosyltransferasen erhoben, so von dem Isoenzym UGT1A1, welches in der Leber unter anderem Bilirubin glucuronidiert. Dieses Enzym ist bei der TR(-) Ratte in der Leber und Niere signifikant um den Faktor 4 hochreguliert [Silva et al. 2005, Johnson et al. 2006, Oswald et al. 2006]. Entsprechende Daten zu Unterschieden im Phase II-Metabolismus zwischen *mdr1a,b* (-/-), *bcrp1* (-/-) Knockout- und Wildtyp-Mäusen wurden bisher nicht publiziert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass tatsächlich in einigen Fällen eine höhere Enzymaktivität bei den transportdefizienten Tieren wie der TR(-) Ratte gefunden wurde und bei diesen Tieren somit mit einem gesteigertem Metabolismus zu rechnen ist. Die *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäuse, welche als Tiermodell zur hepatobiliären Ausscheidung in dieser Doktorarbeit etabliert wurden, zeigen allerdings soweit untersucht keine höhere Enzymaktivität und somit voraussichtlich keine Veränderungen im Arzneistoffmetabolismus.

5.3. Organverteilung und Pharmakokinetik von Phalloidin bei Ratte und Maus

Die selektive Hepatotoxizität von Phalloidin ist durch die organspezifische Aufnahme in die Leber bedingt, wobei bei früheren Transportstudien mit Phallotoxinen eine basolaterale Aufnahme über Carrier in die Hepatozyten (siehe Einleitung) identifiziert wurde. Bisher war allerdings unbekannt, welche Carrier an der kanalikulären Membran für die Ausschleusung von Phallotoxinen in die Galle verantwortlich sind.

Lebertoxische Dosen von Phalloidin verursachen eine starke Cholestase [Dubin et al. 1978], bedingt durch eine Blockade der Depolymerisation des Aktins, sodass Transportvesikel über diese Mikrofilamente nicht mehr an die kanalikuläre Membran gelangen können [Gabbiani et. 1975, Cooper 1987]. Bedingt durch diesen Prozess, wird die Gallebildung gestört, und die

hepatobiliäre Ausscheidung des Toxins kann unter solchen Bedingungen nicht untersucht werden. Ein weiterer Grund für eine fehlende Sekretion des Phalloidins besteht im Verlust von mehreren ABC-Transportern an der kanalikulären Membran, was ebenso mit einem gehemmten zellulären Transport durch ein defektes Zytoskelett einhergeht [Rost et al. 1999]. Phalloidin in einer Dosierung von 0,5 mg/kg KG (eine 17-fach höhere Konzentration als bei der hier vorliegenden Studie eingesetzt) hemmt den Transport von Substanzen über die hepatischen Mrp2-, Bsep- und Mdr1-Membrantransporter [Ohashi et al. 2002]. In dieser zitierten Studie wird unter toxischen Phalloidindosen eine starke Abnahme des Galleflusses um etwa 50-80% beschrieben, eine deutlich verminderte Galleausscheidung des Bsep-Substrates Taurocholat und ebenso von LTC₄ und Pravastatin (typischen Mrp2-Substraten) und von Vinblastin (typische Mdr1-Substrat). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden unter nicht-cholestatischen Phallotoxindosen mit 0,03 mg/kg KG eines Phalloidin-Derivats [³H]-Demethylphalloin ([³H]-DMP) durchgeführt, wobei diese Substanz eine vergleichbare Wirkung am Zytoskelett aufweist wie das Phalloidin [Wieland 1981]. Daher war es bei der vorliegenden Arbeit möglich, die ABC-Transporter zu identifizieren, über die Phalloidin in die Galle ausgeschieden wird. Zur Kontrolle einer einsetzenden Cholestase wurde der Gallefluss bei allen untersuchten Tiermodellen und bei jeder Messreihe über die gesamte Zeitdauer erfasst; er war bei einer Dosierung von 0,03 mg/kg KG [³H]-DMP während der gesamten Messphase (90/120 min) in keinem Fall vermindert.

Die Ergebnisse an TR(-) Ratten und Knockout-Mäusen zeigten, dass das Mrp2 Efflux-Transportsystem für einen Hauptteil wenn nicht sogar für die gesamte Ausscheidung des Phallotoxins über die Galle verantwortlich ist. Im Vergleich zu Mrp2 wurde kein signifikanter Transport über die Mdr1- und Bcrp-Transporter bei der *in situ* Galleausscheidung gemessen, denn bei den *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen war die Gallenausscheidung nicht signifikant beeinträchtigt. Diese Ergebnisse müssen jedoch vorsichtig interpretiert werden, denn es kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben Mrp2 auch die Bsep-Effluxpumpe an der Exkretion von Phalloidin beteiligt ist. Auch wenn Loranger et al. (1996) berichten, dass Phalloidin in einer Dosierung von 0,8 mg/kg KG, einer Konzentration, die zu einem bedeutsam niedrigeren Gallefluss bei Ratten führt, die Gallensäuresekretion nicht reduziert und damit auch der kanalikuläre Bsep-Transporter kein Phalloidin transportieren sollte, so sind die hier vorgestellten *in situ* Daten in Übereinstimmung mit *in vitro* Ergebnissen von doppelt-transfizierten MDCK-Zellen, welche OATP1B1 mit dem MRP2 coexprimieren [Fehrenbach et al 2003]. In diesen Zellkulturen wurde ein transepithelialer Transport von Phalloidin gezeigt. Offen blieb aber, ob auch noch andere kanalikuläre ABC-

Carrier außer MRP2 an der hepatobiliären Phalloidin-Ausscheidung bei diesen Zellen beteiligt sind.

Es ist gut bekannt, dass MRP2/mrp2 zusammen mit BCRP/bcrp und MDR1/mdr1 bei Mensch und Tier eine bedeutende Rolle in der hepatobiliären Ausscheidung von konjugierten Arzneistoffen spielen [Hooiveld et al. 2001, Chandra und Brower 2004, Haimeur et al. 2004, Shitara et al. 2005, Petzniger und Geyer 2006]. So fördert MRP2/mrp2 insbesondere den Transport von Phase II-Metaboliten (Sulfaten, Glucuroniden und Glutathion-Konjugaten). Allerdings wurde das bicyclische Heptapeptid Phalloidin [Rehbinder et al. 1963, Puchinger und Wieland 1969b] während der hier präsentierten *in situ* Ausscheidungsstudien an Ratten und Mäusen nicht metabolisiert. Andererseits ist Phalloidin ein Kation mit geschätztem pK_a über 14 [Fürlinger und Wolfbeis 1983] und somit in dieser Hinsicht ein außergewöhnliches Mrp2 Substrat. Daher kann es als ein neuer Typ eines nichtkonjugierten zyklischen Mrp2 Substrates betrachtet werden, in Ergänzung zu einem anderen zyklischen Peptid, nämlich dem zyklischen Pentapeptid und Endothelin Rezeptor-Antagonist BQ-123, welches ebenfalls ein Substrat für den Mrp2 Transporter war [Shin et al. 1997].

Im Unterschied zur Galle enthielt der Urin von normalen Wistar-Ratten nur Spuren von etwa 0,01% der applizierten [3H]-DMP Dosis, und damit deutlich weniger im Vergleich zu den TR(-) Ratten, bei denen im Urin 8,4% der applizierten Radioaktivität gemessen wurde. Dies zeigt, dass die reduzierte hepatobiliäre Ausscheidung durch eine gesteigerte Elimination über die Niere kompensiert wurde. Eine nähere Analyse dieses Kompensationsmechanismus offenbarte, dass ein Teil des Phalloidins vorher in die Hepatozyten aufgenommen wurde und über einen erneuten basolateralen Transport zurück ins Blut gelangt sein muss [Gavrilova et al. 2007]. Danach gelangt über das Blut Phalloidin zur Niere, von der es über den Urin ausgeschieden wird (siehe Kapitel 5.2). Diese Interpretation der Ergebnisse beruht auf den viel zu niedrigen Gewebekonzentrationen von Phalloidin in der Leber von TR(-) Ratten. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Interpretation, dass offensichtlich Phalloidin entweder ein Mrp3- oder ein Mrp4-Substrat sein muss, denn beide Transporter übernehmen auch für andere cholephile Xenobiotika den Reflux aus der Leber zurück in das Blut, was als kompensatorischer Mechanismus bei Ausfall von Mrp2 angesehen wird. In der Literatur sind folgende Beispiele eines solchen Refluxes von Arzneistoffen aus der Leber bei den TR(-) Ratten beschrieben worden: Pravastatin [Kivistö et al. 2005], Gemfibrozil [Kim et al. 2003] und Carboxydichlorofluoresceindiazetat (CDFDA) [Zamek-Gliszczynski et al. 2002]. Mehrere Studien (s. Kapitel 5.2 und eigene Untersuchungen) zeigen eine Hochregulation von Mrp3 sowie Mrp4 in der Leber bei *mrp2* defizienten Ratten (EHBR und TR(-)) ohne Änderung der

Expression von anderen Transportsystemen wie Oatp1b2 (spezifisches Phalloidin-Transportsystem) bzw. sonstiger Uptake- und Efflux-Carrier (siehe Kapitel 5.2 und Tab. 5.1) [Hirohashi et al. 1998; Ogawa et al. 2000; Akita et al. 2001; Johnson et al. 2006]. Dafür, dass Phalloidin tatsächlich wieder aus der Leber zurück in die Blutbahn abgegeben wird, spricht auch eine höhere Plasmakonzentration von Phalloidin bei der *mrp2*-defizienten TR(-) Ratten zu Versuchsende (Abb. 5.3).

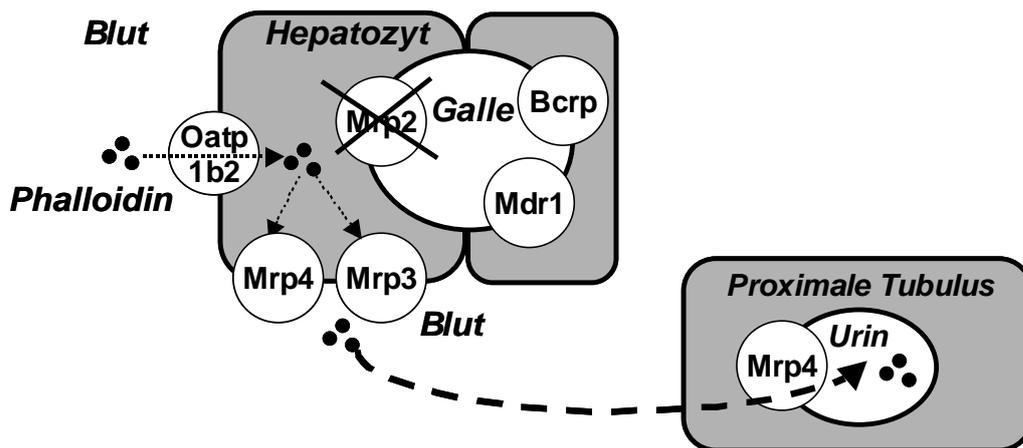


Abb. 5.3. Schematische Darstellung möglicher Kompensationsroute des Phalloidins bei der TR(-) Ratte. Hier wird Phalloidin beim Fehlen von MRP2 in der Leber wieder über MRP3 und MRP4 ins Blut gelangen und anschließend über die Niere ausgeschieden werden.

In einer früheren Studie von Puchinger et al. (1969a, b) wird berichtet, dass nach 24 Stunden über 58,4% der applizierten Dosis (1 mg/kg KG) von Phalloidin über den Urin ausgeschieden wird. Zu beachten ist bei dieser Studie, dass bedingt durch die hohe Konzentration mit einer Cholestase zu rechnen war. In den hier präsentierten Daten lag der Anteil an [³H]-DMP, der über den Urin bei den TR(-) Ratten ausgeschieden wurde, 1000mal höher als bei den normalen Wistar-Ratten innerhalb von 120 Minuten. Ob eine höhere glomeruläre Filtration allein für diesen dramatischen Unterschied verantwortlich sein kann, ist zweifelhaft. Chen et al. (2005) berichten über eine Hochregulierung auf Proteinebene des MRP4-Transporters an der apikalen Membran des proximalen Tubulus der Nieren bei TR(-) Ratten. Diese Hochregulation von MRP4 in der Nieren stellt einen kompensatorischen Mechanismus zur Elimination von bestimmten organischen Anionen bei diesen Ratten dar [Masereeuw et al. 2003] (Kapitel 5.2 und Tab 5.1). Die eigenen Untersuchungen zur Expression von MRP4 an der Nieren bei diesen Ratten bestätigte eine Hochregulation allerdings nicht. Bemerkenswert ist, dass TR(-) Ratten genauso gut wie Mäuse Phalloidin über die Nieren ausscheiden im Unterschied zu den Wistar-Ratten, wobei die Nierenfunktion der TR(-) Ratte keine Veränderungen im Vergleich zu dem Wildtyp zeigt. So bleibt die PAH-Clearance bei der

TR(-) Ratte unverändert [Smeets et al. 2004]. Die erhöhte Phalloidinausscheidung über den Urin, welche bei TR(-) Ratte durch den genetischen Defekt bedingt ist, wird bei der Wistar-Ratte somit nicht beobachtet. Scheinbar genügt bei Wildtyp-Ratten die Elimination des Toxins über die Leber, sofern die Plasmaspiegel des Phalloidins niedrig sind und keine lebertoxischen Effekte wie eine Cholestase auftritt.

5.4. Organverteilung und Pharmakokinetik der Herzglykoside Ouabain und Digoxin bei Ratte und Maus

Trotz struktureller Ähnlichkeit zwischen Ouabain und Digoxin weisen beide Herzglykoside erhebliche Unterschiede in Membrantransport, Pharmakokinetik und Organverteilung auf. Diese Tatsache gilt sowohl für normale Ratten und Mäuse als auch für die Tiere mit Transportdefekten.

5.4.1. Pharmakokinetik und Organverteilung von Ouabain

Ratte

Wie in der einleitenden Literaturübersicht geschildert wurde, gibt es von dem Herzglykosid Ouabain Speziesunterschiede hinsichtlich der Pharmakokinetik. Im Unterschied zu Mensch, Hund und Kaninchen, welche nur einen geringen Anteil des Ouabains über die Galle eliminieren können [Russel und Klaassen 1972], scheiden die Nager Ratte und Maus die Substanz vor allem über die Leber aus. Bei den zuletzt genannten Spezies geschieht dies vor allem über den Mrp2-Effluxtransporter [Geyer et al. 2005], wobei bei TR(-) Ratten im Vergleich zu den Wistar-Ratten bei der *in situ* Galleausscheidung ein erhebliches hepatobiliäres Ausscheidungsdefizit vorliegt.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Pharmakokinetik von Ouabain bei TR(-) Ratten und *mdr1a,b* (-/-) sowie *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen. Bei den TR(-) Ratten wurde im Vergleich zur Wildtyp-Ratte ein deutliches biliäres Ausscheidungsdefizit festgestellt, denn die TR(-) eliminierte nur etwa die Hälfte der Substanz in die Galle im Vergleich zur Wistar-Ratte. Dieses Ausscheidungsdefizit kompensiert das transportdefiziente Tier durch eine erhöhte Exkretion über den Harn. Bemerkenswert ist allerdings, dass die Nierengewebekonzentration von Ouabain bei den Wistar- im Vergleich mit den TR(-) Ratten

um den Faktor 2,1 erhöht ist. Dieser Befund deutet auf eine langsamere Ouabainausscheidung über den Urin bei der Wistar-Ratte hin, wobei möglicherweise die Ursache dieses Phänomens in der unterschiedlichen Expression von Efflux-Carriern wie z.B. Mrp4 liegen könnte. Wie in Kapitel 5.2 beschrieben wurde, liegt die Mrp4-Expression auf Protein-Ebene um den Faktor 2 höher bei der TR(-) Ratte im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren [Chen et al. 2005]. Dies würde natürlich bedeuten, dass Ouabain auch über Mrp4 transportiert werden müsste. Allerdings gibt es in der Literatur diesbezüglich keine Hinweise. Entgegen dieser Hypothese steht die Tatsache, dass eine höhere Expression von Mrp4 auf mRNA-Ebene in den eigenen Untersuchungen nicht gefunden wurde.

Maus

Bei der Maus spielt für die Ausscheidung von Ouabain an der kanalikulären Hepatozytenmembran neben Mrp2 noch ein weiteres Efflux-Transportsystem eine Rolle, das Bcrp. Bestätigend hierzu sind die Ergebnisse, dass bei der *in situ* Galleausscheidung von Ouabain bei den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen eine reduzierte Ausscheidung im Vergleich zum Wildtyp gemessen wurde: 38% beim Bcrp Knockout-Mausstamm statt 48% der applizierten Dosis beim Wildtyp. Folgerichtig wurde eine höhere Gewebekonzentration von Ouabain insbesondere in der Leber, aber auch in Nebennieren, Nieren und Herz festgestellt, was dem Expressionsmuster von Bcrp bei der Maus entspricht (siehe Tab. 1.1 Kapitel Einleitung).

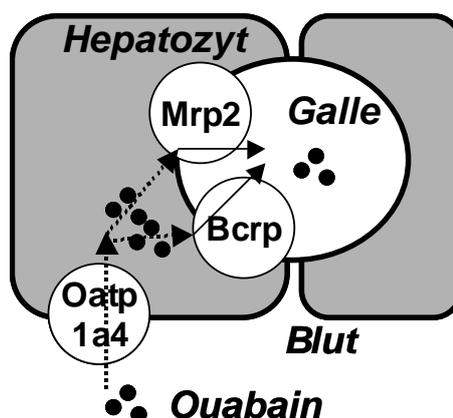


Abb. 5.4. Schematische Darstellung des Carrier-vermittelten Transports von Ouabain in der Leber.

Bei der Maus ist Ouabain in mehrerer Hinsicht für die Pharmakokinetik eine einzigartige Substanz, denn es induziert die MDR1 Genexpression und macht hierdurch die Zelle

resistenter gegenüber hydrophoben Zytostatika [Brouillard et al. 2001]. Da die *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus keine Unterschiede in der Pharmakokinetik im Vergleich zu den Wildtyp Tieren zeigt, spielt der Mdr1-Transporter bei der Ausscheidung von Ouabain offenbar keine Rolle. Hingegen wird die Substanz vor allem über Mrp2 und etwas über Bcrp in die Galle ausgeschieden. Hierbei ist seit der Arbeit von Cox und Wright (1959) bekannt, dass Ouabain keiner Biotransformation unterliegt, was auch in vorgelegter Arbeit erneut gezeigt wurde

5.4.2. Pharmakokinetik und Organverteilung von Digoxin

Das pflanzliche Herzglykosid Digoxin ist schon seit langem ein bekanntes MDR1 Substrat. Diese Ergebnisse wurden zunächst in Zellkulturstudien ermittelt [Schinkel et al. 1995] und später auch *in vivo* an *mdr1a* (-/-) Knockout-Mäusen bestätigt [Schinkel et al. 1995, Mayer et al. 1996].

Digoxin wird zur Behandlung der kongestiven Herzinsuffizienz und von bestimmten Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Herzglykoside wie Digoxin hemmen die membrangebundene Na^+/K^+ -ATPase, was zu einem erhöhten zellulären Gehalt an Natrium führt, wodurch sekundäre Transportsysteme beeinflusst werden. Da Calcium am Herzen über einen Natrium / Calciumaustauscher im Austausch mit Natrium aus der Zelle transportiert wird, kommt es möglicherweise unter Digoxin zu einer erhöhten zellulären Natriumkonzentration und zu einem sekundär erhöhten zellulären Calciumgehalt. Dieser Konzentrationsanstieg an Calcium führt dann zu einer Steigerung der Kontraktionskraft des Herzmuskels. Digoxin wird zu etwa 20 bis 25 % an Plasmaproteine gebunden [Barnhart et al. 1991, Hoffman et al. 1990]. Die durchschnittliche Halbwertszeit liegt bei 1,6 Tagen [Barnhart et al. 1991] und die Ausscheidung erfolgt bei den meisten Spezies mit Ausnahme der Nager unverändert über den Urin. Bei einer Nierenfunktionsstörung oder durch gleichzeitig verabreichte Arzneimittel, welche ebenfalls über die Niere eliminiert werden, sinkt die Digoxin-Elimination über die Nieren entsprechend ab. Dagegen steigt die Ausscheidungsrate über die Leber, wobei Digoxin in geringem Umfang metabolisiert wird [Lewis 1992]. Zu den Digoxin-Metaboliten beim Menschen gehören Digoxigenin, Mono- und Bis-Digitoxoside sowie Dihydrodigoxin [Baselt 1992, Bresnahan und Vlietstra 1979].

Maus

Im Gegensatz zu den meisten Säugern (s. oben) wird Digoxin bei der Maus sowohl über die Leber als auch über die Niere ausgeschieden [Damm et al. 1973, Mayer et al. 1996], während bei Ratten der Hauptausscheidungsweg die Leber darstellt [Damm et al. 1973, Sato et al. 1988, Funakoshi et al. 2003]. Digoxin wird bei Nagern von der Leber aus dem Blut über Oatp1a4 [Noe et al. 1997] und im Dünndarm aus dem Darminhalt über Oatp1a5 [Cattori et al. 2001] aufgenommen.

Betrachtet man die Ergebnisse der *in situ* Galleausscheidung von Digoxin bei der Maus, so zeigen sich erhebliche Unterschiede in der Organverteilung zwischen der *mdr1a,b* (-/-) Knockout- und Wildtyp-Maus: Bei der Knockout-Maus wurden erhöhte Konzentrationen in fast allen Geweben beobachtet, mit Ausnahme von Dün- und Dickdarm. Da gleichzeitig eine verminderte Ausscheidung über die Galle und somit eine reduzierte biliäre Clearance von Digoxin bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus festgestellt wurde (Wildtyp 12,3% der applizierten Dosis vs. 8% bei den Knockout-Tieren nach 90 min), wird die große Bedeutung des Mdr1-Transportsystems für die hepatobiliäre Ausscheidung von Digoxin deutlich. Vergleichbare Daten wurden auch von Mayer et al. (1996) publiziert, die nach 90 min *in situ* Galleausscheidung 24% der applizierten Dosis Digoxin (0,2 mg/kg Körpergewicht) bei Wildtyp- und 16% bei *mdr1a* (-/-) Knockout-Mäusen in der Galle wiedergefunden haben. Die höheren Prozentwerte lassen sich dadurch erklären, dass deren Daten nicht in Form einer Ausscheidungskurve dargestellt wurden. Für dennoch vergleichbare Ergebnisse spricht das identische Ausscheidungsverhältnis von 0,65 zwischen der *mdr1a,b* (-/-) Knockout- und der Wildtyp-Maus in den hier präsentierten *in situ* Galleausscheidungsversuchen und der zitierten Arbeit. Entsprechendes gilt auch für andere Gewebe, in welchen die Konzentrationsunterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Maus vergleichbar waren: 13,0 und 15,0 (Gehirn), 1,8 und 1,7 (Leber), 1,6 und 1,7 (Plasma), 0,3 und 0,21 (Dünndarm) und 0,1 und 0,13 (Dickdarm). Desweiteren war bei den *mdr1a* (-/-) Knockout-Mäusen die biliäre Clearance im Vergleich zum Wildtyp reduziert (1,2 vs. 2,7 ml/h). Diese Daten stimmen gut mit den Daten aus einer Studie von Kawahara et al. (1999) überein, in welcher für die biliäre Clearance Werte von 1,5 und 4,14 ml/h ermittelt wurden.

Die Unterschiede in der Elimination von Digoxin zwischen Knockout- und Wildtyp-Maus werden noch deutlicher, wenn man sich die Niere als Ausscheidungsorgan betrachtet. In einer Studie von Mayer et al. (1996) konnte die Wildtyp-Maus etwa 31% der applizierten Dosis (24 h nach intravenöser Applikation) über den Urin ausscheiden, während es bei der *mdr1a* (-/-) Knockout-Maus mehr als das Doppelte (ca. 73%) waren. Diese signifikanten Unterschiede spiegeln die veränderte Ausscheidung über die Leber wider, denn bei der

Wildtyp-Maus wurde etwa 58% der applizierten Substanz und bei der Knockout-Maus nur 15% über den Kot ausgeschieden. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen beim Wildtyp im Vergleich zur Knockout-Maus eine reduzierte Elimination von Digoxin über den Urin (Ausscheidungsrate nach 90 min von 0,7% bzw. 2,9%). Allerdings zeigen diese Daten auch, dass bei der *mdr1a,b* Doppel-Knockout-Maus die Elimination über den Urin um den Faktor 4 höher liegt im Vergleich zum Wildtyp. Diese Urinausscheidungsrate von Digoxin wird bei den *mdr1a,b/bcrp1* Tripel-Knockout-Mäusen noch deutlicher: Die Digoxin-Elimination in den Urin ist um den Faktor 7,5 höher im Vergleich zu der Wildtyp-Maus. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt könnte in einer höheren Kapazität der glomerulären Digoxinfiltration der Nieren liegen, wobei Digoxin noch zusätzlich über andere Effluxtransporter wie Mrp2 oder Mrp4 in den Urin gelangen könnte.

Die Ergebnisse zur biliären Ausscheidung von Digoxin bei der Tripel-Knockout-Maus (*mdr1a,b/bcrp1* (-/-)) zeigen, dass die Bcrp-Effluxpumpe keine Rolle in der hepatischen Elimination von Digoxin spielt. Hier wurden nämlich keine additiven Effekte zum zuvor beschriebenen Ausscheidungsdefizit der Mdr1-Doppel-Knockout-Maus beobachtet. Allerdings ist nicht erklärbar, warum die Urinausscheidung von Digoxin bei der Tripel-Knockout-Maus noch höher ist als bei der Mdr1-Doppel-Knockout-Maus. Möglicherweise bestehen zwischen beiden Mausstämmen Unterschiede in der glomerulären Filtration oder in der Expression weiterer bisher nicht bekannter renaler Digoxin-Carrier.

Neben der Ausscheidung über die Niere wird Digoxin aus dem Blut in die Hepatozyten durch das Transportprotein Oatp1a4 [Noe et al. 1997] aufgenommen und anschließend in der Leber metabolisiert. Es gibt allerdings in der Literatur keine einheitliche Meinung zur Metabolisierung von Digoxin bei Mäusen. Während Mayer et al. 1996 über 20% Digoxin-Metaboliten (Bis- und Monodigitoxoside) in Galle und Urin messen, wurden in der vorgelegten Arbeit keine Metaboliten von Digoxin in der Galle gefunden. Letzteres steht im Einklang mit den Daten von Kawahara et al. (1999).

Ratte

Im Gegensatz zur Maus scheidet die Ratte Digoxin vor allem über die Leber aus. Nach Literaturangaben beträgt die hepatobiliäre Exkretion 4 Stunden nach Applikation etwa 59%, während im Urin im gleichen Zeitraum nur 4% gemessen werden [Funakoshi et al. 2003]. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit an Wistar-Ratten überein, bei denen bei der *in situ* Galleausscheidung nach 2 Stunden 41% der applizierten Digoxin-Dosis

in der Galle wiedergefunden wurden. Von den TR(-) Ratten konnten dagegen nur 31% der applizierten Dosis über die Galle ausgeschieden werden.

Interessant ist der Befund, dass die Gewebekonzentrationen von Digoxin bei TR(-) Ratten im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede aufweisen, sodass keine ausgeprägten kompensatorischen Mechanismen durch das biliäre Ausscheidungsdefizit von Digoxin bei der TR(-) Ratte vorhanden sind. Eine Erklärung könnte eine gesteigerte Metabolisierung von Digoxin in der Leber der TR(-) Ratte sein, denn im Unterschied zu Mäusen wird bei Ratten Digoxin in der Leber durch CYP3A metabolisiert [Harrison und Gibaldi 1976; Lau et al. 2004, Salphati und Benet 1999]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben ebenfalls einen Digoxin-Metaboliten in der Galle bei beiden Rattenstämmen, was auch in der Studie von Lau et al. (2004) beschrieben wird. Bei der Wildtyp-Ratte wurde in der Galle ein Digoxinmetabolit gefunden, der 15% der gesamten Digoxinmenge ausmachte. Hierbei könnte es sich um Digoxigenin- Bisdigitoxosid handeln, dessen Galleanteil 17% einer applizierten Dosis nach 60 min betrug [Lau et al. 2004]. Dieser Metabolit ist wasserlöslicher und lief daher hinter der Digoxinfront in der Dünnschichtchromatographie. Im Unterschied zu den Erwartungen einer gesteigerten Metabolisierung bei der TR(-) Ratte reduziert sich die Metabolitenmenge auf nur noch 7% 60 min nach Applikation bei der *in situ* Galleausscheidung. Dieses Phänomen ist durch eine verminderte Expression von CYP3A [Jager et al. 1998] bei TR(-) Ratten erklärbar.

5.5. Organverteilung und Pharmakokinetik von makrozyklischen Laktone bei Ratte und Maus

Die wichtigste physiologische Rolle der MDR-Transporterfamilie ist der Schutz von Zellen und Geweben vor Xenobiotika. In diesem Zusammenhang sind genaue Kenntnisse über die Interaktion zwischen Arzneistoffen und den MDR-Transportern notwendig, um mit neuen Wirkstoffen gezielte Pharmakotherapien zu realisieren. In der Veterinärmedizin sind die Antiparasitika aus der Gruppe der Makrozyklischen Laktone (ML) als MDR1-Substrate von Bedeutung. Zu dieser Gruppe zählen Substanzen wie Ivermectin, Selamectin, Moxidectin und Doramectin, bei denen der MDR1-Transporter als ein Hauptfaktor für ihre Bioverfügbarkeit und Toxizität gilt.

Die makrozyklischen Laktone sind bei Säugetieren Agonisten an GABA_A-Rezeptoren. In Parasiten binden Avermectine dagegen an Glycin- [Bloomquist et al. 1993, 2003] und Glutamat-Rezeptoren [Rohrer et al. 1995], was die Grundlage ihrer antiparasitären Wirkung ist. Die Bindung an GABA_A-Rezeptoren erklärt andererseits ihre neurotoxische Wirkung bei Säugetieren. Während Avermectin-empfindliche Glutamat-gesteuerte Chloridkanäle nur bei Insekten, Mollusken und Nematoden [Schaeffer et al. 1989; Vassilatis et al. 1997; Etter et al. 1999] vorkommen, sind GABA_A-Rezeptoren im Zentralnervensystem der Vertebraten zu finden.

Die Ursache der Ivermectin-Überempfindlichkeit einiger Hunderassen, z.B. des Collie, liegt in einer 4-bp Deletion in Exon 4 des caninen Mdr1 Gens [Mealey et al. 2001, Roulet et al. 2003, Geyer et al. 2005]. Auch die Ursache der Neurotoxizität von Moxidectin bei Australian Shepard-Hunden liegt in diesem Gendefekt des Mdr1-Transporters begründet [Geyer et al. 2005]. Selamectin ist ein weiterer Vertreter der Gruppe der makrozyklischen Laktone, welcher im Gegensatz zu Ivermectin in therapeutischer Dosierung auch bei Hunden mit homozygotem Mdr1-Gendefekt sicher ist. Im Gegensatz zu Ivermectin ist Selamectin auch als Spot-on Präparat für den Hund zugelassen [Bishop et al. 2000, Novotny et al. 2000, Sarasola et al. 2002]. Allerdings hat eine aktuelle Studie an Zellkulturen gezeigt [Griffin et al. 2005], dass Ivermectin und Selamectin equipotente Mdr1-Substrate sind, was die Frage nach dem tatsächlichen Transport von Selamectin an der Blut-Hirn-Schranke aufwirft.

5.5.1. Pharmakokinetik von Ivermectin bei Tieren mit Transportdefekten

Ivermectin ist ein seit langem bekanntes MDR1-Substrat [Schinkel et al. 1994], und man würde erwarten, dass ein MDR1^{-/-} Genotyp erhebliche Unterschiede zu den Wildtyp-Tieren in der Pharmakokinetik von Ivermectin aufweist. Diese Vermutung gilt im Prinzip auch für ein anderes gut untersuchtes MDR1-Substrat, das Digoxin, welches tatsächlich erhebliche Unterschiede in der Pharmakokinetik zwischen *mdr1a* (-/-) Knockout- und Wildtyp-Maus zeigte [Kawahara et al. 1999]. So wurden im Falle von Digoxin bis zu 4-fach erhöhte AUC Werte beim MDR1^{-/-} Genotyp gemessen im Vergleich zum Wildtyp und auch die Digoxin-Clearance (sowohl total, als auch renale und biliäre) war bis zu 3-fach erniedrigt bei der *mdr1a* (-/-) Knockout-Maus. Im Gegensatz zu Digoxin zeigte jedoch ein anderes MDR1-Substrat, Cyclosporin A, keine signifikanten Unterschiede in der Plasmakinetik zwischen *mdr1a* (-/-) Knockout und Wildtyp-Maus [Kwei et al. 1999].

Auch für Ivermectin wurden in der vorgelegten Arbeit keine signifikanten Unterschiede in der Pharmakokinetik bei den beiden untersuchten Mausstämmen gefunden. Zwar ist die orale Bioverfügbarkeit bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus (33% vs. 27% beim Wildtyp) schwach erhöht, aber die pharmakokinetische Analyse der Plasmakonzentrationen von Ivermectin ergab nur geringe, nicht signifikante Unterschiede zwischen *mdr1a,b* (-/-) und Wildtyp-Maus. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer bereits publizierten Studie an *mdr1a* (-/-) Knockout-Mäusen, in der auch kein Effekt der Mdr1-Mutation auf die Plasmakinetik von Ivermectin nach i.v. Applikation beobachtet wurde [Kwei et al. 1999]. Zwar wurde in dieser Studie ein bis zu 3-fach erhöhter Plasmaspiegel nach oraler Applikation von Ivermectin bei Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp gemessen, aber dieser Effekt hielt nur bis zur 5. Stunde nach Applikation an. Bereits 8 h nach der Ivermectin-Applikation wurden unabhängig von der Applikationsweise vergleichbare Plasmaspiegel bei allen Tiermodellen gemessen. Der Einfluss der Applikationsform (i.v. gegenüber p.o.) auf die Bioverfügbarkeit von Ivermectin bei Mäusen mit *mdr1*^{-/-} Genotyp weist auf eine unterschiedliche enterale Absorption der Substanz hin. Entsprechendes gilt auch für die dermale Absorption. So konnte die FVB Wildtyp-Maus 24 h nach Spot-on Applikation mehr Ivermectin absorbieren als die *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Rattenversuchen, bei welchen in Anwesenheit von Verapamil, einem MDR1-Inhibitor, eine erhöhte (bis zu 40%) Aufnahme von Ivermectin nach Spot-on Applikation gemessen wurde [Alvinerie et al. 1999].

Interessant ist auch der Einfluss eines MDR1 Gendefektes bei subkutaner bzw. i.v. Applikation auf die Pharmakokinetik und die Konzentration von Ivermectin in Plasma und Gehirn im Vergleich zu anderen ZNS-gängigen Substanzen (siehe Tab. 1.6 Kapitel Einleitung). In diesen Zusammenhang ist eine Studie von Doran et al. (2005) von besonderem Interesse. Hier wurden Pharmakokinetik und Gehirnkonzentrationen von verschiedenen ZNS-wirksamen Pharmaka mit Arzneistoffen aus anderen Stoffgruppen (siehe Tab. 1.6 Kapitel Einleitung) nach subkutaner Applikation bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus und Wildtyp FVB-Maus verglichen. Bemerkenswert ist, dass z.B. Morphin 4 h nach einer intravenösen Applikation ein Konzentrationsverhältnis Gehirn/Plasma (Ratio) von 1,5 zeigte [Schinkel et al. 1995a] und nach subkutaner Applikation von 1,7 [Doran et al. 2005]. Eine Studie von Lankas et al. (1997), welche an *mdr1a*-defekten CF-1 Mäusen durchgeführt wurde, wies eine Ratio von 14,4 für Ivermectin 4 h nach intravenöser Applikation und von 13,5 24 h nach oraler Applikation auf. Schinkel et al. (1994) berichtete über Gehirn/Plasma Verhältnisse von 28 24 h nach oraler Applikation von Ivermectin bei *mdr1a* (-/-) Knockout und Wildtyp-Mäusen.

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit erbrachten die größten Unterschiede im Gehirn/Plasma Koeffizienten von 62,5 zwischen beiden Genotypen 24 h nach oraler Applikation von Ivermectin und von 36,7 72 h nach topischer Applikation. Die Werte der Gehirnkonzentrationen von Ivermectin bei *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen nach oraler Applikation liegen in guter Übereinstimmung mit der Studie von Schinkel et al. (1994) (Tab. 5.3). Dabei wurden bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen nach oraler (24 h) und intravenöser (8 h) Applikation von Ivermectin Gehirnkonzentrationen erreicht, welche bei MDR1-defekten Collies bereits zu starken neurotoxischen Symptomen geführt haben [Pulliam et al. 1985]. Im Vergleich zu vielen anderen MDR1-Substraten (Tab. 1.6. Einleitung, Tab. 5.3) führt Ivermectin mit einem Gehirn/Plasma Koeffizienten von 62,5 die Liste der *in vivo* gemessenen MDR1-Substrate an. Auch nach topischer Applikation war der Gehirn/Plasma Koeffizient um den Faktor 36,7 höher bei den *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen als bei den Wildtyp-Mäusen (Tab. 5.3). Die Gehirnkonzentration von Ivermectin ist nach topischer Applikation mit 27,2 ng/g Gewebe beim MDR1^{-/-} Genotyp jedoch deutlich unterhalb der neurotoxischen Ivermectinkonzentration im Gehirn, welche bei Ivermectin-sensitiven Collies [Pulliam et al. 1985] beobachtet wurde. Ob daher Ivermectin auch bei MDR1^{-/-} Hunden mit bis zu 1 mg/kg KG sicher topisch angewendet werden kann [Paul et al. 2004], lässt sich nicht sicher sagen.

Tab. 5.3. Übersicht von Literaturangaben und eigenen Daten der Gewebekonzentrationen von Ivermectin im Gehirn

Knockout-Maus	Studie (Autor)	Dosis mg/kg KG	Applikationsart und Zeit des Versuchs	Gehirnkonzentration ng/g Gewebe Wildtyp	Gehirnkonzentration ng/g Gewebe Knockout-Maus	Gehirn / Plasma Koeffizient
<i>mdr1a</i>	Schinkel et al. 1994	0,2	oral, 24 h	1,5 ± 1,2	131,0 ± 16,0	28,0
CF-1 (<i>mdr1a</i>)	Lankas et al. 1997	0,2	oral, 24 h	1,4 ± 0,1	46,0 ± 3,3	13,5
CF-1 (<i>mdr1a</i>)	Lankas et al. 1997	0,2	i.v., 4 h	0,9 ± 0,1	19,0 ± 2,0	14,4
<i>mdr1a,b</i>	eigene Daten	0,2	oral, 24 h	2,2 ± 0,8	127,2 ± 21,5	62,5
<i>mdr1a,b</i>	eigene Daten	0,2	i.v., 8 h	4,0 ± 0,3	144,1 ± 37,5	26,8
<i>mdr1a,b</i>	eigene Daten	0,2	Spot-on, 72 h	0,6 ± 0,3	27,2 ± 11,1	36,7

In der therapeutischen Dosierung von 0,2 mg/kg KG soll eine topische Applikation auch bei Hunden mit MDR1-Defekt kaum Probleme machen. Die an der Maus gewonnenen Daten sind nicht unbedingt auf den Hund übertragbar. Z.B. sind die LD₅₀ Werte bei oraler Applikation für die Maus mit intaktem Mdr1 Gen mit 25 mg/kg KG niedriger als bei Hunden mit etwa 80 mg/kg KG [Lankas und Gordon, 1989 (Editor Campbell)]. Andererseits liegt die LD₅₀ für *mdr1a* (-/-) Knockout-Mäusen mit 0,7 – 0,8 mg/kg [Schinkel et al. 1994] höher als die bereits letale

Dosis von 0,2 mg/kg KG bei Ivermectin-sensitiven Collies, die bei *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen sogar nach i.v. Applikation [Kwei et al. 1999, hier präsentierte Studie] keine lebensbedrohenden Intoxikationen auslöst.

Ein weiterer Aspekt, der zurzeit in der Literatur diskutiert wird, ist eine mögliche Rolle von anderen ABC-Transportern wie Mrp1, Mrp2 und Bcrp hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Sensitivität gegenüber Ivermectin. Die Rolle von MRP1 und MRP2 für der Transport von Ivermectin über die Blut-Hirn-Schranke ist noch ungeklärt [Roulet et al. 2003, Schinkel et al. 1994]. Nach Nobmann et al. (2001) hatte LTC₄, ein Substrat mehrerer MRPs (MRP1-MRP3), keine inhibitorische Wirkung auf den Transport von Ivermectin in intakten Gehirnkapillaren von Schweinen. Die *in vitro* Studie von Lespine et al. (2006 und 2007) beschreibt allerdings einen inhibitorischen Effekt von Ivermectin auf die basale ATP-ase Aktivität an aus Fibroblasten Membranvesikeln, präparierten mit überexprimiertem P-Glykoprotein. Für den MRP1 Transporter wurde eine solche Hemmung mit Ivermectin nur in höheren Konzentrationen von 10 µM gezeigt. Für zwei andere Mitglieder der MRP-Familie, die an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert werden, MRP2 und MRP3, wurden keinerlei inhibitorische Effekte festgestellt. Auch die Autoren einer anderer Studie [Brayden und Griffin, 2007] fanden an mit MRP1 und MRP2 transfizierten MDCK II Zelllinien, dass Ivermectin kein Substrat von MRP1 und MRP2 ist. Die hier präsentierte Studie an *mrp1* (-/-) Knockout-Mäusen und *mrp2*-defizienten TR(-) Ratten bestätigen diese Literaturergebnisse, indem keine vermehrte Penetration von Ivermectin in das ZNS beobachtet wurde. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass Soontormalai et al. (2006) berichten, dass die FVB Wildtyp-Maus, die als genetischer Background für die *mdr1a,b* (-/-), *bcrp1* (-/-) und *mrp1* (-/-) Knockout-Mäuse dient, keinen Mrp2 Transporter im Gehirn exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Unterschiede in der Gehirnkonzentration von Ivermectin zwischen *bcrp1* (-/-), *mrp1* (-/-) Knockout und FVB Wildtyp-Mäusen sowie zwischen TR(-)- und Wistar-Ratten festgestellt. Weder im Gehirn *bcrp1* (-/-) und *mrp1* (-/-) Knockout-Mäuse noch im Gehirn der TR(-)-Ratten kam es zu einer Hochregulation des Mdr1-Transporters, so dass die gemessenen Gehirnkonzentrationen nicht durch eine unterschiedliche Carrierexpression in der Blut-Hirn-Schranke verfälscht wurden (s. Tab. 5.1 und Kapitel 5.2). Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass Mdr1 der dominante Effluxtransporter für Ivermectin in der Blut-Hirn-Schranke ist und andere MDR1-verwandte Transporter wie Mrp2, Bcrp und Mrp2 die Penetration von Ivermectin über die Blut-Hirn-Schranke nicht beeinflussen.

5.5.2. Pharmakokinetik von Selamectin bei Tieren mit Transportdefekten

Ein Ergebniss dieser Arbeit war, dass der molekulare Hintergrund der größeren therapeutischen Sicherheit von Selamectin bei MDR1-defekten Hunden im Vergleich zum Ivermectin aufgeschlüsselt werden konnte.

Selamectin wurde ursprünglich als Mittel gegen Ektoparasiten entwickelt und von der Firma Pfizer auf den Markt gebracht [Banks et al. 2000]. Ein wichtiges Kriterium für die Einführung bestand in der Anwendungssicherheit der Substanz beim Ivermectin-sensitiven Collie [Bishop et al. 2000]. Die Idee, die Substanz wegen ihrer therapeutischen Sicherheit für makrozyklische Laktone auch bei MDR1^{-/-} Hunden zu testen, war nicht neu. Noch in 1992 wurde eine Studie von Blizzard et al. (Merck Reseach Laboratories) veröffentlicht, dass ein Epimer von Avermectin B₂ (besitzt eine Hydroxyl-Gruppe an Position C₂₃ und damit eine gesättigte Bindung an Positionen C_{22,23} im Lactonring) an Position C₁₃ signifikant weniger toxisch für Säugetiere ist, aber mit gleicher Effizienz gegen Endoparasiten wie *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia species*, *Oesophagostomum columbianum* wirkte. Dies bestätigten die LD₅₀Werte bei der Maus, die für das C₁₃-Epimer Avermectin B₂ bei 540 mg/kg und beim kommerziellen Avermectin B₁ bei 19 mg/kg KG liegen [Blizzard et al. 1992]. Auch Selamectin besitzt eine höhere therapeutische Sicherheit bei der Maus. Nach einer Dosis von 300 mg/kg KG zeigte die Maus nur milde neurotoxische Symptome, welche nach 24 Stunden wieder vollkommen verschwanden [Bishop et al 2000].

In der vorgelegten Arbeit wurde Selamectin an *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen in einer therapeutischen Dosierung von 12 mg/kg KG verabreicht. Die Selamectin-Gehirnkonzentration 72 h nach topischer Applikation war bei der *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus zwar höher im Vergleich zum Wildtyp, entsprach aber derjenigen Konzentration gemessen nach 24 Stunden beim Wildtyp. Dies deutet daraufhin, dass die Selamectinkonzentration im ZNS wesentlich weniger durch den MDR1-Gendefekt beeinflusst ist, als beim Ivermectin. Ein geringeres neurotoxisches Potenzial von Selamectin wird auch in der Literatur beschrieben [Bishop et al. 2000]. So enthält der Zulassungsbericht für Selamectin bei der EMEA (2002) zwei Studien an Ivermectin-sensitiven Collies, bei welchen keine neurotoxischen Symptome bei topischer Anwendung von bis zu 40 mg/kg KG aufgetreten sind. Daher wurde Selamectin nach topischer Applikation als sicher für den Ivermectin-sensitiven Collie erachtet. Die Aussage dieser Studie ist besonders bemerkenswert, da eine *in*

vitro Studie an Caco-2 Zellen von Griffin et al. (2005) Selamectin als gleichwertiges Mdr1-Substrat wie Ivermectin beschreibt (Tab. 5.4).

Tab. 5.4. Transport von Selamectin und Ivermectin in Caco-2 Zellkulturen in TRANSWELL-Modell [Griffin et al. 2005].

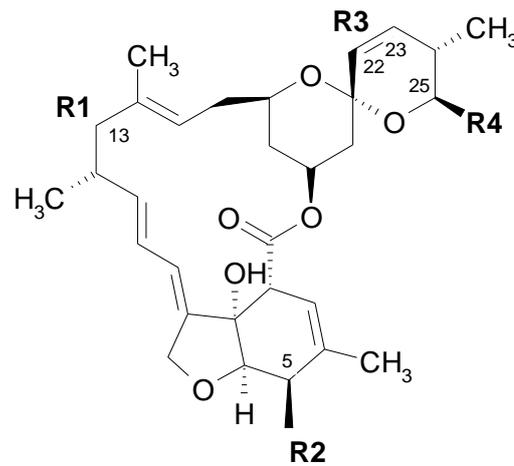
	Apikal zu basolateral ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Basolateral zu apikal ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Ivermectin	0,81 \pm 0,25	6,10 \pm 0,63
Selamectin	1,00 \pm 0,34	4,70 \pm 0,42

Wie oben erwähnt, existieren Glutamat-gesteuerte Chloridkanäle nur bei Insekten und Nematoden [Schaeffer et al. 1989; Vassilatis et al. 1997; Etter et al. 1999]. Diese Tatsache ist für die pharmakodynamischen Effekte des Selamectin von Bedeutung, denn diese Substanz wirkt an Glutamat-gesteuerten Chloridkanälen besser als Ivermectin [Phipps et al. 2005]. So wurden im Gehirn von *Ctenocephalides felis* (Katzenfloh) bis zu 5-fach höhere Konzentrationen von Selamectin im Vergleich zu Ivermectin in Abhängigkeit der Dosis gemessen. Auch die Effektivität von Selamectin gegen *Ctenocephalides felis* ist bis zu 100-fach höher im Vergleich zu Ivermectin [Phipps et al. 2005]. Für die antiparasitäre Wirkung der Avermectine mit der Paralyse von Nematoden ist aber auch die Wirkung an GABA_A-Rezeptoren [Holden Dye und Walker 1990] von Bedeutung. Über eine mögliche Bindung von Selamectin an GABA_A- oder Glycin-Rezeptoren liegen aber keine Daten vor. Die Tatsache, dass die Gehirnkonzentration von Selamectin viel höher als von Ivermectin war, ohne dass neurotoxische Wirkungen auftraten, spricht auch eine schlechtere Affinität von Selamectin an GABA_A- und Glycin-Rezeptoren im Vergleich zu Ivermectin. Verantwortlich dafür ist die unterschiedliche chemische Struktur von Ivermectin und Selamectin. Die Abbildung 5.5 beschreibt die Abhängigkeit der Wirksamkeit gegen Würmer und Flöhe von der Struktur an bestimmten Positionen am Lactonring. Die Studie von Michael und Mitarbeitern (2001) zeigt, dass der Zuckerrest keine Rolle für die anthelmintische Aktivität von Ivermectin und Doramectin besitzt: Beide Substanzen waren gleich wirksam gegen *Haemonchus contortus* in einer Konzentration von 0,001 μ g/ml. Entscheidend für die Wirksamkeit der Avermectine gegen Endoparasiten soll dagegen die Präsenz von Hydroxylgruppen (OH) oder Hydroxyiminogruppen (NOH) an Position C₅ des Lactonrings sein. Die Unterschiede zwischen Ivermectin und Selamectin betreffen auch den Zuckerrest an Position C₁₃ und die Position C₂₅, an welcher sich eine *sec*-Butyl/Isopropyl Gruppe statt Cyclohexyl bei Selamectin befindet (Abb. 5.5). Da Selamectin erst in einer Konzentration 0,1 μ g/ml gegen die Larven von *Haemonchus contortus* wirksam war, was einer 100-fach niedrigeren Effizienz im Vergleich zu Ivermectin entspricht, liegt die therapeutische Dosis des Selamectin

mit 6-12 mg/kg KG entsprechend wesentlich höher als beim Ivermectin (0,2 mg/kg KG). Aus diesen Ergebnissen muss geschlossen werden, dass die Zuckerreste keinen Einfluss auf die antihelminthische Wirkung haben, sondern Hydroxylgruppen (OH) oder Hydroxyiminogruppen (NOH) an Position C₅ und Butyl/Isopropyl Gruppe oder Cyclohexyl an Position C₂₅ des Lactonrings. Der erste Teil dieser Aussage ist auch für die Mdr1-Bindung zutreffend: Die Substanzen welche Hydroxylgruppe (OH) an Position C₅ des Lactonrings besitzen, sind bessere Mdr1-Substrate [Blizzard et al. 1992]. Gleichzeitig ist die Hydroxyiminogruppe (NOH) Gruppe für die Aktivität gegen Ektoparasiten verantwortlich. So zeigt die Studie von Banks et al. (2000), dass eine Hydroxyiminogruppe (NOH) auf Position C₅ des Lactonrings auch für die Wirksamkeit gegen Ektoparasiten, bzw. Floh entscheidend ist. Im Vergleich zu Ivermectin, ist Selamectin in einem *in vitro* *Ctenocephalides felis* Assay viel effizienter (0,1 µg/ml zu 1 µg/ml). Auch in einer Studie von Zakson-Aiken (2001) ist Ivermectin gegen Flöhe nur in höheren Konzentrationen (LC₉₀ 19,1 und LC₅₀ 9,9 µg/ml) wirksam. Jedoch muss einschränkend erwähnt werden, dass in dieser Studie Selamectin, sowie weitere 19 Avermectine, eine dem Ivermectin vergleichbare Wirkung gegen den Katzenfloh gezeigt haben. Allerdings lag die LC₉₀ von Selamectin bei 21,03 µg/ml und damit deutlich höher als für Ivermectin [Zakson-Aiken et al. 2001].

Auch in der hier präsentierten Studie wurde die therapeutische Sicherheit bei der Anwendung von Selamectin beim MDR1^{-/-} Genotyp nachgewiesen, denn in der Pharmakokinetik der Substanz wurden nur tendenzielle aber nicht signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt. Der Gehirn/Plasma Koeffizient von Selamectin lag hier bei 5,5 während er für Ivermectin 62,5 betrug. Die Gehirnkonzentrationen von Selamectin bei *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen waren zwar bis um den Faktor 10 höher im Vergleich zu den Wildtyptieren, aber die Konzentration im Gehirn bei den Knockout-Mäusen nach topischer Applikation war fast identisch mit der Gehirnkonzentration 24 Stunden nach oraler Applikation bei Wildtyptieren. Auch die Gehirnkonzentrationen von Selamectin bei anderen Tieren mit Transportdefekten wie *mrp1* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen sowie *mrp2*-defizienten TR(-) Ratten zeigten keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp.

Daher lässt sich zusammenfassend sagen, dass eine topische Anwendung von Selamectin auch beim MDR1^{-/-} Genotyp in therapeutische Dosierung als sicher angesehen werden kann.



R1 (Position C ₁₃)	R2 (Position C ₅)	R3 (Position C _{22,23})	R4 (Position C ₂₅)	<i>In vitro</i> feeding cat flea assay, µg/ml	Larval development assay, µg/ml
monosaccharide	CH (OH)	CH=CH	sec-Butyl	Keine Aktivität	0,0001
monosaccharide	CH (OH)	CH ₂ -CH ₂	Cyclohexyl	1	0,001
monosaccharide (Selamectin)	C=NOH	CH₂-CH₂	Cyclohexyl	0,1	0,1
monosaccharide	CH (OH)	CH=CH	Cyclohexyl	Keine Aktivität	0,001
monosaccharide	CH (OH)	CH₂-CH₂	sec-Butyl	Keine Aktivität	0,001
monosaccharide	C=NOH	CH=CH	sec-Butyl	1	0,01 - 0,1
monosaccharide	C=NOH	CH ₂ -CH ₂	sec-Butyl	0,25	0,1
monosaccharide	C=NOH	CH=CH	Cyclohexyl	0,25	0,1
disaccharide (Ivermectin)	CH (OH)	CH₂-CH₂	sec-Butyl	19	0,001
disaccharide (Doramectin)	CH (OH)	CH=CH	Cyclohexyl	?	0,001

Abb. 5.5. Abhängigkeit der Struktur von makrozyklischen Laktonen auf die Wirksamkeit gegen Flöhe (modifiziert nach Banks et al. 2000) und Würmer (modifiziert nach Michael et al. 2001). Aus diese Tabelle geht hervor, dass für die parasitische Wirkung die Zuckerreste offenbar von großer Bedeutung sind, indem den Monosaccharid deutlich weniger wirksam war als den Disaccharid.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues pharmakokinetisches Modell zur Untersuchung der hepatobiliären Ausscheidung von Xenobiotika bei Mäusen mit Transportdefekten etabliert. Das Modell erlaubt die Zuordnung eines Arzneistoffs als neues Substrat zu einem bestimmten Arzneistofftransporter sowie Untersuchung der möglichen unerwünschten Wirkungen von Substanzen bei Tieren mit entsprechenden Transportdefekten. Untersucht wurde die Elimination der Modellsubstanzen Selamectin, Ivermectin und Digoxin als Substrate für MDR1-Transporter sowie Phalloidin und Ouabain als Substrate für MRP2 Carrier. Die Antiparasitika Ivermectin und Selamectin weisen in dieser Studie keine Unterschiede in der Pharmakokinetik und in der Gehirnkonzentration zwischen *bcrp1* (-/-), *mrp1* (-/-) Knockout und FVB Wildtyp-Mäuse sowie zwischen Wistar- und *mrp2*-defizient TR(-) Ratten auf. Auch in der hier präsentierten Studie wurde die therapeutische Sicherheit bei der Anwendung von Selamectin beim MDR1^{-/-} Genotyp nachgewiesen.

Die Ergebnisse der *in situ* Galleausscheidung von Digoxin bei der Maus zeigen erhebliche Unterschiede in der Organverteilung zwischen der *mdr1a,b*(-/-) Knockout- und Wildtyp-Maus bei einer reduzierten Gallenausscheidung. Ebenfalls eine reduzierte Gallenausscheidung zeigen TR(-) Ratten im Vergleich zu Wistar-Ratten

Die Ergebnisse an TR(-) Ratten und Knockout-Mäusen zeigten, dass das Mrp2 Efflux-Transportsystem für einen Hauptteil wenn nicht sogar für die gesamte Ausscheidung des Phallotoxins über die Galle verantwortlich ist. Im Vergleich zu Mrp2 wurde kein signifikanter Transport über die Mdr1- und Bcrp-Transporter bei der *in situ* Galleausscheidung gemessen. Im Unterschied zur Galle enthielt der Urin von Wistar-Ratten nur Spuren der applizierten [³H]-DMP Dosis, und dies ist auch deutlich weniger im Vergleich zu den TR(-) Ratten. Dies zeigt, dass die reduzierte hepatobiliäre Ausscheidung durch eine gesteigerte Elimination durch die Niere kompensiert wurde.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Pharmakokinetik von Ouabain weisen auf ein erhebliches biliären Ausscheidungsdefizit bei den TR(-) Ratten im Vergleich zur Wildtyp-Ratte hin, was durch eine gesteigerte Harnexkretion kompensiert wird. In der Maus-Versuchen wurde festgestellt, dass Ouabain über Bcrp transportiert wird, da bei den *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen eine reduzierte Ausscheidung im Vergleich zum Wildtyp gemessen wurde. Der Mdr1 Transporter spielt bei der Ausscheidung von Ouabain offenbar keine Rolle.

7. Summary

The present thesis serves to introduce a pharmacokinetic model for investigating the hepatobiliary excretion of xenobiotics in mice with defects in transport systems. The model allows the classification of drug transported by certain system as well as the relation to side effects due to transport failure in animals. Examined were the elimination of selamectin, ivermectin und digoxin, all substrates of the MDR1 carrier, and of phalloidin und ouabain, transported by MRP2 carrier.

The antiparasitics Ivermectin and Selamectin did not exhibit any differences in pharmacokinetics and the brain concentrations between *bcrp1* (-/-), *mrp1* (-/-) knockout and FVB wild-type-mices. These results were also found in Wistar and *mrp2*-deficient TR(-) rats. The investigation further demonstrated a therapeutical safety of selamectin applied to animals with a the MDR1^{-/-} genotype.

The results of *in situ* bile excretion in the mice exhibit a strong difference in organ distribution as well as a reduced excretion of digoxin between *mdr1a,b*(-/-) knockout- und wild-type. The same could be observed in TR(-) rat compared to Wistar.

The data obtained in TR(-) rat and knockout mice reveal that the Mrp2 efflux system is responsible for main excretion of phalloidin into the bile. In contrast to Mrp2 the Mdr1 and Bcrp- transport systems are not significantly involved in the phalloidin bile excretion. In the urine of Wistar rats only traces of administered [³H]-DMP whereas elevated levels were measured in TR(-) rat. These results show that the reduced hepatobiliary elimination was compensated by an increased kidney excretion.

The pharmacokinetic data of ouabain point to a strong defect in bile excretion in TR(-) rats compared to Wistar which was compensated by enhanced urine elimination. Ouabain is transported by Bcrp as demonstrated by investigations in mice, since *bcrp1* (-/-) knockout-mice exhibit a reduced excretion compared to wildtype. Mdr1 efflux carrier seems not to be involved in the ouabain transport.

8. Literaturverzeichnis

- Abele R, Tampe R (1999) Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta* 1461: 405-419
- Adachi Y, Suzuki H, Sugiyama Y (2001) Comparative studies on in vitro methods for evaluating in vivo function of MDR1 P-glycoprotein. *Pharm Res* 18: 1660-1668
- Akhteruzzaman S, Kato Y, Hisaka A, Sugiyama Y (1999) Primary active transport of peptidic endothelin antagonists by rat hepatic canalicular membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 575-581
- Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511: 7-16
- Allen JD, Brinkhuis RF, Wijnholds J, Schinkel AH (1999) The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res* 59: 4237-4241
- Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai JM, van d, V, van Tellingen O, Reid G, Schellens JH, Koomen GJ, Schinkel AH (2002) Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* 1: 417-425
- Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson A, Dean M (1996) Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet* 5: 1649-1655
- Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* 8: 743-749
- Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res* 58: 5337-5339
- Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, Peiffer A, Zabriskie NA, Li Y, Hutchinson A, Dean M, Lupski JR, Leppert M (1997) Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 277: 1805-1807
- Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, Gerrard B, Baird L, Stauffer D, Peiffer A, Rattner A, Smallwood P, Li Y, Anderson KL, Lewis RA, Nathans J, Leppert M, Dean M, Lupski JR (1997) A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 15: 236-246
- Alvinerie M, Sutra JF, Galtier P, Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Lanusse C (1999) Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle. *Res Vet Sci* 66: 57-61
- 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
- Annilo T, Shulenin S, Chen ZQ, Arnould I, Prades C, Lemoine C, Maintoux-Larois C, Devaud C, Dean M, Deneffe P, Rosier M (2002) Identification and characterization of a novel ABCA subfamily member, ABCA12, located in the lamellar ichthyosis region on 2q34. *Cytogenet Genome Res* 98: 169-176
- Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, Redeker S, Ozbas-Gerceker F, van Vliet EA, Scheffer GL, Scheper RJ, van d, V, Baayen JC, Troost D (2004) Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45: 441-451
- Asaba H, Hosoya K, Takanaga H, Ohtsuki S, Tamura E, Takizawa T, Terasaki T (2000) Blood-brain barrier is involved in the efflux transport of a neuroactive steroid, dehydroepiandrosterone sulfate, via organic anion transporting polypeptide 2. *J Neurochem* 75: 1907-1916

- Atkinson DE, Greenwood SL, Sibley CP, Glazier JD, Fairbairn LJ (2003) Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C584-C591
- Bain LJ, McLachlan JB, LeBlanc GA (1997) Structure-activity relationships for xenobiotic transport substrates and inhibitory ligands of P-glycoprotein. *Environ Health Perspect* 105: 812-818
- 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
- Barnhart ER (1991) publ in: Physician's Desk Reference. Oradell NJ: *Medical Economics Co., Inc.*: 760-775
- Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries EG, Hendrikse NH, Sleijfer DT, Wegman TD, Vaalburg W, van der Graaf WT (2004) The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer* 40: 2064-2070
- Baselt RC (1982) Digoxin. In: Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 2nd ed. Davis CA: Biomedical Publications: 254-257
- Belinsky MG, Bain LJ, Balsara BB, Testa JR, Kruh GD (1998) Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J Natl Cancer Inst* 90: 1735-1741
- Belinsky MG, Dawson PA, Shchaveleva I, Bain LJ, Wang R, Ling V, Chen ZS, Grinberg A, Westphal H, Klein-Szanto A, Lerro A, Kruh GD (2005) Analysis of the in vivo functions of Mrp3. *Mol Pharmacol* 68: 160-168
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290: 1771-1775
- Bergwerk AJ, Shi X, Ford AC, Kanai N, Jacquemin E, Burk RD, Bai S, Novikoff PM, Stieger B, Meier PJ, Schuster VL, Wolkoff AW (1996) Immunologic distribution of an organic anion transport protein in rat liver and kidney. *Am J Physiol* 271: G231-G238
- 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
- Blanco G, Mercer RW (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 275: F633-F650
- Blizzard TA, Margiatta GM, Mrozik H, Shoop WL, Frankshun RA, Fisher MH (1992) Synthesis and biological activity of 13-epi-avermectins: potent anthelmintic agents with an increased margin of safety. *J Med Chem* 35: 3873-3878
- Bloomquist JR (1993) Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to insecticides acting on chloride channels. *Comp Biochem Physiol C* 106: 301-314
- Bloomquist JR (2003) Chloride channels as tools for developing selective insecticides. *Arch Insect Biochem Physiol* 54: 145-156
- Borst P, de Wolf C, van de WK (2006) Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch*
- Borst P, Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71: 537-592
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92: 1295-1302
- Brangi M, Litman T, Ciotti M, Nishiyama K, Kohlhagen G, Takimoto C, Robey R, Pommier Y, Fojo T, Bates SE (1999) Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells. *Cancer Res* 59: 5938-5946
- Brayden DJ, Griffin J (2007) Avermectin transepithelial transport in. *Vet Res Commun* in Press
- Breedveld P, Pluim D, Cipriani G, Wielinga P, van Tellingen O, Schinkel AH, Schellens JH (2005) The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res* 65: 2577-2582

- Breedveld P, Zelcer N, Pluim D, Sonmezer O, Tibben MM, Beijnen JH, Schinkel AH, van Tellingen O, Borst P, Schellens JH (2004) Mechanism of the pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions. *Cancer Res* 64: 5804-5811
- Bresnahan JF, Vlietstra RE (1979) Digitalis glycosides. *Mayo Clin Proc* 54: 675-684
- Broccardo C, Luciani M, Chimini G (1999) The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim Biophys Acta* 1461: 395-404
- Brouillard F, Tondelier D, Edelman A, Baudouin-Legros M (2001) Drug resistance induced by ouabain via the stimulation of MDR1 gene expression in human carcinomatous pulmonary cells. *Cancer Res* 61: 1693-1698
- Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 271: 15091-15098
- Campbell WC, Benz GW (1984) Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J Vet Pharmacol Ther* 7: 1-16
- Campbell WC, Fisher MH, Stapley EO, Albers-Schonberg G, Jacob TA (1983) Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 221: 823-828
- Cattori V, Hagenbuch B, Hagenbuch N, Stieger B, Ha R, Winterhalter KE, Meier PJ (2000) Identification of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) as a major full-length isoform of the liver-specific transporter-1 (rlst-1) in rat liver. *FEBS Lett* 474: 242-245
- Cattori V, van Montfoort JE, Stieger B, Landmann L, Meijer DK, Winterhalter KH, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Localization of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) in rat liver and comparison of its substrate specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflugers Arch* 443: 188-195
- Cavet ME, West M, Simmons NL (1996) Transport and epithelial secretion of the cardiac glycoside, digoxin, by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Br J Pharmacol* 118: 1389-1396
- Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, Endou H (2001) Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* 59: 1277-1286
- Cha SH, Sekine T, Kusuhara H, Yu E, Kim JY, Kim DK, Sugiyama Y, Kanai Y, Endou H (2000) Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J Biol Chem* 275: 4507-4512
- Chandra P, Brouwer KL (2004) The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm Res* 21: 719-735
- Chaudhary PM, Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 66: 85-94
- Chen C, Slitt AL, Dieter MZ, Tanaka Y, Scheffer GL, Klaassen CD (2005) Up-regulation of Mrp4 expression in kidney of Mrp2-deficient TR- rats. *Biochem Pharmacol* 70: 1088-1095
- Chen ZS, Kawabe T, Ono M, Aoki S, Sumizawa T, Furukawa T, Uchiumi T, Wada M, Kuwano M, Akiyama SI (1999) Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol Pharmacol* 56: 1219-1228
- Chen ZS, Robey RW, Belinsky MG, Shchaveleva I, Ren XQ, Sugimoto Y, Ross DD, Bates SE, Kruh GD (2003) Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res* 63: 4048-4054
- Choudhuri S, Ogura K, Klaassen CD (2001) Cloning, expression, and ontogeny of mouse organic anion-transporting polypeptide-5, a kidney-specific organic anion transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 92-98
- Chu XY, Kato Y, Niinuma K, Sudo KI, Hokusui H, Sugiyama Y (1997) Multispecific organic anion transporter is responsible for the biliary excretion of the camptothecin derivative irinotecan and its metabolites in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 304-314

- Chu XY, Strauss JR, Mariano MA, Li J, Newton DJ, Cai X, Wang RW, Yabut J, Hartley DP, Evans DC, Evers R (2006) Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein MRP2 (ABCC2). *J Pharmacol Exp Ther* 317: 579-589
- Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, Burant CF (1996) Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels. *Diabetes* 45: 1439-1445
- Ci L, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y (2007) Involvement of MRP4 (ABCC4) in the luminal efflux of ceftizoxime and cefazolin in the kidney. *Mol Pharmacol* 71: 1591-1597
- Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann JM (2004) Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res* 64: 3296-3301
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654
- Cole SP, Deeley RG (1998) Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays* 20: 931-940
- Collett A, Higgs NB, Sims E, Rowland M, Warhurst G (1999) Modulation of the permeability of H2 receptor antagonists cimetidine and ranitidine by P-glycoprotein in rat intestine and the human colonic cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 171-178
- Cooper JA (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105: 1473-1478
- 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 U S A* 86: 695-698
- Cox E, Wright SE (1959) The hepatic excretion of digitalis glycosides and their genins in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 126: 117-122
- Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, Higgins CF (1991) Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9262-9266
- Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D (1999) Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol Pharmacol* 55: 929-937
- Cui Y, Konig J, Keppler D (2001) Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2. *Mol Pharmacol* 60: 934-943
- de Bruin M, Miyake K, Litman T, Robey R, Bates SE (1999) Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett* 146: 117-126
- Damm KH, Braun W, Heckert H (1973) [The effect of probenecid on the distribution of digitoxin, digoxin and ouabain in the mouse]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 277: 267-279
- De Graaf D, Sharma RC, Mechetner EB, Schimke RT, Roninson IB (1996) P-glycoprotein confers methotrexate resistance in 3T6 cells with deficient carrier-mediated methotrexate uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1238-1242
- de Lange EC, de Bock G, Schinkel AH, de Boer AG, Breimer DD (1998) BBB transport and P-glycoprotein functionality using MDR1A (-/-) and wild-type mice. Total brain versus microdialysis concentration profiles of rhodamine-123. *Pharm Res* 15: 1657-1665
- De Lange EC, Marchand S, van den BD, van dS, I, De Boer AG, Delon A, Bouquet S, Couet W (2000) In vitro and in vivo investigations on fluoroquinolones; effects of the P-glycoprotein efflux transporter on brain distribution of sparfloxacin. *Eur J Pharm Sci* 12: 85-93

- de Lannoy IA, Silverman M (1992) The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 551-557
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42: 1007-1017
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11: 1156-1166
- Desrayaud S, de Lange EC, Lemaire M, Bruelisauer A, de Boer AG, Breimer DD (1998) Effect of the Mdr1a P-glycoprotein gene disruption on the tissue distribution of SDZ PSC 833, a multidrug resistance-reversing agent, in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 438-443
- Dietrich CG, de Waart DR, Ottenhoff R, Schoots IG, Elferink RP (2001) Increased bioavailability of the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in MRP2-deficient rats. *Mol Pharmacol* 59: 974-980
- Dijkstra M, Kuipers F, van den Berg GJ, Havinga R, Vonk RJ (1997) Differences in hepatic processing of dietary and intravenously administered copper in rats. *Hepatology* 26: 962-966
- Doran A, Obach RS, Smith BJ, Hosea NA, Becker S, Callegari E, Chen C, Chen X, Choo E, Cianfroga J, Cox LM, Gibbs JP, Gibbs MA, Hatch H, Hop CE, Kasman IN, Laperle J, Liu J, Liu X, Logman M, Maclin D, Nedza FM, Nelson F, Olson E, Rahematpura S, Raunig D, Rogers S, Schmidt K, Spracklin DK, Szewc M, Troutman M, Tseng E, Tu M, Van Deusen JW, Venkatakrishnan K, Walens G, Wang EQ, Wong D, Yasgar AS, 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 Metab Dispos* 33: 165-174
- Doris PA, Hayward-Lester A, Bourne D, Stocco DM (1996) Ouabain production by cultured adrenal cells. *Endocrinology* 137: 533-539
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15665-15670
- Dubin M, Maurice M, Feldmann G, Erlinger S (1978) Phalloidin-induced cholestasis in the rat: relation to changes in microfilaments. *Gastroenterology* 75: 450-455
- Eaton DL, Richards JA (1986) Kinetic evaluation of carrier-mediated transport of ouabain and taurocholic acid in isolated rat hepatocytes. Evidence for independent transport systems. *Biochem Pharmacol* 35: 2721-2725
- Eckhardt U, Horz JA, Petzinger E, Stuber W, Reers M, Dickneite G, Daniel H, Wagener M, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1996) The peptide-based thrombin inhibitor CRC 220 is a new substrate of the basolateral rat liver organic anion-transporting polypeptide. *Hepatology* 24: 380-384
- Elferink RO, Groen AK (2002) Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim Biophys Acta* 1586: 129-145
- Engelhardt JF, Yankaskas JR, Wilson JM (1992) In vivo retroviral gene transfer into human bronchial epithelia of xenografts. *J Clin Invest* 90: 2598-2607
- Erlichman C, Boerner SA, Hallgren CG, Spieker R, Wang XY, James CD, Scheffer GL, Maliepaard M, Ross DD, Bible KC, Kaufmann SH (2001) The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux. *Cancer Res* 61: 739-748
- Etter A, Cully DF, Liu KK, Reiss B, Vassilatis DK, Schaeffer JM, Arena JP (1999) Picrotoxin blockade of invertebrate glutamate-gated chloride channels: subunit dependence and evidence for binding within the pore. *J Neurochem* 72: 318-326
- European Public Assessment Report (EPAR) (2002) Stronghold EMEA/CVMP/665-99 Rev.2
- Evans WE, Relling MV (2004) Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature* 429: 464-468
- Evers R, Kool M, van Deemter L, Janssen H, Calafat J, Oomen LC, Paulusma CC, Oude Elferink RP, Baas F, Schinkel AH, Borst P (1998) Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA. *J Clin Invest* 101: 1310-1319

- Eytan GD, Regev R, Oren G, Hurwitz CD, Assaraf YG (1997) Efficiency of P-glycoprotein-mediated exclusion of rhodamine dyes from multidrug-resistant cells is determined by their passive transmembrane movement rate. *Eur J Biochem* 248: 104-112
- 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
- Fattinger K, Cattori V, Hagenbuch B, Meier PJ, Stieger B (2000) Rifamycin SV and rifampicin exhibit differential inhibition of the hepatic rat organic anion transporting polypeptides, Oatp1 and Oatp2. *Hepatology* 32: 82-86
- 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
- Flens MJ, Zaman GJ, van d, V, Izquierdo MA, Schroeijs AB, Scheffer GL, van der GP, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* 148: 1237-1247
- Fojo A, Hamilton TC, Young RC, Ozols RF (1987) Multidrug resistance in ovarian cancer. *Cancer* 60: 2075-2080
- Fojo AT, Shen DW, Mickley LA, Pastan I, Gottesman MM (1987) Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. *J Clin Oncol* 5: 1922-1927
- Fromm MF (2000) P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38: 69-74
- Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W, Schrenk D (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters. *Am J Pathol* 157: 1575-1580
- Funakoshi S, Murakami T, Yumoto R, Kiribayashi Y, Takano M (2003) Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics and drug interactions of digoxin and beta-methyl digoxin in rats. *J Pharm Sci* 92: 1455-1463
- Fürlinger E, Wolfbeis OS (1983) The absorption, fluorescence and phosphorescence of phalloidin and α -amanitin. *Biochim. Biophys. Acta* 760 411-414
- Gabbiani G, Montesano R, Tuchweber B, Salas M, Orci L (1975) Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. *Lab Invest* 33: 562-569
- Gao B, Stieger B, Noe B, Fritschy JM, Meier PJ (1999) Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J Histochem Cytochem* 47: 1255-1264
- Gatmaitan ZC, Arias IM (1993) Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine. *Adv Pharmacol* 24: 77-97
- Gavrilova O, Geyer J and Petzinger E. (2007) In vivo relevance of Mrp2-mediated biliary excretion of the *Amanita* mushroom toxin demethylphalloin. *BBA Biomembranes*, 1768:2070-2077
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273: 10046-10050
- Geyer J, Gavrilova O, Petzinger E. (2005) Hepatobiliary elimination of the cardiac glycoside ouabain in rodents: the role of Oatp1a4, Mrp2, and Mdr1. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 371, Suppl.1, R5, 20
- Geyer J, Doring 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. *J Vet Pharmacol Ther* 28: 545-551
- Geyer J, Doring 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. *J Vet Pharmacol Ther* 28: 95-99
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H (1997) Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 16: 871-881
- Gosland MP, Lum BL, Sikic BI (1989) Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin, and vinblastine in multidrug resistant human sarcoma cells. *Cancer Res* 49: 6901-6905

- Goto A, Ishiguro T, Yamada K, Ishii M, Yoshioka M, Eguchi C, Shimora M, Sugimoto T (1990) Isolation of a urinary digitalis-like factor indistinguishable from digoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 1093-1101
- Gotoh Y, Suzuki H, Kinoshita S, Hirohashi T, Kato Y, Sugiyama Y (2000) Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 433-439
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2: 48-58
- Graf J, Peterlik M (1976) Ouabain-mediated sodium uptake and bile formation by isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 230: 876-885
- Gramatte T, Oertel R (1999) Intestinal secretion of intravenous talinolol is inhibited by luminal R-verapamil. *Clin Pharmacol Ther* 66: 239-245
- 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
- Griffin J, Fletcher N, Clemence R, Blanchflower S, Brayden DJ (2005) Selamectin is a potent substrate and inhibitor of human and canine P-glycoprotein. *J Vet Pharmacol Ther* 28: 257-265
- Hagenbuch B, Meier PJ (1996) Sinusoidal (basolateral) bile salt uptake systems of hepatocytes. *Semin Liver Dis* 16: 129-136
- Hagemann E, Schmidt G (1960) Ratte und Maus - Versuchstiere in der Forschung, Walter de Gruyter & Co. Verlag Berlin; 74-88
- Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 5: 21-53
- Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH (1991) Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6259-6263
- Harrison LI, Gibaldi M (1976) Pharmacokinetics of digoxin in the rat. *Drug Metab Dispos* 4: 88-93
- Hasegawa M, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz JD, Takeuchi K, Sugiyama Y (2007) Multidrug resistance-associated protein 4 is involved in the urinary excretion of hydrochlorothiazide and furosemide. *J Am Soc Nephrol* 18: 37-45
- Hazlehurst LA, Foley NE, Gleason-Guzman MC, Hacker MP, Cress AE, Greenberger LW, De Jong MC, Dalton WS (1999) Multiple mechanisms confer drug resistance to mitoxantrone in the human 8226 myeloma cell line. *Cancer Res* 59: 1021-1028
- Hendricks CB, Rowinsky EK, Grochow LB, Donehower RC, Kaufmann SH (1992) Effect of P-glycoprotein expression on the accumulation and cytotoxicity of topotecan (SK&F 104864), a new camptothecin analogue. *Cancer Res* 52: 2268-2278
- Hendrikse NH, Schinkel AH, de Vries EG, Fluks E, Van der Graaf WT, Willemsen AT, Vaalburg W, Franssen EJ (1998) Complete in vivo reversal of P-glycoprotein pump function in the blood-brain barrier visualized with positron emission tomography. *Br J Pharmacol* 124: 1413-1418
- Hewitt EW, Lehner PJ (2003) The ABC-transporter signature motif is required for peptide translocation but not peptide binding by TAP. *Eur J Immunol* 33: 422-427
- Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8: 67-113
- Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusuhara H, Sugiyama Y (2005) Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol* 68: 800-807
- Hirohashi T, Suzuki H, Chu XY, Tamai I, Tsuji A, Sugiyama Y (2000) Function and expression of multidrug resistance-associated protein family in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2). *J Pharmacol Exp Ther* 292: 265-270
- Hirohashi T, Suzuki H, Ito K, Ogawa K, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y (1998) Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in eisai hyperbilirubinemic rats. *Mol Pharmacol* 53: 1068-1075

- Hirohashi T, Suzuki H, Sugiyama Y (1999) Characterization of the transport properties of cloned rat multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3). *J Biol Chem* 274: 15181-15185
- Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y (2000) ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem* 275: 2905-2910
- Hirouchi M, Suzuki H, Sugiyama Y (2005) Treatment of hyperbilirubinemia in Eisai hyperbilirubinemic rat by transfecting human MRP2/ABCC2 gene. *Pharm Res* 22: 661-666
- Hoffman BF, Bigger JT Jr. (1990) Digitalis and allied cardiac glycosides. In: *The pharmacological basis of therapeutics*. Goodman Gilman A, et al., eds. Pergamon Press Inc., New York 10523: 814-839
- Hoffmann K, Loscher W (2007) Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR(-) rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats. *Epilepsia* 48: 631-645
- Hoffmaster KA, Zamek-Gliszczynski MJ, Pollack GM, Brouwer KL (2005) Multiple transport systems mediate the hepatic uptake and biliary excretion of the metabolically stable opioid peptide [D-penicillamine_{2,5}]enkephalin. *Drug Metab Dispos* 33: 287-293
- Holden-Dye L, Walker RJ (1990) Avermectin and avermectin derivatives are antagonists at the 4-aminobutyric acid (GABA) receptor on the somatic muscle cells of *Ascaris*; is this the site of anthelmintic action? *Parasitology* 101 Pt 2: 265-271
- Hollo Z, Homolya L, Davis CW, Sarkadi B (1994) Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. *Biochim Biophys Acta* 1191: 384-388
- Hooijberg JH, Broxterman HJ, Kool M, Assaraf YG, Peters GJ, Noordhuis P, Scheper RJ, Borst P, Pinedo HM, Jansen G (1999) Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 59: 2532-2535
- Hooiveld GJ, van Montfoort JE, Meijer DK, Muller M (2001) Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *Eur J Pharm Sci* 12: 525-543
- Horikawa M, Kato Y, Tyson CA, Sugiyama Y (2002) The potential for an interaction between MRP2 (ABCC2) and various therapeutic agents: probenecid as a candidate inhibitor of the biliary excretion of irinotecan metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet* 17: 23-33
- Horio M, Gottesman MM, Pastan I (1988) ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 3580-3584
- Hosokawa S, Tagaya O, Mikami T, Nozaki Y, Kawaguchi A, Yamatsu K, Shamoto M (1992) A new rat mutant with chronic conjugated hyperbilirubinemia and renal glomerular lesions. *Lab Anim Sci* 42: 27-34
- Hosoyamada M, Sekine T, Kanai Y, Endou H (1999) Molecular cloning and functional expression of a multispecific organic anion transporter from human kidney. *Am J Physiol* 276: F122-F128
- Huang BS, Kudlac M, Kumarathasan R, Leenen FH (1999) Digoxin prevents ouabain and high salt intake-induced hypertension in rats with sinoaortic denervation. *Hypertension* 34: 733-738
- Huang L, Hoffman T, Vore M (1998) Adenosine triphosphate-dependent transport of estradiol-17beta(beta-D-glucuronide) in membrane vesicles by MDR1 expressed in insect cells. *Hepatology* 28: 1371-1377
- Huang Y (2007) Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 26: 183-201
- Hunter J, Hirst BH, Simmons NL (1991) Epithelial secretion of vinblastine by human intestinal adenocarcinoma cell (HCT-8 and T84) layers expressing P-glycoprotein. *Br J Cancer* 64: 437-444
- Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y (2003) Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol Pharmacol* 64: 610-618
- Imai Y, Tsukahara S, Asada S, Sugimoto Y (2004) Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* 64: 4346-4352
- Ishizuka H, Konno K, Naganuma H, Sasahara K, Kawahara Y, Niinuma K, Suzuki H, Sugiyama Y (1997) Temocaprilat, a novel angiotensin-converting enzyme inhibitor, is excreted in bile via an ATP-dependent active

- transporter (cMOAT) that is deficient in Eisai hyperbilirubinemic mutant rats (EHBR). *J Pharmacol Exp Ther* 280: 1304-1311
- Ishizuka H, Konno K, Shiina T, Naganuma H, Nishimura K, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y (1999) Species differences in the transport activity for organic anions across the bile canalicular membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 1324-1330
- Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y (1997) Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol* 272: G16-G22
- Jackson DG, Capra JD (1993) TAP1 alleles in insulin-dependent diabetes mellitus: a newly defined centromeric boundary of disease susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11079-11083
- Jager W, Sartori M, Herzog W, Thalhammer T (1998) Genistein metabolism in liver microsomes of Wistar and mutant TR(-)-rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 100: 105-116
- Jager W, Gehring E, Hagenauer B, Aust S, Senderowicz A, Thalhammer T (2003) The role of hepatic Mrp2 in the interaction of flavopiridol and bilirubin: impact on therapy. *Int J Clin Pharmacol Ther* 41: 610-611
- Jansen PL, Peters WH, Lamers WH (1985) Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport. *Hepatology* 5: 573-579
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D (1994) ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res* 54: 4833-4836
- Ji Y, Morris ME (2005) Transport of dietary phenethyl isothiocyanate is mediated by multidrug resistance protein 2 but not P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 70: 640-647
- Johnson BM, Zhang P, Schuetz JD, Brouwer KL (2006) Characterization of transport protein expression in multidrug resistance-associated protein (Mrp) 2-deficient rats. *Drug Metab Dispos* 34: 556-562
- 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
- Jones K, Hoggard PG, Sales SD, Khoo S, Davey R, Back DJ (2001) Differences in the intracellular accumulation of HIV protease inhibitors in vitro and the effect of active transport. *AIDS* 15: 675-681
- Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15649-15654
- Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC, Schinkel AH (2005) The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med* 11: 127-129
- Jonker JW, Freeman J, Bolscher E, Musters S, Alvi AJ, Titley I, Schinkel AH, Dale TC. (2005) *Contribution of the ABC transporters Bcrp1 and Mdr1a/1b to the side population phenotype in mammary gland and bone marrow of mice.* *Stem Cells*, 23(8): 1059-1065
- Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, Schinkel AH (2000) Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J Natl Cancer Inst* 92: 1651-1656
- Jonker JW, Wagenaar E, van Deemter L, Gottschlich R, Bender HM, Dasenbrock J, Schinkel AH (1999) 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* 127: 43-50
- Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455: 152-162
- Jung KY, Takeda M, Kim DK, Tojo A, Narikawa S, Yoo BS, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, Endou H (2001) Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters. *Life Sci* 69: 2123-2135
- Kala SV, Neely MW, Kala G, Prater CI, Atwood DW, Rice JS, Lieberman MW (2000) The MRP2/cMOAT transporter and arsenic-glutathione complex formation are required for biliary excretion of arsenic. *J Biol Chem* 275: 33404-33408

- Kaminski WE, Piehler A, Pullmann K, Porsch-Ozcurumez M, Duong C, Bared GM, Buchler C, Schmitz G (2001) Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human ABCA2 gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 249-258
- Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ (2006) ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762: 510-524
- Kamisako T, Gabazza EC, Ishihara T, Adachi Y (1999) Molecular aspects of organic compound transport across the plasma membrane of hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 14: 405-412
- Kamisako T, Kobayashi Y, Takeuchi K, Ishihara T, Higuchi K, Tanaka Y, Gabazza EC, Adachi Y (2000) Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *J Gastroenterol* 35: 659-664
- Kane NS, Hirschberg B, Qian S, Hunt D, Thomas B, Brochu R, Ludmerer SW, Zheng Y, Smith M, Arena JP, Cohen CJ, Schmatz D, Warmke J, Cully DF (2000) Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13949-13954
- Karlsson J, Kuo SM, Ziemniak J, Artursson P (1993) Transport of celioprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* 110: 1009-1016
- Karssen AM, Meijer OC, van dS, I, de Boer AG, de Lange EC, De Kloet ER (2002) The role of the efflux transporter P-glycoprotein in brain penetration of prednisolone. *J Endocrinol* 175: 251-260
- Kartner N, Shales M, Riordan JR, Ling V (1983) Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res* 43: 4413-4419
- Kawahara M, Sakata A, Miyashita T, Tamai I, Tsuji A (1999) Physiologically based pharmacokinetics of digoxin in *mdr1a* knockout mice. *J Pharm Sci* 88: 1281-1287
- Keppler D, Arias IM (1997) Hepatic canalicular membrane. Introduction: transport across the hepatocyte canalicular membrane. *FASEB J* 11: 15-18
- Keppler D, Kartenbeck J (1996) The canalicular conjugate export pump encoded by the *cmrp/cmoat* gene. *Prog Liver Dis* 14: 55-67
- Kim MS, Liu DQ, Strauss JR, Capodanno I, Yao Z, Fenyk-Melody JE, Franklin RB, Vincent SH (2003) Metabolism and disposition of gemfibrozil in Wistar and multidrug resistance-associated protein 2-deficient TR- rats. *Xenobiotica* 33: 1027-1042
- Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, Wood AJ, 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
- Kim WY, Benet LZ (2004) P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. *Pharm Res* 21: 1284-1293
- Kispal G, Csere P, Guiard B, Lill R (1997) The ABC transporter *Atm1p* is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* 418: 346-350
- Kiuchi Y, Suzuki H, Hirohashi T, Tyson CA, Sugiyama Y (1998) cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett* 433: 149-152
- Kivistö KT, Grisk O, Hofmann U, Meissner K, Moritz KU, Ritter C, Arnold KA, Lutjohann D, Von Bergmann K, Klöting I, Eichelbaum M, Kroemer HK (2005) Disposition of oral and intravenous pravastatin in MRP2-deficient TR- rats. *Drug Metab Dispos* 33: 1593-1596
- Kivistö KT, Zukunft J, Hofmann U, Niemi M, Rekersbrink S, Schneider S, Luippold G, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2004) Characterisation of cerivastatin as a P-glycoprotein substrate: studies in P-glycoprotein-expressing cell monolayers and *mdr1a/b* knock-out mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370: 124-130
- Koepsell H (1998) Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain. *Annu Rev Physiol* 60: 243-266
- Kojima R, Sekine T, Kawachi M, Cha SH, Suzuki Y, Endou H (2002) Immunolocalization of multispecific organic anion transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 13: 848-857

- Kolenda KD, Lullmann H, Peters T (1971) Metabolism of cardiac glycosides studied in the isolated perfused guinea-pig liver. *Br J Pharmacol* 41: 661-673
- Kolenda KD, Lullmann H, Peters T, Seiler KU (1971) Plasma concentration, uptake by liver, and biliary excretion of tritiated cardiac glycosides in the isolated perfused guinea-pig liver. *Br J Pharmacol* 41: 648-660
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000) A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G156-G164
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000) Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem* 275: 23161-23168
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461: 377-394
- König J, Rost D, Cui Y, Keppler D (1999) Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 29: 1156-1163
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P (1997) Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res* 57: 3537-3547
- Kopplow K, Letschert K, König J, Walter B, Keppler D (2005) Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *Mol Pharmacol* 68: 1031-1038
- Kruh GD, Belinsky MG, Gallo JM, Lee K (2007) Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice. *Cancer Metastasis Rev* 26: 5-14
- Kuipers F, Enserink M, Havinga R, van der Steen AB, Hardonk MJ, Fevery J, Vonk RJ (1988) Separate transport systems for biliary secretion of sulfated and unsulfated bile acids in the rat. *J Clin Invest* 81: 1593-1599
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120: 525-533
- Kupferberg HJ, Schankl LS (1968) Biliary secretion of ouabain-3H and its uptake by liver slices in the rat. *Am J Physiol* 214: 1048-1053
- Kuroda M, Kobayashi Y, Tanaka Y, Itani T, Mifuji R, Araki J, Kaito M, Adachi Y (2004) Increased hepatic and renal expressions of multidrug resistance-associated protein 3 in Eisai hyperbilirubinuria rats. *J Gastroenterol Hepatol* 19: 146-153
- Kusuhara H, Han YH, Shimoda M, Kokue E, Suzuki H, Sugiyama Y (1998) Reduced folate derivatives are endogenous substrates for cMOAT in rats. *Am J Physiol* 275: G789-G796
- Kusuhara H, Sugiyama Y (2002) Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release* 78: 43-54
- 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. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 574-580
- 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 Metab Dispos* 27: 581-587
- Lagas JS, Vlaming ML, van Tellingen O, Wagenaar E, Jansen RS, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH (2006) Multidrug resistance protein 2 is an important determinant of paclitaxel pharmacokinetics. *Clin Cancer Res* 12: 6125-6132
- 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
- Lankas GR, Gordon LR (1989) Toxicology. In: *Ivermectin und Abamectin edc.: Campbell WC*, Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg. 89-113

- Laredo J, Hamilton BP, Hamlyn JM (1994) Ouabain is secreted by bovine adrenocortical cells. *Endocrinology* 135: 794-797
- Laredo J, Shah JR, Lu ZR, Hamilton BP, Hamlyn JM (1997) Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. *Hypertension* 29: 401-407
- Lau YY, Wu CY, Okochi H, Benet LZ (2004) Ex situ inhibition of hepatic uptake and efflux significantly changes metabolism: hepatic enzyme-transporter interplay. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 1040-1045
- Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF (1999) The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 104: R25-R31
- Lazarowski AJ, Garcia Rivello HJ, Vera Janavel GL, Cuniberti LA, Cabeza Meckert PM, Yannarelli GG, Mele A, Crottogini AJ, Laguens RP (2005) Cardiomyocytes of chronically ischemic pig hearts express the MDR-1 gene-encoded P-glycoprotein. *J Histochem Cytochem* 53: 845-850
- Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R (2001) Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev* 53: 569-596
- Lee J, Boyer JL (2000) Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis* 20: 373-384
- Lee YJ, Kusuhara H, Jonker JW, Schinkel AH, 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. *J Pharmacol Exp Ther* 312: 44-52
- Leier I, Hummel-Eisenbeiss J, Cui Y, Keppler D (2000) ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney Int* 57: 1636-1642
- Lespine A, Dupuy J, Orlowski S, Nagy T, Glavinas H, Krajcsi P, Alvinerie M (2006) Interaction of ivermectin with multidrug resistance proteins (MRP1, 2 and 3). *Chem Biol Interact* 159: 169-179
- 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. *Eur J Pharm Sci* 30: 84-94
- Letschert K, Komatsu M, Hummel-Eisenbeiss J, Keppler D (2005) Vectorial transport of the peptide CCK-8 by double-transfected MDCKII cells stably expressing the organic anion transporter OATP1B3 (OATP8) and the export pump ABCG2. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 549-556
- Lewis RP (1992) Clinical use of serum digoxin concentrations. *Am J Cardiol* 69: 97G-106G
- Lichtstein D, Steinitz M, Gati I, Samuelov S, Deutsch J, Orly J (1998) Biosynthesis of digitalis-like compounds in rat adrenal cells: hydroxycholesterol as possible precursor. *Life Sci* 62: 2109-2126
- Lingrel JB, Kuntzweiler T (1994) Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 269: 19659-19662
- Lischka K, Starke D, Failing K, Herling A, Kramer W, Petzinger E (2003) Hepatobiliary elimination of bile acid-modified oligodeoxynucleotides in Wistar and TR- rats: evidence for mrp2 as carrier for oligodeoxynucleotides. *Biochem Pharmacol* 66: 565-577
- Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH, Bates SE (2000) The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J Cell Sci* 113 (Pt 11): 2011-2021
- Loranger A, Barriault C, Yousef IM, Tuchweber B (1996) Structural and functional alterations of hepatocytes during transient phalloidin-induced cholestasis in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 137: 100-111
- Maher JM, Slitt AL, Cherrington NJ, Cheng X, Klaassen CD (2005) Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice. *Drug Metab Dispos* 33: 947-955
- Malakoff D (2000) The rise of the mouse, biomedicine's model mammal. *Science* 288: 248-253
- Malakoff D (2000) Laboratory animals. Researchers fight plan to regulate mice, birds. *Science* 290: 23

- Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61: 3458-3464
- Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, Froot BG, Schellens JH (1999) Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res* 59: 4559-4563
- Masereeuw R, Notenboom S, Smeets PH, Wouterse AC, Russel FG (2003) Impaired renal secretion of substrates for the multidrug resistance protein 2 in mutant transport-deficient (TR-) rats. *J Am Soc Nephrol* 14: 2741-2749
- Masereeuw R, Kooiman K, van Balkom BWM, Heemskerk S, Peters JGP, Russel (2005) Organic anion transporting polypeptides, Oatp1a5 and Oatp1a6, in the apical membrane of renal proximal tubule. *Göttinger Transportertage* 2005, December 03.-04.2005
- Masuda M, Iizuka Y, Yamazaki M, Nishigaki R, Kato Y, Ni'inuma K, Suzuki H, Sugiyama Y (1997) Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res* 57: 3506-3510
- Masuda S, Ibaramoto K, Takeuchi A, Saito H, Hashimoto Y, Inui KI (1999) Cloning and functional characterization of a new multispecific organic anion transporter, OAT-K2, in rat kidney. *Mol Pharmacol* 55: 743-752
- Mayer R, Kartenbeck J, Buchler M, Jedlitschky G, Leier I, Keppler D (1995) Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J Cell Biol* 131: 137-150
- Mayer U, Wagenaar E, Beijnen JH, Smit JW, Meijer DK, van Asperen J, Borst P, Schinkel AH (1996) Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdr 1a P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* 119: 1038-1044
- Mayer U, Wagenaar E, Dorobek B, Beijnen JH, Borst P, Schinkel AH (1997) Full blockade of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC833. *J Clin Invest* 100: 2430-2436
- McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N (1999) pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 274: 23541-23548
- 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: 727-733
- 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: 1453-5, 1434
- Meier PJ, Stieger B (2002) Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64: 635-661
- Meier-Abt F, Faulstich H, Hagenbuch B (2004) Identification of phalloidin uptake systems of rat and human liver. *Biochim Biophys Acta* 1664: 64-69
- Meijer DK, van Monffoort JE (2002) Interactions of cationic drugs and cardiac glycosides at the hepatic uptake level: studies in the rat in vivo, isolated perfused rat liver, isolated rat hepatocytes and oocytes expressing oatp2. *Arch Pharm Res* 25: 397-415
- Meissner K, Heydrich B, Jedlitschky G, Meyer Zu SH, Mosyagin I, Dazert P, Eckel L, Vogelgesang S, Warzok RW, Bohm M, Lehmann C, Wendt M, Cascorbi I, Kroemer HK (2006) The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart. *J Histochem Cytochem* 54: 215-221
- Meissner K, Sperker B, Karsten C, Zu Schwabedissen HM, Seeland U, Bohm M, Bien S, Dazert P, Kunert-Keil C, Vogelgesang S, Warzok R, Siegmund W, Cascorbi I, Wendt M, Kroemer HK (2002) Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem* 50: 1351-1356
- Melaine N, Lienard MO, Dorval I, Le Goascogne C, Lejeune H, Jegou B (2002) Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, Guinea pig, and human. *Biol Reprod* 67: 1699-1707
- Mercier C, Masseguin C, Roux F, Gabrion J, Scherrmann JM (2004) Expression of P-glycoprotein (ABCB1) and Mrp1 (ABCC1) in adult rat brain: focus on astrocytes. *Brain Res* 1021: 32-40

- Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, Pulido MM, Molina AJ, Alvarez AI, Schinkel AH (2005) Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metab Dispos* 33: 614-618
- Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, van Herwaarden AE, Schinkel AH (2005) The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol* 67: 1758-1764
- Merkel DE, Fuqua SA, Tandon AK, Hill SM, Buzdar AU, McGuire WL (1989) Electrophoretic analysis of 248 clinical breast cancer specimens for P-glycoprotein overexpression or gene amplification. *J Clin Oncol* 7: 1129-1136
- 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
- Micheline D, Emmanuel J, Serge E (2002) Effect of Ursodeoxycholic Acid on the Expression of the Hepatocellular Bile Acid Transporters (Ntcp and bsep) in Rats With Estrogen-Induced Cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35: 185-191
- Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, Chaki T, Masuda S, Tokui T, Eto N, Abe M, Satoh F, Unno M, Hishinuma T, Inui K, Ito S, Goto J, Abe T (2004) Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3569-3574
- Miller DS, Nobmann SN, Gutmann H, Toeroek M, Drewe J, Fricker G (2000) Xenobiotic transport across isolated brain microvessels studied by confocal microscopy. *Mol Pharmacol* 58: 1357-1367
- Mitsuhashi N, Miki T, Senbongi H, Yokoi N, Yano H, Miyazaki M, Nakajima N, Iwanaga T, Yokoyama Y, Shibata T, Seino S (2000) MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis. *J Biol Chem* 275: 17536-17540
- Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y (2003) Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 55: 425-461
- Mizuno N, Suzuki M, Kusuhara H, Suzuki H, Takeuchi K, Niwa T, Jonker JW, Sugiyama Y (2004) Impaired renal excretion of 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole (E3040) sulfate in breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) knockout mice. *Drug Metab Dispos* 32: 898-901
- Morrissey A, Rosner E, Lanning J, Parachuru L, Dhar CP, Han S, Lopez G, Tong X, Yoshida H, Nakamura TY, Artman M, Giblin JP, Tinker A, Coetzee WA (2005) Immunolocalization of KATP channel subunits in mouse and rat cardiac myocytes and the coronary vasculature. *BMC Physiol* 5: 1
- Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Vore M (2000) Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 717-723
- Motulsky AG (2002) From pharmacogenetics and ecogenetics to pharmacogenomics. *Med Secoli* 14: 683-705
- Murata M, Tamai I, Kato H, Nagata O, Tsuji A (1999) Efflux transport of a new quinolone antibacterial agent, HSR-903, across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 51-57
- Nakagawa M, Schneider E, Dixon KH, Horton J, Kelley K, Morrow C, Cowan KH (1992) Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 52: 6175-6181
- Nakagawa R, Hara Y, Arakawa H, Nishimura S, Komatani H (2002) ABCG2 confers resistance to indolocarbazole compounds by ATP-dependent transport. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 669-675
- Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, Ikegami Y, Hayasaka S, Sano K, Shiozawa K, Kawabata S, Soda H, Ishikawa T, Tanabe S, Kohno S (2001) Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 827-832
- Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, Mealey KL, Pedersen NC (2004) Breed distribution and history of canine mdr1-1{Delta}, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Newell DR, Burtles SS, Fox BW, Jodrell DI, Connors TA (1999) Evaluation of rodent-only toxicology for early clinical trials with novel cancer therapeutics. *Br J Cancer* 81: 760-768

- Newton DJ, Wang RW, Evans DC (2005) Determination of phase I metabolic enzyme activities in liver microsomes of Mrp2 deficient TR- and EHBR rats. *Life Sci* 77: 1106-1115
- Nezasa K, Tian X, Zamek-Gliszczyński MJ, Patel NJ, Raub TJ, Brouwer KL (2006) Altered hepatobiliary disposition of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein in Abcg2 (Bcrp1) and Abcc2 (Mrp2) knockout mice. *Drug Metab Dispos* 34: 718-723
- Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, Keppler D (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* 129: 349-360
- Nies AT, Keppler D (2006) The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch*
- Niinuma K, Takenaka O, Horie T, Kobayashi K, Kato Y, Suzuki H, Sugiyama Y (1997) Kinetic analysis of the primary active transport of conjugated metabolites across the bile canalicular membrane: comparative study of S-(2,4-dinitrophenyl)-glutathione and 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl)benzothiazole glucuronide. *J Pharmacol Exp Ther* 282: 866-872
- Nobmann S, Bauer B, Fricker G (2001) Ivermectin excretion by isolated functionally intact brain endothelial capillaries. *Br J Pharmacol* 132: 722-728
- Noe B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1997) Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10346-10350
- 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
- 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
- Ogihara T, Kamiya M, Ozawa M, Fujita T, Yamamoto A, Yamashita S, Ohnishi S, Isomura Y (2006) What kinds of substrates show P-glycoprotein-dependent intestinal absorption? Comparison of verapamil with vinblastine. *Drug Metab Pharmacokinet* 21: 238-244
- Ohashi M, Sano N, Takikawa H (2002) Effects of phalloidin on the biliary excretion of cholephilic compounds in rats. *Pharmacology* 66: 31-35
- Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, Gotz A, Chambenoit O, Diederich W, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G (2000) Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet* 24: 192-196
- Oswald S, Westrup S, Grube M, Kroemer HK, Weitschies W, Siegmund W (2006) Disposition and sterol-lowering effect of ezetimibe in multidrug resistance-associated protein 2-deficient rats. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 1293-1299
- Pamer E, Cresswell P (1998) Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16: 323-358
- 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: 5733-5744
- Paradis M: Ivermectin in small animal dermatology. *Part I. Pharmacology and toxicology*. Compend Contin Educ Pract Vet 20: 193-200, 1998
- Patel P, Weerasekera N, Hitchins M, Boyd CA, Johnston DG, Williamson C (2003) Semi Quantitative Expression Analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP Gene Transcripts in 1st and 3rd Trimester Human Placenta. *Placenta* 24: 39-44
- Paul AJ, Hutchens DE, Firkins LD, Borgstrom M (2004) 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 (2004) Effects of dermal application of 10.0% imidacloprid-0.08% ivermectin in ivermectin-sensitive Collies. *Am J Vet Res* 65: 277-278
- Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS, Jr., DiPietro JA (1987) Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res* 48: 684-685

- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271: 1126-1128
- Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P, Oude Elferink RP (1999) Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 338 (Pt 2): 393-401
- Payen L, Courtois A, Champion JP, Guillouzo A, Fardel O (2000) Characterization and inhibition by a wide range of xenobiotics of organic anion excretion by primary human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 60: 1967-1975
- Perrin A, Brasmes B, Chambaz EM, Defaye G (1997) Bovine adrenocortical cells in culture synthesize an ouabain-like compound. *Mol Cell Endocrinol* 126: 7-15
- Peters WH, Roelofs HM (1992) Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferases. *Cancer Res* 52: 1886-1890
- 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, Fischer K (1985) Transport functions of the liver. Lack of correlation between hepatocellular ouabain uptake and binding to (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 815: 334-340
- Petzinger E, Frimmer M (1982) Energy linked uptake of demethylphalloin by isolated rat liver cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 319: 87-92
- Petzinger E, Geyer J (2006) Drug transporters in pharmacokinetics. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372: 465-475
- Petzinger E, Ziegler K, Frimmer M (1979) Inhibition of 3H-demethylphalloin uptake in isolated rat hepatocytes under various experimental conditions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 307: 275-281
- Phipps AN, Martin-Short MR, Littlewood L, Blanchflower SE, Gration KA (2005) Disposition of 3H-selamectin and 3H-ivermectin in the brain of the cat flea *Ctenocephalides felis felis* using micro-image analysis. *Vet Parasitol* 131: 89-94
- Polli JW, Baughman TM, Humphreys JE, Jordan KH, Mote AL, Webster LO, Barnaby RJ, Vitulli G, Bertolotti L, Read KD, Serabjit-Singh CJ (2004) The systemic exposure of an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist is limited in mice by the P-glycoprotein and breast cancer resistance protein efflux transporters. *Drug Metab Dispos* 32: 722-726
- Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W (2003) Brain access and anticonvulsant efficacy of carbamazepine, lamotrigine, and felbamate in ABCC2/MRP2-deficient TR- rats. *Epilepsia* 44: 1479-1486
- Puchinger H, Wieland T (1969) ³H-desmethylphalloin. *Liebigs Ann.Chem.* 725: 238-240
- Puchinger H, Wieland T (1969) [Search for some metabolites from poisoning by desmethylphalloin (DMP)]. *Eur J Biochem* 11: 1-6
- Pulido MM, Molina AJ, Merino G, Mendoza G, Prieto JG, Alvarez AI (2006) Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *J Vet Pharmacol Ther* 29: 279-287
- Pulliam JD, Seward RL, Henry RT, Steinberg SA (1985) Investigating ivermectin toxicity in collies. *Veterinary Medicine* 80: 33-40
- Putman M, van Veen HW, Konings WN (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 672-693
- Qazzaz HM, Goudy SL, Valdes R, Jr. (1996) Deglycosylated products of endogenous digoxin-like immunoreactive factor in mammalian tissue. *J Biol Chem* 271: 8731-8737
- Rabindran SK, He H, Singh M, Brown E, Collins KI, Annable T, Greenberger LM (1998) Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res* 58: 5850-5858

- Rabindran SK, Ross DD, Doyle LA, Yang W, Greenberger LM (2000) Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res* 60: 47-50
- Rajendra R, Gounder MK, Saleem A, Schellens JH, Ross DD, Bates SE, Sinko P, Rubin EH (2003) Differential effects of the breast cancer resistance protein on the cellular accumulation and cytotoxicity of 9-aminocamptothecin and 9-nitrocamptothecin. *Cancer Res* 63: 3228-3233
- Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME, Snyder AZ, Finch RA, Sartorelli AC, Piwnica-Worms D (1999) Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3900-3905
- Rehbinder D, Leoffler G, Wieland O, Wieland T (1963) [Studies on the mechanism of the poisonous effect of phalloidin with poisons labelled with radioactive substances.]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 331: 132-142
- Reichel C, Gao B, Van Montfoort J, Cattori V, Rahner C, Hagenbuch B, Stieger B, Kamisako T, Meier PJ (1999) Localization and function of the organic anion-transporting polypeptide Oatp2 in rat liver. *Gastroenterology* 117: 688-695
- Rhoads CP (1978) Classics in oncology. The sword and the ploughshare; Cornelius P. Rhoads. Excerpted from the Journal of the Mount Sinai Hospital, Volume XIII, Number 6, 1946. *CA Cancer J Clin* 28: 306-312
- Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem TA, Runge S, Risbood M, Poruchynsky MS, Bates SE (2003) Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br J Cancer* 89: 1971-1978
- Robey RW, Medina-Perez WY, Nishiyama K, Lahusen T, Miyake K, Litman T, Senderowicz AM, Ross DD, Bates SE (2001) Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 7: 145-152
- Robey RW, Steadman K, Polgar O, Morisaki K, Blayney M, Mistry P, Bates SE (2004) Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res* 64: 1242-1246
- Rodin SM, Johnson BF (1988) Pharmacokinetic interactions with digoxin. *Clin Pharmacokinet* 15: 227-244
- Rohrer SP, Birzin ET, Costa SD, Arena JP, Hayes EC, Schaeffer JM (1995) Identification of neuron-specific ivermectin binding sites in *Drosophila melanogaster* and *Schistocerca americana*. *Insect Biochem Mol Biol* 25: 11-17
- 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
- Rost D, Mahner S, Sugiyama Y, Stremmel W (2002) Expression and localization of the multidrug resistance-associated protein 3 in rat small and large intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G720-G726
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Muller CR, Strom TM, Oldenburg J (2004) Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427: 537-541
- 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
- Russell JQ, Klaassen CD (1972) Species variation in the biliary excretion of ouabain. *J Pharmacol Exp Ther* 183: 513-519
- Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 268: 6077-6080
- Salama NN, Kelly EJ, Bui T, Ho RJ (2005) The impact of pharmacologic and genetic knockout of P-glycoprotein on nelfinavir levels in the brain and other tissues in mice. *J Pharm Sci* 94: 1216-1225
- Salphati L, Benet LZ (1999) Metabolism of digoxin and digoxigenin digitoxosides in rat liver microsomes: involvement of cytochrome P4503A. *Xenobiotica* 29: 171-185
- Sarasola P, Jernigan AD, Walker DK, Castledine J, Smith DG, Rowan TG (2002) Pharmacokinetics of selamectin following intravenous, oral and topical administration in cats and dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 25: 265-272
- 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: 117-118

- Sasabe H, Kato Y, Suzuki T, Itose M, Miyamoto G, Sugiyama Y (2004) Differential involvement of multidrug resistance-associated protein 1 and p-glycoprotein in tissue distribution and excretion of grepafloxacin in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 648-655
- Sasaki M, Suzuki H, Ito K, Abe T, Sugiyama Y (2001) Transcellular transport of organic anions across double-transfected MDCK II cell monolayer expressing both human organic anion transporting polypeptide (OATP2/SLC21A6) and multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2). *J Biol Chem*
- Sato Y, Kanai S, Kitani K (1988) Enhancing effect of bucolome on biliary excretion of ouabain and digoxin in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 60: 173-189
- Savary S, Allikmets R, Denizot F, Luciani MF, Mattei MG, Dean M, Chimini G (1997) Isolation and chromosomal mapping of a novel ATP-binding cassette transporter conserved in mouse and human. *Genomics* 41: 275-278
- Schaeffer JM, Haines HW (1989) Avermectin binding in *Caenorhabditis elegans*. A two-state model for the avermectin binding site. *Biochem Pharmacol* 38: 2329-2338
- Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002) The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99: 507-512
- Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler D (1997) Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 8: 1213-1221
- Scheffer GL, Kool M, de Haas M, de Vree JM, Pijnenborg AC, Bosman DK, Elferink RP, van de V, Borst P, Scheper RJ (2002) Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab Invest* 82: 193-201
- Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 8: 161-170
- 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 U S A* 94: 4028-4033
- 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: 491-502
- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97: 2517-2524
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P (1995) Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 96: 1698-1705
- Schmitz G, Langmann T, Heimerl S (2001) Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J Lipid Res* 42: 1513-1520
- Schmoldt A, Ahsendorf B (1980) Cleavage of digoxigenin digitoxosides by rat liver microsomes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 5: 225-232
- Schneider E, Hunke S (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 22: 1-20
- Schneider E, Hunke S (1998) ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 22: 1-20
- Schoner W, Scheiner-Bobis G (2005) Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer. *Semin Nephrol* 25: 343-351
- Schoner W, Scheiner-Bobis G (2007) Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293(2): C509-36
- Schuetz EG, Umbenhauer DR, Yasuda K, Brimer C, Nguyen L, Relling MV, Schuetz JD, Schinkel AH (2000) Altered expression of hepatic cytochromes P-450 in mice deficient in one or more *mdr1* genes. *Mol Pharmacol* 57: 188-197

- Schwenk M, Wiedmann T, Remmer H (1981) Uptake, accumulation and release of ouabain by isolated rat hepatocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 316: 340-344
- Seelig A (1998) A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* 251: 252-261
- Seitz S, Kretz-Rommel A, Oude Elferink RP, Boelsterli UA (1998) Selective protein adduct formation of diclofenac glucuronide is critically dependent on the rat canalicular conjugate export pump (Mrp2). *Chem Res Toxicol* 11: 513-519
- Sesink AL, Arts IC, de Boer VC, Breedveld P, Schellens JH, Hollman PC, Russel FG (2005) Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol Pharmacol* 67: 1999-2006
- Shi NQ, Ye B, Makielski JC (2005) Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. *J Mol Cell Cardiol* 39: 51-60
- Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Sakagami M, Terada N, Tsujimura T (2003) Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *Am J Pathol* 163: 3-9
- Shin HC, Kato Y, Yamada T, Niinuma K, Hisaka A, Sugiyama Y (1997) Hepatobiliary transport mechanism for the cyclopentapeptide endothelin antagonist BQ-123. *Am J Physiol* 272: G979-G986
- Shitara Y, Sato H, Sugiyama Y (2005) Evaluation of drug-drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 689-723
- Shoda J, Miura T, Utsunomiya H, Oda K, Yamamoto M, Kano M, Ikegami T, Tanaka N, Akita H, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y (2004) Genipin enhances Mrp2 (Abcc2)-mediated bile formation and organic anion transport in rat liver. *Hepatology* 39: 167-178
- Silva VM, Thibodeau MS, Chen C, Manautou JE (2005) Transport deficient (TR-) hyperbilirubinemic rats are resistant to acetaminophen hepatotoxicity. *Biochem Pharmacol* 70: 1832-1839
- Smeets PH, Van Aubel RA, Wouterse AC, van den Heuvel JJ, Russel FG (2004) Contribution of multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2) to the renal excretion of p-aminohippurate (PAH) and identification of MRP4 (ABCC4) as a novel PAH transporter. *J Am Soc Nephrol* 15: 2828-2835
- Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, . (1993) Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75: 451-462
- Smitherman PK, Townsend AJ, Kute TE, Morrow CS (2004) Role of multidrug resistance protein 2 (MRP2, ABCC2) in alkylating agent detoxification: MRP2 potentiates glutathione S-transferase A1-1-mediated resistance to chlorambucil cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 260-267
- Solbach TF, Konig J, Fromm MF, Zolk O (2006) ATP-binding cassette transporters in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 16: 7-15
- 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
- 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
- Sparreboom A, Gelderblom H, Marsh S, Ahluwalia R, Obach R, Principe P, Twelves C, Verweij J, McLeod HL (2004) Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clin Pharmacol Ther* 76: 38-44
- Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH, van Tellingen O (1997) Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2031-2035
- Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J (2001) Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med* 7: 201-204

- Spears KJ, Ross J, Stenhouse A, Ward CJ, Goh LB, Wolf CR, Morgan P, Ayrton A, Friedberg TH (2005) Directional trans-epithelial transport of organic anions in porcine LLC-PK1 cells that co-express human OATP1B1 (OATP-C) and MRP2. *Biochem Pharmacol* 69: 415-423
- Srivastava SK, Watkins SC, Schuetz E, Singh SV (2002) Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage. *Mol Carcinog* 33: 156-162
- St Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1495-R1503
- Stieger B, Meier PJ (1998) Bile acid and xenobiotic transporters in liver. *Curr Opin Cell Biol* 10: 462-467
- Stockel B, Konig J, Nies AT, Cui Y, Brom M, Keppler D (2000) Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem* 267: 1347-1358
- Sugiyama D, Kusuhara H, Shitara Y, Abe T, Meier PJ, Sekine T, Endou H, Suzuki H, Sugiyama Y (2001) Characterization of the efflux transport of 17beta-estradiol-D-17beta-glucuronide from the brain across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 316-322
- Sugiyama D, Kusuhara H, Shitara Y, Abe T, Sugiyama Y (2002) Effect of 17beta-Estradiol-D-17beta-Glucuronide on the Rat Organic Anion Transporting Polypeptide 2-Mediated Transport Differs Depending on Substrates. *Drug Metab Dispos* 30: 220-223
- Summerfield SG, Stevens AJ, Cutler L, del Carmen OM, Hammond B, Tang SP, Hersey A, Spalding DJ, 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. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 1282-1290
- Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y (2003) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J Biol Chem* 278: 22644-22649
- Taipalensuu J, Tornblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjoqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjostrom B, Lundgren B, Artursson P (2001) Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 164-170
- Takano M, Hasegawa R, Fukuda T, Yumoto R, Nagai J, Murakami T (1998) Interaction with P-glycoprotein and transport of erythromycin, midazolam and ketoconazole in Caco-2 cells. *Eur J Pharmacol* 358: 289-294
- Takara K, Kakumoto M, Tanigawara Y, Funakoshi J, Sakaeda T, Okumura K (2002) Interaction of digoxin with antihypertensive drugs via MDR1. *Life Sci* 70: 1491-1500
- Tamai I, Tsuji A (2000) Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 89: 1371-1388
- 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. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 146-152
- ten Hove T, Drillenburg P, Wijnholds J, Te Velde AA, van Deventer SJ (2002) Differential susceptibility of multidrug resistance protein-1 deficient mice to DSS and TNBS-induced colitis. *Dig Dis Sci* 47: 2056-2063
- 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 U S A* 84: 7735-7738
- Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y, Adachi Y, Sakisaka S, Kuwano M (1999) Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am J Hum Genet* 64: 739-746
- Tojo A, Sekine T, Nakajima N, Hosoyamada M, Kanai Y, Kimura K, Endou H (1999) Immunohistochemical localization of multispecific renal organic anion transporter 1 in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 10: 464-471
- Tranquilli WJ, Paul AJ, Seward RL (1989) Ivermectin plasma concentrations in collies sensitive to ivermectin-induced toxicosis. *Am J Vet Res* 50: 769-770

- Trezise AE, Buchwald M (1991) In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 353: 434-437
- Tsuruoka S, Ishibashi K, Yamamoto H, Wakaumi M, Suzuki M, Schwartz GJ, Imai M, Fujimura A (2002) Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 41-45
- Turner MJ & Schaeffer JM: Mode of Action of Ivermectin. In: *Ivermectin and Abamectin* (WC Campbell, ed), Springer-Verlag, New York (USA); pp 73-88, 1989
- Uhr M, Grauer MT (2003) abcb1ab P-glycoprotein is involved in the uptake of citalopram and trimipramine into the brain of mice. *J Psychiatr Res* 37: 179-185
- Uhr M, Grauer MT, Yassouridis A, Ebinger M (2007) Blood-brain barrier penetration and pharmacokinetics of amitriptyline and its metabolites in p-glycoprotein (abcb1ab) knock-out mice and controls. *J Psychiatr Res* 41: 179-188
- 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: 753-759
- Uhr M, Namendorf C, Grauer MT, Rosenhagen M, Ebinger M (2004) P-glycoprotein is a factor in the uptake of dextromethorphan, but not of melperone, into the mouse brain: evidence for an overlap in substrate specificity between P-gp and CYP2D6. *J Psychopharmacol* 18: 509-515
- Uhr M, Steckler T, Yassouridis A, Holsboer F (2000) Penetration of amitriptyline, but not of fluoxetine, into brain is enhanced in mice with blood-brain barrier deficiency due to mdr1a P-glycoprotein gene disruption. *Neuropsychopharmacology* 22: 380-387
- Van Aubel RA, Peters JG, Masereeuw R, Van Os CH, Russel FG (2000) Multidrug resistance protein mrp2 mediates ATP-dependent transport of classic renal organic anion p-aminohippurate. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F713-F717
- van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87: 507-517
- van Herwaarden AE, Jonker JW, Wagenaar E, Brinkhuis RF, Schellens JH, Beijnen JH, Schinkel AH (2003) The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res* 63: 6447-6452
- Vassilatis DK, Elliston KO, Paress PS, Hamelin M, Arena JP, Schaeffer JM, Van der Ploeg LH, Cully DF (1997) Evolutionary relationship of the ligand-gated ion channels and the avermectin-sensitive, glutamate-gated chloride channels. *J Mol Evol* 44: 501-508
- 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: 47-55
- Vavricka SR, Van Montfoort J, Ha HR, Meier PJ, Fattinger K (2002) Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology* 36: 164-172
- Vlaming ML, Mohrmann K, Wagenaar E, de Waart DR, Elferink RP, Lagas JS, van Tellingen O, Vainchtein LD, Rosing H, Beijnen JH, Schellens JH, Schinkel AH (2006) Carcinogen and anticancer drug transport by Mrp2 in vivo: studies using Mrp2 (Abcc2) knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 319-327
- Vogelgesang S, Kunert-Keil C, Cascorbi I, Mosyagin I, Schroder E, Runge U, Jedlitschky G, Kroemer HK, Oertel J, Gaab MR, Pahnke J, Walker LC, Warzok RW (2004) Expression of multidrug transporters in dysembryoplastic neuroepithelial tumors causing intractable epilepsy. *Clin Neuropathol* 23: 223-231
- Volk EL, Schneider E (2003) Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* 63: 5538-5543
- Vulevic B, Chen Z, Boyd JT, Davis W, Jr., Walsh ES, Belinsky MG, Tew KD (2001) Cloning and characterization of human adenosine 5'-triphosphate-binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2). *Cancer Res* 61: 3339-3347

- Wacher VJ, Salphati L, Benet LZ (2001) Active secretion and enterocytic drug metabolism barriers to drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 46: 89-102
- Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I, Kimura A, Sakisaka S, Adachi Y, Kuwano M (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet* 7: 203-207
- Wakaumi M, Ishibashi K, Ando H, Kasanuki H, Tsuruoka S (2005) Acute digoxin loading reduces ABCA8A mRNA expression in the mouse liver. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 1034-1041
- Walters HC, Craddock AL, Fusegawa H, Willingham MC, Dawson PA (2000) Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G1188-G1200
- Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S, Baba M (2003) Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol Pharmacol* 63: 65-72
- Wang X, Nitanda T, Shi M, Okamoto M, Furukawa T, Sugimoto Y, Akiyama S, Baba M (2004) Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein. *Biochem Pharmacol* 68: 1363-1370
- Wieland T (1981) Amatoxins and phallotoxins – Structure and toxicity, in: V.Voelter, G.Weitzel (Eds.), *Structure and Activity of Natural Peptides*, Walter de Gruyter Publisher, Berlin – New York, pp. 23-40
- Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CAAM, Zaman GJR, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, Borst P. (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nature Med*, 3:1275-9
- Wijnholds J, deLange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van d, V, Schinkel AH, Scheper RJ, Breimer DD, Borst P (2000) Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest* 105: 279-285
- Woehlecke H, Pohl A, Alder-Baerens N, Lage H, Herrmann A (2003) Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2). *Biochem J* 376: 489-495
- Xiong H, Suzuki H, Sugiyama Y, Meier PJ, Pollack GM, Brouwer KL (2002) Mechanisms of impaired biliary excretion of acetaminophen glucuronide after acute phenobarbital treatment or phenobarbital pretreatment. *Drug Metab Dispos* 30: 962-969
- Yamaguchi H, Yano I, Hashimoto Y, Inui KI (2000) Secretory mechanisms of grepafloxacin and levofloxacin in the human intestinal cell line caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 360-366
- Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S, Inagaki N (2001) ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett* 508: 221-225
- 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. *Pharm Res* 16: 1213-1218
- Zakson-Aiken M, Gregory LM, Meinke PT, Shoop WL (2001) Systemic activity of the avermectins against the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 38: 576-580
- Zamek-Gliszczyński MJ, Xiong H, Patel NJ, Turncliff RZ, Pollack GM, Brouwer KL (2003) Pharmacokinetics of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein and its diacetate promoiety in the liver. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 801-809
- Zelcer N, Reid G, Wielinga P, Kuil A, van dH, I, Schuetz JD, Borst P (2003) Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J* 371: 361-367
- Zelcer N, Saeki T, Bot I, Kuil A, Borst P (2003) Transport of bile acids in multidrug-resistance-protein 3-overexpressing cells co-transfected with the ileal Na⁺-dependent bile-acid transporter. *Biochem J* 369: 23-30
- Zelcer N, Saeki T, Reid G, Beijnen JH, Borst P (2001) Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). *J Biol Chem* 276: 46400-46407

- Zelcer N, van de WK, de Waart R, Scheffer GL, Marschall HU, Wielinga PR, Kuil A, Kunne C, Smith A, van d, V, Wijnholds J, Elferink RO, Borst P (2006) Mice lacking Mrp3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides. *J Hepatol* 44: 768-775
- Zelcer N, van de WK, Hillebrand M, Sarton E, Kuil A, Wielinga PR, Tephly T, Dahan A, Beijnen JH, Borst P (2005) Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7274-7279
- Zeng H, Liu G, Rea PA, Kruh GD (2000) Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res* 60: 4779-4784
- Zeng Z, Andrew NW, Arison BH, Luffer-Atlas D, Wang RW (1998) Identification of cytochrome P4503A4 as the major enzyme responsible for the metabolism of ivermectin by human liver microsomes. *Xenobiotica* 28: 313-321
- Zhang XP, Ritke MK, Yalowich JC, Slovak ML, Ho JP, Collins KI, Annable T, Arceci RJ, Durr FE, Greenberger LM (1994) P-glycoprotein mediates profound resistance to bisantrene. *Oncol Res* 6: 291-301
- Zhang Y, Benet LZ (2001) The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 40: 159-168
- Zhang Y, Han H, Elmquist WF, Miller DW (2000) Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res* 876: 148-153
- Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP (2002) Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12339-12344

9. Anhang

Verwendete Versuchstiere

Tab. 9.1. *In situ* Galleausscheidungsversuche und Genotypisierung bei Ratten.

Tier No	Ratte-Stamm	Gewicht g	Testsubstanz	Applizierte Dosis, pmol	Appl. Dosis, µg	Appl. Dosis, mg/kg KG	Abbildung
1	Wistar	310,0	ohne Substanz				Abb. 4.1
2	Wistar	346,0	ohne Substanz				Abb. 4.1
3	Wistar	330,0	ohne Substanz				Abb. 4.1
4	TR(-)	320,0	ohne Substanz				Abb. 4.1
5	TR(-)	304,0	ohne Substanz				Abb. 4.1
6	TR(-)	312,0	ohne Substanz				Abb. 4.1
7	Wistar	360,0	Digoxin	3971,26	3,10	0,009	Abb. 4.33 – 4.36
8	Wistar	356,0	Digoxin	3987,77	3,11	0,009	Abb. 4.33 – 4.36
9	Wistar	370,0	Digoxin	4245,95	3,32	0,009	Abb. 4.33 – 4.36
10	TR(-)	340,0	Digoxin	4009,08	3,13	0,009	Abb. 4.33 – 4.36
11	TR(-)	354,0	Digoxin	3987,77	3,11	0,009	Abb. 4.33 – 4.36
12	TR(-)	350,0	Digoxin	4245,95	3,31	0,009	Abb. 4.33 – 4.36
13	Wistar	350,0	[³ H]Ouabain	350,13	0,20	0,0006	Abb. 4.27
14	Wistar	320,0	[³ H]Ouabain	294,77	0,17	0,0005	Abb. 4.27
15	Wistar	330,0	[³ H]Ouabain	294,77	0,17	0,0005	Abb. 4.27
16	TR(-)	300,0	[³ H]Ouabain	292,83	0,17	0,0006	Abb. 4.27
17	TR(-)	320,0	[³ H]Ouabain	291,58	0,17	0,0005	Abb. 4.27
18	TR(-)	300,0	[³ H]Ouabain	293,27	0,17	0,0006	Abb. 4.27
19	Wistar	300,0	[³ H]Ouabain	13981,1	8,17	0,027	Abb. 4.20 – 4.24
20	Wistar	306,0	[³ H]Ouabain	14345,8	8,39	0,027	Abb. 4.20 – 4.24
21	Wistar	300,0	[³ H]Ouabain	13616,4	7,96	0,026	Abb. 4.20 – 4.24
22	TR(-)	341,0	[³ H]Ouabain	15274,5	8,93	0,026	Abb. 4.20 – 4.24
23	TR(-)	330,0	[³ H]Ouabain	15527,0	9,08	0,027	Abb. 4.20 – 4.24
24	TR(-)	350,0	[³ H]Ouabain	15905,7	9,30	0,026	Abb. 4.20 – 4.24
25	Wistar	400,0	[³ H]DMP	14420,33	11,17	0,028	Abb. 4.14, 4.16 – 4.19
26	Wistar	420,0	[³ H]DMP	14626,33	11,33	0,027	Abb. 4.14, 4.16 – 4.19
27	Wistar	440,0	[³ H]DMP	14731,40	11,41	0,027	Abb. 4.14, 4.16 – 4.19
28	TR(-)	320,0	[³ H]DMP	13390,31	10,37	0,032	Abb. 4.14, 4.16 – 4.19
29	TR(-)	350,0	[³ H]DMP	13318,80	10,32	0,029	Abb. 4.14, 4.16 – 4.19
30	TR(-)	248,0	[³ H]DMP	13621,50	10,55	0,030	Abb. 4.14, 4.16 – 4.19
31	Wistar	406,0	[³ H]Ivermectin	142,76	0,124	0,00031	Abb. 4.38 – 4.39
32	Wistar	398,0	[³ H]Ivermectin	142,76	0,124	0,00031	Abb. 4.38 – 4.39
33	Wistar	400,0	[³ H]Ivermectin	141,69	0,124	0,00031	Abb. 4.38 – 4.39
34	TR(-)	300,0	[³ H]Ivermectin	118,97	0,104	0,00034	Abb. 4.38 – 4.39
35	TR(-)	312,0	[³ H]Ivermectin	118,07	0,103	0,00033	Abb. 4.38 – 4.39
36	TR(-)	303,0	[³ H]Ivermectin	118,97	0,103	0,00034	Abb. 4.38 – 4.39
37	Wistar	325,0	[³ H]Ivermectin	83863,4	73,39	0,23	Abb. 4.42
38	Wistar	270,0	[³ H]Ivermectin	82128,8	71,87	0,27	Abb. 4.42
39	Wistar	335,0	[³ H]Ivermectin	92336,5	80,86	0,24	Abb. 4.42
40	TR(-)	352,0	[³ H]Ivermectin	92794,2	81,20	0,23	Abb. 4.42
41	TR(-)	354,0	[³ H]Ivermectin	87642,7	76,70	0,22	Abb. 4.42
42	TR(-)	353,0	[³ H]Ivermectin	80283,4	70,26	0,20	Abb. 4.42
43	Wistar	420,0	[³ H]Selamectin	683521,1	5262,9	12,5	Abb. 4.45
44	Wistar	412,0	[³ H]Selamectin	669941,2	5158,3	12,5	Abb. 4.45
45	Wistar	370,0	[³ H]Selamectin	575101,9	4428,1	12,0	Abb. 4.45
46	TR(-)	316,0	[³ H]Selamectin	610189,7	4698,3	14,9	Abb. 4.45
47	TR(-)	360,0	[³ H]Selamectin	612905,7	4719,2	13,1	Abb. 4.45
48	TR(-)	330,0	[³ H]Selamectin	622411,6	4792,4	14,5	Abb. 4.45

49	Wistar	330,0	Genotypisierung				Abb. 4.10 – 4.12
50	Wistar	325,0	Genotypisierung				Abb. 4.10 – 4.12
51	Wistar	340,0	Genotypisierung				Abb. 4.10 – 4.12
52	TR(-)	310,0	Genotypisierung				Abb. 4.10 – 4.12
53	TR(-)	339,0	Genotypisierung				Abb. 4.10 – 4.12
54	TR(-)	315,0	Genotypisierung				Abb. 4.10 – 4.12

Tab. 9.2. *In situ* Galleausscheidungsversuche und Genotypisierung bei Mäusen.

Tier No	Maus-Stamm	Gewicht g	Testsubstanz	Appl. Dosis, pmol	Appl. Dosis, µg	Appl. Dosis, mg/kg KG	Abbildung
1	FVB	28,0	ohne Substanz				Abb. 4.2
2	FVB	29,0	ohne Substanz				Abb. 4.2
3	FVB	27,0	ohne Substanz				Abb. 4.2
4	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	30,0	ohne Substanz				Abb. 4.2
5	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	28,0	ohne Substanz				Abb. 4.2
6	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	29,0	ohne Substanz				Abb. 4.2
7	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	27,0	ohne Substanz				Abb. 4.2
8	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	28,0	ohne Substanz				Abb. 4.2
9	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	26,0	ohne Substanz				Abb. 4.2
10	FVB	32,0	[³ H]Taurocholat	456,1	0,24	7,5	Abb. 4.3, 4.4
11	FVB	30,0	[³ H]Taurocholat	438,6	0,23	7,54	Abb. 4.3, 4.4
12	FVB	31,0	[³ H]Taurocholat	456,1	0,24	7,58	Abb. 4.3, 4.4
13	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	37,0	[³ H]Taurocholat	627,1	0,32	8,74	Abb. 4.3, 4.4
14	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	34,0	[³ H]Taurocholat	646,7	0,33	9,80	Abb. 4.3, 4.4
15	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	42,0	[³ H]Taurocholat	822,3	0,42	10,0	Abb. 4.3, 4.4
16	FVB	32,0	[³ H]DHEAS	17,7	0,007	0,00022	Abb. 4.5, 4.6
17	FVB	30,0	[³ H]DHEAS	20,3	0,008	0,00026	Abb. 4.5, 4.6
18	FVB	30,0	[³ H]DHEAS	20,6	0,008	0,00026	Abb. 4.5, 4.6
19	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	34,0	[³ H]DHEAS	17,9	0,007	0,00021	Abb. 4.5, 4.6
20	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	36,0	[³ H]DHEAS	19,9	0,008	0,00021	Abb. 4.5, 4.6
21	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	26,0	[³ H]DHEAS	17,6	0,007	0,00026	Abb. 4.5, 4.6
22	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	25,0	[³ H]DHEAS	17,3	0,007	0,00027	Abb. 4.5, 4.6
23	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	26,0	[³ H]DHEAS	17,7	0,007	0,00026	Abb. 4.5, 4.6
24	FVB	33,0	[³ H]Digoxin	661,9	0,52	0,01	Abb. 4.28 – 4.32
25	FVB	30,0	[³ H]Digoxin	560,9	0,44	0,01	Abb. 4.28 – 4.32
26	FVB	28,0	[³ H]Digoxin	504,8	0,39	0,01	Abb. 4.28 – 4.32
27	FVB	30,0	[³ H]Digoxin	560,9	0,44	0,01	Abb. 4.28 – 4.32
28	FVB	32,0	[³ H]Digoxin	578,1	0,45	0,01	Abb. 4.28 – 4.32
29	FVB	30,0	[³ H]Digoxin	589,0	0,46	0,01	Abb. 4.28 – 4.32
30	FVB	29,0	[³ H]Digoxin	545,4	0,43	0,01	Abb. 4.28 – 4.32
31	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	33,0	[³ H]Digoxin	563,2	0,44	0,01	Abb. 4.28 – 4.32

32	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	31,0	[³ H]Digoxin	564,0	0,44	0,01	Abb. 4.28 – 4.32
33	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	32,0	[³ H]Digoxin	560,9	0,44	0,01	Abb. 4.28 – 4.32
34	FVB	28,0	[³ H]Ouabain	41,7	0,024	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
35	FVB	28,0	[³ H]Ouabain	41,7	0,024	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
36	FVB	27,0	[³ H]Ouabain	40,23	0,023	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
37	FVB	30,0	[³ H]Ouabain	41,5	0,024	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
38	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	32,0	[³ H]Ouabain	40,8	0,024	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
39	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	34,0	[³ H]Ouabain	45,5	0,027	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
40	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	31,0	[³ H]Ouabain	44,6	0,026	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
41	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	30,0	[³ H]Ouabain	41,9	0,025	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
42	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	27,0	[³ H]Ouabain	37,4	0,022	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
43	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	27,0	[³ H]Ouabain	38,8	0,023	0,0008	Abb. 4.24 – 4.27
44	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	29,0	[³ H]Ouabain	65,4	0,038	0,001	Abb. 4.24 – 4.27
45	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	28,0	[³ H]Ouabain	42,8	0,025	0,0009	Abb. 4.24 – 4.27
46	FVB	35,5	[³ H]DMP	1465,09	1,14	0,032	Abb. 4.14, 4.15, 4.18, 4.19
47	FVB	30,5	[³ H]DMP	1294,16	1,00	0,033	Abb. 4.14, 4.15, 4.18, 4.19
48	FVB	33,5	[³ H]DMP	1416,25	1,10	0,033	Abb. 4.14, 4.15, 4.18, 4.19
49	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	36,4	[³ H]DMP	1581,43	1,22	0,033	Abb. 4.14, 4.15, 4.18, 4.19
50	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	41,5	[³ H]DMP	1862,01	1,44	0,034	Abb. 4.14, 4.15, 4.18, 4.19
51	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	34,5	[³ H]DMP	1657,95	1,28	0,037	Abb. 4.14, 4.15, 4.18, 4.19
52	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	26,0	[³ H]DMP	1109,6	0,86	0,033	Abb. 4.14, 4.15, 4.18, 4.19
53	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	28,0	[³ H]DMP	1157,8	0,90	0,032	Abb. 4.14, 4.15, 4.18, 4.19
54	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	28,0	[³ H]DMP	1177,8	0,91	0,033	Abb. 4.14, 4.15, 4.18, 4.19
55	FVB	35,0	[³ H]Ivermectin	54,78	0,05	0,0013	Abb. 4.37
56	FVB	39,0	[³ H]Ivermectin	52,96	0,05	0,0012	Abb. 4.37
57	FVB	37,0	[³ H]Ivermectin	54,78	0,05	0,0013	Abb. 4.37
58	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	37,0	[³ H]Ivermectin	51,87	0,05	0,0012	Abb. 4.37
59	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	39,0	[³ H]Ivermectin	51,87	0,05	0,0012	Abb. 4.37
60	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	35,0	[³ H]Ivermectin	51,87	0,05	0,0013	Abb. 4.37
61	FVB Wildtyp	31,0	Ivermectin (i.v.)	6976,7	6,11	0,20	Abb 4.40, 4.41
62	FVB Wildtyp	30,0	Ivermectin (i.v.)	7353,4	6,43	0,21	Abb 4.40, 4.41
63	FVB Wildtyp	33,0	Ivermectin (i.v.)	8595,2	7,52	0,23	Abb 4.40, 4.41
64	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	31,0	Ivermectin (i.v.)	7297,6	6,39	0,21	Abb 4.40, 4.41
65	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	34,0	Ivermectin (i.v.)	7943,5	6,95	0,20	Abb 4.40, 4.41
66	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	31,0	Ivermectin (i.v.)	8232,6	7,20	0,23	Abb 4.40, 4.41

67	FVB Wildtyp	31,0	Ivermectin (oral)	6905,9	6,04	0,19	Abb 4.40, 4.41
68	FVB Wildtyp	31,0	Ivermectin (oral)	7036,0	6,16	0,20	Abb 4.40, 4.41
69	FVB Wildtyp	31,0	Ivermectin (oral)	7109,8	6,22	0,20	Abb 4.40, 4.41
70	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	31,0	Ivermectin (oral)	6805,4	5,96	0,19	Abb 4.40, 4.41
71	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	27,0	Ivermectin (oral)	6645,6	5,59	0,21	Abb 4.40, 4.41
72	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	32,0	Ivermectin (oral)	7032,6	6,15	0,19	Abb 4.40, 4.41
73	<i>bcrp1(-/-)</i> Knockout-Maus	28,0	Ivermectin (oral)	5913,6	5,17	0,18	Abb 4.40, 4.41
74	<i>bcrp1(-/-)</i> Knockout-Maus	27,0	Ivermectin (oral)	4428,8	3,88	0,14	Abb 4.40, 4.41
75	<i>bcrp1(-/-)</i> Knockout-Maus	29,0	Ivermectin (oral)	6333,7	5,54	0,19	Abb 4.40, 4.41
76	<i>mrp1(-/-)</i> Knockout-Maus	29,0	Ivermectin (oral)	6828,5	5,98	0,21	Abb. 4.41
77	<i>mrp1(-/-)</i> Knockout-Maus	30,0	Ivermectin (oral)	7141,5	6,25	0,21	Abb. 4.41
78	<i>mrp1(-/-)</i> Knockout-Maus	31,0	Ivermectin (oral)	7018,4	6,14	0,20	Abb. 4.41
79	<i>mrp1(-/-)</i> Knockout-Maus	30,0	Ivermectin (oral)	7517,7	6,58	0,22	Abb. 4.41
80	FVB Wildtyp	26,0	Ivermectin (Spot-on)	6852,6	6,00	0,23	Abb 4.40, 4.41
81	FVB Wildtyp	30,0	Ivermectin (Spot-on)	6852,6	6,00	0,20	Abb 4.40, 4.41
82	FVB Wildtyp	25,0	Ivermectin (Spot-on)	6852,6	6,00	0,24	Abb 4.40, 4.41
83	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	30,0	Ivermectin (Spot-on)	7163,8	6,27	0,21	Abb 4.40, 4.41
84	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	29,0	Ivermectin (Spot-on)	7163,8	6,27	0,22	Abb 4.40, 4.41
85	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	32,0	Ivermectin (Spot-on)	7163,8	6,27	0,20	Abb 4.40, 4.41
86	FVB Wildtyp	33,0	Selamectin (i.v.)	668426,7	510,33	15,46	Abb 4.43, 4.44
87	FVB Wildtyp	33,0	Selamectin (i.v.)	629016,9	489,22	14,82	Abb 4.43, 4.44
88	FVB Wildtyp	33,0	Selamectin (i.v.)	552651,9	425,88	12,9	Abb 4.43, 4.44
89	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	41,0	Selamectin (i.v.)	626990,4	469,57	11,5	Abb 4.43, 4.44
90	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	33,0	Selamectin (i.v.)	667881,0	500,90	15,2	Abb 4.43, 4.44
91	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	45,0	Selamectin (i.v.)	668732,9	500,83	11,1	Abb 4.43, 4.44
92	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	31,0	Selamectin (i.v.)	623582,8	467,02	15,1	Abb 4.43, 4.44
93	FVB Wildtyp	33,0	Selamectin (oral)	594076,1	453,99	13,75	Abb 4.43, 4.44
94	FVB Wildtyp	26,0	Selamectin (oral)	538178,9	410,65	15,8	Abb 4.43, 4.44
95	FVB Wildtyp	28,0	Selamectin (oral)	496863,6	379,70	13,56	Abb 4.43, 4.44
96	FVB Wildtyp	34,0	Selamectin (oral)	526359,7	373,51	11,00	Abb 4.43, 4.44
97	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	39,0	Selamectin (oral)	553248,5	427,16	11,0	Abb 4.43, 4.44
98	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	43,0	Selamectin (oral)	596011,6	460,18	10,70	Abb 4.43, 4.44
99	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	39,0	Selamectin (oral)	534539,6	412,72	10,58	Abb 4.43, 4.44
100	<i>mdr1a,b(-/-)</i> Knockout-Maus	30,0	Selamectin (oral)	539885,0	416,85	13,90	Abb 4.43, 4.44
101	<i>bcrp1(-/-)</i> Knockout-Maus	29,0	Selamectin (oral)	468916,2	353,70	12,17	Abb 4.43, 4.44
102	<i>bcrp1(-/-)</i> Knockout-Maus	29,0	Selamectin (oral)	489708,3	369,38	12,74	Abb 4.43, 4.44
103	<i>bcrp1(-/-)</i>	27,0	Selamectin (oral)	493812,0	372,48	13,80	Abb 4.43, 4.44

	Knockout-Maus						
104	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	28,0	Selamectin (oral)	460982,4	347,72	12,42	Abb 4.43, 4.44
105	<i>mrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	30,0	Selamectin (oral)	454236,4	349,2	11,64	Abb 4.43, 4.44
106	<i>mrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	29,0	Selamectin (oral)	464304,5	354,94	12,24	Abb 4.44
107	<i>mrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	30,0	Selamectin (oral)	48513,2	372,96	12,43	Abb 4.44
108	<i>mrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	32,0	Selamectin (oral)	473202,0	363,78	11,37	Abb 4.44
109	FVB Wildtyp	28,0	Selamectin (Spot-on)	473697,9	364,73	13,03	Abb 4.43, 4.44
110	FVB Wildtyp	28,0	Selamectin (Spot-on)	473697,9	364,73	13,03	Abb 4.43, 4.44
111	FVB Wildtyp	34,0	Selamectin (Spot-on)	435580,5	330,67	9,73	Abb 4.43, 4.44
112	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	27,0	Selamectin (Spot-on)	435580,5	330,67	12,25	Abb 4.43, 4.44
113	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	31,0	Selamectin (Spot-on)	435580,5	330,67	10,67	Abb 4.43, 4.44
114	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus	34,0	Selamectin (Spot-on)	435580,5	330,67	9,73	Abb 4.43, 4.44
115	<i>mdr1a,b/bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	30,0	[³ H]Digoxin	731,7	0,57	0,019	Abb. 4.29 – 4.32
116	<i>mdr1a,b/bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	28,0	[³ H]Digoxin	707,4	0,55	0,019	Abb. 4.29 – 4.32
117	<i>mdr1a,b/bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus	29,0	[³ H]Digoxin	707,4	0,57	0,019	Abb. 4.29 – 4.32
118	FVB Wildtyp		Genotypisierung				Abb. 4.7 – 4.9
119	FVB Wildtyp		Genotypisierung				Abb. 4.7 – 4.9
120	FVB Wildtyp		Genotypisierung				Abb. 4.7 – 4.9
121	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus		Genotypisierung				Abb. 4.7 – 4.9
122	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus		Genotypisierung				Abb. 4.7 – 4.9
123	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus		Genotypisierung				Abb. 4.7 – 4.9
124	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus		Genotypisierung				Abb. 4.7 – 4.9
125	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus		Genotypisierung				Abb. 4.7 – 4.9
126	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus		Genotypisierung				Abb. 4.7 – 4.9

Tabellen zur *in situ* Galleausscheidung von Digoxin

Tab. 9.3. Gewebekonzentration 90 min nach *in situ* Galleausscheidung von Digoxin bei den FVB-Wildtyp- und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen.

Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (+/+) Maus, pmol/g Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus, pmol/g Gewebe	Ratio, <i>mdr1a,b</i> (-/-) / <i>mdr1a,b</i> (+/+)
Leber	27,05 ± 14,13	49,14 ± 28,99	1,8
Dünndarm	76,55 ± 21,91	21,92 ± 8,17	0,3**
Dickdarm	58,28 ± 17,84	5,40 ± 0,34	0,1***
Nebenniere	22,35 ± 12,16	55,63 ± 6,04	2,5**
Niere	13,97 ± 3,94	17,69 ± 4,95	1,3
Magen	5,74 ± 3,77	8,64 ± 4,16	1,5
Milz	7,26 ± 3,65	10,68 ± 2,21	1,5
Nebenhoden	5,56 ± 2,34	11,51 ± 0,81	2,1
Hoden	18,19 ± 13,32	47,75 ± 3,39	2,6**
Herz	11,79 ± 3,84	16,85 ± 6,73	1,4
Lunge	9,31 ± 3,25	18,40 ± 3,75	2,0
Gehirn	1,23 ± 0,25	16,05 ± 2,47	13,0***
Plasma	16,64 ± 2,91	26,54 ± 6,89	1,6
Fettgewebe	4,21 ± 1,83	8,36 ± 1,04	2,0
Muskelgewebe	18,61 ± 5,74	23,93 ± 1,65	1,3

Tab. 9.4. Gewebekonzentrationen 120 min nach i.v. Applikation von Digoxin mit einer Dosierung von 0,01 mg/kg Körpergewicht bei Wistar und TR(-) Ratten.

Gewebe	Wistar-Ratte, pmol/g Gewebe	TR(-) Ratte, pmol/g Gewebe	Ratio, TR(-)/Wistar
Leber	24,70 ± 5,05	30,76 ± 1,25	1,2
Dünndarm	18,26 ± 2,24	10,61 ± 3,55	0,6
Dickdarm	8,86 ± 0,68	7,35 ± 2,16	0,8
Nebenniere	129,02 ± 31,03	98,79 ± 26,85	0,8
Niere	8,64 ± 7,70	6,82 ± 4,54	0,8
Magen	5,83 ± 1,07	1,97 ± 1,14	0,3
Milz	4,02 ± 1,07	4,92 ± 3,09	1,2
Nebenhoden	2,42 ± 0,57	3,64 ± 0,99	1,5
Hoden	1,06 ± 0,35	1,14 ± 0,23	1,1
Herz	2,73 ± 0,68	3,03 ± 0,73	1,1
Lunge	3,26 ± 1,07	1,29 ± 0,47	0,4
Gehirn	0,76 ± 0,13	0,45 ± 0,00	0,6
Plasma*	8,18 ± 0,82	8,86 ± 2,02	1,1
Fettgewebe	1,29 ± 0,80	2,05 ± 0,23	1,6
Muskelgewebe	4,39 ± 0,35	6,44 ± 1,68	1,5

* Die Plasma wurde in pmol/ml angegeben

Tab. 9.5. Dünnschichtchromatographie der Galleproben von *in situ* Galleausscheidungs-Versuchen mit [³H]Digoxin bei Ratten.

Spur Nr.	Probe	Galle µl	Dpm/µl	Aufgetragene dpm	Aufgetragene µl
1	TR(-) Ratte t=0	31,2	Hinzuges. Digox 50000	50000	0,4/5,0
2	TR(-) Ratte t=16	21,3	9104	50000	5,49
3	TR(-) Ratte t=40	28,5	9096	50000	5,50
4	TR(-) Ratte t=60	26,2	7544	50000	6,63
5	Digoxin kalt + Galle t=0	10,0	25µg/5µl/0 dpm	0	10,0/5,0
6	Wistar-Ratte t=16	85,9	9362	50000	5,52
7	Wistar-Ratte t=40	53,8	7746	50000	6,69
8	Wistar-Ratte t=60	66,7	6544	50000	7,64
9	Wistar-Ratte t=0	10,0	Hinzuges. Digox 50000	50000	0,40/5,00

Tab. 9.6: Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie der Gallenprobe von *in situ* Galleausscheidung von Digoxin bei den Wistar- und TR(-) Ratten.

Probe	Metabolite Peak1 %*	Digoxin Peak2 %	Summe	Probe	Metabolit Peak1 %	Digoxin Peak2 %	Summe
Wistar t=16 min	12,91	60,68	73,59	TR(-) t=16 min	4,48	70,80	75,28
Wistar t=40 min	15,33	58,66	73,99	TR(-) t=40 min	6,99	66,31	73,30
Wistar t=60 min	17,07	59,59	76,66	TR(-) t=60 min	8,90	57,58	66,48

* Prozent-Zahl von aufgetragenen dpm-Menge der Galleprobe

Tabelle zur *in situ* Galleausscheidung von Ouabain

Tab. 9.7: Organverteilung von Ouabain bei Mäusen nach 60 min *in situ* Galleausscheidung bei den Mäusen.

Organe	<i>mdr1a,b</i> (+/+) Maus, % appl. Dosis	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus, % appl. Dosis	<i>bcrp1</i> (-/-) Knockout-Maus, % appl. Dosis	Ratio, <i>mdr1a,b</i> (-/-)/ <i>mdr1a,b</i> (+/+))	Ratio, <i>bcrp1</i> (-/-) / <i>mdr1a,b</i> (+/+))
Leber	6,81 ± 3,65	11,37 ± 5,05	13,71 ± 1,98	1,7	2,0
Dünndarm	0,65 ± 0,22	0,94 ± 0,52	1,06 ± 0,41	1,4	1,6
Dickdarm	0,25 ± 0,09	0,34 ± 0,26	0,55 ± 0,22	1,4	2,2
Nebenniere	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,9	1,0
Niere	3,06 ± 0,55	4,59 ± 1,92	6,98 ± 3,03	1,5	2,3
Magen	0,24 ± 0,15	0,27 ± 0,11	0,23 ± 0,06	1,1	1,0
Milz	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,03	1,3	1,9
Nebenhoden	0,14 ± 0,14	0,08 ± 0,05	0,19 ± 0,16	0,6	1,4
Hoden	0,11 ± 0,07	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,06	1,0	1,5
Herz	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,20 ± 0,06	1,3	2,0
Lunge	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,18 ± 0,07	1,5	2,1
Gehirn	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,13	1,1	2,7
Plasma	1,73 ± 0,93	2,26 ± 1,27	1,92 ± 0,49	1,3	1,1
Urin	3,64 ± 2,54	2,56 ± 0,89	-	0,7	-
Galle	47,63 ± 7,57	48,99 ± 9,37	38,44 ± 6,25	1,0	0,8
Restkörper	34,47 ± 6,68	25,65 ± 10,27	35,29 ± 4,25	0,7	1,0

Tab. 9.8.: Gewebekonzentrationen von [³H]Ouabain bei den FVB Wildtyp, *mdr1a,b* (-/-), *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus 60 min nach i.v. Applikation von 0,8 µg/kg KG Ouabain.

Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (+/+), fmol/g Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (-/-), fmol/g Gewebe	<i>bcrp1</i> (-/-), fmol/g Gewebe	Ratio <i>mdr1a,b</i> (-/-) : <i>mdr1a,b</i> (+/+)	Ratio <i>bcrp1</i> (-/-) : <i>mdr1a,b</i> (+/+)
Leber	1666,63 ± 325,88	3190,21 ± 1494,30	3976,67 ± 578,30	1,9*	2,4**
Dünndarm	360,67 ± 260,40	311,15 ± 193,31	370,00 ± 110,00	0,9	1,0
Dickdarm	211,88 ± 86,18	189,01 ± 174,88	313,33 ± 102,14	0,9	1,5
Nebenniere	771,63 ± 162,20	726,31 ± 263,09	1523,33 ± 210,08	0,9	2,0**
Niere	3141,64 ± 962,81	3861,30 ± 1930,42	6633,33 ± 2706,17	1,2	2,1
Magen	213,57 ± 60,37	208,81 ± 73,38	213,33 ± 30,55	1,0	1,0
Milz	206,18 ± 156,83	168,13 ± 23,47	323,33 ± 122,20	0,8	1,6
Hoden	191,59 ± 26,97	188,51 ± 37,98	263,33 ± 87,37	1,0	1,4
Herz	321,86 ± 104,63	305,60 ± 49,46	716,67 ± 245,42	0,9	2,2*
Lunge	273,11 ± 159,12	300,13 ± 75,20	406,67 ± 161,66	1,1	1,5
Gehirn	45,70 ± 21,27	48,08 ± 7,93	106,67 ± 115,47	1,1	2,3
Plasma	268,08 ± 27,77	438,49 ± 253,42	303,33 ± 25,17	1,6	1,1
Fettgewebe	222,57 ± 94,89	228,28 ± 103,45	410,00 ± 105,36	1,0	1,8
Muskelgewebe	718,68 ± 106,93	817,72 ± 594,77	900,00 ± 157,16	1,1	1,3

** $p < 0,01$ FVB Wildtyp-Maus vs. *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus

* $p < 0,05$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

* $p < 0,05$ FVB Wildtyp-Maus vs. *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus

Tab. 9.9: Gewebekonzentrationen von [³H]Ouabain bei Wistar- und TR(-) Ratten 120 min nach *in situ* Galleausscheidung von Ouabain in einer Dosierung von 26 µg/kg KG.

Gewebe	TR(-) Ratte, pmol/g Gewebe	Wistar-Ratte, pmol/g Gewebe	Ratio, TR(-)/Wistar
Leber	125,24 ± 56,15	46,38 ± 15,16	2,7
Dünndarm	14,47 ± 2,56	8,42 ± 1,19	1,7
Dickdarm	14,18 ± 4,07	9,73 ± 0,49	1,5
Nebenniere	51,72 ± 48,54	17,71 ± 1,81	2,9
Niere	62,30 ± 35,78	133,42 ± 82,80	0,5
Magen	12,29 ± 0,28	8,50 ± 3,87	1,4
Milz	6,97 ± 1,52	7,54 ± 3,63	0,9
Hoden	4,59 ± 0,59	3,76 ± 0,66	1,2
Herz	11,84 ± 0,95	13,81 ± 2,48	0,9
Lunge	12,99 ± 1,86	9,32 ± 0,79	1,4
Gehirn	2,99 ± 0,14	3,02 ± 0,53	1,0
Blut	12,46 ± 7,11	5,88 ± 4,64	2,1
Urin	46,40 ± 15,10	10,64 ± 9,31	4,4
Fettgewebe	6,94 ± 2,47	6,45 ± 0,67	1,1
Muskelgewebe	27,21 ± 3,71	25,87 ± 4,13	1,1

Tabellen zur *in situ* Galleausscheidung von [³H]DMP

Tab. 9.10.: Gewebekonzentrationen von [³H]-DMP bei den FVB Wildtyp, *mdr1a,b* (-/-), *bcrp1* (-/-) Knockout-Maus und bei den Wistar und TR(-) Ratten 90/120 min nach i.v. Applikation von 0,03 mg/kg KG.

Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (+/+), pmol/g Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (-/-), pmol/g Gewebe	<i>bcrp1</i> (-/-), pmol/g Gewebe	Wistar-Ratte, pmol/g Gewebe	TR(-) Ratte, pmol/g Gewebe
Leber	148,54 ± 15,36	172,73 ± 59,83	266,09 ± 112,51	297,05 ± 75,35	285,90 ± 39,38
Dünndarm	9,37 ± 0,30	11,44 ± 0,73	11,25 ± 4,13	11,56 ± 6,45	25,33 ± 3,33
Dickdarm	5,08 ± 1,41	7,14 ± 1,65	9,58 ± 5,41	7,62 ± 3,84	15,73 ± 6,61
Niere	136,55 ± 56,42	98,58 ± 39,74	148,65 ± 96,03	128,38 ± 82,54	489,61 ± 203,44*
Magen	6,95 ± 2,66	9,94 ± 1,14	8,15 ± 3,09	8,84 ± 1,71	21,18 ± 2,83
Milz	8,70 ± 0,86	12,96 ± 1,09	16,84 ± 4,05	11,57 ± 0,87	16,19 ± 8,95
Hoden	7,26 ± 2,41	5,96 ± 0,32	6,62 ± 1,93	6,36 ± 0,40	11,53 ± 3,85
Herz	5,78 ± 0,76	9,30 ± 3,40	8,52 ± 1,97	7,88 ± 1,79	6,76 ± 2,16
Lunge	9,34 ± 1,86	17,38 ± 2,37	10,94 ± 1,79	8,32 ± 4,02	16,79 ± 4,18
Gehirn	2,62 ± 0,07	3,30 ± 0,10	3,16 ± 0,17	2,34 ± 0,07	3,36 ± 0,46
Plasma	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,02
Muskelgewebe	5,68 ± 2,31	2,63 ± 0,62	4,72 ± 0,60	7,15 ± 9,59	5,67 ± 4,26
Fettgewebe	12,38 ± 1,11	10,97 ± 1,27	12,71 ± 4,78	8,17 ± 4,48	12,19 ± 3,14

* $p < 0,05$ Wistar-Ratten vs. TR(-) Ratten

Tabellen zur Pharmakokinetik von Ivermectin

Tab. 9.11. Gewebekonzentrationen von Ivermectin 8 Stunden nach der i.v. Applikation von Ivermectin mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen.

Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (+/+) Maus, ng/g Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout-Maus, ng/g Gewebe	Ratio, <i>mdr1a,b</i> (-/-) / <i>mdr1a,b</i> (+/+) Maus
Gehirn	4,02 ± 0,27	144,12 ± 37,55	35,9***
Plasma (ng/ml)	48,01 ± 18,75	49,09 ± 15,14	1,0
Leber	386,49 ± 138,48	454,32 ± 276,28	1,2
Dünndarm	238,77 ± 60,27	503,65 ± 314,87	2,1
Dickdarm	637,89 ± 74,83	540,14 ± 212,43	0,8
Niere	220,30 ± 19,76	240,86 ± 41,93	1,1
Magen	126,72 ± 16,85	179,76 ± 20,15	1,4
Milz	82,73 ± 6,75	97,42 ± 26,06	1,2
Hoden	38,00 ± 6,97	86,32 ± 13,56	2,3**
Herz	93,32 ± 28,31	105,18 ± 28,88	1,1
Lunge	49,12 ± 9,66	69,63 ± 10,11	1,4
Fettgewebe	359,35 ± 152,86	231,03 ± 126,79	0,6
Muskelgewebe	74,80 ± 14,28	96,14 ± 22,83	1,3

*** $p < 0,001$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

** $p < 0,01$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

Tab. 9.12. Gewebekonzentrationen von Ivermectin 24 Stunden nach oraler Applikation von Ivermectin mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp, *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen.

Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (+/+), ng/g Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (-/-), ng/g Gewebe	<i>bcrp1</i> (-/-), ng/g Gewebe	Ratio <i>bcrp1</i> (-/-) : <i>mdr1a,b</i> (+/+)	Ratio <i>mdr1a,b</i> (-/-) : <i>mdr1a,b</i> (+/+)
Gehirn	2,15 ± 0,75	127,23 ± 21,54	2,09 ± 0,35	1,0	59,2***
Plasma (ng/ml)	2,99 ± 4,38	22,61 ± 4,60	21,10 ± 4,22	0,9	1,0
Leber	101,66 ± 31,04	375,67 ± 76,07	92,89 ± 69,83	0,9	3,7**
Dünndarm	151,24 ± 72,35	318,07 ± 94,63	101,21 ± 78,03	0,7	2,1
Dickdarm	349,91 ± 146,65	965,39 ± 412,91	451,41 ± 340,87	1,3	2,8
Niere	83,36 ± 27,44	190,60 ± 48,08	43,86 ± 23,61	0,5	2,3*
Magen	65,81 ± 32,11	158,96 ± 65,56	86,65 ± 63,37	1,3	2,4
Milz	33,34 ± 23,74	59,82 ± 14,90	21,64 ± 11,58	0,6	1,8
Hoden	31,95 ± 9,48	103,48 ± 30,13	15,16 ± 12,14	0,5	3,2*
Herz	44,05 ± 6,30	101,27 ± 1,22	22,78 ± 14,12	0,5	2,3***
Lunge	19,29 ± 6,43	52,37 ± 18,25	13,44 ± 4,03	0,7	2,7
Fettgewebe	152,22 ± 50,69	384,48 ± 32,97	86,75 ± 46,08	0,6	2,5**
Muskelgewebe	24,34 ± 12,83	67,15 ± 6,18	43,10 ± 24,22	1,8	2,8**

* $p < 0,05$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

** $p < 0,01$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

*** $p < 0,001$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

Tab. 9.13. Gewebekonzentrationen von Ivermectin 72 Stunden nach Spot-on Applikation von Ivermectin mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen.

Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (+/+) Maus, ng/g Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout- Maus, ng/g Gewebe	Ratio, <i>mdr1a,b</i> (-/-) / <i>mdr1a,b</i> (+/+)
Gehirn	0,56 ± 0,31	27,17 ± 11,08	48,4***
Plasma (ng/ml)	3,98 ± 2,87	7,23 ± 1,04	1,8
Leber	30,18 ± 17,51	37,89 ± 6,77	1,3
Dünndarm	30,58 ± 20,06	70,51 ± 22,59	2,3
Dickdarm	70,87 ± 47,67	88,79 ± 40,97	1,3
Niere	24,47 ± 14,35	32,86 ± 18,07	1,3
Magen	19,91 ± 4,33	26,16 ± 12,61	1,3
Milz	10,79 ± 3,34	14,01 ± 8,43	1,3
Hoden	6,70 ± 2,62	23,36 ± 9,15	3,5*
Herz	20,79 ± 6,17	34,02 ± 14,15	1,6
Lunge	8,54 ± 0,98	14,70 ± 5,56	1,7
Fettgewebe	59,04 ± 53,35	60,33 ± 29,54	1,0
Muskelgewebe	50,23 ± 26,48	12,07 ± 4,64	0,2

*** $p < 0,001$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

Tab. 9.14. Gewebekonzentrationen von Ivermectin 8 Stunden nach intravenöse Applikation von Ivermectin mit einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG bei den Wistar und TR(-) Ratten.

Gewebe	Wistar-Ratten, ng/g Gewebe	TR(-) Ratten, ng/g Gewebe	Ratio, TR(-) / Wistar
Gehirn	5,23 ± 0,92	5,33 ± 1,27	1,0
Plasma (ng/ml)	58,54 ± 18,85	35,12 ± 11,99	0,6
Leber	286,31 ± 192,31	293,71 ± 31,98	1,0
Dünndarm	289,14 ± 24,52	1123,46 ± 520,52	3,9
Dickdarm	159,40 ± 42,70	193,86 ± 16,61	1,2
Niere	210,03 ± 81,96	139,47 ± 31,69	0,7
Magen	219,19 ± 47,34	257,43 ± 21,88	1,2
Milz	122,77 ± 82,83	131,88 ± 53,67	1,1
Hoden	19,84 ± 0,73	19,36 ± 5,89	1,0
Herz	118,10 ± 28,40	104,23 ± 30,90	0,9
Lunge	191,45 ± 114,47	122,71 ± 56,33	0,6
Fettgewebe	168,97 ± 77,06	177,13 ± 77,10	1,0
Muskelgewebe	121,85 ± 14,57	95,53 ± 7,94	0,8

Tabellen zur Pharmakokinetik von Selamectin

Tab. 9.15. Gewebekonzentrationen von Selamectin 8 Stunden nach intravenöse Applikation von Selamectin mit einer Dosierung von 12 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen.

Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (+/+) Maus, µg/g Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout- Maus, µg/g Gewebe	Ratio, <i>mdr1a,b</i> (-/-) / <i>mdr1a,b</i> (+/+)
Gehirn	0,39 ± 0,27	2,53 ± 1,07	6,5*
Plasma (µg/ml)	5,98 ± 0,89	4,26 ± 0,20	0,7
Leber	11,31 ± 6,60	6,70 ± 3,13	0,6
Dünndarm	16,43 ± 9,43	20,27 ± 7,30	1,2
Dickdarm	21,79 ± 11,73	14,83 ± 7,18	0,7
Niere	10,11 ± 6,77	7,93 ± 3,91	0,8
Magen	4,47 ± 2,86	6,18 ± 3,55	1,4
Milz	4,89 ± 3,52	3,81 ± 1,70	0,8
Hoden	0,98 ± 0,77	1,96 ± 0,84	2,0
Herz	4,81 ± 3,37	4,36 ± 3,45	0,9
Lunge	4,19 ± 2,53	5,22 ± 2,42	1,2
Fettgewebe	8,70 ± 8,20	7,14 ± 6,32	0,8
Muskelgewebe	5,37 ± 3,63	8,20 ± 3,08	1,5

* $p < 0,05$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

Tab. 9.16. Gewebekonzentrationen von Selamectin 24 Stunden nach oraler Applikation von Selamectin mit einer Dosierung von 12 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp, *mdr1a,b* (-/-) und *bcrp1* (-/-) Knockout-Mäusen.

Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (+/+), µg/g Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (-/-), µg/g Gewebe	<i>bcrp1</i> (-/-), µg/g Gewebe	Ratio <i>mdr1a,b</i> (-/-) : <i>mdr1a,b</i> (+/+)	Ratio <i>bcrp1</i> (-/-) : <i>mdr1a,b</i> (+/+)
Gehirn	0,70 ± 0,22	3,43 ± 0,65	0,75 ± 0,05	4,9***	1,1
Plasma (µg/ml)	2,21 ± 0,98	2,14 ± 0,46	2,53 ± 0,78	1,0	1,1
Leber	15,26 ± 7,10	8,31 ± 1,71	14,91 ± 4,67	0,5	1,0
Dünndarm	21,58 ± 9,90	17,95 ± 6,94	13,62 ± 4,31	0,8	0,6
Dickdarm	66,85 ± 30,84	43,91 ± 16,82	34,70 ± 12,70	0,7	0,5
Niere	15,70 ± 4,71	7,36 ± 1,12	23,84 ± 5,16	0,5	1,5
Magen	20,32 ± 8,06	10,38 ± 3,85	16,17 ± 3,44	0,5	0,8
Milz	7,38 ± 3,69	3,44 ± 1,15	4,92 ± 0,91	0,5	0,7
Hoden	5,14 ± 4,45	3,38 ± 0,80	2,95 ± 0,51	0,7	0,6
Herz	8,59 ± 4,86	4,56 ± 1,33	5,55 ± 1,23	0,5	0,6
Lunge	7,50 ± 5,03	2,90 ± 0,95	3,97 ± 0,53	0,4	0,5
Fettgewebe	21,61 ± 8,82	10,25 ± 8,79	23,78 ± 5,45	0,5	1,1
Muskelgewebe	11,23 ± 4,78	13,80 ± 3,72	13,39 ± 3,39	1,2	1,2

*** $p < 0,001$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

Tab. 9.17. Gewebekonzentrationen von Selamectin 72 Stunden nach Spot-on Applikation von Selamectin mit einer Dosierung von 12 mg/kg KG bei den FVB Wildtyp und *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Mäusen.

Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (+/+) Maus, µg/g Gewebe	<i>mdr1a,b</i> (-/-) Knockout- Maus, µg/g Gewebe	Ratio, <i>mdr1a,b</i> (-/-) / <i>mdr1a,b</i> (+/+)
Gehirn	0,11 ± 0,02	1,12 ± 0,20	10,0*
Plasma (µg/ml)	0,24 ± 0,08	0,44 ± 0,16	1,8
Leber	0,77 ± 0,33	2,25 ± 1,26	2,9
Dünndarm	0,95 ± 0,28	2,34 ± 0,36	2,5**
Dickdarm	1,73 ± 0,44	3,32 ± 0,83	1,9
Niere	1,03 ± 0,49	1,95 ± 0,93	1,9
Magen	0,93 ± 0,05	2,34 ± 0,54	2,5
Milz	0,50 ± 0,17	0,90 ± 0,25	1,8
Hoden	0,45 ± 0,06	1,50 ± 0,40	3,4*
Herz	0,56 ± 0,13	1,09 ± 0,47	1,9
Lunge	0,62 ± 0,23	0,81 ± 0,18	1,3
Fettgewebe	3,71 ± 1,73	3,32 ± 1,03	0,9
Muskelgewebe	0,38 ± 0,11	1,11 ± 0,11	2,9

* $p < 0,05$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

** $p < 0,01$ FVB Wildtyp-Maus vs. *mdr1a,b* (-/-) Knockout-Maus

Tab. 9.18. Gewebekonzentrationen von Selamectin 8 Stunden nach intravenöse Applikation von Selamectin mit einer Dosierung von 12 mg/kg KG bei den Wistar und TR(-) Ratten.

Gewebe	Wistar-Ratten, µg/g Gewebe	TR(-) Ratten, µg/g Gewebe	Ratio, TR(-) / Wistar
Gehirn	0,84 ± 0,10	0,82 ± 0,13	1,0
Plasma (ng/ml)	3,95 ± 1,18	3,52 ± 0,71	0,9
Leber	14,85 ± 6,97	21,42 ± 5,15	1,4
Dünndarm	21,86 ± 6,04	79,11 ± 57,98	3,6
Dickdarm	6,10 ± 1,19	9,51 ± 3,33	1,6
Niere	8,07 ± 1,10	9,84 ± 1,04	1,2
Magen	8,97 ± 0,88	11,34 ± 5,52	1,3
Milz	5,39 ± 1,13	10,36 ± 4,43	1,9
Hoden	1,02 ± 0,06	1,45 ± 0,74	1,4
Herz	5,33 ± 1,70	6,95 ± 2,66	1,3
Lunge	5,40 ± 0,66	8,85 ± 2,37	1,6
Fettgewebe	5,84 ± 2,14	5,01 ± 2,23	0,9
Muskelgewebe	4,95 ± 0,52	5,67 ± 0,45	1,1

10. Danksagung

Ich möchte unserem Institutsleiter Herr Prof. Dr. Ernst Petzinger sehr herzlich dafür danken, dass er mir die Anfertigung einer Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie ermöglicht hat und auch für die gründlichen Korrekturen dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich neben Herrn Prof. Dr. Petzinger in seiner Funktion als Sprecher des Graduiertenkollegs Molekulare Veterinärmedizin auch bei seinem Stellvertreter, Herrn Prof. Dr. Rolf Bauerfeind, Frau Jana Heber sowie bei meinen Kollegen für die Unterstützung in der Forschung bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch und vor allem meinem guten Freund und Mentor Prof. Dr. Joachim Geyer bedanken. Lieber Achim, alles, was ich kann, habe ich von dir gelernt! Ich danke Dir für deine Geduld mit mir, manchmal hatten wir sehr interessante Diskussionsrunden. Ich danke Dir und Deiner Frau Sabine für Eure Unterstützung und den Glauben an mich.

Weiterhin möchte ich meiner Freundin und guten Arbeitskollegin Frau Barbara Döring für ihre Hilfe und Unterstützung sowohl beruflich als auch privat herzlich danken. Besonderer Dank gilt Barbara für ihre sofortige Bereitschaft, mir beim Operieren zu helfen und für alle Deutsch-Korrekturen, die ein enormes Ausmaß annahmen!! Ich möchte auch bei meinen Arbeitskollegen Dr. Carla Fernandes, Stefanie Klintzsch, Kerstin Meerkamp, Gary Grosser und Simone Bürger für ihre Hilfe und Unterstützung danken. Hervorzuheben ist die Hilfe von Carla Fernandes bei den Maus-Operationen und die Hilfe von Kerstin Meerkamp für die hervorragende Anleitung bei der Genotypisierung (Real-Time PCR) der Knockout-Tiere.

Für ihre täglich Hilfe im Labor möchte ich mich auch sehr herzlich bei unseren Mitarbeitern Regina Leidorf, Klaus Schuh, Dr. Jörg Alber und Christoph Zimmermann bedanken. Besonders zu erwähnen ist die Hilfe von Herrn Kurt Stumpf bei der Durchführung der Dünnschichtchromatographie der Galleproben. Bedanken möchte ich mich auch an dieser Stelle bei den Tierpflegern Ingo Lotz und Manuela Binz sowie dem gesamten Team des Zentralen Tierlabors der JLU Giessen für die hervorragende Zusammenarbeit und gute Betreuung den Tieren. Schließlich möchte mich auch bei der guten Seele des Institutes, Frau Dorothee von Schnakenburg, für ihren täglichen Kampf für unser Wohl bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. P. Michael Schmitz und seiner Frau Dr. Nataliya, die mir diesen Sprung von einer ukrainischen Hochschule an eine Universität in Deutschland ermöglicht haben sowie für die stetige freundliche Unterstützung hier in Giessen.

Bei meiner sehr guten Freundin Nataliya Möser sowie bei Winfried Wingerroth möchte ich mich für die Hilfe und die Gespräche, die mir immer wieder Kraft auch für meine Arbeit gegeben haben, bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich jederzeit und bedingungslos bei meiner Arbeit unterstützt haben, obwohl es manchmal nicht so ganz leicht war.

Zu guter Letzt möchte ich mich außerordentlich bei meinem Freund und Lebensgefährten Christopher Leitsch für seine stetige und kraftvolle Unterstützung und Liebe, die mir die nötige Kraft und den Ansporn zur Anfertigung meiner Dissertation gegeben hat, bedanken.

Diese Arbeit wurde in den Jahren 2004-2007 durch einen Stipendium von Deutschen Pharmaunternehmen (Sanofi-Aventis, Pfizer Tiergesundheit, Dr. Pfleger) und Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Graduirtenkolleg „Molekulare Veterinärmedizin“ an der Justus-Liebig-Universität Gießen gefördert.

11. Erklärung

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5313-3

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



9 17 8 3 8 3 5 19 5 3 1 3 0