

Einfluss der Modulation von P-Glykoprotein (P-gp) auf die Verfügbarkeit und Wirksamkeit der pharmakologischen Behandlung psychiatrischer Erkrankungen im Tiermodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg- Universität Mainz

Vorgelegt von:

David Holthöwer

geb. in Arnsberg- Neheim (NRW)

Mainz, 2011

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 09.06.2011

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>Seite</u>
1.1	Blut-Hirn Schranke	1
1.1.1	Physiologische und anatomische Besonderheiten der Blut-Hirn Schranke und die Bedeutung für den Transport von Arzneistoffen	1
1.1.2	Transportmechanismen an der Blut-Hirn Schranke	3
1.1.3	Arzneistoff-Transporter der ATP-Binding-Cassette-Genfamilie an der Blut-Hirn Schranke	5
1.2	P-Glykoprotein (P-gp)	7
1.2.1	Bedeutung von P-gp in der Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS)	7
1.2.2	Bedeutung von P-gp in der Behandlung von Therapie-resistenter Schizophrenie	10
1.2.3	Bedeutung von P-gp in der Pathogenese und neuer Ansätze zur Therapie der Alzheimer Krankheit	13
1.2.4	Modulation von P-gp und die Bedeutung für pharmakokinetische und pharmakodynamische Effekte von Psychopharmaka	16
1.3	Zielsetzung der Arbeit	20
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	
2.1	Chemikalien/ Arzneimittel/ Antikörper	24
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Arzneimittel	27
2.1.3	Antikörper	28

	<u>Seite</u>
2.2. Geräte und Gebrauchs-/ Verbrauchsmaterial	29
2.2.1 Geräte	29
2.2.2 Gebrauchsmaterial	31
2.2.3 Verbrauchsmaterial	32
2.3 Benutzte Computer Software	34
2.3.1 Software zur Validierung und Auswertung der HPLC Analysen	34
2.3.2 Software zur Auswertung der Verhaltensuntersuchungen	34
2.3.3 Software zur Auswertung der biochemischen Untersuchungen	34
2.3.4 Software zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse	34
2.4 HPLC-Analysen	35
2.4.1 Prinzip der High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)	35
2.4.2 HPLC-Methode Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon (Methode I)	37
2.4.3 HPLC-Methode Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon (Methode II)	37
2.4.4 HPLC-Methode Haloperidol	38
2.5 Herstellung der Injektionslösungen	38
2.6 Versuchstiere	39
2.7 Untersuchungen zur veränderten Verteilung von Antipsychotika in Gehirn/ Serum	40
2.7.1 Präparation von Proben	40
2.7.2 Gewebeaufbereitung für die HPLC-Analysen	40
2.7.3 Auswertung der HPLC-Analysen	40
2.7.4 Statistische Auswertung der HPLC-Analysen	40
2.7.5 Charakterisierung verschiedener P-gp Modulatoren (Vorversuch)	41

	<u>Seite</u>	
2.7.6	Vergleich Risperidon und Haloperidol	45
2.8	Verhaltenspharmakologische Untersuchungen	48
2.8.1	RotaRod	48
2.8.1.1	Aufbau des RotaRod	48
2.8.1.2	Durchführung der Untersuchungen auf dem RotaRod	50
2.8.1.3	Auswertung der Untersuchungen auf dem RotaRod	51
2.8.1.4	Statistische Auswertung der Untersuchungen auf dem RotaRod	52
2.8.2	Barnes Maze	52
2.8.2.1	Aufbau der Barnes Maze	53
2.8.2.2	Durchführung der Barnes Maze Untersuchungen	55
2.8.2.3	Auswertung der Barnes Maze Untersuchungen	58
2.8.2.4	Statistische Auswertung der Barnes Maze Untersuchungen	59
2.9	Untersuchungen zur Hirngängigkeit von Acitretin	59
2.9.1	Verteilung von Acitretin in Gehirn und Serum von P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Mäusen	59
2.10	Biochemische Untersuchungen	60
2.10.1	Western Blot Analysen	60
2.10.2	Durchführung der Western Blot Analysen	60
2.10.3	Vorbereitung der Proben für die Western Blot Analysen	63
2.10.3.1	Aufbereitung von Maus-Hirn-Fractionen	63
2.10.3.2	Isolierung von Thrombozyten aus Maus-Blut-Proben	64
2.10.4	Proteinbestimmung nach Bradford	65
2.10.5	Auswertung der Western Blot Analysen	66

	<u>Seite</u>	
2.10.6	Statistische Auswertung der Western Blot Analysen	66
2.10.7	Western Blot Analyse der P-gp Expression	67
2.10.8	Western Blot Analyse der ADAM10 Expression	67
2.10.9	Western Blot Analyse der APPs α Sekretion	68
3	<u>Ergebnisse</u>	
3.1	Untersuchungen zur veränderten Verteilung von Antipsychotika in Gehirn/ Serum	69
3.1.1	Charakterisierung verschiedener P-gp Modulatoren (Vorversuch)	69
3.1.1.1	Rifampicin und Dexamethason	76
3.1.1.2	5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) und Acitretin	86
3.1.1.3	Quercetin	96
3.1.2	Vergleich Risperidon und Haloperidol	107
3.1.2.1	Risperidon	107
3.1.2.2	Haloperidol	119
3.2	Verhaltenspharmakologische Untersuchungen	125
3.2.1	RotaRod	125
3.2.1.1	Risperidon	125
3.2.1.2	Haloperidol	131
3.2.2	Barnes Maze	137
3.2.2.1	Vergleich Risperidon und Haloperidol vs. Placebo	137
3.2.2.2	Risperidon	145

	<u>Seite</u>
3.2.2.3 Haloperidol	149
3.3 Untersuchungen zur Hirngängigkeit von Acitretin	155
3.3.1 Validierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben	155
3.3.2 Verteilung von Acitretin in Gehirn und Serum bei P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Mäusen	158
3.4 Biochemische Untersuchungen	161
3.4.1 P-gp Expression	161
3.4.2 ADAM10 Expression	163
3.4.3 APPs α Sekretion	167
<u>4 Diskussion</u>	
4.1 Charakterisierung verschiedener P-gp Modulatoren (Vorversuch)	169
4.2 Untersuchungen zur veränderten Verteilung von Antipsychotika in Gehirn und Serum	175
4.3 Verhaltenspharmakologische Untersuchungen	178
4.3.1 RotaRod	178
4.3.2 Barnes Maze	181
4.4 Validierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben	184
4.5 Untersuchungen zur Hirngängigkeit von Acitretin	185
4.6 Biochemische Untersuchungen	186
4.7 Zusammenfassung	191
4.8 Summary	192

Anhang

	<u>Seite</u>
I Verzeichnis der verwendeten Literatur	193
II Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	210

1 Einleitung

1.1 Blut-Hirn Schranke

1.1.1 Physiologische und anatomische Besonderheiten der Blut-Hirn Schranke und die Bedeutung für den Transport von Arzneistoffen

Die physiologische Bedeutung der Blut-Hirn Schranke ist der Schutz des Hirngewebes vor sowohl schädlichen endogenen Substanzen, als auch toxischen Xenobiotika, zu denen auch Medikamente zählen [Fromm (2000)]. Die Blut-Hirn Schranke ist eine Barriere, die den Austausch von körpereigenen und körperfremden Substanzen zwischen Blutkreislauf und Hirngewebe reguliert und nur für bestimmte Moleküle mit besonderen physiko-chemischen Eigenschaften durchlässig ist. Dazu gehören z.B. sehr lipophile Stoffe mit einem hohen log-P Wert und Moleküle mit einem geringen Molekulargewicht. Dies konnte bereits in den 1980er Jahren in einem Rattenmodell gezeigt werden [Levin (1980)]. Diese Eigenschaften haben besondere Bedeutung für die Absorption, Distribution, Metabolisierung und der Elimination (ADME) von endogenen wie exogenen Substanzen im Körper und sie spielen eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung und Beurteilung von Arzneistoffen und haben nicht zuletzt auch Bedeutung bei der Arzneimittelentwicklung. Auf diesem Hintergrund werden Substanzen nach dem sog. Biopharmazeutischen Klassifizierungssystem durch Daten zur Löslichkeit und Penetration von biologischen Membranen eingeteilt, um Rückschlüsse ziehen zu können, die sich auf die Verteilung der Substanzen in verschiedenen Geweben bzw. Kompartimenten des Körpers beziehen [Thiel-Demby et al. (2008)]. Die Forschung zur Funktion der Blut-Hirn Schranke selbst reicht weit zurück und ist mit den Namen einiger bedeutender Wissenschaftlern des letzten Jahrhunderts verbunden. Eine der ersten Untersuchungen zur Permeabilität und der Schrankenfunktion zwischen den verschiedenen Kompartimenten Blut, Liquor und Hirngewebe stammen von Lewandowsky (1900). Durch Injektionen mit Preußisch Blau konnte er erstmals zeigen, dass die Verteilung dieses Farbstoffes zwischen den Kompartimenten nicht einheitlich war. Paul Ehrlich hatte schon Ende des 19. Jahrhunderts zahlreiche Versuche mit Methoden der Vitalfärbung durchgeführt, die durch seinen Mitarbeiter Goldmann, unter der Verwendung des Farbstoffs Trypan-Blau, erweitert wurden [Goldmann (1909 und 1913); Riederer, Laux und Pöldinger (1992)]. Eine umfangreiche Darstellung der Strukturen der Blut-Hirn Schranke erfolgte dann von Stern und Gaultier (1921 und 1922) und von Walter (1929) [Davson and Welch (1971); Zettel, Mix und Lehnitz (2005)]. Hier wurde auch der Begriff der Schrankenfunktion manifestiert, der bis heute für die Beschreibung verschiedener Blut-Gewebe-Kompartimente gebräuchlich ist [Zettel, Mix und Lehnitz (2005)]. Erst die Entwicklung moderner Mikroskopie-Verfahren erlaubte schließlich Untersuchungen

auf zellulärer Ebene, wobei gezeigt werden konnte, dass die Blut-Hirn Schranke auf der besonderen Funktion der Hirnendothelien in den Kapillargefäßen des zentralen Nervensystems beruht [Reese und Karnovsky (1967); Rubin und Staddon (1999)]. Es konnte belegt werden, dass im Unterschied zu Zellen peripherer Blutgefäße, die Endothelzellen des zentralen Nervensystems den parazellulären Transport durch eine starke Reduktion der Fenestration (tight junctions) deutlich beschränken und die passive Diffusion, z.B. durch eine Reduktion der Vesikelanzahl, ebenfalls nur in geringem Ausmaß möglich ist [Bradbury (1985 und 1993); Pardridge (1995) ; Johansson (1999)]. Diese Endothelzellen weisen einen erheblichen elektrischen Widerstand auf, der darauf hinweist, dass der zelluläre Transport eingeschränkt ist [Butt et al. (1990)]. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Endothelzellen der Kapillargefäße im zentralen Nervensystem einen effektiven Schutzmechanismus für das Gehirn darstellen. Die Aufklärung des hohen Widerstandes zeigte, dass die Zytoskelette dieser Endothelien durch verschiedene Membranproteine, wie z.B. Occludin oder Claudin, fest miteinander verbunden sind und dies der Grund für die fehlende Fenestration ist [Rubin und Staddon (1999); Hawkins und Davis (2005)]. Neben den tight junctions spielen verschiedene, auf die Endothelzellen aufgelagerte, Zelltypen eine wichtige Funktion bei der Bildung einer Barriere. So besteht die Blut-Hirn Schranke aus dem gemeinsamen Verbund von Endothelzellen, Perizyten und Gliazellen, die zusätzlich den Transport durch Diffusion einschränken [Rubin und Staddon (1999); Hawkins und Davis (2005)]. Insbesondere der aktive Transport und der spezifische Rezeptorvermittelte Transport (s. Abb. 1.1.1) haben an der Blut-Hirn Schranke auf Grund dieser morphologischen und anatomischen Besonderheiten der Gehirnendothelien die größte Bedeutung [Lee et al. (2001); Löscher und Potschka (2005a); Dallas et al. (2006)]. Die Blut-Hirn Schranke und dessen Transportmechanismen stellen die Therapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems vor besondere Herausforderungen.

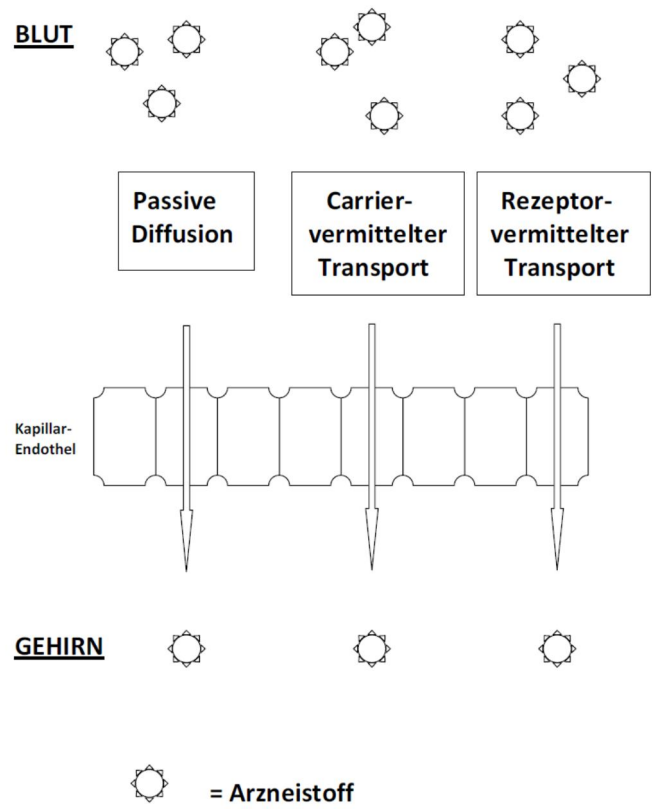


Abb. 1.1.1: Wichtige Transportmechanismen für Arzneistoffe an der Blut-Hirn Schranke.

1.1.2 Transportmechanismen an der Blut-Hirn Schranke

Die Grundlagen für einen Transport über die Blut-Hirn Schranke sind schon seit vielen Jahrzehnten bekannt. Man hatte schon früh herausgefunden, dass die besonderen Verhältnisse an dieser Barriere zwischen Hirngewebe und Blut auch bestimmte Transportmechanismen voraussetzen. Neben den physiko-chemischen Eigenschaften einer Substanz spielt insbesondere der Carrier-vermittelte Transport eine wesentliche Rolle bei der Verteilung von Arzneistoffen im Gehirn [Oldendorf (1974); Pardridge (1997)]. Neben diesem spezifischen Transport ins Hirngewebe (Influx), der u.a. für die Versorgung des Gehirns mit notwendigen Aminosäuren und Glukose notwendig ist, kommt dem aktiven Auswärtstransport (Efflux) aus dem Hirngewebe durch bestimmte Transportproteine, insbesondere für die Verteilung von Arzneistoffen im Gehirn, eine besondere Bedeutung zu [Rubin und Staddon (1999); Hagenbuch et al. (2002); Löscher und Potschka (2005b)]. Neben der physiologischen Funktion für den Schutz vor toxischen Einflüssen [Schinkel (1997)], schränkt der aktive Auswärtstransport, unter Verbrauch von ATP, die Möglichkeiten zur pharmakologischen

Therapie von Erkrankungen des ZNS deutlich ein. Dass diesen Transportproteinen eine große evolutionäre Bedeutung zukommt, zeigt die artenübergreifende Expression und genetische Konservierung, sowie die breite Substratspezifität. So zeigen einige dieser Transporter, Substratüberlappung [Schinkel (1997)]. Sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten verfügen über physiologische Efflux-Transporter [Schinkel (1997)]. Insbesondere die Erkenntnis, dass auch Arzneistoffe Substrate dieser Transporter sein können und dadurch ein Einfluss auf deren Verteilung möglich ist, macht deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen Transportmechanismen an der Blut-Hirn Schranke und der Wirkung von zentral-wirksamen Medikamenten besteht. Dies ist u.a. bei der Behandlung psychiatrischer Erkrankungen, die eine Penetration der eingesetzten Medikamente ins Hirngewebe voraussetzt, von Bedeutung [Urquhart und Kim (2009)]. Die Vorhersage ob ein Wirkstoff Substrat eines Efflux-Transporters ist kann nicht allein von strukturellen Voraussetzungen getroffen werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Substratspektrum von Efflux-Transportern eine chemisch und strukturell sehr heterogene Gruppe von Substanzen umfasst [Schinkel (1997)]. Es ist somit notwendig, Faktoren zu ermitteln und näher zu untersuchen, die die Wirksamkeit und den Erfolg einer psychopharmakologischen Therapie gefährden können. Die Weiterentwicklung von *in-silico* oder Perfusionstechniken zur Vorhersage der Substratspezifität waren wichtige Schritte, um die Effektivität und den Erfolg der Wirkstoffsuche der pharmazeutischen Forschung zu optimieren [Clark (2001); Murakami et al. (2000); Summerfield et al. (2007)]. Um Aussagen treffen zu können, ob eine Substanz eine Transporter-abhängige Verteilung an der Blut-Hirn Schranke zeigt, ist die Kombination von physiko-chemischen als auch biopharmazeutischer Daten ein möglicher Ansatzpunkt [Demel et al. (2009)]. Diese Daten geben erste Hinweise auf die strukturellen Voraussetzungen und bilden die Grundlage zur Beurteilung einer Substanz. Die physiologische Bedeutung der Blut-Hirn Schranke ist relevant für die pharmakologische Behandlung psychiatrischer Erkrankungen. Bei nachgewiesener Hirngängigkeit kann eine Veränderung der Aktivität von Transportproteinen die Wirksamkeit von Psychopharmaka beeinflussen. Verstärkter Efflux kann zu einer Wirkabschwächung führen, verminderter Efflux zu einer Wirkverstärkung. Psychopharmaka sind diesbezüglich schlecht charakterisiert. Insbesondere für den Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Modulierbarkeit der Transportproteine an der Blut-Hirn Schranke und deren Einfluss auf die pharmakologische Therapie psychiatrischer Erkrankungen fehlen entsprechende Daten. Die Bedeutung pharmakokinetischer Interaktionen bedingt durch genetische oder pharmakologisch induzierte Veränderungen der Expression und der Aktivität von Transportproteinen und die daraus resultierenden pharmakodynamischen Konsequenzen müssen daher besser untersucht werden. Es gilt dabei, Faktoren zu ermitteln, die möglicherweise die Wirksamkeit einer psychopharmakologischen Therapie einschränken.

1.1.3 **Arzneistoff-Transporter der ATP-Binding-Cassette-Genfamilie an der Blut-Hirn Schranke**

Die Forschung zur Bedeutung der Transportproteine aus der großen Gruppe der ATP-Binding Cassette-Genfamilie (ABC-Transporter) für die Verteilung und die Wirksamkeit von Arzneistoffen stammt ursprünglich aus dem Bereich der Onkologie. In der Chemotherapie maligner Tumoren wurde beobachtet, dass es im Verlauf der Behandlung zu einer Resistenzentwicklung kommen kann. Als Ursache wurde u.a. festgestellt, dass das Tumorgewebe Efflux-Transporter, sog. Multi-Drug-Resistance-Proteine (MDR-Proteine) exprimiert, über die Chemotherapeutika aus dem Tumorgewebe ausgeschleust werden. Die Entdeckung von Membranproteinen, die den Transport der zytotoxischen Substanzen einschränken konnten, war ein wichtiger Ansatzpunkt, um die Therapie von Krebserkrankungen zu verbessern [Juliano und Ling (1976); Lehnert (1994)]. Ziel war es, Medikamente zu entwickeln, die MDR-Proteine hemmen, um Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika zu überwinden [Volm und Efferth (1994)]. Heute sind eine Vielzahl an Substraten, Inhibitoren und Induktoren verschiedener Transportproteine, nicht nur an der Blut-Hirn Schranke, bekannt [Pal und Mitra (2006)]. Dabei fällt auf, dass sich in nahezu jeder Wirkstoffgruppe zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen Substrate von Transportproteinen, insbesondere von P-Glykoprotein (P-gp), finden. Neben dem bekanntesten und am besten untersuchten Transporter P-gp [Seeger und van Veen (2009)] gibt es eine Vielzahl aktiver Transportproteine in verschiedenen Familien und Unterfamilien, die den Auswärtstransport von endogenen und exogenen Substanzen forcieren [Dean et al. (2001)]. Die ABC-Genfamilie, mit zahlreichen Unterfamilien, zählt zu den größten bislang bekannten Proteinfamilien und ist daher für die Wissenschaft auf Grund der physiologischen und therapeutischen Bedeutung dieser Proteine von höchstem Interesse [Jones und George (2000)]. Es wurden bislang 48 verschiedene ABC-Transporter im humanen Genom identifiziert, die in sieben Unterfamilien (A-G) aufgeteilt sind [Abutkar et al. (2003)]. Die Substratspezifitäten und die Bedeutung für physiologische wie therapeutische Transportmechanismen sind allerdings bislang noch nicht ausreichend untersucht. Die systematische Aufklärung der Struktur und Funktion dieser Transporter ist notwendig für ein verbessertes Verständnis der Wirkung von Arzneimitteln. Darüber hinaus ist denkbar, dass eine Modulation der Funktion dieser Proteine für therapeutische Zwecke nutzbar gemacht werden kann [Löscher und Potschka (2005a und 2005b)]. Zur Entwicklung von P-gp Inhibitoren wurden Röntgen-Struktur-Analysen, kristallographische Methoden und mikroskopische Techniken verwendet [Jones und George (2000)]. Die meisten ABC-Transporter weisen vier besondere Strukturmerkmale auf. Dazu gehören zwei hydrophobe Transmembran-Domänen, die für den Transport der Substrate durch die

Zellmembran essentiell sind und zwei hydrophile zytoplasmatische Nucleotid Bindestellen zur Bereitstellung von ATP und dessen Hydrolyse für den aktiven Transportmechanismus [Seeger und van Veen (2009)]. Man geht davon aus, dass 12 Transmembran-Domänen mit einer α -Helix Struktur eine Pore bilden, die für die Penetration der Zellmembran notwendig ist [Jones und George (2000); Dean et al (2001)]. Neben dem Auswärtstransport sind die verschiedenen ABC-Proteine aber auch am physiologischen Influx und der Homöostase von Lipiden, Aminosäuren und weiteren lebensnotwendigen Nährstoffen beteiligt [Dean et al. (2001)]. Somit wird deutlich warum sich eine artenübergreifende Expression von Efflux-Transportern in der Evolution durchgesetzt hat. Ebenso ist die Beteiligung von ABC Transportern an der Pathogenese von einigen Erkrankungen wie z.B. cystischer Fibrose (CF) bekannt [Dean et al. (2001)]. Der Anteil von aromatischen im Vergleich zu nicht-aromatischen Aminosäuren ist bei ABC-Transportern gegenüber anderen Transport-Proteinen verhältnismäßig hoch [Bolhuis et al. (1997)]. Daher ist man zunächst davon ausgegangen, dass auch Substrate dieser Proteine aromatische Strukturen enthalten und sehr lipophil sein müssen. Dies konnte jedoch durch weitere Untersuchungen zur Substratspezifität zurückgewiesen werden [Bolhuis et al. (1997); Schinkel (1997)]. Neben P-gp finden sich an der Blut-Hirn Schranke noch weitere ABC-Transporter mit ähnlichen Funktionen. An der luminalen (apikalen) Membran sind, neben P-gp, das Multi-Drug-Resistance-Associated-Protein 2 (MRP2) und das Breast-Cancer-Resistance-Protein (BCRP) besonders stark exprimiert [Bauer et al. (2005); Breedveld et al. (2006)]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Transporter sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen können [Hoffmann und Löscher (2007)]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es zwischen den Transportern auch Substratüberschneidungen gibt. Dies konnte z.B. für BCRP und P-gp (s. Abb. 1.1.3) nachgewiesen werden [De Vries et al. (2007)]. Dies ist ein weiterer Beleg für die wichtige physiologische Bedeutung der ABC-Transporter.

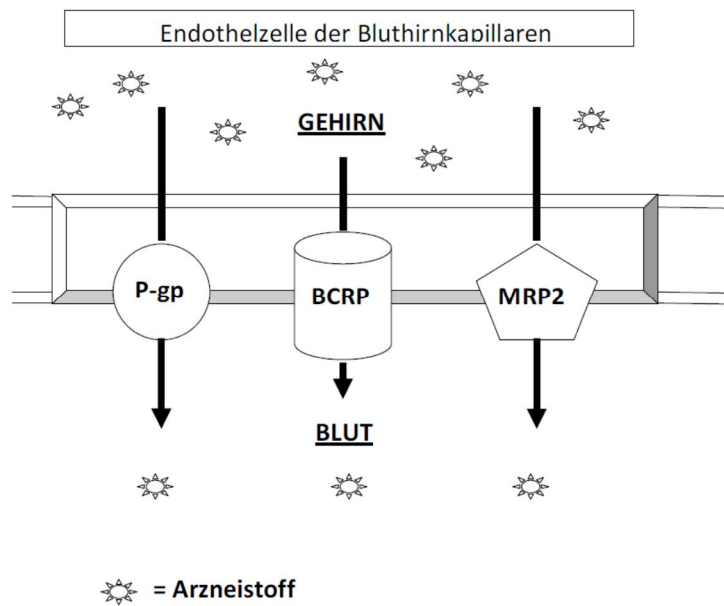


Abb. 1.1.3: Expression verschiedener Efflux-Transporter an der Blut-Hirn Schranke [modifiziert nach Bauer et al. (2005)]. Durch die Transporter der ATP-Binding-Cassette-Genfamilie (ABC-Transporter), wie z.B. P-Glykoprotein (P-gp), Breast-Cancer-Resistance-Protein (BCRP) und Multi-Drug-Resistance-Associated-Protein 2 (MRP2), können Substrate dieser Proteine, unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP), aktiv aus dem Hirngewebe zurück ins Blut transportiert werden (aktiver Efflux). Dies führt zu einer schnelleren Elimination aus dem Zielgewebe, die mit einer Verminderung der therapeutischen Wirksamkeit verbunden sein kann.

1.2 P-Glykoprotein (P-gp)

1.2.1 Bedeutung von P-gp in der Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS)

Der Efflux-Transporter P-gp ist der am längsten bekannte und am besten untersuchte ABC Transporter. Die Bedeutung von P-gp für verschiedene Erkrankungen und deren Behandlung ist bereits seit vielen Jahren bekannt. Die Molekülgröße von P-gp liegt bei 170 kDa mit einer Sequenz von 1230 Aminosäuren [Bendayan et al. (2006); Zhou (2008)]. Beim Mensch wird P-gp durch das MDR1 Gen codiert, während bei Nagern zwei Gene (mdr1a und mdr1b) die Expression dieses Transport-Proteins steuern [Lee und Bendayan (2004)]. Untersuchungen zur Bedeutung der unterschiedlichen Genexpression bei Nagern durch Analyse von mRNA haben ergeben, dass im Hirngewebe, insbesondere im Hippocampus, die Isoform mdr1b aktiv ist [Kwan et al. (2003)]. Dies

könnte möglicherweise auf eine besondere physiologische Funktion von P-gp im Gehirn beispielsweise bei Lernprozessen hinweisen. Es gibt auch Hinweise für eine pathophysiologische Bedeutung von P-gp bei Erkrankungen des ZNS. Erste molekulare Untersuchungen von P-gp als Membran-Transporter wurden in mutierten ovariellen Hamster-Zelllinien vorgenommen [Juliano und Ling (1976)]. Die Entwicklung einer Therapie-Resistenz unter Beteiligung von P-gp beschränkt sich heute nicht nur auf den Bereich der Chemotherapeutika wie Antibiotika oder Zytostatika sondern auch auf Arzneimittel aus anderen Wirkstoffklassen. Durch verstärkten Auswärtstransport kann die medikamentöse Behandlung verschiedener Erkrankungen abgeschwächt bis wirkungslos gemacht werden [Gottesman et al. (2002)]. Es wird diskutiert, dass P-gp assoziierte Veränderungen für die Pathogenese und Effektivität der Behandlung von Erkrankungen wie Epilepsie, Depression, Demenz vom Alzheimer Typ oder des Morbus Parkinson bedeutsam sind [Lee und Bendayan (2004)]. Während bei der Epilepsie und der Depression eher die pharmakokinetischen Interaktionen von P-gp mit Medikamenten an der Blut-Hirn Schranke im Vordergrund stehen, gibt es bei der Alzheimer Krankheit und dem Morbus Parkinson Hinweise einer Beteiligung von P-gp an der Progression bzw. sogar der Pathophysiologie der Erkrankungen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse gab es erste klinische Behandlungsversuche mit P-gp Inhibitoren zur Augmentierung bzw. Modulation. Jedoch mussten die meisten Studien auf Grund der Toxizität abgebrochen werden [Lee und Bendayan (2004)]. Die Toxizität beruhte offensichtlich nicht auf den toxischen Eigenschaften der Inhibitoren selbst. Vielmehr wurden der Ausfall des P-gp abhängigen Entgiftungsmechanismus und die damit einhergehende Akkumulation toxischer Stoffe für diese Effekte verantwortlich gemacht. Dies spricht dafür, dass P-gp von essenzieller physiologischer Bedeutung ist (s. Abb. 1.2.1). Für die pharmakologische Behandlung neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen wie Epilepsie, Depression und Schizophrenie werden pharmakokinetische Interaktionen an der Blut-Hirn Schranke angenommen. Mehrere Arbeiten lieferten Hinweise, dass eine Resistenz gegenüber der Behandlung mit Antipsychotika oder Antiepileptika mit veränderten P-gp Eigenschaften assoziiert sein könnten [Bebawy und Chetty (2008); Robey et al. (2008)]. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von P-gp in der Blut-Hirn Schranke und dem Therapieansprechen konnte sowohl für Antipsychotika als auch für Antidepressiva durch *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wahrscheinlich gemacht werden. Die Bedeutung von P-gp für die Wirkstoffkonzentration im Gehirn und die Charakterisierung von Substratspezifitäten von Antidepressiva ist von Uhr und Mitarbeitern mehrfach unter Verwendung eines P-gp knockout Mausmodells gezeigt worden [Uhr et al. (2000 und 2003); Uhr und Grauer (2003)]. Es zeigte sich, dass sowohl Substanzen aus der Gruppe der trizyklischen Antidepressiva wie beispielsweise Amitriptylin, als auch moderne und selektivere Antidepressiva wie Venlafaxin oder Citalopram Affinität zu P-gp zeigen können [Karlsson et al. (2010)]. Hier hat sich erneut bestätigt, dass es keine allgemein gültigen Regeln für P-gp Substrate gibt und Screening unumgänglich ist. Es

gibt in diesem Zusammenhang auch klinische Befunde, die zeigen konnten, dass das Ansprechen auf eine antidepressive Therapie mit genotypischen Veränderungen (Polymorphismen) von P-gp in Verbindung gebracht werden kann und daher möglicherweise eine Genotypisierung sinnvoll sein könnte, um die Effektivität einer pharmakologischen Therapie der Depression zu optimieren [Uhr et al. (2008)]. Für verschiedene Antipsychotika, unabhängig von der chemischen Struktur, konnte ebenfalls eine Affinität zu P-gp nachgewiesen werden [Abou El-Ela et al. (2004); Boulton et al. (2002); Doan et al. (2002); Doran et al. (2005); Kirschbaum et al. (2008)]. Dabei zeigte es sich, dass sowohl sehr lipophile Substanzen wie Olanzapin, Quetiapin oder Risperidon, als auch relativ hydrophile Substanzen wie Amisulprid P-gp abhängig transportiert werden können. Dadurch kann deren Penetration ins Hirngewebe limitiert werden und der therapeutische Effekt der Substanzen möglicherweise reduziert werden. *In vitro* Untersuchungen konnten auch zeigen, dass manche atypische Antipsychotika ein P-gp inhibitorisches Potential haben [Wang et al. (2006)]. Es gibt jedoch keine *in vivo* Studien, die dies bestätigen könnten. Ebenso muss man bei der Bewertung der Ergebnisse dieser Untersuchungen berücksichtigen, dass die gewählten Konzentrationen der eingesetzten Antipsychotika unphysiologisch hoch gewählt wurden. Dadurch wird eine Sättigung des Transporters P-gp wahrscheinlich. Bei *in vivo* Untersuchungen mit dem P-gp knockout Mausmodell zeigte sich, dass Risperidon und dessen aktiver Metabolit hoch affine Substrate von P-gp sind, während bei Haloperidol keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung im Hirngewebe zwischen Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout Mäusen zu beobachten waren [Doran et al. (2005); Kirschbaum et al. (2008)]. Daher eignen sich diese Substanzen gut für einen direkten Vergleich bei Untersuchungen zur Modulation von P-gp. Dadurch ist man in der Lage den Effekt der Modulation des Transporters von möglichen weiteren Effekten, z.B. im Bereich des metabolischen Stoffwechsels oder anderen Transportprozessen unterscheiden zu können.

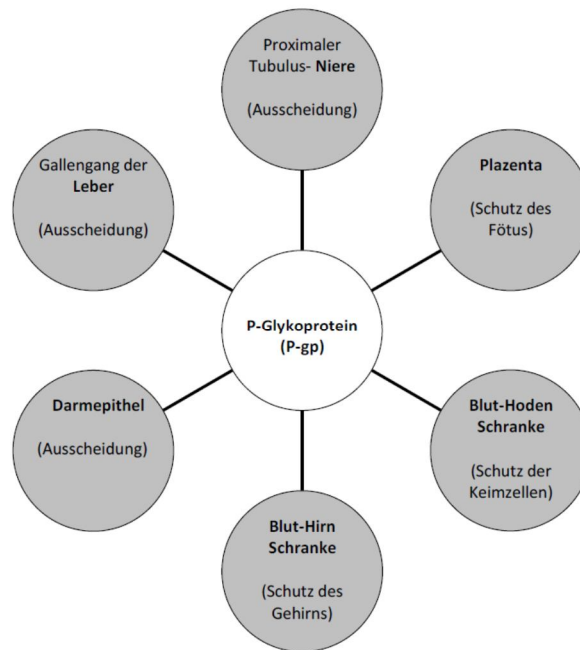


Abb. 1.2.1: Expression von P-gp an verschiedenen Blut-Gewebe Schranken und physiologischen Membranen und dessen Funktion bei physiologischen Prozessen [Nach Endres et al. (2006)].

1.2.2 Bedeutung von P-gp in der Behandlung von Therapie-resistenter Schizophrenie

Die Therapie-Resistenz bei der Schizophrenie stellt ein ernstzunehmendes Problem dar. Angaben und klinische Daten zur Prävalenz zeigen deutliche Schwankungen und werden mit einem Prozentsatz von bis zu 48 % angegeben [Bebawy et al. (2008)]. Die meisten Publikationen zu diesem Thema gehen jedoch von 20-30 % der Patienten aus, die nur partiell auf die pharmakologische Therapie mit Antipsychotika ansprechen und weiteren 7 %, bei denen unter der Therapie mit Antipsychotika kein Effekt zu beobachten ist [Schäfer et al. (2004)]. Zunächst wurde eine Definition der Therapie-Resistenz in der Behandlung der Schizophrenie von Kane et al. (1988) vorgenommen. Danach mussten mindestens zwei der 4 Positivsymptome der Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS) [Overall und Gorham (1962)], einer Methode für erfahrene Psychiater zur Beurteilung des klinischen Bildes eines Patienten und Diagnosestellung, vorhanden sein und eine bestimmte Schwere der Erkrankung musste vorliegen. Die Erkrankung musste für mindestens 5 Jahre ohne Phasen der Besserung bestehen und es mussten mindestens drei pharmakologische Behandlungsversuche mit Antipsychotika, früher auch als Neuroleptika bezeichnet, mit einer Dauer von mindestens 6 Wochen aus mindestens zwei verschiedenen Wirkstoffklassen in den letzten 5 Jahren der Erkrankung erfolgt

sein. Die Empfehlungen zur Behandlung der Therapie-Resistenz haben sich seitdem deutlich geändert. Die Entwicklung neuer Antipsychotika der zweiten Generation (z.B. Quetiapin, Risperidon, Olanzapin, Amisulprid, Ziprasidon oder Aripiprazol), den sog. atypischen Antipsychotika, hat zur Empfehlung von diesen Medikamenten als first-line Therapie geführt und daher die Grundlagen der Empfehlungen von Kane überholt. Die klassischen oder typischen Neuroleptika bzw. Antipsychotika haben deutlich an Bedeutung verloren, nicht zuletzt wegen der höheren Inzidenz von motorischen Nebenwirkungen. Die Inzidenz für motorische Nebenwirkungen war ein wesentlicher Grund für die Klassifizierung in typische und atypische Antipsychotika. Jedoch treten unter den Atypika andere Nebenwirkungen häufiger auf als unter Typika, z.B. starke Gewichtszunahme oder seltene Nebenwirkungen wie Agranulozytose [Benkert und Hippus (2007)]. Die Überlegenheit der Atypika gegenüber Typika konnte jedoch in der unabhängigen, doppel-blinden CATIE Studie mit mehr als 1400 Schizophrenie-Patienten nicht bestätigt werden [Liebermann et al. (2005)]. In dieser Studie fanden sich jedoch die meisten Studienabbrüche auf Grund von motorischen Nebenwirkungen in der Gruppe der mit Typika behandelten Patienten [Liebermann et al. (2005)]. In einer Meta-Analyse konnte gezeigt werden, dass unter Behandlung mit Atypika weniger Medikamente zur Behandlung von motorischen Nebenwirkungen verordnet werden als unter Behandlung mit Typika [Leucht et al. (1998)]. Insgesamt betrachtet ist bis heute die Stellung von Clozapin mit einer überlegenen Wirksamkeit für die Behandlung der Therapie-Resistenz bei der Schizophrenie geblieben und stellt eine Schnittmenge dar [Kane et al. (1988)]. Die heutigen Empfehlungen zum Vorgehen bei Therapie-resistenter Schizophrenie schließen vor allem die Behandlung bzw. den Switch zu Atypika ein, insbesondere zu Clozapin [Schäfer et al. (2004)]. Die Gründe für das Auftreten einer Therapie-resistenten Schizophrenie sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt lediglich Hypothesen zu Faktoren, die an der Entwicklung einer Resistenz beteiligt sein können. Bei der Therapie mit Atypika, insbesondere solchen, die P-gp Substrate sind wie Olanzapin, Risperidon oder auch Clozapin, können genetische Polymorphismen, die die Expression und Aktivität des Transportproteins verändern, an der Ätiologie einer Therapie-Resistenz beteiligt sein [Bozina et al. (2006); Gunes et al. (2008); Jaquenoud Sirot et al. (2009)]. Dies könnte beispielsweise zu einem verstärkten Efflux an der Blut-Hirn Schranke führen, der die Wirksamkeit der eingesetzten Medikamente abschwächen könnte (s. Abb 1.2.2). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass viele Substrate von P-gp auch oftmals Substrate des Arzneimittel-metabolisierenden Leberenzym CYP3A4 sind [Pal und Mitra (2006)]. Dabei scheint es offensichtlich eine genetische Kopplung der Expression von P-gp und CYP3A4 zu geben, die physiologisch von Bedeutung ist. Durch die Metabolisierung der Phasen I und II werden besser wasserlösliche Metabolite gebildet, die durch P-gp abhängigen Transport (auch als Phase III bezeichnet) in Leber und Niere schneller ausgeschieden werden können. Daher interagieren Induktoren und Inhibitoren von CYP3A4 auch häufig mit P-gp abhängigen Transportprozessen [Pal

und Mitra (2006)]. Interaktionen zwischen Psychopharmaka, P-gp und einer CYP-Modulation sind nicht selten. Das Wissen über ein mögliches Interaktionspotential ist wichtig, da es viele Hinweise in der Literatur gibt, die belegen, dass eine Modulation von P-gp mit einer Modulation von Cytochrom Enzymen, insbesondere CYP3A4, die eine wesentliche Rolle bei der Metabolisierung spielen, einhergeht [Kivistö et al. (2004); Pal und Mitra (2006)]. Dies hängt vor allen Dingen damit zusammen, dass sowohl die Regulation von P-gp als auch das für die Biotransformation von Arzneistoffen wichtige CYP3A4 u.a. über die Transkriptionsfaktoren Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und Constitutive-Androstane-Rezeptor (CAR) gesteuert wird [Urquhart et al. (2007)]. Dies scheint von großer physiologischer Bedeutung zu sein, wie von van Waterschoot et al. (2009) gezeigt. Durch einen dualen knockout von P-gp und CYP3A bei Mäusen wurde die Toxizität von Docetaxel überproportional gesteigert, stärker als durch den jeweiligen knockout allein. Somit können bei Substanzen, die Substrate von P-gp und z.B. CYP3A4 sind, pharmakokinetische Interaktionen von großer Bedeutung sein. Aus den genannten Gründen können auch pharmakogenetische Analysen zur Bestimmung von Polymorphismen von P-gp und CYP Enzymen im klinischen Alltag durchaus nützlich sein. In Verbindung mit dem Therapeutischen Drug Monitoring (TDM) von Psychopharmaka kann somit eine Individualisierung des Patienten erfolgen, die den Verlauf der pharmakologischen Therapie begleiten, die Wirksamkeit und das Ansprechen auf die Medikamente verbessern und Interaktionen vermeiden helfen kann [Härtter und Hiemke (2002 und 2003); Kootstra-Ros et al. (2006)].

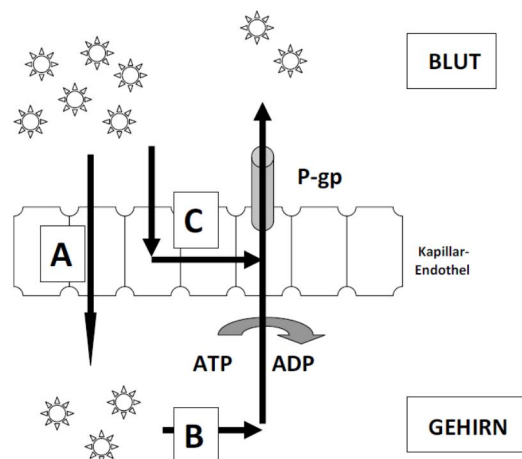


Abb. 1.2.2: Funktion von P-gp an der Blut-Hirn Schranke. Ein Pharmakon kann durch passive Diffusion aus dem Blut ins Gehirn penetrieren [A]. Bei diesem Transport durch die Endothelzellen können durch das an der apikalen Membran exprimierte P-gp Substrate dieses Transporters bereits in der Zellmembran von P-gp abgefangen und zurück ins Blut befördert werden [C] oder nach Penetration ins Hirngewebe, durch konzentrationsabhängige Diffusion zurück in die Endothelzellen, durch P-gp aus dem Hirngewebe heraustransportiert werden [B].

1.2.3 Bedeutung von P-gp in der Pathogenese und neuer Ansätze zur Therapie der Alzheimer Krankheit

Beim Morbus Alzheimer spielen extrazelluläre Protein-Ablagerungen in Form von Amyloid-Plaques und intrazelluläre Tangles in der Pathologie der Erkrankung eine wichtige Rolle [Hardy et al. (1998)]. Es ist aber bislang noch nicht geklärt, ob diese ursächlich an der Erkrankung beteiligt sind oder Folge der Alzheimer Krankheit sind. Insbesondere die genaue Ursache der Neurotoxizität und der damit verbundenen Atrophie des Hirngewebes ist bislang unklar [Hardy et al. (1998)]. Seit längerem wird ein Zusammenhang zwischen den Amyloid-Ablagerungen und dem Efflux-Transporter P-gp diskutiert. *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass P-gp Inhibitoren den Transport von den Amyloid-Proteinen A β 40 und A β 42 einschränken konnten und somit die Ablagerung dieser Proteine im Hirngewebe verstärken [Kuhnke et al. (2007)]. Es konnte in einer weiteren Untersuchung gezeigt werden, dass beide Peptide mit P-gp interagieren und eine Hemmung von P-gp zu einer reduzierten A β Sekretion führt [Lam et al. (2001)]. Dies wurde in einem Alzheimer Mausmodell bestätigt, bei dem eine P-gp Defizienz zu einer gesteigerten Plaque-Menge im Hirngewebe führte [Cirrito et al. (2005)]. Dadurch wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine verringerte Amyloid-Clearance an der Blut-Hirn Schranke zu einer verstärkten Oligomerisierung von A β 40-42 zu Plaques führt. Dadurch scheint der P-gp abhängige Transport ein mögliches Target für die Behandlung der Alzheimer Krankheit darzustellen. Diese Ergebnisse konnten kürzlich noch einmal von Hartz und Mitarbeitern (2010) bestätigt werden. Sie konnten, unter Verwendung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) über-exprimierenden Mausstammes (Tg2576) belegen, dass eine P-gp Induktion mit 3-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) die Amyloid-Ablagerungen und die A β Menge im Gehirn dieser Mäuse verringern. Somit könnte eine frühzeitige Aktivierung des P-gp abhängigen Transportes an der Blut-Hirn Schranke zu einer Reduzierung der pathologischen Protein-Ablagerungen im Gehirn führen. Daher ist bei der Behandlung der Alzheimer Krankheit die Modulation der P-gp Funktion bzw. Expression ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Therapien. Neben P-gp wird auch eine Beeinflussung der Amyloid-Prozessierung immer wieder diskutiert. Insbesondere die pharmakologische Aktivierung des Enzyms ADAM10 (A Disintegrin And Metalloproteinase 10), ein Enzym, das die Bildung von neurotoxischen Amyloid-Plaques reduzieren bzw. verhindern kann, scheint erfolgversprechend zu sein. ADAM10 scheint eine weitere therapeutische Zielstruktur für eine zukünftige Beeinflussung der Alzheimer Krankheit zu sein. *In vitro* Untersuchungen konnten belegen, dass ADAM10 α -Sekretase Aktivität zeigt und die Amyloid-Clearance steigern kann [Lammich et al. (1999)]. Eine α -Sekretase Inhibition durch eine dominant-negative Form von ADAM10 führte zu einer Steigerung der Plaque Ablagerungen [Schroeder et al. (2009)]. Es konnte

gezeigt werden, dass ADAM10 die klinisch relevante physiologische Form der α -Sekretase ist und eine Reduktion der ADAM10 Aktivität, im Gegensatz zu anderen Enzymen, wie ADAM9 oder ADAM17, zu einer gesteigerten Amyloid-Ablagerung führt [Kuhn et al. (2010)]. Die α -Sekretase ADAM10 ist ein Enzym, das die Amyloid-Prozessierung zu nicht-amyloidogenen und neuroprotektiven Abbauprodukten wie APP α forciert [Kojro et al. (2001); Bandyopadhyay et al. (2006); Tippmann et al. (2009)]. Die Funktion von ADAM10 ist essenziell für die Entwicklung des zentralen Nervensystems. Eine ADAM10-Defizienz führt zu schweren Entwicklungsstörungen von Embryonen bei Mäusen mit einer sehr frühen pränatalen Letalität [Hartmann et al. (2002)]. Somit sind sowohl Modulatoren von P-gp als auch von ADAM10 mögliche neue Targets in der Behandlung der Alzheimer Krankheit. Die Ergebnisse einer klinischen Studie haben gezeigt, dass ADAM10 im Blut und Liquor bei Alzheimer Patienten reduziert ist und auch die APP α Sekretion deutlich gegenüber gesunden Kontrollen verringert ist [Colciaghi et al. (2002)]. Dies macht die klinische Relevanz und Bedeutung von ADAM10 deutlich. Neben Polyphenolen, die antioxidativ und neuroprotektiv wirken können und auch Transporter-modulierende Eigenschaften zeigen [Ono et al. (2003); Obregon et al. (2006); Heo und Lee (2004)], könnte die pharmakologische Stimulierung der ADAM10 Aktivität an Bedeutung gewinnen. Das eine mögliche klinische Relevanz der Modulation von ADAM10 besteht, konnte bereits durch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden. Durch eine ADAM10 Überexpression konnten die bei einem APP-überexprimierenden Mausstamm deutlich vermehrt auftretenden Amyloid-Plaques sichtbar reduziert bzw. nahezu verhindert werden, während durch eine Überexpression einer inaktiven Form von ADAM10 und eine damit verbundene Hemmung der endogenen ADAM10 Aktivität, eine Zunahme von Amyloid Plaques beobachtet werden konnte [Postina et al. (2004); Fahrenholz und Postina (2006)]. Die Arbeitsgruppe von Fahrenholz charakterisierte auch den ADAM10 Promoter und zeigte dabei, dass das synthetische Retinoid Acitretin den ADAM10 Promotor aktiviert und zu einer Zunahme der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung führt [Tippmann et al. (2009)]. Die Modulation des Retinsäure-Rezeptors (RAR) spielt demnach bei der Regulation der ADAM10 Aktivität eine besondere Rolle. Retinoide scheinen eine klinisch relevante Möglichkeit zur Aktivierung von ADAM10 in der Therapie der Alzheimer Krankheit zu spielen [Shudo et al. (2009); Fahrenholz et al. (2010); Fahrenholz (2010)]. Es konnte gezeigt werden, dass das Retinoid Acitretin die all-trans Retinsäure (at-RA) von einem zytosolischen Bindungsprotein verdrängt und zu einer Aktivierung des RAR führt, die für die Aktivierung von ADAM10 wichtig zu sein scheint [Armstrong et al. (2005)]. Die Fähigkeit des aktivierten RAR, Heterodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren wie PXR, CAR oder dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR) zu bilden zeigt, welches große therapeutische Potential sich daraus ergibt [Tippmann et al. (2009)]. Schmitt und Mitarbeiter (2006) konnten bereits belegen, dass mit einer Überexpression von ADAM10 eine Veränderung der Verhaltensmuster von Mäusen verbunden ist. Die ADAM10 Expression konnte

in der Morris Water Maze mit dem Lernverhaltens in Verbindung gebracht werden [Postina et al. (2004); Schröder et al. (2009)]. Die ist ein erster Hinweis für die therapeutische Anwendung von Retinoiden als ADAM10-Aktivatoren bei der Alzheimer Krankheit und der Behandlung der damit verbundenen kognitiven Defizite. Ein Zusammenhang mit der P-gp bzw. der CYP Expression, vermittelt durch die Transkriptionsfaktoren PXR oder CAR, ist daher nicht ausgeschlossen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass manche Retinoide Substrate von P-gp sind und eine Induktion von CYP-Enzymen und P-gp ein möglicher Grund für eine Retinoid- Resistenz bei Leukämie-Zelllinien sein kann [Kizaki et al. (1996)]. Es ist jedoch noch nicht einheitlich geklärt, ob das synthetische Retinoid Acitretin ein Substrat von P-gp ist und ob dies möglicherweise einen Einfluss auf die therapeutische Nutzbarkeit dieses Wirkstoffes hat. Eine Kombination aus *in silico* und *in vitro* Verfahren zur Bestimmung der P-gp Affinität von verschiedenen Xenobiotika belegt eine Interaktion von Retinoiden mit P-gp [Chang et al. (2006)]. Acitretin war ebenfalls in dieser Arbeit eingeschlossen und zeigte, im Gegensatz zu anderen Retinoiden wie Retinsäure und Retinol, kein P-gp induzierendes Potential. Dennoch fehlen bislang wichtige *in vivo* Untersuchungen zu diesen Daten. Auch das Interaktionspotential mit CYP-Enzymen, insbesondere in den Hepatozyten, aber auch in anderen peripheren Geweben, ist in der Literatur noch uneinheitlich. Während manche Arbeitsgruppen zu dem Ergebnis kommen, dass Acitretin keinen Einfluss auf die CYP-Aktivität hat [Small und McNamara (1994)], konnten andere Studien mit *in vitro* Versuchen eine Induktion, insbesondere des wichtigen CYP3A4 und des entsprechenden Enzyms in Hepatozyten von Nagern (CYP3A11) [Martignoni et al. (2006)], durch eine Aktivierung des Retinoid-X-Rezeptors (RXR) durch verschiedene Retinoide zeigen. Dadurch besteht ein mögliches Interaktionspotential in Bezug auf Metabolismus und Verteilung von anderen Pharmaka [Wang et al. (2008)]. Acitretin war jedoch nicht Teil dieser Arbeit, so dass weitere Untersuchungen folgen müssen, um zu klären ob und in welchem Maße Acitretin oder andere Retinoide an pharmakokinetischen Interaktionen beteiligt sein können. Dies ist insbesondere für die Arzneimittelsicherheit bei klinischen Studien von großer Bedeutung. Es konnte darüber hinaus sowohl im Tierversuch [Silverberg et al. (2010)], als auch in klinischen Untersuchungen [Bartels et al. (2009)] gezeigt werden, dass die Expression von P-gp mit steigendem Alter abnimmt und somit auch der A β Transport reduziert sein könnte. Es besteht auch ein Zusammenhang zwischen der Expression von P-gp im Hirngewebe und der gemessenen A β Last, die die Bedeutung der P-gp abhängigen Amyloid-Clearance bekräftigt [Vogelgesang et al. (2004)]. Es konnte bislang jedoch noch kein Zusammenhang zwischen P-gp Polymorphismen und dem Auftreten von dementiellen Erkrankungen oder dem Risiko für die Alzheimer Krankheit festgestellt werden [Frankfort et al. (2006)].

1.2.4 Modulation von P-gp und die Bedeutung für pharmakokinetische und pharmakodynamische Effekte von Psychopharmaka

Eine der ersten Untersuchungen zur therapeutisch nutzbaren Modulation von P-gp stammt von Tsuruo und Mitarbeitern (1981). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass durch die Koapplikation des Calciumkanalblockers Verapamil, einem P-gp Inhibitor, die Toxizität von Vinblastin und Vincristin in einer Chemotherapie-resistenten Leukämie-Zelllinie erhöht und somit die Multi-Drug-Resistenz (MDR) aufgehoben werden kann. Die dominierende Rolle von P-gp an der Blut-Hirn Schranke führte dazu, dass insbesondere nach weiteren Wegen zur Modulation dieses Transporters gesucht wurde [Fromm (2004)]. Für die Regulation der P-gp Expression ist hauptsächlich der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und dessen Aktivierung verantwortlich [Bauer et al. (2005)]. Nach der Entdeckung dieses nuklearen Transkriptionsfaktors konnten Substanzen ermittelt werden, die eine gezielte Expressionskontrolle ermöglichen sollten. Eine der ersten Beschreibungen des PXR erfolgte von Kliewer et al. (1998), die mit ihrer Arbeit zeigen konnten, dass bei der Regulation von metabolischen Prozessen ein Transkriptionsfaktor beteiligt ist, der von verschiedenen endogenen Steroid-Hormonen, aber auch von synthetisch hergestellten Steroiden aktiviert bzw. moduliert werden kann [Kliewer et al. (1998)]. Die Ergebnisse, dass Steroide nicht nur an der Aktivitätskontrolle von PXR beteiligt sind, sondern sogar durch diesen molekularen Mechanismus ihre eigene Synthese und Wirkung steuern konnten, war ein neuer Ansatzpunkt zur therapeutischen Nutzung der Expressionskontrolle durch Transkriptionsfaktoren. Als therapeutisch verwendete Aktivatoren von PXR konnten u.a. Rifampicin, Dexamethason und Johanniskrautextrakt identifiziert werden [Weber et al. (2004); Kageyama et al. (2005)]. In weiteren Untersuchungen von Kliewer et al. (2002) wurde die Struktur von PXR und die damit verbundenen spezieabhängigen Wirkungen untersucht. Nukleare Transkriptionsfaktoren bestehen u.a. aus zwei besonders wichtigen Bereichen, der DNA-Bindungsdomäne und der Ligand-Bindungsdomäne. Die DNA-Bindungsdomäne bewirkt, dass der aktivierte Transkriptionsfaktor an den entsprechenden Promoter der DNA binden kann. Die Ligand-Bindungsdomäne ist wichtig für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch endogene oder körperfremde Substanzen, um eine Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern zu ermöglichen. Darüber hinaus konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass es bedeutende Unterschiede bei der Struktur und der damit verbundenen pharmakologischen Modulation von PXR zwischen verschiedenen Spezien gibt. Während die DNA-Bindungsdomäne zwischen Mensch und Nagern 96 % genetische Übereinstimmung zeigt, liegt diese bei der Ligand Bindungsdomäne nur bei 76-77 % Übereinstimmung [Kliewer et al. (2002)]. Dies macht deutlich, dass zur Aktivierung von PXR bei verschiedenen Spezien auch unterschiedliche Modulatoren eingesetzt werden müssen. Während z.B.

Rifampicin und verschiedene Antiepileptika nur die Funktion des humanen PXR modulieren können, wirkt das synthetische Steroid 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) nur bei Nagern PXR-aktivierend. Dexamethason dagegen zeigt sowohl bei Nagern als auch beim Mensch eine hohe Affinität zur Ligand-Bindungsdomäne von PXR. Daher sind insbesondere Dexamethason und PCN für tierexperimentelle Untersuchungen in Nagern gut geeignet und finden häufig Verwendung [Bauer et al. (2004)]. Beim Johanniskrautextrakt wurde u.a. Quercetin, ein in Früchten und anderen Nahrungsmitteln weit verbreitetes Flavonoid, als P-gp Modulator identifiziert [Weber et al. (2004)]. Diese Substanz ist insbesondere deshalb interessant, da *in vivo* Untersuchungen gezeigt haben, dass Quercetin dosisabhängige Effekte zeigt. In niedrigen Dosen wirkt Quercetin als P-gp Induktor und in höheren Dosen als P-gp Inhibitor [Mitsunaga et al. (2000)]. Neben PXR sind auch noch weitere nukleare Transkriptionsfaktoren, wie der Constitutive-Androstan-Rezeptor (CAR) oder der Glukokortikoid-Rezeptor (GR) an der Regulation der P-gp Expression beteiligt [Miller (2010)]. Durch PXR und CAR, z.T. auch über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR), werden sowohl eine Vielzahl an Phase I Enzymen, z.B. der CYP-Familie, die für die Biotransformation von besonderer Bedeutung sind, und auch Phase II Enzymen, die an der Konjugation, dem entero-hepatischen Kreislauf und der Ausscheidung von endogenen und xenobiotischen Substanzen verantwortlich sind, als auch die Expression von Transport-Proteinen (auch als Phase III Transporter benannt), wie P-gp, reguliert [Köhle und Bock (2009)]. Dies macht deutlich, dass es mehrere Möglichkeiten zur Beeinflussung der Expression und Aktivität von P-gp und anderen ABC-Transportern gibt. Man muss auf der anderen Seite bedenken, dass die komplexe Regulation über nukleare Transkriptionsfaktoren ein erhebliches Interaktionspotential darstellt. Dies könnte insbesondere bei multimorbiden bzw. älteren Patienten, bei denen häufig eine Polymedikation zur Behandlung mehrerer verschiedener Erkrankungen notwendig ist, eintreten. Die Möglichkeit zur Modulation der P-gp Expression und Aktivität bietet daher Möglichkeiten für gezielte Interventionen. Ebenso können genetische Polymorphismen die Aktivität von P-gp beeinflussen und modulieren [Hoffmeyer et al. (1999)]. Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammenhänge zwischen genetischen Polymorphismen, der Aktivität von P-gp und dem Ansprechen bzw. der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen klinisch relevant sein können [Eichelbaum et al. (2004)]. Für psychiatrische Erkrankungen konnte insbesondere für die pharmakologische Therapie der Depression gezeigt werden, dass genetische Polymorphismen im Bereich P-gp klinische Relevanz haben können und der Erfolg einer antidepressiven Therapie von der Aktivität von P-gp beeinflusst werden kann [Uhr et al. (2008)]. Die Ergebnisse dieser Studie sind erste Hinweise, dass Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke und die damit verbundenen pharmakokinetischen Interaktionen mit Pharmaka den pharmakodynamischen Effekt von Psychopharmaka beeinträchtigen können. Ähnliche Befunde gibt es auch für die Antipsychotika Risperidon und Clozapin. In einer italienischen Studie konnte gezeigt werden, dass durch P-gp

Polymorphismen Plasmaspiegel von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon reduziert werden konnten [Gunes et al. (2008)]. Leider fehlen in dieser Arbeit Angaben zu Veränderungen der Nebenwirkungen oder des klinischen Effektes bei den behandelten Patienten, so dass man nicht beurteilen kann, ob die genetischen Variationen auch klinisch relevant sind. Gleiches gilt für eine Studie zur Abhängigkeit von Clozapin und Nor-Clozapin Plasmaspiegeln und dem P-gp Genotyp [Jaquenoud Sirot et al. (2009)]. Ein bestimmter Haplotyp zeigte 1.6-fach höhere Clozapin-Spiegel im Vergleich zu anderen genetischen Variationen. Aber auch hier gibt es keine Angaben zum klinischen Effekt. Diese Beispiele machen deutlich, dass insbesondere für die pharmakodynamischen Konsequenzen einer genetisch bedingten oder pharmakologisch verursachten P-gp Modulation Daten fehlen und die klinische Relevanz von P-gp für psychiatrische Erkrankungen noch viele Fragen offen lässt. Für die Untersuchung pharmakodynamischer Effekte eignen sich knockout Mausmutanten, die kein funktionales P-gp besitzen besser als *in vitro* Modelle, da ein *in vivo* Modell die physiologischen Bedingungen eher abbilden als Zellkulturen [Schinkel et al. (1997)]. Mäuse haben im Gegensatz zum Menschen zwei verschiedene Gene, die für zwei P-gp Varianten (mdr 1a und mdr 1b) codieren [Schinkel et al. (1997)]. Dies ist besonders interessant, da die Isoform mdr1a nahezu im gesamten Hirngewebe gleich stark exprimiert wird, während mdr1b hauptsächlich im Hippocampus vorkommt [Kwan et al. (2003)]. Dies deutet auf verschiedene Funktionen der P-gp Proteine hin. Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen der Expression von P-gp im Hippocampus und dem Einfluss der pharmakologischen Therapie der Schizophrenie auf kognitive Defizite. Kognitive Defizite gehören zu den Symptomen einer Schizophrenie und sind damit für die pharmakologische Therapie dieser Erkrankung interessant [Tuulio-Henricksson et al. (2004); Galderisi et al. (2009); Rajji TK et al. (2009); Kalkstein et al. (2010)]. Es gibt Daten die eine Überlegenheit von atypischen Antipsychotika gegenüber z.B. Haloperidol in Bezug auf Negativsymptome der Schizophrenie, wie Antriebslosigkeit oder depressive Verstimmung, zeigen konnten [Tollefson und Sanger (1997)], jedoch konnte insbesondere die positive Veränderung von kognitiven Leistungen bislang nicht hinreichend belegt werden [Keefe et al. (1999)]. Darüber hinaus fehlen Daten, die eine Beteiligung von P-gp belegen. Die Bedeutung der P-gp Varianten für die pharmakodynamischen Wirkungen ist bislang nicht ausreichend untersucht. Da im Rahmen dieser Arbeit die Modulation von P-gp untersucht werden sollte eignet sich die Verwendung des P-gp knockout Mausmodells nicht. Daher wurden in dieser Arbeit hauptsächlich FVB/N Wildtyp Mäuse mit funktionalem P-gp verwendet. Lediglich für die Untersuchungen zum P-gp abhängigen Transport von Acitretin wurde die Verteilung von Acitretin im Gehirn und Serum von P-gp doppel knockout Mäusen, bei denen beide Proteine inaktiv sind (mdr1a/1b -/-; FVB/N Hintergrund) mit dem Wildtyp verglichen. Dies stellt ein valides Modell zur Bestimmung der Bedeutung von P-gp im Bereich der Verteilung von Psychopharmaka dar [Uhr et al. (2000; 2003); Doran et al. (2005)]. Auch für Untersuchungen zur Bedeutung von P-gp in Bezug auf

pharmakodynamische Effekte von Psychopharmaka eignet sich das *in vivo* Mausmodell gut. Es konnte gezeigt werden, dass unter Behandlung mit Risperidon eine Beeinträchtigung der motorischen Fähigkeiten, die vergleichbar mit den unter Antipsychotika-Therapie auftretenden extrapyramidal-motorischen Symptomen (EPMS) bei Patienten in der Klinik sind, bei P-gp knockout Mäusen bereits unter weitaus geringeren Dosen auftreten als beim Wildtyp [Kirschbaum et al. (2008)]. In dieser Arbeit wurde das sog. RotaRod verwendet, mit dessen Hilfe man verschiedene Einflüsse auf die motorischen Fähigkeiten von Nagern messen kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe des RotaRod nachgewiesen werden, wie sich die Modulation von P-gp auf die motorischen Nebenwirkungen auswirkt. Dies ist wichtig, um einen Wirkungsverlust der Antipsychotika nach erfolgter P-gp Induktion nachzuweisen, und sollte dazu beitragen einen Bezug zwischen einer pharmakokinetischen Interaktion mit P-gp und dessen Einfluss auf die Pharmakodynamik herzustellen. Wie zuvor erwähnt sind neben motorischen Nebenwirkungen auch kognitive Defizite, die möglicherweise durch Antipsychotika beeinflusst werden können, therapeutisch interessant [McGurk et al. (2004); Tuulio-Henricksson et al. 2004)]. Daher sollten in dieser Arbeit auch Effekte einer P-gp Modulation auf die Kognition untersucht werden. Für den Tierversuch eignen sich sowohl die Morris Water Maze [Morris (1984)], als auch die Barnes Maze [Barnes (1979)] für Untersuchungen des räumlichen Lernens bei Nagern. Während in der Water Maze das Verhalten von Nagern, Wasser zu meiden im Vordergrund steht, wird bei der „trockenen“ Barnes Maze das Fluchtverhalten von Nagern auf freien Flächen genutzt. In dieser Arbeit wurde die Barnes Maze verwendet, um festzustellen, ob es Unterschiede in Bezug auf die Beeinträchtigung der Kognition zwischen typischen Antipsychotika (Haloperidol) und atypischen Antipsychotika (Risperidon) gibt. Es gibt Befunde, die im Tierversuch zeigen konnten, dass Atypika kognitive Defizite in einem Schizophrenie-Mausmodell reduzieren konnten und somit ein möglichen Vorteil bei der Behandlung von kognitiven Defiziten bei Schizophrenie Patienten sein könnten [Mutlu et al. (2011)]. Während in einer Meta-Analyse gezeigt werden konnte, dass Atypika in Bezug auf die kognitive Funktion Typika überlegen sind [Woodward et al. (2005)], konnte in einer klinischen Studie mit einer kleinen Probandenzahl jedoch kein Vorteil einer Langzeittherapie mit atypischen Antipsychotika gegenüber konventionellen Antipsychotika beobachtet werden [Selva-Vera et al. (2010)]. Der Nutzen von Atypika und insbesondere der Unterschied zwischen verschiedenen Atypika im Bereich der Behandlung von kognitiven Defiziten blieb bislang unklar [van Veelen NM et al. (2010)]. In einer *in vivo* Untersuchung mit Ratten konnte bereits gezeigt werden, dass eine Langzeitbehandlung mit Haloperidol im Gegensatz zu einer Risperidon-Behandlung das räumliche Lernen, möglicherweise durch neurotoxische Effekte von Haloperidol, beeinträchtigt [Terry et al. (2003)]. Dies macht deutlich, dass es bislang noch nicht einheitlich gelungen ist, die Effekte von Typika und Atypika auf die kognitive Funktion zu beschreiben. Daher sollte dies ein Teil der eigenen pharmakodynamischen

Untersuchungen sein. Zum anderen sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob sich eine Modulation von P-gp auf die Effekte von Haloperidol und Risperidon in Bezug auf das räumliche Lernen von Mäusen auswirkt. Am Beispiel von Haloperidol (kein P-gp Substrat) und Risperidon (P-gp Substrat) sollte dies *in vivo* unter Verwendung der Barnes Maze untersucht werden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Modulation von metabolischen Prozessen und Transport-abhängigen Verteilungsmechanismen an der Blut-Hirn Schranke kann erhebliche Auswirkungen auf die pharmakologische Therapie von Erkrankungen des ZNS haben. Dies ist für Arzneimittelwechselwirkungen auf der Ebene des Cytochrom P450-Systems vielfach belegt. Das Verständnis pharmakokinetischer Wechselwirkungen ist wichtig für eine möglichst effektive und sichere Psychopharmakotherapie. In den letzten Jahrzehnten hat sich das Wissen über den Einfluss von ABC-Transportern an der Blut-Hirn Schranke, insbesondere von P-gp, auf die Verteilung und Pharmakokinetik von Arzneistoffen erweitert. Ziel dieser Arbeit am Tiermodell der Maus war die Untersuchung und Analyse einer P-gp Modulation und dessen Einfluss auf die Wirksamkeit von Antipsychotika, die Substrate von P-gp sind.

Folgende Hypothesen wurden geprüft:

- 1.) Eine Induktion des Efflux-Transporters P-gp führt zu einer Reduktion der Hirn-/ Serumspiegel des P-gp Substrates Risperidon bei Wildtyp Mäusen.
- 2.) Die Veränderung der Verteilung von Risperidon hat pharmakodynamische Konsequenzen.

Es wurde auf Basis bestehender Daten davon ausgegangen, dass die Verteilung von Risperidon durch eine P-gp Induktion beeinflusst wird. Als Folge kann mit reduzierten Hirn-/ und Serumspiegeln gerechnet werden. Am Beispiel von Risperidon und seines aktiven Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon, zwei hoch affinen Substraten von P-gp, sollte der Einfluss verschiedener P-gp Modulatoren untersucht werden. Risperidon und sein aktiver Metabolit dienten dabei als Modellsubstrate, um zu belegen, dass eine Modulation der P-gp Aktivität zu einer veränderten Verteilung der Antipsychotika führt. Es konnte bereits belegt werden, dass verschiedene Antipsychotika, insbesondere aus der Gruppe der atypischen Antipsychotika, Substrate von P-gp sind. Somit ist ein mögliches Interaktionspotential mit der Modulation von P-gp gegeben. Da modulierende Effekte, wie eine Induktion oder Hemmung von P-gp der klinischen Situation näher kommen als eine P-gp Defizienz, wurde geplant, den Einfluss einer P-gp Induktion zu untersuchen. Durch eine Induktion von P-gp an

der Blut-Hirn Schranke sollten die Konzentrationen der Antipsychotika im Hirngewebe reduziert werden, wenn es sich um Substrate von P-gp handelt. Dadurch kann die Wirksamkeit der Medikamente abgeschwächt werden. Da eine Induktion von P-gp nicht selektiv an der Blut-Hirn Schranke stattfindet, wurde gleichzeitig mit einer Zunahme der P-gp Expression in peripheren Geweben wie z.B. in der Niere oder der Leber gerechnet, die einen zusätzlichen Effekt auf die Pharmakokinetik der Substanzen haben könnte. Im ersten Schritt der Arbeiten wurden Effekte der bekannten P-gp Modulatoren Dexamethason, Rifampicin, PCN und Quercetin untersucht. Für die meisten dieser Substanzen sind hauptsächlich P-gp induzierende Effekte nachgewiesen. Für Quercetin gibt es jedoch auch Hinweise zu einer dosisabhängigen Inhibition von P-gp. Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen dienten zur Identifizierung von P-gp Modulatoren. Die potentesten Modulatoren wurden dann für die weiteren Untersuchungen verwendet. Dafür wurden Hirngewebe- und Serumkonzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon nach Behandlung mit den P-gp Modulatoren analysiert und mit einer Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung mit diesen Substanzen verglichen. Anschließend wurden die zwei stärksten P-gp Modulatoren des Vorversuches erneut miteinander verglichen. Bei dieser Arbeit wurden die Effekte auf die Verteilung von Risperidon und seines aktiven Metaboliten als P-gp Substrate mit den Effekten auf die Verteilung von Haloperidol, eines P-gp Nichtsubstrates, verglichen. Damit wurden andere Wirkungen der P-gp Modulatoren, die nicht direkt mit dem P-gp abhängigen Transport in Verbindung stehen, identifiziert.

Im nächsten Schritt wurden die möglichen pharmakodynamischen Konsequenzen der P-gp Modulation getestet. Es gibt viele Arbeiten zu Veränderungen der Pharmakokinetik von Arzneistoffen durch P-gp Modulation. Daten zur klinischen Relevanz dieser Daten bzw. zum Einfluss dieser Ergebnisse auf pharmakologische Effekte sind jedoch selten. Desweiteren wurden die pharmakodynamischen Effekte der zwei stärksten P-gp Modulatoren getestet. Dabei wurden zunächst Wirkungen auf die Motorik unter Verwendung des RotaRod Testsystemes untersucht. Es wurde angenommen, dass durch eine P-gp abhängige Reduzierung der Hirnkonzentrationen von Antipsychotika mit einer Reduzierung der motorischen Nebenwirkungen, die über Dopamin-antagonistische Wirkungen der Antipsychotika vermittelt werden, zu rechnen ist. Bei diesen Untersuchungen wurden wiederum die Wirkungen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon mit den Wirkungen von Haloperidol verglichen. Im zweiten Teil der pharmakodynamischen Untersuchungen sollte untersucht werden, ob eine P-gp Modulation Einfluss auf kognitive Effekte von Antipsychotika hat. Kognitive Einschränkungen durch die Verwendung von Antipsychotika sind für betroffene Patienten mit einer großen Belastung verbunden, da sie die Alltagskompetenzen zusätzlich einschränken. Als einen therapeutischen Vorteil der Gruppe der atypischen Antipsychotika gegenüber älteren Medikamenten gilt eine Verbesserung der Negativsymptomatik, zu denen kognitive Defizite zählen. Es fehlen jedoch bislang aussagekräftige Daten hierzu. Die Untersuchungen

im Rahmen dieser Arbeit boten die Möglichkeit, Wirkungen eines atypischen Antipsychotikums (Risperidon) mit denen eines typischen Antipsychotikums (Haloperidol) zu vergleichen. Dies wurde mit Hilfe der Barnes Maze untersucht.

Im letzten Teil der Arbeit wurde der Einfluss einer P-gp Modulation auf eine potenzielle Behandlung der Alzheimer Krankheit untersucht. Ein neuer Ansatz für eine mögliche Therapie bzw. einer Verhinderung der Progression der Erkrankung, ist die Therapie mit Retinoiden. Das synthetische Retinoid Acitretin konnte als eine Substanz identifiziert werden, die *in vitro* in der Lage ist, die Amyloid-Prozessierung positiv zu beeinflussen und damit die Ablagerungen von Amyloid-Plaques zu verhindern. Ungeklärt sind bislang für Acitretin jedoch die Affinität zu P-gp und mögliche modulierende Effekte in Bezug auf Transporter an der Blut-Hirn Schranke.

Folgende Hypothesen sollten dabei geklärt werden:

- 1.) Acitretin ist hirngängig und wird P-gp abhängig transportiert.
- 2.) Eine Gabe von Acitretin führt zu einer Zunahme der ADAM10 Expression und zu einer Aktivierung des nicht-amyloidogenen Abbaus des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP).

Dazu wurde zunächst der Einfluss von Acitretin auf den P-gp abhängigen Transport von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon, wie bereits bei den anderen P-gp Modulatoren beschrieben, untersucht. Darüber hinaus wurde untersucht, ob Acitretin selbst P-gp Substrateigenschaften zeigt. Damit sollte überprüft werden, ob bei der Anwendung von Acitretin bei *in vivo* Versuchen eine notwendige Penetration ins Hirngewebe erfolgt. Nach Etablierung und Validierung einer geeigneten HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben sollte daher die Verteilung von Acitretin in Hirngewebe und Serum Proben von WT und P-gp doppel knockout Mäusen miteinander verglichen werden, um die P-gp Substratspezifität von Acitretin zu bestimmen. Dadurch sollte untersucht werden, ob Acitretin P-gp abhängig transportiert wird und somit mit pharmakokinetischen Interaktionen zu rechnen ist. Abschließend wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen die P-gp Expression bzw. Induktion der zwei stärksten P-gp Modulatoren des Vorversuches auf molekularer Ebene untersucht, um zu belegen, dass durch die Behandlung mit den P-gp Modulatoren eine Zunahme der P-gp Expression an der Blut-Hirn Schranke von Wildtyp (WT) Mäusen stattgefunden hat, die mit den pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Veränderungen in Verbindung gebracht werden kann. Durch die Western Blot Analysen sollte der Einfluss von Acitretin auf die Amyloid-Prozessierung näher untersucht werden. Dazu wurde die Expression von ADAM10 als physiologische Form der α -Sekretase in Thrombozyten und Hirngewebe bestimmt. Darüber hinaus wurde die Sekretion des löslichen APP-Fragmentes APPs α als Marker für die nicht-

amyloidogene Amyloid-Prozessierung analysiert. Dabei wurden mit Acitretin behandelte WT und P-gp doppel knockout Mäusen mit Kontrollgruppen verglichen.

Die beschriebenen Untersuchungen sollten dazu beitragen, herauszufinden, ob damit zu rechnen ist, dass Arzneimittelinteraktionen zwischen P-gp Modulatoren und P-gp Substraten den Erfolg einer pharmakologischen Behandlung psychiatrischer Erkrankungen gefährden. Es galt mit dieser präklinischen Untersuchung Daten zu generieren, die die pharmazeutische Betreuung von Patienten verbessern können, z.B. im Rahmen des TDM von Psychopharmaka, im Sinne einer verbesserten Arzneimittelwirksamkeit und –sicherheit. Im Gegensatz zu pharmakokinetischen Interaktionen mit dem Cytochrom P450 System und den damit verbundenen Konsequenzen für die pharmakologische Therapie verschiedener Erkrankungen ist die klinische Bedeutung von Interaktionen mit P-gp bislang wenig untersucht. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, das Verständnis von P-gp für die pharmakologische Behandlung von psychiatrischen Erkrankungen zu verbessern. Die Arbeiten zu Acitretin und dessen therapeutischer Nutzbarkeit für die Behandlung der Alzheimer Krankheit sollten darüber hinaus wichtige *in vivo* Daten liefern, die zeigen, ob eine ADAM10 Modulation eine neue therapeutische Option für die Alzheimer Krankheit darstellt. Dazu war es wichtig zu ermitteln, ob Acitretin P-gp abhängig transportiert wird und ob Acitretin in der Lage ist die Blut-Hirn Schranke zu überwinden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien/ Arzneimittel/ Antikörper

2.1.1 Chemikalien

Name	Bezeichnung (Hersteller)	Hersteller/ Lieferant
Acetonitril	Acetonitril Optigrade Promochem	LGC Standards GmbH; Wesel (Deutschland)
Acrylamid	Rotiphorese Gel (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Acitretin	Acitretin	Fluka Analytical/ Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim (Deutschland)
Ameisensäure	Ameisensäure Rotipuran > 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Ammoniumacetat	Ammoniumacetat	Merck KGaA; Darmstadt (Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Auftragepuffer (SDS-Gel)	NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen GmbH; Darmstadt (Deutschland)
Bradford-Reagenz	Roti-Nanoquant	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Butylhydroxytoluol	Butylhydroxytoluol	Appli-Chem GmbH; Darmstadt (Deutschland)
Di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	E. Merck; Darmstadt (Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	1,4-Dithiothreit > 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Eluent HPLC Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon	RADsyD-Benzo/TZA II by HPLC	Bio-Rad Laboratories GmbH; München (Deutschland)
Essigsäure (Eisessig)	Essigsäure >98 %	Merck KGaA; Darmstadt (Deutschland)

Ethanol	Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	EGTA > 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Glycin	Glycin >99,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Haloperidol (Standard)	Haloperidol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim (Deutschland)
9-Hydroxyrisperidon (Paliperidon; Standard)	9-OH-Risperidon	<u>Zur Verfügung gestellt von:</u> Janssen-Cilag GmbH ; Beerse (Belgien)
I-Block	I-Block Protein Based Blocking Reagent <u>Verwendung als 0,2 %-ige Lösung in PBST 0,05 %</u>	Tropix/ Applied Biosystems Deutschland GmbH; Darmstadt (Deutschland)
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid (zur Analyse)	E. Merck; Darmstadt (Deutschland)
Kaliumhydrogenphosphat	Kaliumhydrogenphosphat pro analysi	E. Merck; Darmstadt (Deutschland)
Kochsalz (NaCl)	Natriumchlorid Rotipuran > 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Maisöl	Corn oil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim (Deutschland)
Methanol	Methanol HPLC Grade	Fisher Scientific UK Limited; Loughborough (UK)
Milchpulver	Milchpulver Blotting Grade	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat	Natriumdihydrogenphosphat pro analysi	E. Merck; Darmstadt (Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Phenylmethylsulfonylfluorid > 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Pregnen carbonitril (PCN)	3-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α - Carbonitril	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim (Deutschland)

Propandiol	1,2-Propandiol	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Protease Inhibitor Tabletten	Inhibitor complete mini	F. Hoffmann-La Roche AG; Basel (Schweiz)
Quercetin	Quercetinhydrat >95 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim (Deutschland)
Rinder-Serum-Albumin (BSA)	Albumin Fraktion V > 98 %; pulv., bovine	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Risperidon (Standard)	Risperidon	MB Biomedicals Europe; Illkirch (Frankreich)
Salzsäure (HCl)	Salzsäure rauchend 37 %	Merck KGaA; Darmstadt (Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SDS Pellets >99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
TEMED	TEMED 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Tetrahydrofuran	Tetrahydrofuran Rotisolv HPLC, unstabilisiert	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
TRIS	TRIS pufferan > 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Tween 20	Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Protein Standard Marker für Gelelektrophorese	Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot (Deutschland)
Protein Standard Marker für Gelelektrophorese	Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot (Deutschland)
Substrat für Western Blot Entwicklung	Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce Inc.; Rockford (USA)

2.1.2 Arzneimittel

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller/ Vertrieb
Dexamethason	Fortecortin Injekt 100 mg	Merck Pharma GmbH; Darmstadt (Deutschland)
Haloperidol	Haldol Janssen Injektionslösung 5 mg/ml	Janssen-Cilag GmbH; Neuss (Deutschland)
Isofluran	Forene	Abbott Deutschland; Wiesbaden (Deutschland)
	Isotone Kochsalz-Lösung 0,9 % Braun Infusionslösung	B. Braun Melsungen AG; Melsungen (Deutschland)
Rifampicin	Eremfat 300 mg i.v.	Fatol Arzneimittel GmbH; Schiffweiler (Deutschland)
Risperidon	Risperdal Lösung 1 mg/ml	Janssen-Cilag GmbH; Neuss (Deutschland)

2.1.3 Antikörper

Name	Herkunft/ Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
Antikörper ADAM10	Anti-ADAM10; C-Terminus; Kaninchen; IgG polyklonal	Chemicon Inc.; Temecula (USA)
Antikörper Aktin	Anti-Aktin; Kaninchen; IgG polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim (Deutschland)
Antikörper APP α	Anti-Maus APP α ; Kaninchen; polyklonal	<u>Zur Verfügung gestellt von:</u> Paul M. Matthews; New York (USA)
Antikörper CD61	Anti-CD61; IgG; Kaninchen	Biomol GmbH; Hamburg (Deutschland)
Antikörper GAPDH	GAPDH (14C10); Kaninchen; monoklonal	Cell Signaling Technology Inc.; Danvers (USA)
Antikörper P-gp	Mdr (H-241); Kaninchen; polyklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc.; Santa Cruz (USA)
Sekundärantikörper	Meerrettich-Peroxidase- gekoppelter anti-Kaninchen IgG	Pierce Inc.; Rockford (USA)

2.2 Geräte und Gebrauchs-/ Verbrauchsmaterial

2.2.1 Geräte

Name	Bezeichnung (Hersteller)	Hersteller/ Lieferant
Analysenwaage	Analysenwaage MC 1	Sartorius AG; Göttingen (Deutschland)
Barnes Maze	Barnes Maze for Mouse ENV-562-M	Med Associates Inc.; St. Albans (UK)
CCD Kamera (Western Blot Analysen)	Stella	Raytest GmbH; Straubenhardt (Deutschland)
Elektrophorese Kammer	Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH; München (Deutschland)
Eppendorf Multipipette	Eppendorf Multipipette plus	Eppendorf AG; Hamburg (Deutschland)
Eppendorf Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf Pipette Reference 0,5-10 µl	Eppendorf AG; Hamburg (Deutschland)
Eppendorf Pipette 10-100 µl	Eppendorf Pipette Reference 10-100 µl	Eppendorf AG; Hamburg (Deutschland)
Eppendorf Pipette 200-1000 µl	Eppendorf Pipette 200-1000 µl	Eppendorf AG; Hamburg (Deutschland)
Gefrierschrank	Economic- no frost	Bosch Hausgeräte GmbH; München (Deutschland)
Heizplatte	Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG; Hamburg (Deutschland)
Homogenisator	Potter S	B. Braun Biotech International GmbH; Melsungen (Deutschland)
Homogenisator	Tissue lyser LT	Qiagen GmbH; Hilden (Deutschland)
HPLC-Anlagen	Agilent Technologies 1200 Series	Bio-Rad Laboratories GmbH; München (Deutschland)
Kühlschrank	Bosch- automatic	Bosch Hausgeräte GmbH; München (Deutschland)

Kühlschrank	Liebherr Profi-line	Liebherr Hausgeräte GmbH; Ochsenhausen (Deutschland))
Kamera für Versuchsaufzeichnung (Barnes Maze)	Sony CCD IRIS	Sony Deutschland GmbH; Berlin (Deutschland)
Netzgerät für Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Power Pac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH; München (Deutschland)
Platten-Lesegerät	Biochrom Expert 96	Asys Hitech; Eugendorf (Österreich)
Reinstwasser-Anlage	Direct-Q 3 UV with Pump	Millipore S.A.S; Molsheim (Frankreich)
RotaRod	RotaRod Advanced	TSE Systems GmbH; Bad Homburg (Deutschland)
Schüttelplatte (Orbitalschüttler)	Multi-Bio 3 D	Lab4You GmbH; Berlin (Deutschland)
Standzentrifuge	Rotina 48 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen (Deutschland)
Standzentrifuge	Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech GmbH; Osterode (Deutschland)
Tiefkühlschrank	Liebherr Premium-No Frost	Liebherr Hausgeräte GmbH; Ochsenhausen (Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex RK510S	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG; Berlin (Deutschland)
Ultrazentrifuge	Optima L-90 K	Beckman Coulter GmbH; Krefeld (Deutschland)
Vortexer	Vibrofix VF1	Janke + Kunkel GmbH & Co. KG; Staufen (Deutschland)
Zentrifuge	Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Scientific; Rockford (USA)
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf AG; Hamburg (Deutschland)

2.2.2

Gebrauchsmaterial

Name	Bezeichnung (Hersteller)	Hersteller/ Lieferant
Analytische HPLC-Säule (Risperidon)	ODS Hypersil C ₁₈ ; 5 µm (150x3 mm)	MZ Analysentechnik GmbH; Mainz (Deutschland)
Analytische HPLC-Säule (Risperidon)	PerfectSil 120 ODS-L; 5 µm (250x4,6 mm)	MZ Analysentechnik GmbH; Mainz (Deutschland)
Analytische HPLC-Säule (Acitretin)	PerfectBond ODS-H; 5 µm (200 x 4,6 mm)	MZ Analysentechnik GmbH; Mainz (Deutschland)
Interferenzfilter (Plattenlesegerät)	Interferenzfilter für Microplate Reader Expert 96	Biochrom/ Omnilab- Laborzentrum GmbH + Co. KG; Bonn (Deutschland)
Kryobox	Kryobox aus Karton; weiß 136x136x75 mm; standard	Ratiolab GmbH; Dreieich (Deutschland)
Filter für Blotting/ Füllstoff	Mini-Trans-Blot Filter Paper	Bio-Rad GmbH; München (Deutschland)
Gel-Kämme	Mini Protean System comb; 15 well	Bio-Rad GmbH; München (Deutschland)
Rastereinsätze für Kryobox	Rastereinsätze Kryobox; Karton; 9x9; 133x133x25 mm	Ratiolab GmbH; Dreieich (Deutschland)
Short plates Glasplatten	Short plates; Mini Protean System	Bio-Rad GmbH; München (Deutschland)
Spacer Glasplatten	Spacer plates with 1,0 mm spacers; Mini Protean System	Bio-Rad GmbH; München (Deutschland)
Stahl Kugeln (Tissue lyser)	Stainless Steel Beads; 5 mm	Qiagen GmbH; Hilden (Deutschland)
Ultrazentrifugen Tubes	Tube Thickwall (250 µl)	Beckman Coulter GmbH; Krefeld (Deutschland)
Vorsäule (HPLC Risperidon)	Perfect Bond CN 20 µm (10x4 mm)	MZ Analysentechnik GmbH; Mainz (Deutschland)
Vorsäule (HPLC Acitretin)	PerfectBond C18, 20 µm, 10x4,0 mm	MZ Analysentechnik GmbH; Mainz (Deutschland)

2.2.3

Verbrauchsmaterial

Name	Bezeichnung (Hersteller)	Hersteller/ Lieferant
Aufsätze für Eppendorf Multipipette	Eppendorf Combitips; 5 ml	Eppendorf AG; Hamburg (Deutschland)
Citrat-Monovette	S-Monovette Citrat	Sarstedt AG & Co.; Nürnbrecht (Deutschland)
Eppendorf Safe-Lock tubes	Eppendorf Safe-Lock tubes	Eppendorf AG; Hamburg (Deutschland)
Eppendorf Gefäße	Eppendorf Reagiergefäß; 1,5 ml	Eppendorf AG; Hamburg (Deutschland)
HPLC-Analysengefäße mit Deckel	HPLC serum tubes	Chromacol Ltd.; Welwyn Garden City (UK)
Kanüle 21 G	BD Microlance 3; 21 G	Becton Dickinson S.A.; Fraga (Spanien)
Kanüle 22 G	BD Microlance 3; 22 G	Becton Dickinson S.A.; Fraga (Spanien)
Kanüle 26 G	BD Microlance 3; 26 G	Becton Dickinson S.A.; Fraga (Spanien)
Kanüle 27 G	Sterican; 27 G	B. Braun Melsungen AG; Melsungen (Deutschland)
Nitrocellulose- Membran	High-Bond-ECL Nitrocellulosis Membrane	Amersham Biosciences Europe GmbH; Freiburg (Deutschland)
Pasteurpipetten	Pasteurpipette mit dünner Spitze; LDPE; unsteril; 155 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe (Deutschland)
Pipettenspitze 1000 µl	Pipettenspitze 1000 µl; blau	Sarstedt AG & Co.; Nürnbrecht (Deutschland)
Pipettenspitze 200 µl	Pipettenspitze 200 µl; gelb	Sarstedt AG & Co.; Nürnbrecht (Deutschland)
Pipettenspitze 10 µl	Pipettenspitze 10 µl; weiß	Sarstedt AG & Co.; Nürnbrecht (Deutschland)
Reader-Platten, 96-well	Tissue Culture Plate 96-well; Flat Bottom	Sarstedt Inc; Newton (USA)

Spritze 1 ml	Injekt-F Tuberkulin	B. Braun Melsungen AG; Melsungen (Deutschland)
Spritze 5 ml	BD Discardit II	Becton Dickinson S.A.; Fraga (Spanien)
Spritze 10 ml	BD Discardit II	Becton Dickinson S.A.; Fraga (Spanien)
Zellkultur-Tubes; 15 ml	Cellstar PP-Test tubes; steril; 15 ml	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen (Deutschland)
Zellkultur-Tubes; 50 ml	Cellstar PP-Test tubes; steril; 50 ml	Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen (Deutschland)
Zellkultur-Röhrchen, Glas	Pyrex Borosilicate Glass Disposable culture tubes (13x100 mm)	Corning Inc.; New York (USA)

2.3 Benutzte Computer Software

2.3.1 Software zur Validierung und Auswertung der HPLC-Analysen

Für die Validierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben wurde die Software Valistat Version 1.0 [Arvecon GmbH; Walldorf (Deutschland)] verwendet. Die Validierung der HPLC-Methoden von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon (Methoden I/ Methode II) und Haloperidol wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit von anderen Mitarbeitern des Neurochemischen Labors vorgenommen und abgeschlossen, da diese Teil der Laborroutine sind [Kirschbaum et al. (2008)]. Somit waren diese nicht Teil meiner Arbeit. Die ermittelten Daten der Validierung werden bei der Übersicht der HPLC-Methoden gezeigt (s. 2.4.2/ 2.4.3/ 2.4.4). Die Validierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben war Teil dieser Arbeit.

Für die Auswertung der HPLC-Analysen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon, Haloperidol und Acitretin wurde die Software HP ChemStation for LC 3D [Agilent Technologies; Waldbronn (Deutschland)] verwendet.

2.3.2 Software zur Auswertung von Verhaltensuntersuchungen

Für die Auswertung der pharmakodynamischen Effekte der Antipsychotika auf dem RotaRod wurde das Programm TSE RotaRod V4.0 (07-2005) [TSE Systems GmbH; Bad Homburg (Deutschland)] verwendet.

Zur Analyse der Verhaltensuntersuchungen in der Barnes Maze wurde zur automatischen Aufzeichnung und anschließender Auswertung der einzelnen Trials die Software Etho Vision XT Version 5.1 [Noldus Information Technology; Wageningen (Niederlande)] verwendet.

2.3.3 Software zur Auswertung der biochemischen Untersuchungen

Für die Proteinbestimmung mit Hilfe der Methode nach Bradford wurde im Rahmen der biochemischen Untersuchungen die Software Mikro Win Microplate Data Reduction [Mikrotek Laborsysteme GmbH; Overarth (Deutschland)] zur Auswertung der Ergebnisse verwendet.

Die Analyse der Western Blot Untersuchungen (Visualisierung/ Quantifizierung) wurde mit Hilfe der Software AIDA image analyzer 4.26 [Raytest GmbH; Straubenhardt (Deutschland)] vorgenommen.

2.3.4 Software zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Version 18.0 [SPSS Inc.; Chicago (USA)].

2.4 HPLC-Analysen

2.4.1 Prinzip der High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Die Methode der High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) ist eine Sonderform chromatographischer Verfahren und wurde als physikalisch-chemische Methode zur Trennung und Anreicherung löslicher Stoffe für analytische und präparative Zwecke entwickelt. Die Chromatographie beruht auf der Verteilung der zu untersuchenden Substanz zwischen einer mobilen Phase (flüssig) und einer stationären Phase (i.d.R. fest). Die Wechselwirkungen zwischen beiden Phasen beruhen dabei hauptsächlich auf Adsorptions- und Verteilungsvorgängen. Bei der HPLC befindet sich die stationäre Phase in der sog. analytischen Säule in einem System aus mehreren Komponenten (s. Abb. 2.4.1 A). Unter Verwendung eines hohen Druckes (> 40 bar) werden die zu analysierenden Substanzen mit Hilfe eines Eluenten zur Säule transportiert. Man unterscheidet hauptsächlich eine isokratische Arbeitsweise (Fließmittelzusammensetzung bleibt über den gesamten Analysenzeitraum gleich) und eine Gradientenelution (Fließmittelzusammensetzung kann unter Verwendung mehrerer Pumpen während des Analysenzeitraumes variiert werden). Die Fließmittel für die HPLC müssen eine besonders hohe Reinheit besitzen und frei von Gasblasen sein, um keine Störsignale im Detektor zu verursachen. Mit Hilfe eines Schaltventils kann die Fließrichtung zu verschiedenen Schaltzeiten variiert werden. Das in den Trennsäulen befindliche Material besteht bei der in dieser Arbeit verwendeten Reversed-Phase-HPLC (RP-HPLC) aus einem lipophilen Material (meist C₁₈ Material), der Eluent enthält eine oder mehrere polare Komponenten. Es gibt verschiedene Detektorsysteme zur Bestimmung der Analyten. Der am häufigsten verwendete Detektortyp ist der UV-Detektor zur Lichtabsorptionsmessung, der auch in dieser Arbeit ausnahmslos verwendet wurde [Rücker, Neugebauer und Willems (2001)].

Eine HPLC Anlage besteht i.d.R. aus:

- 1.) **Probenkammer/ Probengeber mit Säulenschaltung (Probeneinlass-System)**
- 2.) **Pumpe(n) [für Eluent(en)]**
- 3.) **Säulenkammer**
- 4.) **Detektor**
- 5.) **Computer zur Auswertung und Steuerung**

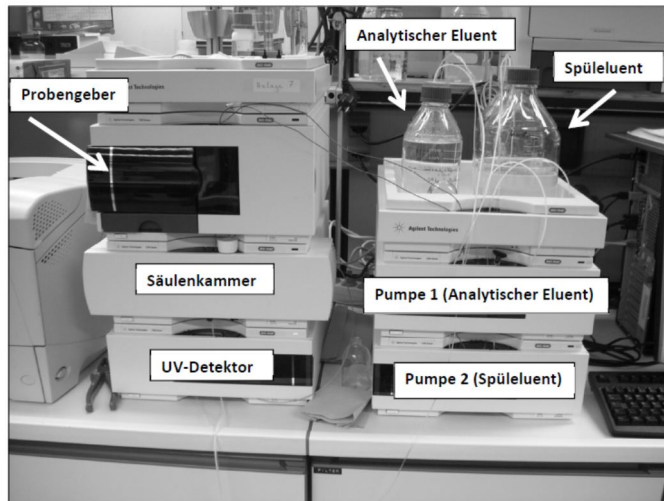
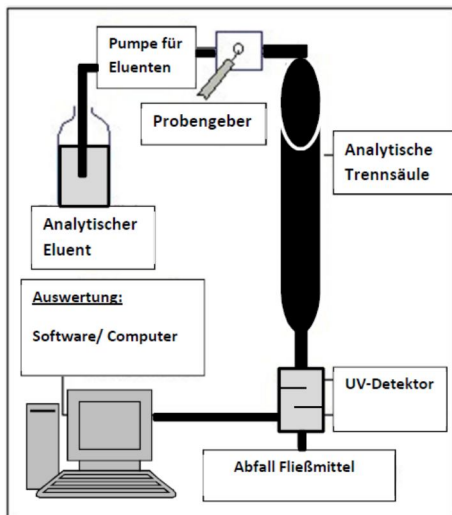


Abb. 2.4.1 A: Schematische Darstellung des Aufbaus einer HPLC-Anlage (links) und ein Beispiel einer in dieser Arbeit verwendeten HPLC-Anlage des Neurochemischen Labors (rechts).

Bei allen in dieser Arbeit beschriebenen HPLC-Analysen wurde nach demselben Schema vorgegangen. Durch ein 6-Wege-Ventil wurde die zu analysierende Probe mit dem Spüleluent durch eine erste Pumpe auf eine Vorsäule gespült, um Lipide, Proteine und weitere Plasmabestandteile, die zu Störpeaks und Überlagerungen bei der Auswertung führen können, aus der Probe zu entfernen (ca. 5-10 Minuten). Im sog. Back-Flush-Verfahren wurde mit Hilfe einer zweiten Pumpe und des analytischen Eluenten die Probe in entgegengesetzter Richtung auf die analytische Säule zur chromatographischen Trennung gespült. Zur Detektion wurde die Probe mit Hilfe des analytischen Eluenten zum UV-Detektor, mit einer individuell einstellbaren Wellenlänge zur quantitativen Bestimmung des Analyten, transportiert. Die Analysenzeit variierte je nach zu bestimmender Substanz. Am Ende der Analysenzeit wurde wiederum die Ausgangsposition durch das 6-Wege-Ventil eingestellt.

2.4.2 HPLC-Methode Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon (Methode I)

Vorsäule	Perfect Bond CN 20 µm (10x4 mm)
Analytische Säule	ODS Hypersil C ₁₈ 3 µm (150x3 mm)
Spüleluent	8 % Acetonitril in Reinstwasser (0,8 ml/min)
Analytischer Eluent	38 % Acetonitril/ 0,4 % TEMED in Reinstwasser (pH 6,5; 0,4 ml/min)
Temperatur	40 °C
Wellenlänge (UV-Detektor)	285 nm
Laufzeit (gesamt)	23 min

Diese Methode war linear in einem Bereich von 2-60 ng/ml mit einer Nachweisgrenze von 1 ng/ml für Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon. Die Präzision lag bei < 10 % für Risperidon und < 6 % für 9-Hydroxyrisperidon.

2.4.3 HPLC-Methode Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon (Methode II)

Vorsäule	Perfect Bond CN 20 µm (10x4 mm)
Analytische Säule	PerfectSil 120 ODS-L 5 µm (250x4,6 mm)
Spüleluent	8 % Acetonitril in Reinstwasser (1,0 ml/min)
Analytischer Eluent	RADsyD-Benzo/TZA II by HPLC von Bio-Rad (1,3 ml/min) [Zusammensetzung: 640 ml Reinstwasser , 4 ml TEMED mischen; mit Essigsäure auf pH: 6,5 einstellen; 375 ml Acetonitril zugeben]
Temperatur	40 °C
Wellenlänge (UV-Detektor)	285 nm
Laufzeit (gesamt)	20 min

Diese Methode war linear in einem Bereich von 2-60 ng/ml mit einer Nachweisgrenze von 1 ng/ml für Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon. Die Präzision lag bei < 5 % für Risperidon und < 4 % für 9-Hydroxyrisperidon.

2.4.4 HPLC-Methode Haloperidol

Vorsäule	Perfect Bond CN 20 µm (10x4 mm)
Analytische Säule	PerfectSil 120 ODS-L 5 µm (250x4,6 mm)
Spüleluent	8 % Acetonitril in Reinstwasser (1,0 ml/min)
Analytischer Eluent	RADsyD-Benzo/TZA II by HPLC von Bio-Rad (1,3 ml/min) [Zusammensetzung: 640 ml Reinstwasser , 4 ml TEMED mischen; mit Essigsäure auf pH: 6,5 einstellen; 375 ml Acetonitril zugeben]
Temperatur	40 °C
Wellenlänge (UV-Detektor)	252 nm
Laufzeit (gesamt)	25 min

Diese Methode war linear in einem Bereich von 2-20 ng/ml mit einer Nachweisgrenze von 2 ng/ml und einer Präzision von < 8 % für Haloperidol.

2.5 Herstellung der Injektionslösungen

Für die Herstellung der Injektionslösungen für die intra-peritonealen (i.p.) Injektionen wurden entweder Fertigarzneimittel (FAM) verwendet und diese bis zur gewünschten Zielkonzentration mit einem geeigneten Lösungsmittel/ Vehikel versetzt oder, bei Fehlen eines Fertigpräparates, die Reinsubstanz direkt in einem geeigneten Lösungsmittel/ Vehikel gelöst und bis zur Zielkonzentration verdünnt. Bei Verwendung von isotonischer Kochsalzlösung als Vehikel wurde bis zu einem Volumen von 0,5 ml für die i.p. Injektion ergänzt. Die anderen Vehikel wurden abhängig vom Körpergewicht dosiert (Tab 2.5).

Tab. 2.5: Eingesetzte Chemikalien/ Arzneistoffe für die i.p. Injektionen.

Name der Substanz	Fertigarzneimittel (falls vorhanden)	Eingesetzte Verdünnung	Lösungsmittel/ Vehikel
Acitretin	---	1,0 mg/ml	Maisöl
Dexamethason	Fortecortin Injekt 100	Individuelle Dosis (zunächst unverdünnt)	Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %
Haloperidol	Haldol Janssen Injektionslösung 5 mg/ml	Individuelle Dosis (zunächst unverdünnt)	Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %
PCN	---	7,5 mg/ml	Maisöl
Quercetin	---	1,0 mg/ml	Propandiol
Rifampicin	Eremfat 300 i.v.	14,4 mg/ml	Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %
Risperidon	Risperdal Lösung 1 mg/ml	Individuelle Dosis (zunächst unverdünnt)	Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %

2.6 Versuchstiere

Sowohl für die pharmakokinetischen Untersuchungen, als auch für die Verhaltenstests und biochemischen Arbeiten wurden WT Mäuse (FVB/N Stamm) bzw. P-gp doppel knockout Mäuse (abcb1a/1b -/-; FVB/N Hintergrund) aus der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz verwendet. Diese wurden frühestens ab einem Alter von 6-8 Wochen für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um eine intakte Blut-Hirn-Schranke sicherzustellen. Das Gewicht der Tiere schwankte, je nach Alter, zwischen 20-40 g.

Innerhalb einer Testung wurde versucht, ein einheitliches Gewicht der verwendeten Tiere sicherzustellen. Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal 5 Tieren pro Käfig in einem klinik-internen Tierstall in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin Mainz gehalten. Dabei wurde eine konstante Temperatur von durchschnittlich 22°C, eine mittlere Luftfeuchtigkeit von 60 % und ein Licht-Dunkel Zyklus von jeweils 12 h (Licht an um 6 h morgens, Licht aus um 18 h abends) eingehalten. Alle durchgeführten Experimente entsprachen den Vorgaben der europäischen Richtlinie 86/609/EEC (1986) zum Schutz von Versuchstieren. Dies wurde von lokalen Behörden überwacht.

2.7 Untersuchungen zur veränderten Verteilung von Antipsychotika in Gehirn/ Serum

2.7.1 Präparation der Proben

Für die pharmakokinetischen Untersuchungen wurden die benötigten Versuchstiere zunächst mit Isofluran narkotisiert und anschließend dekapitiert. Zur Analyse der Konzentrationen der injizierten Antipsychotika wurde das Blut aus dem Rumpf des Tieres mit Hilfe eines Trichters in einem Glasrohr aufgefangen und anschließend auf Eis zwischengelagert, um die Blutgerinnung abzuwarten. Das Gehirn der Versuchstiere wurde herauspräpariert und mit einem sagittalen Schnitt halbiert. Eine Gehirnhälfte wurde für weitere, eventuell später notwendige Untersuchungen, bei -20 °C tiefgefroren gelagert. Die andere Gehirnhälfte wurde für die anschließende HPLC-Analyse (s. 2.7.2) des Hirngewebes auf Eis zwischengelagert.

2.7.2 Gewebeaufbereitung für die HPLC-Analyse

Für die HPLC-Analysen von Konzentrationen der injizierten Antipsychotika wurden die gewonnenen Blutproben in der Standzentrifuge bei 3.000 g für 10 min zentrifugiert und das erhaltene Serum abpipettiert. Danach wurde der Blutkuchen mit Hilfe einer Pipettenspitze noch einmal durchmischt und erneut zentrifugiert. Das dabei erhaltene Serum wurde mit dem im ersten Zentrifugationsschritt erhaltenen Serum vereinigt und gemischt. Anschließend wurden die Serumproben bei -20°C bis zur Analyse gelagert oder sofort per HPLC analysiert.

Die für die HPLC-Analyse vorgesehenen Hirnhälften wurden auf der Analysenwaage gewogen und mit 4 Teilen Methanol homogenisiert (wahlweise mit Potter oder tissue lyzer). Die Extraktion mit Methanol war für alle Hirnproben gleich, unabhängig von der verwendeten HPLC-Methode. Anschließend wurden die erhaltenen Hirnhomogenate in der Tischzentrifuge bei 13.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und entweder bei -20°C bis zur Analyse gelagert oder sofort per HPLC analysiert. Die Aufbereitung der Hirngewebeproben wurde an die von Doran et al. (2005) vorgestellte Vorgehensweise angepasst.

2.7.3 Auswertung der HPLC-Analysen

Die HPLC-Analysen der Konzentrationen der injizierten Antipsychotika in Serum-/ und Hirngewebeproben wurden einzeln mit Hilfe eines Computers und der dazugehörigen Software (s. 2.3.1) manuell ausgewertet.

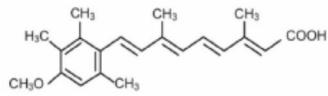
2.7.4 Statistische Auswertung der HPLC-Analysen

Zur statistischen Beurteilung der pharmakokinetischen Untersuchungen wurden die Ergebnisse der HPLC-Analysen der einzelnen Versuchsgruppen im Statistikprogramm (s. 2.3.4) verglichen. Zunächst

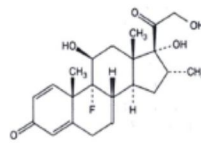
wurde ein Test auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) durchgeführt. Für den anschließenden Test auf statistische Signifikanz wurde, entsprechend des Ergebnisses des Shapiro-Wilk-Tests, entweder der Student's t-test oder der Mann-Whitney U-Test verwendet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

2.7.5 Charakterisierung verschiedener P-gp Modulatoren (Vorversuch)

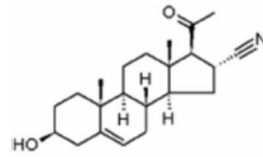
Da eine Modulation der P-gp Funktion wie eine Induktion oder Hemmung der klinischen Situation näher kommen als eine vollständige P-gp Defizienz, war geplant, den Einfluss einer Modulation von P-gp auf die Verteilung von Risperidon und seines aktiven Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon in Serum und Hirngewebe von Mäusen zu untersuchen. Die Untersuchungen sollte insbesondere Risperidon umfassen, weil die Arbeitsgruppe hier bereits auf Vorerfahrungen zurückgreifen konnte [Kirschbaum et al. (2008)]. Da sich in der Literatur Berichte über verschiedene Substanzen zur P-gp Modulation finden, habe ich mich für Acitretin (ein synthetisches Retinoid), Dexamethason (ein synthetisches Glucokortikoid), Quercetin (ein natürliches Flavonoid), 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; ein synthetisches Steroid) und Rifampicin (ein Antibiotikum zur Behandlung der Tuberkulose) entschieden [Mitsunaga et al. (2000); Liu et al. (2003); Bauer et al. (2004); Kageyama et al. (2005); Chang et al. (2006)]. Es musste zunächst festgestellt werden, welche der Substanzen sich am potentesten auf die P-gp Expression und Aktivität auswirkt. In unseren Untersuchungen wurde die Reinsubstanz Quercetin als Ersatz für den vielfach zitierten Johanniskrautextrakt verwendet. In der Literatur finden sich Hinweise, dass Quercetin, ein im Johanniskraut vorkommendes Flavonoid, und Hyperforin, ein Phloroglucinderivat, die höchstpotenten P-gp-Induktoren sind [Weber et al. (2004)]. Ich habe mich u.a. aus Stabilitätsgründen für die Testung von Quercetin entschieden. Quercetin wurde auf Grund von beschriebenen dosisabhängigen Effekten auf die P-gp Aktivität/ Expression in zwei verschiedenen Konzentrationen verwendet. Für die verwendete niedrige Konzentration (0,1 mg/kg/d) gibt es in der Literatur Hinweise für P-gp induzierende Effekte, während die höhere Konzentration (1 mg/kg/d) P-gp inhibierend wirken soll [Mitsunaga et al. (2000)]. Insbesondere war es wichtig festzustellen wie stark ausgeprägt der modulierende Effekt auf P-gp war.



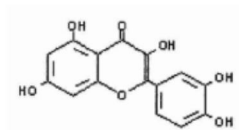
Acitretin



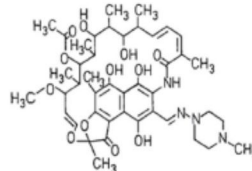
Dexamethason



5-Pregnen-3β-ol-20-on-16α-Carbonitril (PCN)



Quercetin



Rifampicin

Abb. 2.7.5: Mögliche Modulatoren von P-gp, die im Vorversuch auf Ihre Effekte untersucht wurden.

Für den Vorversuch wurden die jeweiligen Versuchstiere (Anzahl s. Ergebnisse) für 4 bzw. 11 aufeinanderfolgende Tage mit dem jeweiligen P-gp Modulator (Acitretin, Dexamethason, PCN, Quercetin oder Rifampicin) oder dem entsprechenden Vehikel (Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %, Maisöl oder Propandiol) als Kontrollgruppe behandelt. Die Injektionen wurden 1mal täglich mit einem Abstand von 24 h durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Injektionsintervalle gewählt, um zu untersuchen, ob es einen zeitabhängigen Effekt der P-gp Modulation gibt.

Tab. 2.7.5 A: Eingesetzte Dosen für die i.p. Injektionen von P-gp Modulatoren und Kontrollgruppen.

P-gp Modulator	Eingesetzte Dosis	Kontrollgruppe
Acitretin	5 mg/kg/d	3,33 ml/kg/d Maisöl
Dexamethason	50 mg/kg/d	0,5 ml Isotonische Kochsalzlösung/d
PCN	25 mg/kg/d	3,33 ml/kg/d Maisöl
Quercetin	0,1 mg/kg/d	1 ml/kg/d Propandiol
Quercetin	1 mg/kg/d	1 ml/kg/d Propandiol
Rifampicin	10 mg/kg/d	0,5 ml Isotonische Kochsalzlösung/d

Um den Einfluss der P-gp Modulation auf die Konzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon, die beide Substrate von P-gp sind, zu untersuchen, erfolgte an Tag 5 bzw. Tag 12 eine einmalige Injektion mit 3 mg/kg Risperidon. An den Zeitpunkten 1 h, 3 h und 6 h nach der Risperidon-Injektion wurden Serum-/ Hirngewebeproben zur HPLC-Analyse (s. 2.4) gewonnen und präpariert (s. 2.7.1) und für die Analyse der Konzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon aufbereitet (s. 2.7.2). Die Proben des Vorversuches wurden mit der HPLC-Methode I zur Bestimmung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon analysiert (s. 2.4.2). Die Ergebnisse der Bestimmung der Konzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon wurden sowohl für die Darstellung eines Konzentrations-Zeit-Verlaufes dieser Substanzen verwendet, als auch zur Berechnung der Gehirn-Serum Verhältnisse. Diese wurden zur Bewertung der Verteilung der Antipsychotika zwischen dem ZNS und dem peripheren Gewebe herangezogen. Ebenso wurden die Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisse zur Bewertung der Beeinflussung metabolischer Prozesse durch die P-gp Modulatoren berechnet.

Tab. 2.7.5 B: Anzahl der Versuchstiere für die pharmakokinetischen Untersuchungen zur Verteilung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon im Hirngewebe und Serum von P-gp Wildtyp (WT) Mäusen im Rahmen des Vorversuches nach 4 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin, 50 mg/kg/d Dexamethason, 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN), 5 mg/kg/d Acitretin, 0,1 mg/kg/d bzw. 1,0 mg/kg/d Quercetin im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Saline, Maisöl oder Propandiol).

<u>Zeitpunkt nach Risperidon-Injektion</u>	<u>Rifampicin 10 mg/kg</u>	<u>Dexamethason 50 mg/kg</u>	<u>Kontrolle (Saline)</u>
1h	n=5	n=6	n=5
3 h	n=4	n=5	n=5
6 h	n=5	n=4	n=4
<u>Zeitpunkt nach Risperidon-Injektion</u>	<u>PCN 25 mg/kg</u>	<u>Acitretin 5 mg/kg</u>	<u>Kontrolle (Maisöl)</u>
1h	n=5	n=5	n=5
3 h	n=5	n=5	n=5
6 h	n=5	n=4	n=5
<u>Zeitpunkt nach Risperidon-Injektion</u>	<u>Quercetin 0,1 mg/kg</u>	<u>Quercetin 1,0 mg/kg</u>	<u>Kontrolle (Propandiol)</u>
1h	n=5	n=4	n=5
3 h	n=4	n=4	n=5
6 h	n=4	n=5	n=5

Tab. 2.7.5 C: Anzahl der Versuchstiere für die pharmakokinetischen Untersuchungen zur Verteilung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (WT) Mäusen im Rahmen des Vorversuches nach 11 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin, 50 mg/kg/d Dexamethason, 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN), 5 mg/kg/d Acitretin, 0,1 mg/kg/d bzw. 1,0 mg/kg/d Quercetin im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Saline, Maisöl oder Propandiol) [k.D.=keine Daten vorhanden]. Nach chronischer Gabe von Rifampicin über 11 Tage zeigte sich eine unerklärliche hohe Letalität von über 50 % bei den Versuchstieren und der Versuch musste daher abgebrochen werden. In den anderen Gruppen ohne Daten wurden meist auf Grund des geringen Effektes auf eine Fortführung des Versuches verzichtet.

<u>Zeitpunkt nach Risperidon-Injektion</u>	<u>Rifampicin 10 mg/kg</u>	<u>Dexamethason 50 mg/kg</u>	<u>Kontrolle (Saline)</u>
1h	n=5	n=4	n=5
3 h	n=4	n=5	n=5
6 h	k.D.	n=5	n=5
<u>Zeitpunkt nach Risperidon-Injektion</u>	<u>PCN 25 mg/kg</u>	<u>Acitretin 5 mg/kg</u>	<u>Kontrolle (Maisöl)</u>
1h	n=5	k.D.	n=5
3 h	n=5	k.D.	n=5
6 h	n=5	k.D.	n=4
<u>Zeitpunkt nach Risperidon-Injektion</u>	<u>Quercetin 0,1 mg/kg</u>	<u>Quercetin 1,0 mg/kg</u>	<u>Kontrolle (Propandiol)</u>
1h	n=5	k.D.	n=5
3 h	n=5	k.D.	n=5
6 h	n=5	k.D.	n=5

2.7.6 Vergleich Risperidon und Haloperidol

Für den Vergleich des Einflusses einer P-gp Modulation auf die Konzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon als P-gp Substrate und Haloperidol als P-gp Nichtsubstrat, in Serum- und Hirngewebeproben wurden die jeweiligen Versuchstiere (Anzahl s. Ergebnisse) für 11 Tage mit den P-gp Modulatoren (Dexamethason oder PCN) bzw. dem entsprechenden Vehikel (Isotonische Kochsalzlösung oder Maisöl) als Kontrollgruppe durch i.p. Injektion behandelt. Bei diesem Versuch wurden nur noch die beiden potentesten P-gp Modulatoren des Vorversuches über den längeren Applikationszeitraum von 11 Tagen verwendet, um die Tierzahlen möglichst gering zu halten.

Tab. 2.7.6 A: Eingesetzte Dosen für die i.p. Injektionen von P-gp Modulatoren und Kontrollgruppen.

P-gp Modulator	Eingesetzte Dosis	Kontrollgruppe
Dexamethason	50 mg/kg/d	0,5 ml Isotonische Kochsalzlösung
PCN	25 mg/kg/d	3,33 ml/kg/d Maisöl

Tab. 2.7.6 B: Anzahl der Versuchstiere für die pharmakokinetischen Untersuchungen zur Verteilung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Saline oder Maisöl).

Zeitpunkt nach Risperidon-Injektion	Dexamethason 50 mg/kg/d	Kontrolle (Saline)	PCN 25 mg/kg/d	Kontrolle (Maisöl)
0,5 h	n=8	n=8	n=7	n=7
1 h	n=8	n=8	n=8	n=8
2 h	n=8	n=8	n=8	n=8
3 h	n=8	n=8	n=8	n=8
6 h	n=8	n=8	n=7	n=8

Tab. 2.7.6 C: Anzahl der Versuchstiere für die pharmakokinetischen Untersuchungen zur Verteilung von Haloperidol im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Saline oder Maisöl).

Zeitpunkt nach Haloperidol-Injektion	Dexamethason 50 mg/kg/d	Kontrolle (Saline)	PCN 25 mg/kg/d	Kontrolle (Maisöl)
0,5 h	n=6	n=7	n=5	n=6
1 h	n=6	n=7	n=6	n=6
2 h	n=6	n=6	n=6	n=6
3 h	n=8	n=6	n=5	n=6
6 h	n=8	n=6	n=6	n=6

An Tag 12 erfolgte die einmalige i.p. Injektion mit 3 mg/kg Risperidon oder 3 mg/kg Haloperidol. Die Zeitpunkte der Entnahme von Gewebe wurden für diesen Versuch erweitert, um weiterreichende Daten zur Verteilung der Antipsychotika zu erhalten. Dazu wurden an den Zeitpunkten 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h und 6 h nach der Injektion mit Risperidon oder Haloperidol Serum-/ Hirngewebeproben zur HPLC-Analyse (s. 2.4) gewonnen und präpariert (s. 2.7.1) und ggf. für die Analyse der Konzentrationen von Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon oder Haloperidol aufbereitet (s. 2.7.2). Die Proben des Vorversuches wurden mit der HPLC-Methode II zur Bestimmung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon (s. 2.4.3) und mit der HPLC-Methode zur Bestimmung von Haloperidol (s. 2.4.4) analysiert.

Die HPLC-Methode zur Bestimmung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon wurde im Rahmen einer Umstrukturierung im Neurochemischen Labor zwischen Vorversuch und der Untersuchungen zum Vergleich von Risperidon und Haloperidol verändert und neu validiert. Da diese Methode Teil der Laborroutine gewesen ist, war es daher auch notwendig, die Analysen dieser Arbeit anzupassen. Wie bereits im Vorversuch erläutert, wurden auch hier Konzentrations-Zeit Verläufe, die Gehirn-Serum Verhältnisse und die Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisse berechnet und dargestellt. Für Haloperidol konnte nur die Berechnung des Gehirn-Serum Verhältnisses durchgeführt und beurteilt werden, da es keine bekannten aktiven Metabolite von Haloperidol gibt und die HPLC-Methode zur Bestimmung von Haloperidol (s. 2.4) die Analyse von Haloperidol Metaboliten nicht umfasst. Somit

war eine Beurteilung der Beeinflussung metabolischer Prozesse nur durch die Abnahme der gemessenen Haloperidol-Konzentration in Serum und Hirngewebe möglich.

2.8 Verhaltenspharmakologische Untersuchungen

2.8.1 RotaRod

Die Fähigkeit von Nagern, auf Geschwindigkeits-/ und Richtungsänderungen zu reagieren und auf rotierenden Gegenständen zu balancieren, ist ein Verhaltensmuster, das bereits seit mehreren Jahren erfolgreich zur Beurteilung und Untersuchung pharmakodynamischer Wirkungen eingesetzt wird. Der sog. RotaRod Test ist in der Literatur beschrieben und umfasst Untersuchungen der motorischen Fähigkeiten von Nagern unter verschiedenen Versuchsbedingungen [Jones & Roberts (1968)]. Es konnte mehrfach belegt werden, dass das Verhalten der Tiere dabei mit der Funktionalität und der Modulation des dopaminergen Systems in direkter Verbindung steht. Somit ist dieser Test für Untersuchungen zur pharmakodynamischen Beeinflussung der Motorik durch die Behandlung mit Antipsychotika geeignet, deren antipsychotische Wirkung sich vor allem durch die antagonistische Wirkung am Dopamin D2 Rezeptor begründet [Kelly et al. (1998); Marwaha (1982); Perez-Raya et al. (1989); Rubinstein et al. (1997); Ohno et al. (1989)].

2.8.1.1 Aufbau des RotaRod

Das RotaRod für fünf Mäuse bestand aus einer Stange von 3 cm Durchmesser, die durch sechs Querwände in fünf Abschnitte eingeteilt werden konnte. Die Stange wurde von einem Elektromotor angetrieben, der über einen Computer und der dazu gehörigen Software gesteuert wurde. Die mit einer schwarzen Gummischicht überzogene Stange diente den Mäusen als rutschfeste Unterlage für die Untersuchungen und war etwa 16 cm über der Bodenplatte des RotaRod-Systems angebracht. Damit war sicher gestellt, dass die Versuchstiere auf der Stange blieben und sich nicht, bedingt durch eine zu geringe Höhe, dem Versuch entziehen konnten. Lichtschranken etwa in 3 cm Höhe über der Bodenplatte des RotaRod-Systems sorgten in jeder der abgeteilten Boxen für die Detektion der Mäuse am Ende des Versuches. Das Computerprogramm TSE RotaRod System V4.0 ermöglichte die Programmierung eines Durchgangs mit mehreren Phasen verschiedener Geschwindigkeiten. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit drehte sich die Stange zuerst über 10 s bei 2,5 Umdrehungen pro Minute (U/min) und wurde anschließend über 230 s linear auf 27,5 Umdrehungen pro Minute beschleunigt, was als akzelerierender RotaRod Test bezeichnet wird. (Abb. 2.8.1.1). Bis zu fünf Tiere wurden nacheinander auf die, sich bereits zur Gewöhnung bei 2,5 U/min drehenden Stange, gesetzt. Als alle Mäuse richtig in der jeweiligen Box platziert worden waren, wurden das zuvor erstellte Profil

sowie die Zeitmessung am Computer gestartet (Tab. 2.8.1.1). Falls eine Maus nach ihrer individuellen Laufleistung von der Stange herunterfiel, wurde die Zeit durch die automatische Detektion der Lichtschranken gestoppt und die Zeit jedes einzelnen Versuchstieres aufgezeichnet. Das RotaRod-System und die beschriebene Versuchsdurchführung sind schon längere Zeit im Verhaltenspharmakologischen Labor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie etabliert und wurde bereits für die Untersuchung pharmakodynamischer Wirkungen von Antipsychotika in Bezug auf das motorisches Verhalten von Nagern angewendet [Kirschbaum et al. (2008)].

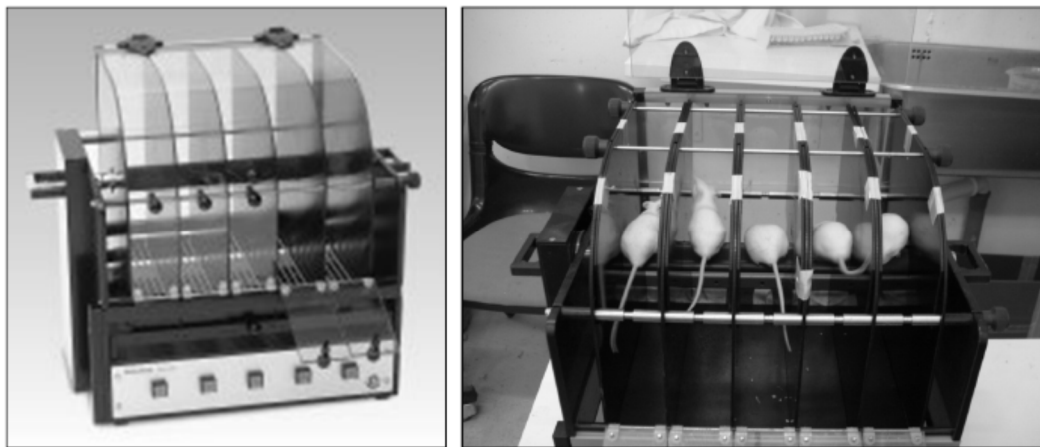


Abb. 2.8.1.1: Apparatur des RotaRod-Systems zur Testung der Balancefähigkeit von Nagern auf einer rotierenden Stange (links) [Quelle: Produktinformation RotaRod Advanced; TSE Systems; Bad Homburg (Deutschland)] und ein Bild des RotaRod während eines Versuchs (rechts).

Tab. 2.8.1.1: Zeit-/ Phasenprofil der Untersuchungen auf dem RotaRod.

Profileinstellung	Geschwindigkeit (Umdrehungen/Minute)	Dauer
Gewöhnung	2,5 U/min	Bis zur Startphase
Startphase	2,5 U/min	10 s
Beschleunigungsphase	Lineare Steigerung von 2,5 – 27,5 U/min	230 s

2.8.1.2 Durchführung der Untersuchungen auf dem RotaRod

Zur Bestimmung der Balancefähigkeit der Versuchstiere mit dem RotaRod-System wurden die Tiere zunächst innerhalb von 5 Tagen an das RotaRod gewöhnt. Hierzu wurden an Tag 1 drei Durchläufe des bereits beschriebenen Profils (Tab. 2.8.1.1) durchgeführt, an den Tagen 2 bis 5 jeweils 4 Durchläufe pro Tag. Im nächsten Schritt der Untersuchungen wurde anschließend über den Zeitraum von 11 Tagen (Tag 6 bis Tag 16), in denen die P-gp Modulatoren bzw. die Vehikel (Kontrollgruppen) injiziert wurden, an jedem Tag (jeweils 4 Durchläufe pro Tag) das lokomotorische Verhalten auf dem RotaRod untersucht. Dies diente zum einem zur Beurteilung weiterer Lerneffekte durch wiederholtes Training auf dem RotaRod, und zum anderen auch zur Beurteilung der Beeinflussung der Laufleistung durch die P-gp Modulatoren bzw. die Vehikel. Nur so war es möglich, den tatsächlichen Einfluss der Antipsychotika im nächsten Schritt der Untersuchungen auf dem RotaRod zu beurteilen. An Tag 17 wurde das Antipsychotikum (Risperidon oder Haloperidol) in einer Dosis von jeweils 3 mg/kg injiziert und die Laufleistung auf dem RotaRod an verschiedenen Zeitpunkten (0,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 10 h) nach der Antipsychotika-Injektion gemessen.

Tab. 2.8.1.2 A: Anzahl der Versuchstiere bei den RotaRod Untersuchungen zum Einfluss der Modulation der P-gp Expression auf die pharmakodynamischen Wirkungen von Risperidon bei Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Saline oder Maisöl).

Zeitpunkt nach Risperidon-Injektion	Dexamethason 50 mg/kg/d	Kontrolle (Saline)	PCN 25 mg/kg/d	Kontrolle (Maisöl)
0,5 h	n=19	n=20	n=17	n=19
2 h	n=19	n=20	n=17	n=19
4 h	n=19	n=20	n=17	n=19
6 h	n=19	n=20	n=17	n=19
8 h	n=19	n=20	n=17	n=19
10 h	n=19	n=20	n=17	n=19

Tab. 2.8.1.2 B: Anzahl der Versuchstiere bei den RotaRod Untersuchungen zum Einfluss der Modulation der P-gp Expression auf die pharmakodynamischen Wirkungen von Haloperidol bei Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Saline oder Maisöl).

Zeitpunkt nach Haloperidol-Injektion	Dexamethason 50 mg/kg/d	Kontrolle (Saline)	PCN 25 mg/kg/d	Kontrolle (Maisöl)
0,5 h	n=20	n=20	n=18	n=20
2 h	n=20	n=20	n=18	n=20
4 h	n=19	n=20	n=18	n=20
6 h	n=19	n=20	n=18	n=20
8 h	n=19	n=20	n=18	n=20
10 h	n=19	n=20	n=18	n=20

2.8.1.3 Auswertung der Untersuchungen auf dem RotaRod

Durch die Gewöhnung an den Tagen 1-5 konnte man die individuelle Laufleistung zur Beurteilung der motorischen Fähigkeiten eines jeden Versuchstieres ermitteln. Um die Auswirkungen einer pharmakologischen Therapie auf die Motorik vergleichen zu können, wurde der Mittelwert aus Tag 4 und Tag 5 als Kontrollwert der Gewöhnungsphase jedes einzelnen Versuchstieres für die weiteren Untersuchungen auf dem RotaRod festgelegt. Dadurch war jedes Versuchstier seine eigene Kontrolle (Tab. 2.8.1.3).

Die Veränderung der Laufleistung auf dem RotaRod an den Tagen 6-16 wurde im Vergleich zum Mittelwert aus der Laufleistung der Tage 4 und 5 beurteilt. Der Mittelwert der Laufleistung der Tage 6-16 wurde wiederum als Kontrollwert für die Untersuchungen an Tag 17 verwendet (Tab. 2.8.1.3).

Die Laufleistung der Versuchstiere auf dem RotaRod nach Gabe eines Antipsychotikums an Tag 17 wurde jeweils mit dem Trainings-Kontrollwert (Mittelwert der Laufleistung der Tage 6-16) verglichen (Tab. 2.8.1.3).

Tab 2.8.1.3: Zeitlicher Ablauf der Untersuchungen auf dem RotaRod.

Phase der RotaRod Untersuchungen	Zeitraum	Ermittlung der Kontrollwerte/ Versuchsergebnisse
Gewöhnungsphase	Tag 1- Tag 5	Mittelwert aus Tag 4 und Tag 5 als Kontrollwert für die anschließende Trainingsphase
Trainingsphase	Tag 6- Tag 16	Mittelwert aus Tag 6 bis Tag 16 als Kontrollwert für den Versuch an Tag 17
Untersuchungen zur Wirkung von Antipsychotika	Tag 17	Messung der Laufleistung auf dem RotaRod 0,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 10 h nach Antipsychotika-Injektion

2.8.1.4 Statistische Auswertung der Untersuchungen auf dem RotaRod

Für die statistische Bewertung der Versuchsergebnisse der Untersuchungen auf dem RotaRod wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem t-Test (s. 2.3.4) durchgeführt. Dabei wurden die mit den P-gp Modulatoren behandelten Gruppen mit den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen.

2.8.2 Barnes Maze

Die Barnes Maze ist eine Methode für die Untersuchungen im Bereich Lernen und Gedächtnis. Dieser Test in einer trockenen Umgebung, im Gegensatz zur Morris Water Maze, wurde von Carol Barnes 1979 entwickelt [Barnes (1979)]. Zunächst wurde diese Methode zur Untersuchungen von Ratten verwendet. Später wurden die Einsatzmöglichkeiten dieser Methode auch für andere Nager erweitert. Die Barnes Maze besteht aus einer runden Plattform mit einer verschiedenen Anzahl von Löchern am Rand, unter denen eine Fluchtbox individuell angebracht werden kann. Man nutzt bei diesem Verfahren den Fluchreflex von Nagetieren im offenen Gelände. Es wird die Zeit bestimmt, die das Versuchstier benötigt, um die beschriebene Fluchtbox zu finden. Darüber hinaus kann man bei mehrtägigen Versuchen die Lernleistung bestimmen. Die Maze kann mit einer Vielzahl an Möglichkeiten in ihrer Funktion und im Erscheinungsbild verändert werden [Sunyer et al. (2007)].

2.8.2.1 Aufbau der Barnes Maze

Der Versuchsaufbau bestand aus einer runden, weiß-laminierten Holzscheibe mit einem Durchmesser von 122 cm. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die Maze jedoch rot angestrichen, da die Verwendung von weißen Versuchstieren dies notwendig machte auf Grund des nötigen Kontrastes für die Kameraerkennung. Am Rand dieser Scheibe waren 40 gleich große Löcher mit einem Durchmesser von 5 cm im Abstand von jeweils 9° von der Maze-Mitte zwischen den einzelnen Löchern angebracht (Produktinformation Barnes Maze for Mouse; ENV-562-M; Med Associates Inc.). Jedes der Löcher konnte durch Anbringen einer Box unter der Maze individuell verändert werden. Die Barnes Maze beinhaltete eine schwarze Kunststoffbox (23 x 5 x 3,5 cm), die den Versuchstieren als Zufluchtsort (Fluchtbox) dienen sollte. Diese konnte beliebig unter einem der vorhandenen Löcher angebracht werden (s. 2.8.2.1 C). Der Einstieg in die Box wurde den Tieren durch eine Füllung aus dem, im Tierstall ebenfalls verwendeten Käfigeinstreus erleichtert. Das Loch mit der Fluchtbox sollte von der Maus, vom Zentrum der Maze aus betrachtet, nicht von den restlichen Löcher unterschieden werden können, damit die Maus nicht schon dadurch zum Zufluchtsort geleitet wurde. Die Maze wurde auf einem Gestell 140 cm über dem Boden aufgestellt (Abb. 2.8.2.1 A). Über der Barnes Maze war eine Kamera zur automatischen Aufzeichnung des Versuches angebracht, die mit einem Computer zur Auswertung der Ergebnisse verbunden war. An den, die Maze umgebenden, Wänden wurden optische Hinweise, zur Orientierung der Versuchstiere auf der Maze, angebracht. Ein Ventilator sorgte dafür, dass der Fluchtreflex der Tiere ausgelöst wurde und die Motivation zur Erkundung der Maze gesteigert wurde. Dies war notwendig, damit die Versuchstiere nicht in der Mitte der Maze verharren (Abb. 2.8.2.1 B und Abb. 2.8.2.1 C).



Abb. 2.8.2.1 A: Modell des Aufbaus einer Barnes Maze mit Gestell und Fluchtbox (schwarz) [Quelle: Produktinformation Barnes Maze for Rat; ENV-562-R; Med Associates Inc.; St. Albans (UK)].

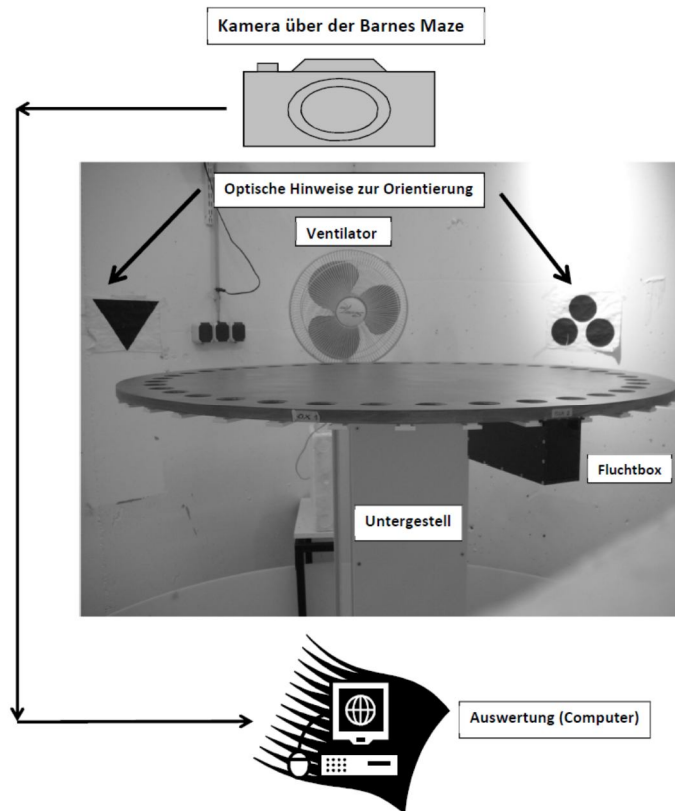


Abb. 2.8.2.1 B: Aufbau der verwendeten Barnes Maze.

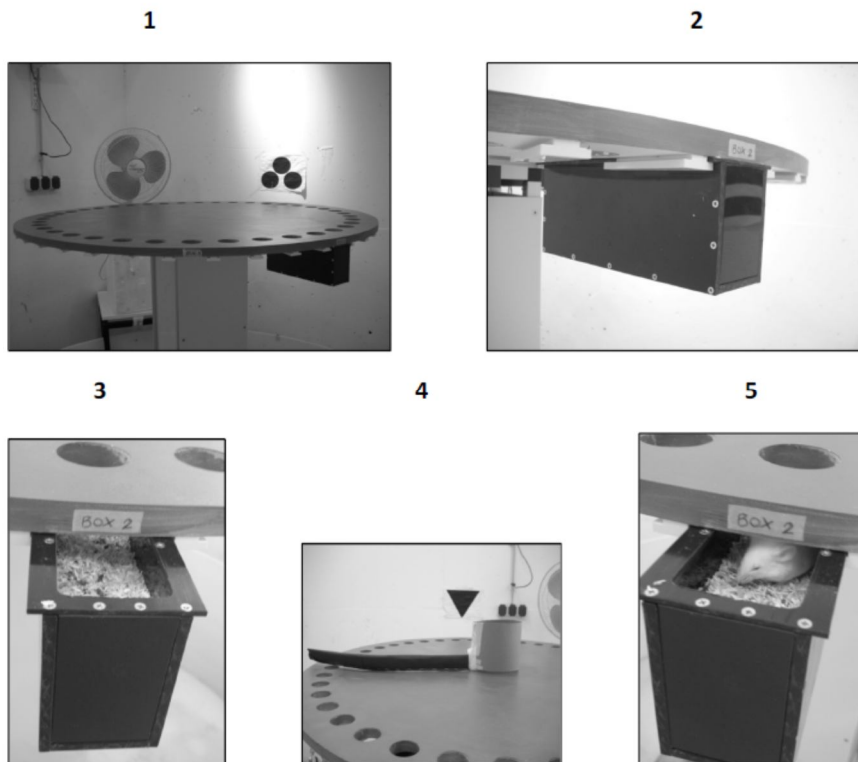


Abb. 2.8.2.1 C: Bilder der verwendeten Barnes Maze und dessen Zubehör [1: Barnes Maze; 2: Fluchtbox; 3: Fluchtbox mit Einstreu; 4: Zylinder zur Platzierung der Versuchstiere in der Maze-Mitte am Startpunkt des Versuchs; 5: Maus in Fluchtbox (nach erfolgtem Versuch)].

2.8.2.2 Durchführung der Barnes Maze Untersuchungen

Der Versuch startete mit einer Gewöhnungsphase der Mäuse an die Maze. Dazu wurden die Tiere in die Fluchtbox der Barnes Maze gesetzt und 2 min dort belassen. Anschließend wurde das Versuchstier mit Hilfe eines Zylinders aus Pappe und einer daran angebrachten Haltestange in die Mitte der Maze gesetzt. Dann wurde die Maus vorsichtig in Richtung Fluchtbox geleitet. Dabei wurde darauf geachtet, das Versuchstier nicht zu stark zu bedrängen. Nach Erreichen der Fluchtbox wurde die Maus dort wiederum für 2 min belassen. Bei der anschließenden Versuchsdurchführung wurde die Maus in die Mitte der Maze gesetzt und das Computerprogramm und die Kameraaufzeichnung vorbereitet. Die Zeit- und Kameradetektion startete jedoch erst, nachdem die Maus eine, im Computerprogramm festgelegte Grenze (etwa in Höhe des halben Maze-Radius) überschritten hatte. Dieses Vorgehen sollte verhindern, dass die durch die Medikation bedingte Verlangsamung der Bewegungsabläufe dazu führte, dass die Maus während des gesamten Versuchsablaufes nur in der Maze-Mitte verblieb. Durch Einführung dieser Grenze wurde also erst dann die Aufzeichnung gestartet wenn die Maus auch wirklich in der Maze aktiv war. Die Maus hatte nach Starten der Aufzeichnung 3 min Zeit, die Fluchtbox zu finden. Nach Erreichen der Fluchtbox durfte die Maus 1 min in der Fluchtbox bleiben bevor der nächste Versuchsdurchgang gestartet wurde. War die Maus nach der angegebenen Zeit nicht erfolgreich wurde sie vom Versuchsleiter zu dem richtigen Loch hingeführt und in die Fluchtbox geleitet, in welcher sie dann 1 min verbleiben durfte (Abb. 2.8.2.2 D). Der Versuch wurde in dieser Weise an 4 aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 4 Durchläufen pro Tag wiederholt (Lernphase). Die 4 Tage der Lernphase waren gleichzeitig die letzten 4 Tage des 11-tägigen Injektionszeitraumes der zu untersuchenden P-gp Modulatoren (Dexamethason und PCN) bzw. deren Kontrollen (Isotonische Kochsalzlösung oder Maisöl). Die Injektionen der P-gp Modulatoren bzw. der Vehikel fand immer am Nachmittag statt, um einen längeren Abstand zu den Injektionen der Antipsychotika am Vormittag zu gewährleisten. Während der Lernphase wurde den Mäusen zusätzlich zu Beginn des Versuches akut Risperidon (0,1 mg/kg), Haloperidol (0,2 mg/kg) oder Placebo (0,5 ml isotonische Kochsalzlösung) i.p. injiziert und der Versuch 30 min nach dieser Injektion gestartet. An Tag 5 war der eigentliche Versuchstag, der aus einem einzigen Durchlauf bestand. An diesem Tag waren die Mäuse völlig unbehandelt. Dieser Versuchstag sollte dazu dienen, beurteilen zu können, inwieweit sich die Versuchstiere an die Lokalisation der Fluchtbox erinnern konnten und welchen Einfluss die jeweilige Vorbehandlung auf das Lernverhalten der Versuchstiere hatte [Sunyer et al. (2007)].

Tab. 2.8.2.2 A: Anzahl der Versuchstiere bei den Untersuchungen in der Barnes Maze zum Einfluss von Risperidon (0,1 mg/kg) oder Haloperidol (0,2 mg/kg) auf die Kognition und das Lernverhalten bei Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Placebo Gruppe (Saline Injektion).

Zeitpunkt	Risperidon 0,1 mg/kg	Haloperidol 0,2 mg/kg	Placebo (Saline 0,5 ml)
Tag 1	n=11	n=12	n=11
Tag 2	n=11	n=12	n=11
Tag 3	n=11	n=12	n=11
Tag 4	n=11	n=12	n=11
Tag 5	n=11	n=12	n=11

Tab. 2.8.2.2 B: Anzahl der Versuchstiere bei den Untersuchungen in der Barnes Maze zum Einfluss der Modulation der P-gp Expression auf die pharmakodynamischen Wirkungen von Risperidon (0,1 mg/kg) bei Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Saline oder Maisöl).

Zeitpunkt	Dexamethason 50 mg/kg/d	Kontrolle (Saline)	PCN 25 mg/kg/d	Kontrolle (Maisöl)
Tag 1	n=12	n=12	n=12	n=12
Tag 2	n=12	n=12	n=12	n=12
Tag 3	n=12	n=12	n=12	n=12
Tag 4	n=12	n=12	n=12	n=12
Tag 5	n=12	n=12	n=12	n=12

Tab. 2.8.2.2 C: Anzahl der Versuchstiere bei den Untersuchungen in der Barnes Maze zum Einfluss der Modulation der P-gp Expression auf die pharmakodynamischen Wirkungen von Haloperidol (0,2 mg/kg) bei Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Saline oder Maisöl).

Zeitpunkt	Dexamethason 50 mg/kg/d	Kontrolle (Saline)	PCN 25 mg/kg/d	Kontrolle (Maisöl)
Tag 1	n=12	n=10	n=11	n=12
Tag 2	n=12	n=10	n=11	n=12
Tag 3	n=12	n=10	n=11	n=12
Tag 4	n=12	n=10	n=11	n=12
Tag 5	n=12	n=10	n=11	n=12

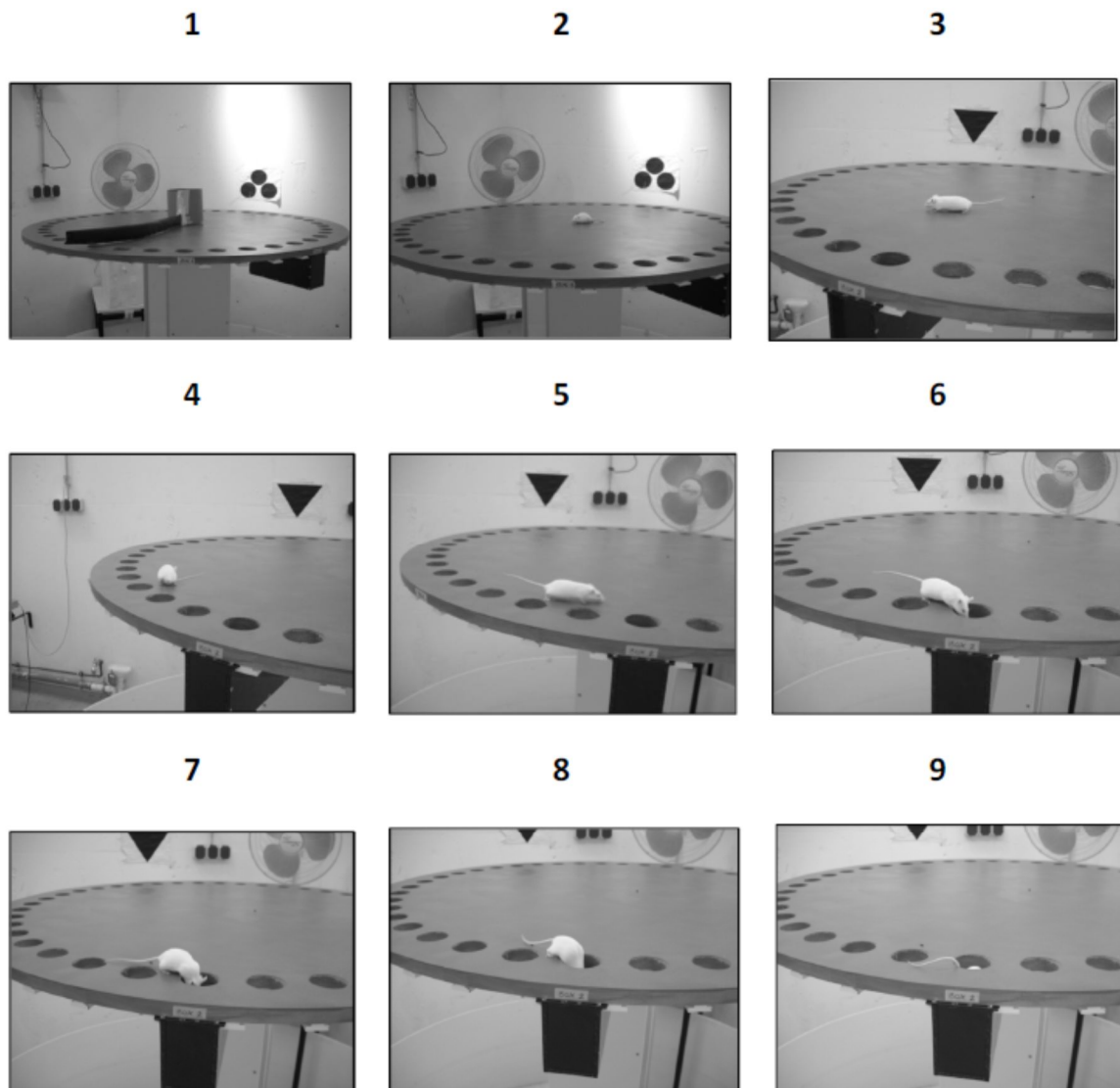


Abb. 2.8.2.2 D: Ablauf eines Versuches in der Barnes Maze [1: Startposition (Das Versuchstier befindet sich in einem Zylinder aus Pappe mit Haltegriff in der Mitte der Maze); 2: Der Zylinder wird angehoben, der Versuch beginnt; 3: Die Maus überschreitet den Startpunkt, etwa auf Höhe des halben Maze-Radius, für die automatische Aufzeichnung des Versuches durch eine Kamera; 4 und 5: Die Maus beginnt die Maze zu erkunden und die Fluchtbox zu suchen; 6: Das Versuchstier hat die Fluchtbox erreicht; 7: Die Maus hat die Fluchtbox erkannt; 8: Die Maus geht in die Fluchtbox hinein; 9: Die Maus verbleibt nach erfolgreichem Test für 1 min in der Fluchtbox].

2.8.2.3 Auswertung der Barnes Maze Untersuchungen

Zur Bewertung der Effekte der P-gp Modulatoren und der Antipsychotika auf das Lernverhalten der Versuchstiere wurde während der einzelnen Versuchsdurchgänge die Fehlerhäufigkeit (Aufsuchen eines Lochs ohne Fluchtbox) manuell erfasst, während die gelaufene Strecke und die Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox durch die über der Barnes Maze angebrachte Kamera und der Software des angeschlossenen Computers erfolgte (s. 2.3.2). Als Fehler galt generell das Aufsuchen eines falschen

Loches. blieb die Maus längere Zeit an einem falschen Loch und schaute mehrmals hinein, so galt dies als ein Fehler. Ebenso wurde die Geschwindigkeit der Versuchstiere in der Barnes Maze berechnet. Zur deskriptiven Darstellung des Lerneffektes der Versuchstiere wurde darüber hinaus die Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox an Tag 1 (Beginn der Lernphase) mit der Latenz von Tag 4 (Ende der Lernphase) verglichen.

2.8.2.4 Statistische Auswertung der Barnes Maze Untersuchungen

Für die statistische Bewertung der Versuchsergebnisse der Barnes Maze Untersuchungen wurde eine ANOVA-Analyse mit anschließendem t-Test (s. 2.3.4) durchgeführt. Dabei wurden die, mit den P-gp Modulatoren, vorbehandelten Gruppen mit den jeweiligen Kontrollgruppen unter Risperidon- bzw. Haloperidol-Gabe verglichen. Ebenso wurden zur Beurteilung der reinen Antipsychotika-Effekte gegenüber Placebo Versuchstiere ohne weitere Vorbehandlung miteinander verglichen.

2.9 Untersuchungen zur Hirngängigkeit von Acitretin

2.9.1 Verteilung von Acitretin in Gehirn und Serum von P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Mäusen

Nach erfolgter Etablierung und Validierung einer geeigneten HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben (s. Ergebnisse 3.3.1) wurde die Verteilung von Acitretin in Hirngewebe- und Serumproben von WT und P-gp KO Mäusen untersucht. Für die Bestimmung der Hirngängigkeit und den P-gp Substrateigenschaften von Acitretin wurde die Verteilung von Acitretin in Gehirnhomogenaten und Serum im Tierversuch untersucht (Anzahl der Versuchstiere s. Ergebnisse). Dazu wurden die Tiere vom Stamm FVB/N (WT Mäuse) und P-gp doppel KO Mäuse (abcb1a/1b -/-; FVB/N Hintergrund) akut mit 5 mg/kg Acitretin behandelt. Die Injektion von Acitretin erfolgte i.p. nach vorheriger Betäubung mit Isofluran. 1 h, 3 h und 6 h nach Acitretin Injektion wurden Hirngewebe- und Serumproben entnommen (s. 2.7.1 und 2.7.2) und mit der HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben bestimmt (s. 2.9.1). Die Ergebnisse von WT und P-gp doppel knockout Mäusen wurden miteinander verglichen. Neben der Bestimmung der absoluten Konzentration von Acitretin in Gehirnhomogenaten und Serum, wurde auch das Gehirn/ Serum Verhältnis bestimmt.

Tab. 2.9.1: Anzahl der Versuchstiere bei den pharmakokinetischen Untersuchungen zum Einfluss von P-gp auf die Verteilung von Acitretin (5 mg/kg/d) im Hirngewebe und Serum im Vergleich von Wildtyp (WT) Mäusen mit P-gp doppel knockout (KO) Mäusen.

Zeitpunkt nach Acitretin-Injektion	Acitretin (WT) 5 mg/kg/d	Acitretin (KO) 5 mg/kg/d
1 h	n=5	n=5
3 h	n=5	n=4
6 h	n=5	n=4

2.10 Biochemische Untersuchungen

2.10.1 Western Blot Analysen

Die Western Blot Technik wurde zur Identifizierung von Proteinen durch spezifische Antikörper entwickelt. Dazu müssen die Proteine zunächst mit Hilfe der Gelelektrophorese, abhängig von ihrer Molekülgröße [bei Verwendung eines Natrium-Dodecylsulfat-Gels (SDS) Gel], getrennt werden. Anschließend werden die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Membran [meist Nitrocellulose (NC) oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)] adhärent übertragen. Nach dem Blocken der freien Bindestellen der Membran kann diese mit dem spezifischen Primärantikörper inkubiert werden und nach anschließender Inkubation mit einem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper und des entsprechenden Substrates entwickelt und die Proteinmenge analysiert werden.

2.10.2 Durchführung der Western Blot Analysen

Die Durchführung der Western Blot Analysen unter Verwendung einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese verlief nach folgendem Schema.

- 1.) **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:** -Trennen der Proteine-
Trenn- und Sammelgel wurden gegossen (Tab. 2.10.2 A), die vorbereiteten Proben mit der gewünschten Proteinkonzentration mit Hilfe eines Auftragepuffers in die verschiedenen Geltaschen aufgetragen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Elektrophorese-Puffer

aufgetrennt. Dieser Puffer wurde unter Verwendung von Reinstwasser und der folgenden Chemikalien hergestellt:

Chemikalien	Konzentration
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (m/V)

Bei 25-30 A (Sammelgel) bzw. 30-40 A (Trenngel) wurde die Elektrophorese über einen Zeitraum von ca. 1,5 -2 h durchgeführt.

2.) **Tank Blot:** -Überführung der Proteine auf eine Membran-

Die Membran wurde für das jeweilige Gel passend zugeschnitten. Das Gel, die Membran, Filtervliese und Füllstoff für den Proteintransfer wurden in Blot-Puffer gelegt und getränkt. Dann wurde ein „Sandwich“ aus Füllstoff-Filtervlies-Membran-Gel-Filtervlies-Füllstoff hergestellt und in die Elektrophorese Kammer eingelegt.

Bei 100 V wurde der Proteintransfer über ca. 2 h durchgeführt.

Der Blot-Puffer wurde unter Verwendung von Reinstwasser und der folgenden Chemikalien hergestellt:

Chemikalien	Konzentration
TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (m/V)
Methanol	20 % (V/V)

3.) **Blocken:** -Absättigung der freien Bindungsstellen der Membran-

Dazu wurden verschiedene Blocklösungen (I-Block oder 5 % Milchpulver in TBST 0,05 %) verwendet.

Die Membran wurde für 1 h oder über Nacht mit der Blocklösung inkubiert (Tab. 2.10.2 B).

4.) **Primärantikörper:** -Bindung an das Zielprotein-

Der Primärantikörper wurde in PBST 0,05 %, TBST 0,05 % oder Blocklösung bis zur notwendigen Konzentration verdünnt. Die Membran wurde über Nacht oder über 2 h mit dem Primärantikörper inkubiert (Tab. 2.10.2 B).

5.) **Waschen:** -Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers-

Die Membran wurde fünfmal für 5 min mit PBST 0,05 % auf dem Orbitalschüttler gewaschen.

6.) **Sekundärantikörper:** -Detektion des Zielproteins-

Der Sekundärantikörper wurde in PBST 0,05 % bis zur notwendigen Konzentration verdünnt und anschließend mit der Membran 1 h inkubiert (s. Tab. 2.10.2 B).

7.) **Waschen:** -Entfernung des überschüssigen Sekundärantikörpers-

Die Membran wurde fünfmal für 5 min mit PBST 0,05 % auf dem Orbitalschüttler gewaschen.

8.) **Entwicklung:** -Chemilumineszenz-Reaktion zur Detektion-

Für eine Membran wurde 1 ml des Zwei-Komponenten-Substrates SuperSignal (1:1) angesetzt, für 5 min unter ständiger Bewegung inkubiert und anschließend mit der CCD-Kamera entwickelt.

Tab. 2.10.2 A: Zusammensetzung des verwendeten Sammel-/ Trenngels für die Elektrophorese.

Sammelgel (5 %)		Trenngel (8 %)	
Acrylamid (37,5:1)	0,5 ml	Acrylamid (37,5:1)	1,3 ml
0,5 M TRIS (pH 6,8)	0,75 ml	3,0 M TRIS (pH 8,8)	0,625 ml
SDS (10 %)	0,03 ml	SDS (10 %)	0,05 ml
Reinstwasser	1,72 ml	Reinstwasser	3,025 ml
TEMED	3 µl	TEMED	5 µl
APS (10 %)	15 µl	APS	25 µl

Tab. 2.10.2 B: Blocklösungen und Verdünnungen für die verwendeten Antikörper.

Antikörper	Blocklösung (Inkubationszeit)	Verdünnung (Inkubationszeit)	Verdünnungs- lösung
Antikörper ADAM10	I-Block (1 h)	1:1000 (über Nacht)	I-Block
Antikörper Aktin	I-Block (1 h)	1:1000 (über Nacht)	I-Block
Antikörper APP α	I-Block (1 h)	1:5000 (über Nacht)	PBST 0,05 %
Antikörper CD61	I-Block (1 h)	1:1000 (über Nacht)	I-Block
Antikörper GAPDH	I-Block (1 h)	1:1000 (über Nacht)	PBST 0,05 %
Antikörper P-gp	Milch 5 % in TBST 0,05 % (über Nacht)	1:200 (2 h)	TBST 0,05 %
Sekundärantikörper	---	1:3000 (1 h)	PBST 0,05 %

2.10.3 Vorbereitung der Proben für die Western Blot Analysen

Für die Western Blot Analysen mussten die benötigten Protein-Fractionen aus Gewebeproben (Hirngewebe/ Blut) der Versuchstiere gewonnen werden. Für die Protein-Analysen des Hirngewebes zur Expression von P-gp wurde die Protein-Fraktion der membranständigen Proteine benötigt und für die Analyse der APP α Menge und der ADAM10 Expression im Hirngewebe wurde die Protein-Fraktion der löslichen Proteine der Hirngewebehomogenate (s. 2.10.3.1) benötigt.

Für die Analyse der ADAM10 Expression in Thrombozyten mussten die gewonnenen Blutproben der Versuchstiere aufbereitet werden (s. 2.10.3.2).

2.10.3.1 Aufbereitung von Maus-Hirn-Fractionen

Die Gehirne der Versuchstiere lagen nach Präparation (s. 2.7.1) als Hirnhemisphären vor. Das Cerebellum wurde entfernt, da die Expression der Zielproteine dort nur gering ist und durch dieses Gewebe die Konzentration der Zielproteine durch die Gewebekomogenisierung nur unnötig verringert worden wäre. Die Hirnhälften wurde bei -80°C tiefgefroren und bis zur weiteren Aufbereitung für die Western Blot Analysen gelagert.

Für die Aufbereitung der Hirnhälften wurden diese in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in 450 μ l eiskaltem Homogenisierungspuffer (20 mM TRIS-HCl; pH: 8,5; 1 Protease Inhibitor Tablette pro 7 ml TBS-Pufferlösung) unter Zugabe einer vorgekühlten Stahlkugel mit dem Tissue lyzer (2 min

bei 50 Hz) homogenisiert. Nach dem Homogenisieren wurde das erhaltene Homogenat in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und das Homogenisierungsgefäß mit 525 µl des Homogenisierungspuffers (s.o.) nachgespült. Ein Aliquot von 250 µl des jeweils dabei erhaltenen Homogenates (Gesamtvolumen: 975 µl) wurde in ein Ultrazentrifugen-Gefäß pipettiert und bei 135.000 g für 1,75 h bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Fraktion der löslichen Proteine) wurde abgenommen und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde mit Hilfe einer 1 ml Spritze und einer 26 G Kanüle unter Verwendung von 500 µl eiskaltem TBS Puffer (1,5 mM NaCl/ 0,5 M TRIS; pH: 7,4; 1 Protease Inhibitor Tablette pro 7 ml TBS Puffer) homogenisiert. Das erhaltene Homogenat (Fraktion der membranständigen Proteine) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.10.3.2 Isolierung von Thrombozyten aus Maus-Blut-Proben

Die Arbeitsschritte zur Isolierung von Thrombozyten aus Maus-Hirn-Proben wurden nach dem Protokoll von Colciaghi et al. (2002) modifiziert und angepasst. Thrombozyten enthalten über 95 % des peripher zirkulierenden Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) und stellen einen leicht zugänglichen Surrogatparameter dar [Di Luca et al. (1998)]. Die Funktion in Thrombozyten ist nicht geklärt, jedoch wird eine Beteiligung an der Blutgerinnung diskutiert [Borroni et al. (2010)]. Die benötigten Blutproben für die Isolierung der Thrombozyten wurden nach Dekapitierung der Versuchstiere in einem Eppendorf- Gefäß (2 ml Volumen) unter Zusatz von 75 µl Citrat Lösung (aus Citrat-S-Monovetten) gewonnen. Die Blutproben wurden gut mit der Citratlösung vermischt, um zu verhindern, dass die Blutgerinnung einsetzt. Das Blut wurde zügig weiter verarbeitet, um eine Degradation von Proteinen bzw. eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Die Isolierung der Thrombozyten erfolgte aus dem sog. „Platelet-rich-Plasma“ (PRP). Dazu wurde die Blutprobe für 10 min bei 200 g (1000 U/min) und RT (20°C) in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Plasma wurde mit Hilfe einer Zellkultur-Pasteurpipette abgenommen und hineingefüllt. Dabei sollte darauf geachtet werden, den „buffy coat“ nicht zu aspirieren. Dann wurde erneut in der Tischzentrifuge zentrifugiert [20 min; 1200 g (3600 U/min); RT (20°C)]. Das erhaltene Pellet wurde mit 0,5 ml Puffer A (Tab. 2.10.3.2) bei RT gewaschen und anschließend wurde wiederum zentrifugiert [10 min; 1200 g (3600 U/min); RT (20°C)]. Das erhaltene Pellet wurde erneut mit 0,5 ml Puffer A bei RT gewaschen. Das in einem letzten Zentrifugationsschritt (15 min bei 3000 g bei einer Temperatur von 4°C] gebildete Pellet wurde in 10 µl Puffer B (4°C) resuspendiert und auf Eis gelagert. Diese Suspension wurde bei -80°C eingefroren. Diese Suspension wurde für die Bestimmung der ADAM10 Expression mit Hilfe der Western Blot Technik verwendet und bei der SDS-Gelelektrophorese aufgetragen. Bei diesen Proben wurde vor dem Auftragen für die Gelelektrophorese keine Proteinbestimmung mehr durchgeführt, da die Menge der erhaltenen Suspension zu gering war. Zur Sicherstellung des Vergleiches gleicher

Mengen Protein wurde bei der Auswertung der Western Blot Ergebnisse auf die CD61 Menge normiert (Auftragekontrolle).

Tab. 2.10.3.2: Übersicht der Pufferlösungen für die Isolierung von Thrombozyten aus Maus-Blut-Proben.

Pufferlösung	Zusammensetzung
Protease Inhibitor Mix (7x)	1 Tablette Inhibitor complete mini (Roche) in 1,5 ml Reinstwasser lösen
Stocklösung EGTA	0,4 M EGTA in Reinstwasser
Stocklösung PMSF	10 mM PMSF in Isopropanol
Puffer A (Waschpuffer)	10 mM TRIS (pH: 7,4 mit HCl einstellen) in Reinstwasser (steril filtriert)
Puffer B (Lysispuffer)	1 mM EGTA und 0,1 mM PMSF in 10 mM TRIS-HCl; pH: 7,4 (steril filtriert) <u>Herstellung:</u> Pro ml 10 mM TRIS-HCl Lösung werden 143 µl Protease Inhibitor Mix, 2,5 µl Stocklösung EGTA und 1 µl Stocklösung PMSF zugegeben

2.10.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration in den Protein-Fractionen der Hirngewebeproben zu ermitteln, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Fraktionen löslicher Proteine (s. 2.10.3.1) im Verhältnis 1:20 und die Membranfraktionen (s. 2.10.3.1) im Verhältnis 1:50 mit Reinstwasser verdünnt. Dann wurden in einer 96-well Platte zu jeweils 10 µl Probe (lösliche Proteinfraktionen bzw. Membranfraktionen) 10 µl Ameisensäure zugegeben und anschließend 20 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Bradford Reagenz (1 Teil des Reagenz Konzentrats wurde zuvor mit 4 Teilen Reinstwasser verdünnt) wurde erneut für 30 min inkubiert. Im Anschluss daran wurde im Platten-Lesegerät bei 595 nm die Extinktion der Proben gemessen. Gleichzeitig wurde auf der Platte eine Kalibrationsreihe mit BSA (s. Tab. 2.10.4) in einer Vierfachbestimmung angesetzt und gemessen. Die ermittelten Mittelwerte der Vierfachbestimmung wurden in Microsoft Office Excel

Version 2003 [Microsoft Deutschland GmbH; Unterschleißheim (Deutschland)] eingetragen. Die erhaltene Geradengleichung wurde als Grundlage für die Bestimmung der Proteinmenge verwendet. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen und der Mittelwert der Proben und Standards zur Auswertung herangezogen. Für die Western Blot Untersuchungen zur P-gp Expression und der ADAM10 Expression im Hirngewebe wurde von jeder Probe (Fraktion der membranständigen Proteine) 60 µg Protein aufgetragen. Zur Bestimmung der APPs α Expression wurde von jeder Probe (Fraktion löslicher Proteine) 30 µg Protein aufgetragen. Die Proben zur Bestimmung der ADAM10 Expression in Thrombozyten wurden auf Grund des geringen Probenvolumens ohne vorherige Proteinbestimmung aufgetragen (s. 2.10.3.2).

Tab. 2.10.4: Kalibrationsreihe und Verdünnungen für die Proteinbestimmung nach Bradford.

<u>BSA Stammlösung [µl]</u> (Konzentration: 0,5 µg BSA/ ml)	<u>Reinstwasser [µl]</u>	<u>Ameisensäure [µl]</u>	Gesamtvolumen jeweils 20 µl
0 µl (entspricht 0 µg)	10 µl	10 µl	
2 µl (entspricht 1 µg)	8 µl	10 µl	
4 µl (entspricht 2 µg)	6 µl	10 µl	
6 µl (entspricht 3 µg)	4 µl	10 µl	
8 µl (entspricht 4 µg)	2 µl	10 µl	
10 µl (entspricht 5 µg)	0 µl	10 µl	

2.10.5 Auswertung der Western Blot Analysen

Die Western Blot Analysen wurden mit Hilfe der CCD-Kamera Stella und der Software AIDA image analyzer 4.26 (s. 2.3.3) durch Messung der Lichtemission und anschließender Grauwertanalyse ausgewertet.

2.10.6 Statistische Auswertung der Western Blot Analysen

Zur statistischen Beurteilung der biochemischen Untersuchungen wurden die Ergebnisse der Western Blot Analysen der einzelnen Behandlungsgruppen im Statistikprogramm SPSS (s. 2.3.4) verglichen. Zunächst wurde ein Test auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) durchgeführt. Für den anschließenden Test auf statistische Signifikanz wurde entsprechend des Ergebnisses des Shapiro-Wilk-Tests entweder der Student's t-test oder der Mann-Whitney U-Test verwendet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

2.10.7 Western Blot Analyse der P-gp Expression

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener P-gp Modulatoren (Dexamethason oder PCN) bzw. der Kontrollen (Isotonische Kochsalzlösung oder Maisöl) auf die P-gp Expression wurden die Versuchstiere (WT Mäuse, FVB/N Stamm) über einen Zeitraum von 11 Tagen mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d PCN oder Vehikel (0,5 ml/d isotonische Kochsalzlösung oder 3,33 ml/kg/d Maisöl) behandelt. An Tag 12 erfolgte die Präparation des Gehirns (s. 2.7.1) und die Aufbereitung der Maus-Hirn-Proben für die Western Blot Untersuchungen (s. 2.10.3.1).

Tab. 2.10.7: Anzahl der Versuchstiere für die Western Blot Untersuchungen bzw. der Grauwertanalyse der P-gp Expression im Hirngewebe von Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) oder Vehikel (Kontrolle).

Dexamethason 50 mg/kg/d	Kontrolle (Saline)	PCN 25 mg/kg/d	Kontrolle (Maisöl)
n=5	n=5	n=5	n=5

2.10.8 Western Blot Analyse der ADAM10 Expression

Bei den Untersuchungen zur ADAM10 Expression wurden die Versuchstiere [Wildtyp (WT) Mäuse; FVB/N Stamm bzw. P-gp doppel knockout (KO) Mäuse; FVB/N Hintergrund) für den Zeitraum von 4 Tagen mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (3,33 ml/kg/d Maisöl) behandelt. An Tag 5 wurden die benötigten Hirngewebe-/ Blutproben präpariert und gesammelt (s. 2.7.1) und für die weiteren Western Blot Untersuchungen weiter aufgearbeitet (s. 2.10. 3.1 und 2.10.3.2). Die ADAM10 Expression wurde in Thrombozyten und Hirngewebe (Fraktion der membranständigen Proteine) bestimmt.

Tab. 2.10.8 A: Anzahl der Versuchstiere für die Western Blot Untersuchungen und Grauwertanalyse der ADAM10 Expression in Thrombozyten von Wildtyp (WT) oder P-gp doppel knockout (KO) Mäusen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle).

Acitretin WT 5 mg/kg/d	Kontrolle WT (Maisöl)	Acitretin KO 5 mg/kg/d	Kontrolle KO (Maisöl)
n=5	n=4	n=5	n=4

Tab. 2.10.8 B: Anzahl der Versuchstiere für die Western Blot Untersuchungen und Grauwertanalyse der ADAM10 Expression im Hirngewebe von Wildtyp (WT) oder P-gp doppel knockout (KO) Mäusen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle).

Acitretin WT 5 mg/kg/d	Kontrolle WT (Maisöl)	Acitretin KO 5 mg/kg/d	Kontrolle KO (Maisöl)
n=5	n=5	n=5	n=5

2.10.9 Western Blot Analyse der APPs α Sekretion

Für die Analyse der APPs α Sekretion wurden die löslichen Protein-Fractionen der Hirngewebeproben aus der Untersuchungen zur ADAM10 Expression (s. 2.10.7) verwendet.

Tab. 2.10.9: Anzahl der Versuchstiere für die Western Blot Untersuchungen bzw. der Grauwertanalyse der APPs α Sekretion im Hirngewebe von Wildtyp (WT) oder P-gp doppel knockout (KO) Mäusen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle).

Acitretin WT 5 mg/kg/d	Kontrolle WT (Maisöl)	Acitretin KO 5 mg/kg/d	Kontrolle KO (Maisöl)
n=5	n=5	n=5	n=5

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur veränderten Verteilung von Antipsychotika in Gehirn/ Serum

3.1.1 Charakterisierung verschiedener P-gp Modulatoren (Vorversuch)

Im Vorversuch sollten die verschiedenen potenziellen P-gp Modulatoren (Rifampicin, Dexamethason, PCN, Acitretin und Quercetin) auf ihren Einfluss auf den P-gp abhängigen Transport von Risperidon und seines aktiven Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon untersucht werden. Nach Verabreichung der P-gp Modulatoren bzw. dem Vehikel als Kontrolle über 4 bzw. 11 Tage wurde Risperidon (3 mg/kg) injiziert und 1 h, 3 h und 6 h nach Injektion wurden Serum-/ und Hirngewebeproben entnommen. Unter Verwendung einer HPLC-Methode wurden die Konzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon bestimmt. Die Ergebnisse nach Verabreichung der P-gp Modulatoren wurden mit den Kontrollen verglichen, um einen möglichen Effekt auf die Verteilung von Risperidon und seines aktiven Metaboliten als Maß für die Wirkung der Modulatoren und eine funktionelle Konsequenz zu belegen. Die Ergebnisse des Vorversuches sollten dazu dienen, die P-gp Modulatoren mit dem größten Interaktionspotential zu identifizieren. Diese sollten dann in den weiteren Untersuchungen dieser Arbeit verwendet werden.

Tab. 3.1.1 A: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe im Hirngewebe von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 4-tägiger Behandlung. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Rifa=Rifampicin; Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; Aci=Acitretin; Quer0,1=Quercetin 0,1 mg/kg; Quer1,0=Quercetin 1,0 mg/kg].

Gehirn	Risperidon-Konzentration [ng/g]			9-Hydroxyrisperidon-Konzentration [ng/g]			Aktive Summe [ng/g]		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
Rifa	38 +/- 4 [0,029]	5 +/- 1 [0,016]	0	13 +/- 1 [0,859]	6 +/- 1 [0,016]	4 +/- 1 [0,030]	51 +/- 5 [0,038]	10 +/- 1 [0,016]	4 +/- 1 [0,030]
Dexa	42 +/- 8 [0,039]	5 +/- 1 [0,008]	0	12 +/- 1 [0,491]	6 +/- 1 [0,008]	0	54 +/- 8 [0,046]	11 +/- 1 [0,003]	0
Kontrolle (Saline)	73 +/- 11	15 +/- 3	0	14 +/- 2	27 +/- 2	0	87 +/- 12	42 +/- 5	0
PCN	55 +/- 4 [0,017]	0 [0,001]	0	19 +/- 1 [0,113]	0 [0,008]	0 [0,310]	74 +/- 5 [0,085]	0 [0,008]	0 [0,075]
Aci	105 +/- 5 [0,023]	18 +/- 3 [0,777]	0 [0,413]	24 +/- 3 [0,017]	25 +/- 4 [0,222]	13 +/- 1 [0,556]	129 +/- 6 [0,014]	42 +/- 7 [0,421]	13 +/- 1 [0,730]
Kontrolle (Maisöl)	80 +/- 7	19 +/- 2	3 +/- 2	14 +/- 2	20 +/- 1	8 +/- 3	94 +/- 9	39 +/- 3	11 +/- 5
Quer0,1	56 +/- 6 [0,055]	19 +/- 1 [0,016]	0	15 +/- 1 [0,167]	16 +/- 3 [0,776]	0	71 +/- 7 [0,151]	35 +/- 3 [0,008]	0
Quer1,0	57 +/- 2 [0,038]	11 +/- 2 [1,000]	0	18 +/- 2 [0,025]	18 +/- 1 [0,042]	0	76 +/- 4 [0,177]	29 +/- 2 [0,159]	0
Kontrolle (Propandiol)	76 +/- 6	10 +/- 1	0	13 +/- 1	15 +/- 1	0	88 +/- 7	25 +/- 1	0

Tab. 3.1.1 B: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe im Serum von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 4-tägiger Behandlung. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Rifa=Rifampicin; Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; Aci=Acitretin; Quer0,1=Quercetin 0,1 mg/kg; Quer1,0=Quercetin 1,0 mg/kg].

Gehirn	Risperidon-Konzentration [ng/g]			9-Hydroxyrisperidon-Konzentration [ng/g]			Aktive Summe [ng/g]		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
Rifa	346 +/- 41 [0,369]	53 +/- 10 [0,585]	8 +/- 3 [0,730]	163 +/- 20 [0,059]	192 +/- 35 [0,167]	107 +/- 45 [0,217]	509 +/- 60 [0,219]	245 +/- 44 [0,081]	114 +/- 48 [0,247]
Dexa	254 +/- 24 [0,501]	12 +/- 2 [0,007]	2 +/- 1 [0,005]	150 +/- 11 [0,039]	79 +/- 6 [0,009]	23 +/- 11 [0,027]	404 +/- 32 [0,935]	91 +/- 7 [0,002]	25 +/- 4 [0,018]
Kontrolle (Saline)	288 +/- 46	46 +/- 7	8 +/- 1	111 +/- 12	119 +/- 10	51 +/- 9	398 +/- 57	165 +/- 16	60 +/- 9
PCN	194 +/- 9 [<0,001]	6 +/- 2 [<0,001]	0 [0,008]	241 +/- 19 [0,174]	50 +/- 17 [<0,001]	24 +/- 8 [0,004]	434 +/- 25 [0,032]	55 +/- 18 [<0,001]	24 +/- 7 [0,002]
Aci	346 +/- 14 [0,363]	63 +/- 13 [0,659]	12 +/- 4 [0,893]	260 +/- 14 [0,019]	157 +/- 25 [0,654]	83 +/- 21 [0,556]	605 +/- 16 [0,031]	220 +/- 37 [0,646]	95 +/- 25 [0,556]
Kontrolle (Maisöl)	323 +/- 20	57 +/- 4	12 +/- 2	206 +/- 10	146 +/- 6	88 +/- 10	529 +/- 25	202 +/- 8	100 +/- 13
Quer0,1	228 +/- 16 [0,003]	70 +/- 12 [0,988]	2 +/- 1 [0,071]	183 +/- 8 [0,265]	148 +/- 9 [0,413]	41 +/- 5 [0,250]	411 +/- 23 [0,006]	218 +/- 10 [0,730]	43 +/- 5 [0,494]
Quer1,0	265 +/- 8 [0,016]	61 +/- 7 [0,552]	10 +/- 4 [1,000]	222 +/- 12 [0,116]	158 +/- 16 [0,413]	68 +/- 13 [0,222]	487 +/- 12 [0,096]	219 +/- 23 [0,774]	78 +/- 16 [0,299]
Kontrolle (Propandiol)	363 +/- 27	71 +/- 12	12 +/- 5	196 +/- 8	139 +/- 9	43 +/- 14	559 +/- 33	209 +/- 21	55 +/- 13

Tab. 3.1.1 C: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe im Hirngewebe von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 11-tägiger Behandlung. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Rifa=Rifampicin; Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; Aci=Acitretin; Quer0,1=Quercetin 0,1 mg/kg; Quer1,0=Quercetin 1,0 mg/kg].

Gehirn	Risperidon-Konzentration [ng/g]			9-Hydroxyrisperidon-Konzentration [ng/g]			Aktive Summe [ng/g]		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
Rifa	33 +/- 5 [0,009]	0 [<0,001]	---	0 [0,001]	0 [0,001]	---	33 +/- 5 [0,003]	0 [0,001]	---
Dexa	21 +/- 2 [0,003]	0 [<0,001]	0	17 +/- 2 [0,195]	0 [0,001]	0	38 +/- 3 [0,010]	0 [0,001]	0
Kontrolle (Saline)	73 +/- 11	11 +/- 1	0	13 +/- 2	16 +/- 2	0	86 +/- 12	26 +/- 3	0
PCN	38 +/- 1 [0,001]	0 [<0,001]	0	18 +/- 1 [<0,001]	0 [<0,001]	0	56 +/- 2 [<0,001]	0 [<0,001]	0
Aci	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Kontrolle (Maisöl)	85 +/- 7	19 +/- 1	0	38 +/- 2	42 +/- 3	0	123 +/- 9	61 +/- 3	0
Quer0,1	92 +/- 8 [0,323]	24 +/- 2 [0,199]	0	35 +/- 3 [0,002]	27 +/- 2 [0,002]	0	128 +/- 11 [0,165]	51 +/- 2 [0,005]	0
Quer1,0	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Kontrolle (Propandiol)	76 +/- 13	20 +/- 3	0	13 +/- 4	16 +/- 1	0	89 +/- 17	36 +/- 3	0

Tab. 3.1.1 D: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe im Serum von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 11-tägiger Behandlung. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Rifa=Rifampicin; Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; Aci=Acitretin; Quer0,1=Quercetin 0,1 mg/kg; Quer1,0=Quercetin 1,0 mg/kg].

Gehirn	Risperidon-Konzentration [ng/g]			9-Hydroxyrisperidon-Konzentration [ng/g]			Aktive Summe [ng/g]		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
Rifa	230 +/- 33 [0,071]	39 +/- 4 [0,043]	---	166 +/- 11 [0,146]	120 +/- 14 [0,323]	---	396 +/- 42 [0,071]	159 +/- 18 [0,138]	---
Dexa	116 +/- 10 [0,016]	3 +/- 1 [0,002]	1 +/- 1 [0,099]	176 +/- 9 [0,288]	54 +/- 7 [0,001]	7 +/- 3 [0,038]	292 +/- 16 [<0,001]	58 +/- 8 [<0,001]	8 +/- 4 [0,045]
Kontrolle (Saline)	311 +/- 6	65 +/- 9	10 +/- 5	192 +/- 11	142 +/- 15	79 +/- 21	503 +/- 17	207 +/- 21	90 +/- 25
PCN	109 +/- 8 [<0,001]	13 +/- 1 [<0,001]	1 +/- 1 [0,362]	184 +/- 5 [<0,001]	77 +/- 5 [<0,001]	18 +/- 6 [0,368]	294 +/- 12 [<0,001]	91 +/- 6 [0,008]	19 +/- 7 [0,356]
Aci	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Kontrolle (Maisöl)	443 +/- 19	89 +/- 4	9 +/- 7	292 +/- 10	186 +/- 10	40 +/- 21	735 +/- 29	275 +/- 12	49 +/- 28
Quer0,1	275 +/- 29 [0,355]	78 +/- 6 [0,095]	2 +/- 1 [0,095]	180 +/- 17 [0,095]	146 +/- 19 [0,453]	15 +/- 6 [0,222]	454 +/- 45 [0,151]	223 +/- 19 [0,177]	18 +/- 7 [0,222]
Quer1,0	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Kontrolle (Propandiol)	226 +/- 41	59 +/- 7	4 +/- 1	145 +/- 27	128 +/- 11	30 +/- 6	371 +/- 67	187 +/- 15	34 +/- 7

Tab. 3.1.1 E: Statistische Bewertung der Gehirn/ Serum Verhältnisse von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe bei Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden die Signifikanz (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 4-tägiger Behandlung. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Rifa=Rifampicin; Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; Aci=Acitretin; Quer0,1=Quercetin 0,1 mg/kg; Quer1,0=Quercetin 1,0 mg/kg].

Modulator	Gehirn/ Serum Verhältnis Risperidon			Gehirn/ Serum Verhältnis 9-Hydroxyrisperidon			Gehirn/ Serum Verhältnis Aktive Summe		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
Rifa	<0,001	<0,001	---	0,136	<0,001	0,067	<0,001	<0,001	0,030
Dexa	0,008	0,084	---	0,064	<0,001	0,556	0,004	<0,001	---
PCN	0,589	<0,001	0,201	0,999	0,008	0,114	0,275	0,008	0,063
Aci	0,241	0,290	0,201	0,274	0,421	0,111	0,367	1,000	0,199
Quer0,1	0,422	0,063	---	0,102	0,720	---	0,383	0,254	---
Quer1,0	0,971	0,286	---	0,038	0,654	---	0,620	0,146	---

Tab. 3.1.1 F: Statistische Bewertung der Gehirn/ Serum Verhältnisse von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe bei Wildtyp (WT) Mäusen . Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die Signifikanz (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 11-tägiger Behandlung. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Rifa=Rifampicin; Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; Quer0,1=Quercetin 0,1 mg/kg].

Modulator	Gehirn/ Serum Verhältnis Risperidon			Gehirn/ Serum Verhältnis 9-Hydroxyrisperidon			Gehirn/ Serum Verhältnis Aktive Summe		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
Rifa	<0,001	0,005	---	0,001	<0,001	---	<0,001	<0,001	---
Dexa	0,016	0,005	---	0,200	<0,001	---	0,009	0,002	---
PCN	0,002	<0,001	---	0,025	<0,001	---	0,304	<0,001	---
Quer0,1	0,865	0,589	---	<0,001	0,002	---	0,080	0,068	---

Tab. 3.1.1 G: Statistische Bewertung der Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisse im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden die Signifikanz (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 4-tägiger Behandlung. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Rifa=Rifampicin; Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; Aci=Acitretin; Quer0,1=Quercetin 0,1 mg/kg; Quer1,0=Quercetin 1,0 mg/kg].

Modulator	Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis (Gehirn)			Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis (Serum)		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
Rifa	0,006	0,063	0,690	0,093	0,147	0,250
Dexa	0,032	0,032	---	0,016	<0,001	---
PCN	0,004	<0,001	0,185	<0,001	0,016	0,002
Aci	0,088	0,015	0,185	0,174	0,870	0,578
Quer0,1	0,001	0,032	---	0,001	0,940	0,163
Quer1,0	0,016	0,905	---	0,002	0,193	0,278

Tab. 3.1.1 H: Statistische Bewertung der Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisse im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden die Signifikanz (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 11-tägiger Behandlung. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Rifa=Rifampicin; Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; Quer0,1=Quercetin 0,1 mg/kg].

Modulator	Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis (Gehirn)			Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis (Serum)		
	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
Rifa	<0,001	<0,001	---	0,176	0,072	---
Dexa	0,016	<0,001	---	<0,001	<0,001	0,883
PCN	0,589	0,001	---	<0,001	<0,001	0,673
Quer0,1	0,150	0,235	---	0,511	0,324	0,926

3.1.1.1 Rifampicin und Dexamethason

Die Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon wurden durch die Injektion von Rifampicin und Dexamethason sowohl im Hirngewebe als auch im Serum beeinflusst. 4 Tage nach einmal täglicher Injektion konnte im Hirngewebe in den Gruppen, die Rifampicin oder Dexamethason erhalten hatten, eine signifikante Reduktion der Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe beobachtet werden (Abb. 3.1.1.1 A). Insbesondere an dem Konzentrationsverlauf von 9-Hydroxyrisperidon in der Kontrollgruppe konnte man im Vergleich zu den Gruppen, die einen P-gp Modulator erhalten hatten, erkennen, dass ein Anstieg der Konzentration des Metaboliten im Hirngewebe nur in den Kontrollgruppen zu beobachten war. Im Gegensatz zur Dexamethason-Gruppe konnte nach 6 h in der Rifampicin-Gruppe jedoch eine signifikant erhöhte 9-Hydroxyrisperidon Konzentration gemessen werden (Abb. 3.1.1.1 A).

In den Serum Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe unterschieden sich die Dexamethason-Gruppe und die Rifampicin-Gruppe deutlich. Während in der Rifampicin-Gruppe weder bei den Konzentration von Risperidon noch von 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon signifikante Unterschiede beobachtet werden konnten, waren die Serumkonzentration von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und deren aktiver Summe in der Dexamethason-Gruppe signifikant reduziert gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 3.1.1.1 B). Allerdings konnte nach 1 h im Serum in der Dexamethason-Gruppe eine signifikant erhöhte 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (Abb. 3.1.1.1 B).

Nach 11 Tagen Gabe der P-gp Modulatoren konnten die Ergebnisse der Versuche nach 4 Tagen Gabe reproduziert werden. Der Effekt auf die Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe wurde dadurch z.T. noch deutlicher. Im Hirngewebe waren die Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon nach Injektion von Dexamethason stärker reduziert als nach 4 Tagen Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe, während sich in der Rifampicin-Gruppe weniger starke Veränderungen zwischen den beiden Applikationszeiträumen zeigten (Abb. 3.1.1.1 C). In der Dexamethason-Gruppe und der Kontrollgruppe waren die Konzentrationen der Analyten nach 6 h unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-Methode. Auf Grund einer während der Versuchsreihe festgestellten erhöhten Toxizität bei den Versuchstieren durch die chronische Gabe von Rifampicin liegen keine Daten für diese Gruppe vor. Der Versuch musste aus tierschutzrechtlichen Gründen daraufhin abgebrochen werden (s. Kennzeichnung in den entsprechenden Abbildungen).

Bei den Untersuchungen der Serum-Konzentrationen zeigte sich, ähnlich zu den Ergebnissen nach 4 Tagen, nur an einem beobachteten Zeitpunkt in der Rifampicin-Gruppe ein signifikanter Effekt (Reduktion) auf die Risperidon-Konzentration, während die Konzentrationen von 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon nicht signifikant unterschiedlich waren (Abb. 3.1.1.1 D). In der Dexamethason-Gruppe konnte dagegen nach 11 Tagen Behandlung eine signifikante Reduktion der Serumkonzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe gemessen werden (Abb. 3.1.1.1 D).

Um die Verteilung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon näher beurteilen zu können wurde das Verhältnis dieser Substanzen zwischen Hirngewebe und Serum berechnet. Es zeigte sich dabei nach 4 Tagen Behandlung mit Rifampicin oder Dexamethason eine signifikant reduzierte Konzentration von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und insbesondere der aktiven Summe von Risperidon in beiden P-gp Modulator-Gruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (Abb. 3.1.1.1 E). Nach 11 Tagen Behandlung zeigte sich dies noch deutlicher. Sowohl in der Rifampicin-, als auch in der Dexamethason-Gruppe war die Verteilung zwischen Hirngewebe und Serum deutlich gegenüber den Kontrollen reduziert (Abb. 3.1.1.1 F).

Zur Beurteilung möglicher metabolischer Effekte der verwendeten Substanzen auf die Bildung von 9-Hydroxyrisperidon aus Risperidon, die u.U. ebenfalls wichtig für mögliche Interaktionen sind, wurden die Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisse bestimmt. Dabei zeigte sich nach 4-tägiger Behandlung in der Rifampicin-Gruppe ein signifikant reduziertes Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Gehirn im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 h nach Risperidon-Injektion (Abb. 3.1.1.1 G), während im Serum keine signifikanten Veränderungen zu beobachten waren (Abb. 3.1.1.1 G). Bei der Dexamethason-Gruppe war im Hirn ebenfalls nach 1 h ein signifikant reduziertes Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis messbar, während nach 3 h ein signifikant erhöhtes Verhältnis zu beobachten war (Abb. 3.1.1.1 G). Im Serum war eine signifikante Reduktion des Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisses an allen beobachteten Zeitpunkten messbar (Abb. 3.1.1.1 G).

Nach 11 Tagen Injektion von Rifampicin war das Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Hirngewebe signifikant reduziert, während im Serum keine signifikanten Unterschiede messbar waren (Abb. 3.1.1.1 H). In der Dexamethason-Gruppe war das Verhältnis im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl im Hirn, als auch im Serum signifikant reduziert (Abb. 3.1.1.1 H).

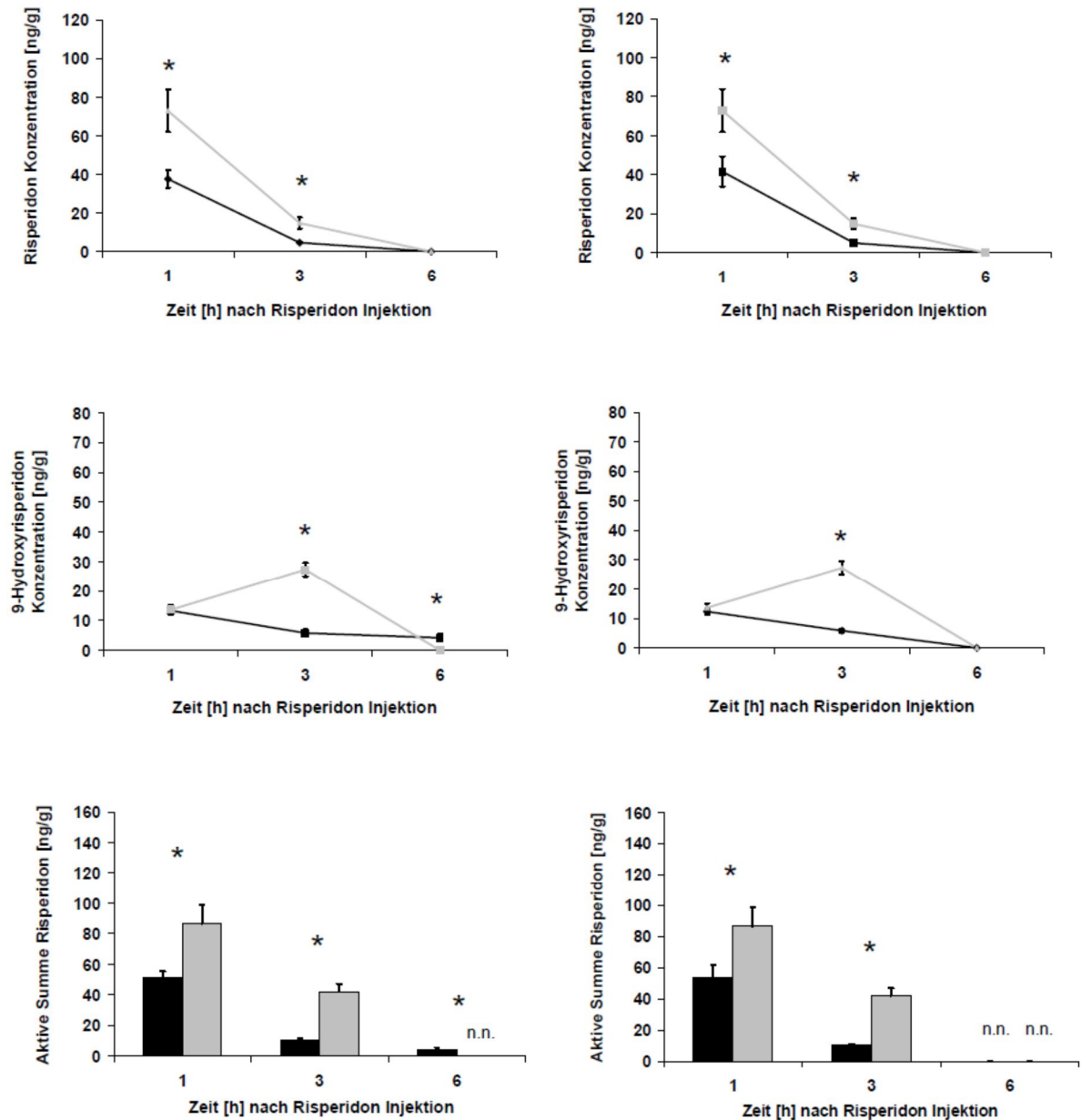


Abb. 3.1.1.1 A: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Hirngewebe nach 4 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin (links) oder 50 mg/kg/d Dexamethason (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrollen); n.n.= nicht nachweisbar; * p<0,05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

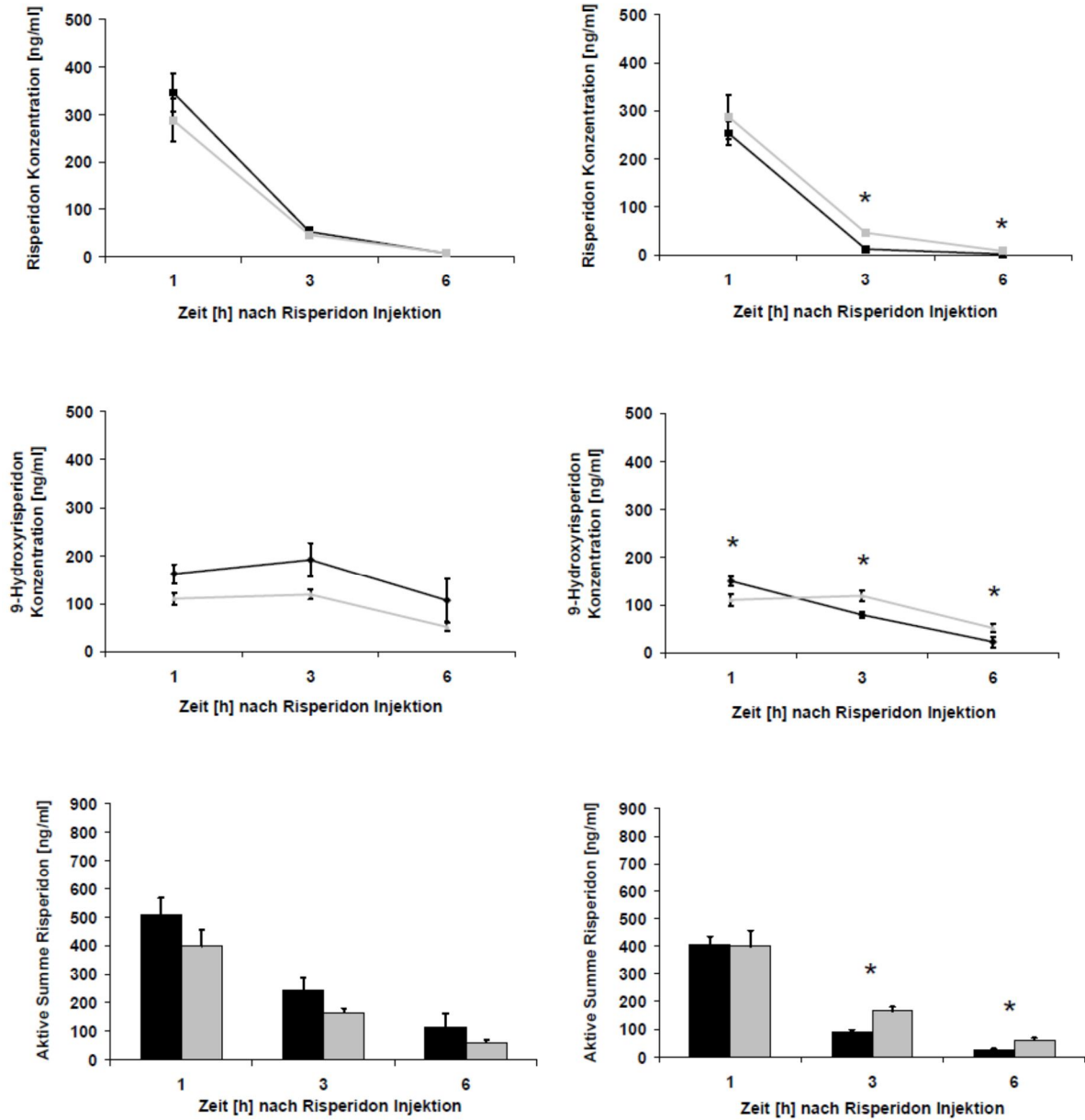


Abb. 3.1.1.1 B: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Serum nach 4 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin (links) oder 50 mg/kg/d Dexamethason (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

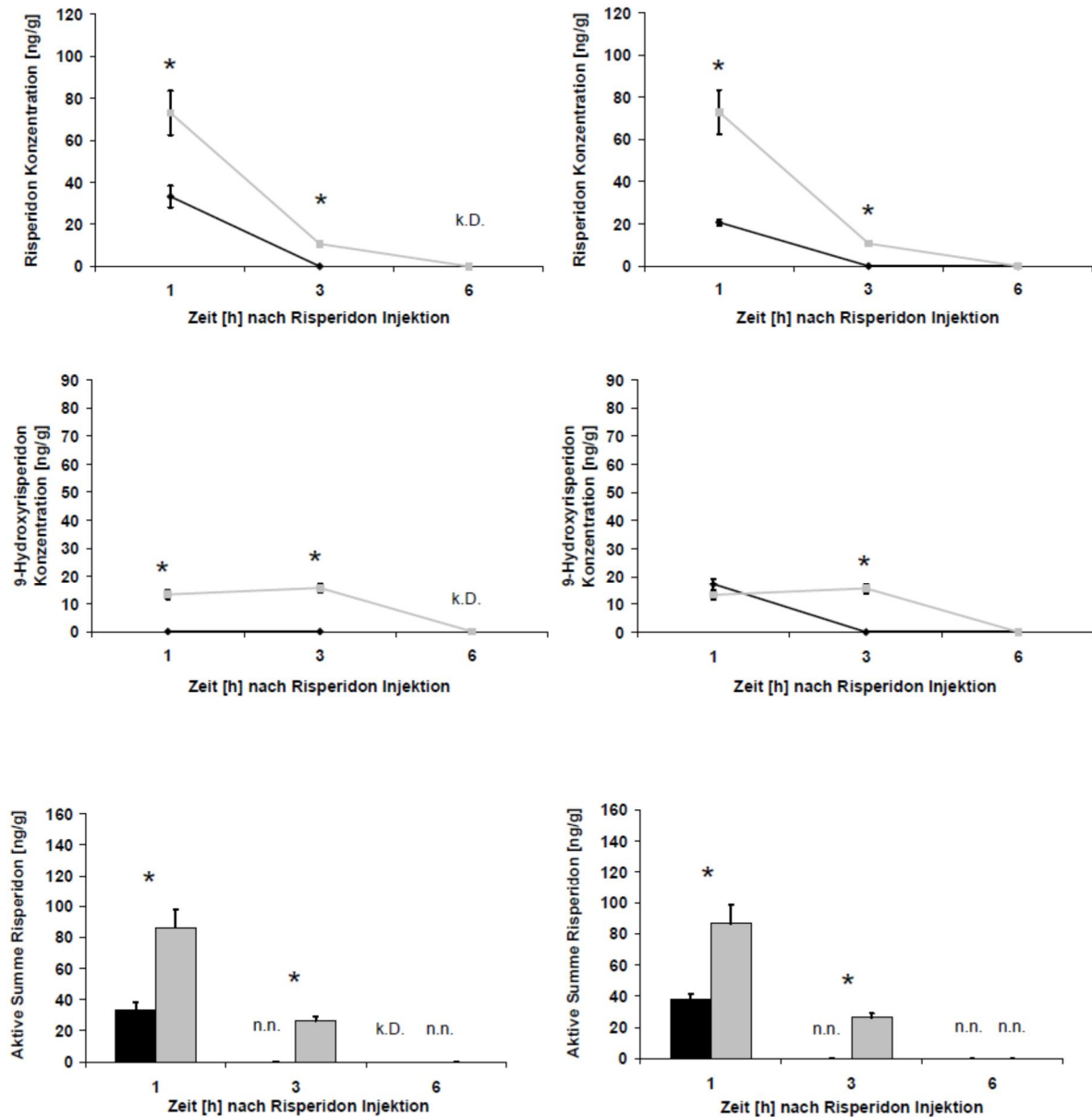


Abb. 3.1.1.1 C: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Hirngewebe nach 11 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin (links) oder 50 mg/kg/d Dexamethason (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; k.D.= keine Daten vorhanden; * p<0,05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

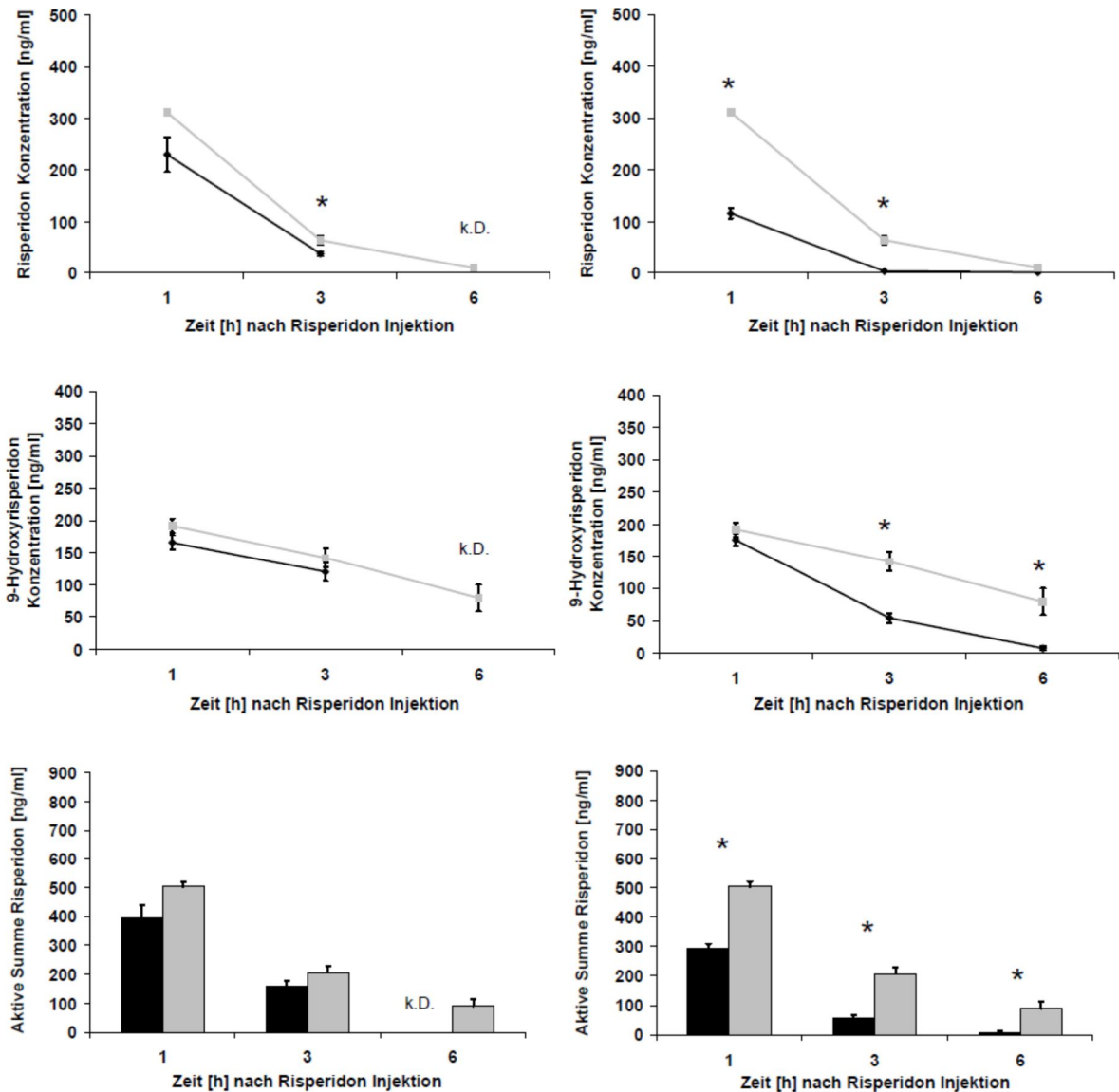


Abb. 3.1.1.1 D: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Serum nach 11 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin (links) oder 50 mg/kg/d Dexamethason (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle)]; n.n.= nicht nachweisbar; k.D.= keine Daten vorhanden; * $p < 0,05$. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

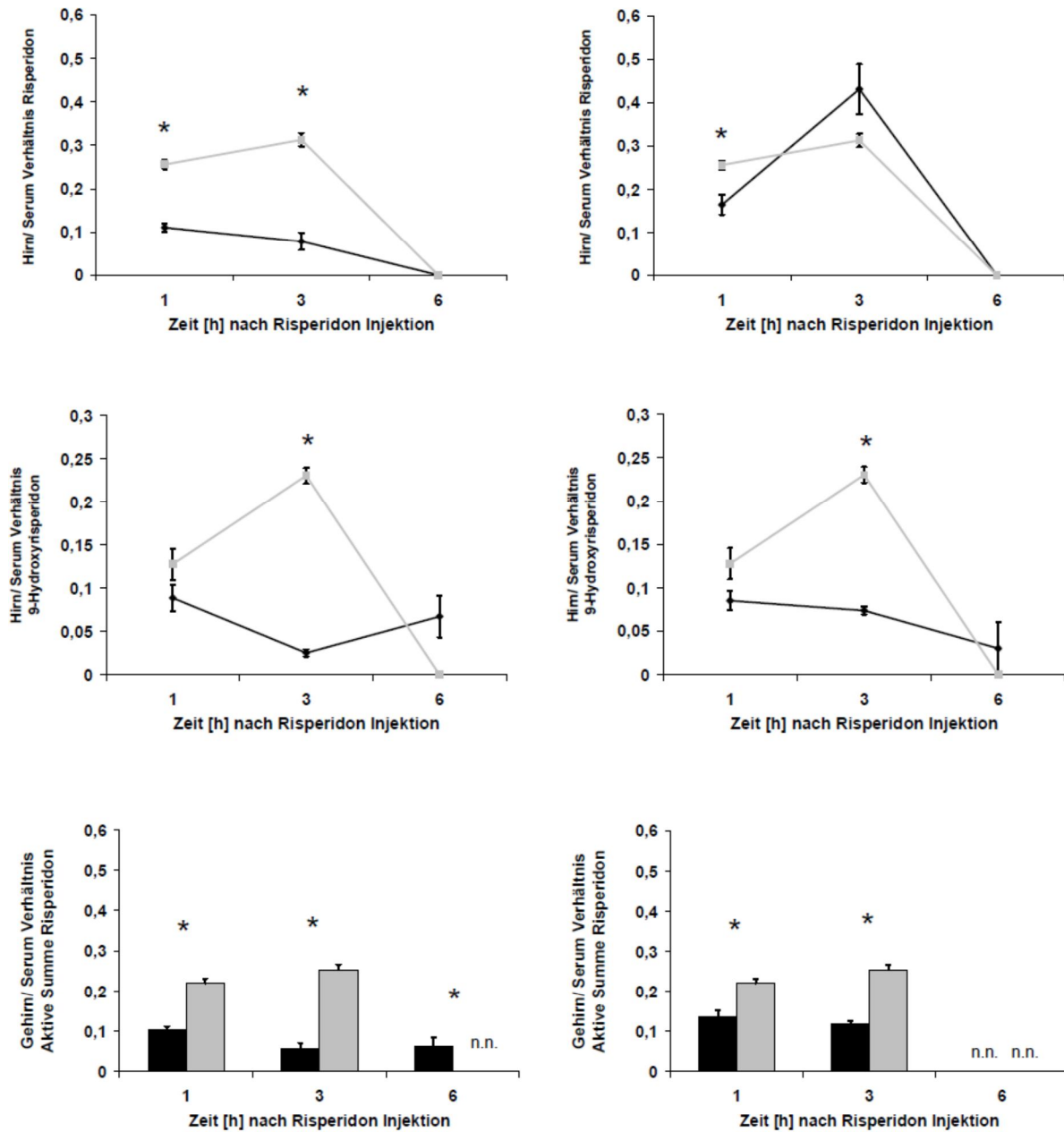


Abb. 3.1.1.1 E: Gehirn/ Serum Verhältnis von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) nach 4 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin (links) oder 50 mg/kg/d Dexamethason (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * p < 0,05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

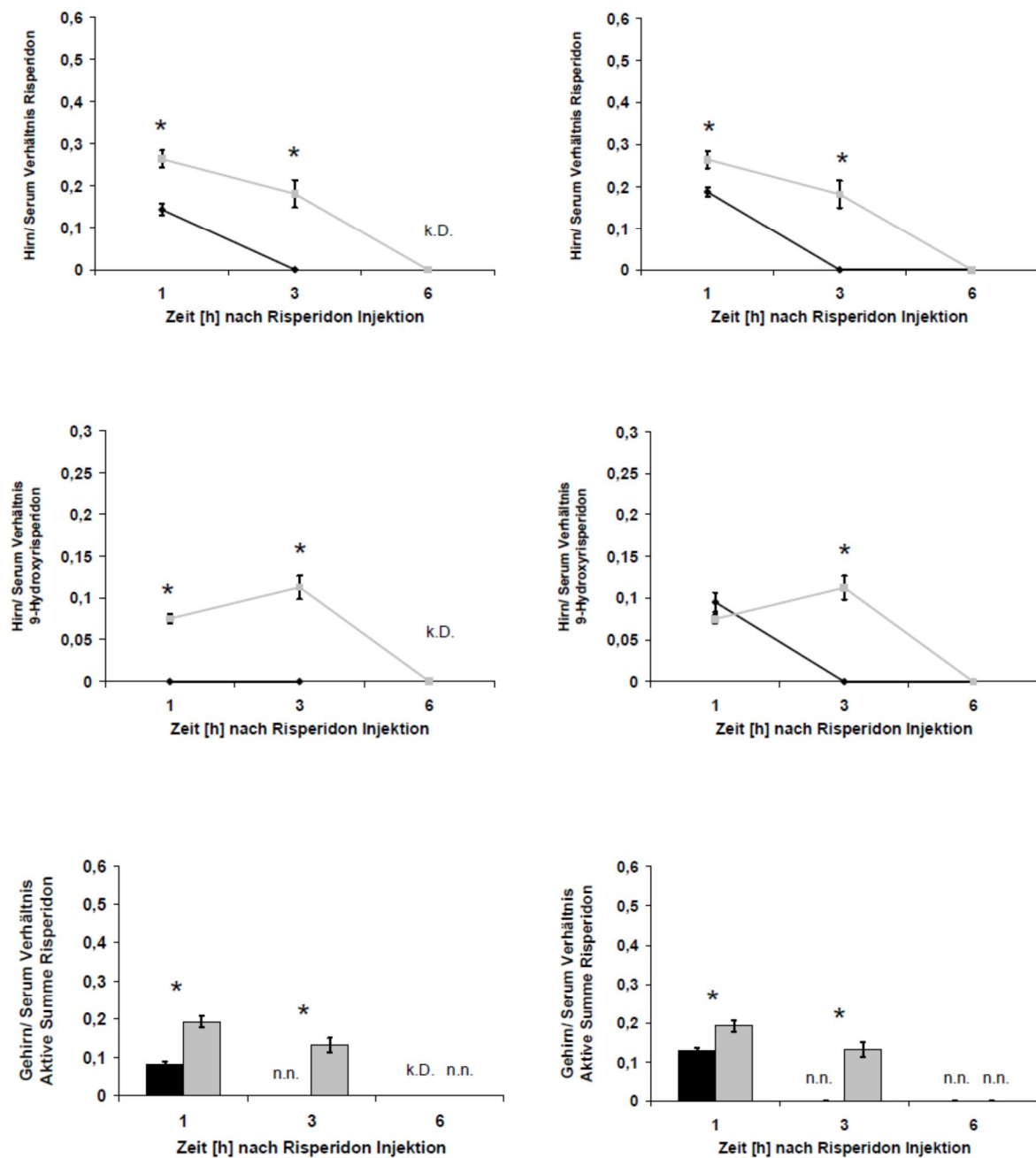


Abb. 3.1.1.1 F: Gehirn/ Serum Verhältnis von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) nach 11 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin (links) oder 50 mg/kg/d Dexamethason (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; k.D.= keine Daten vorhanden; * p<0,05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

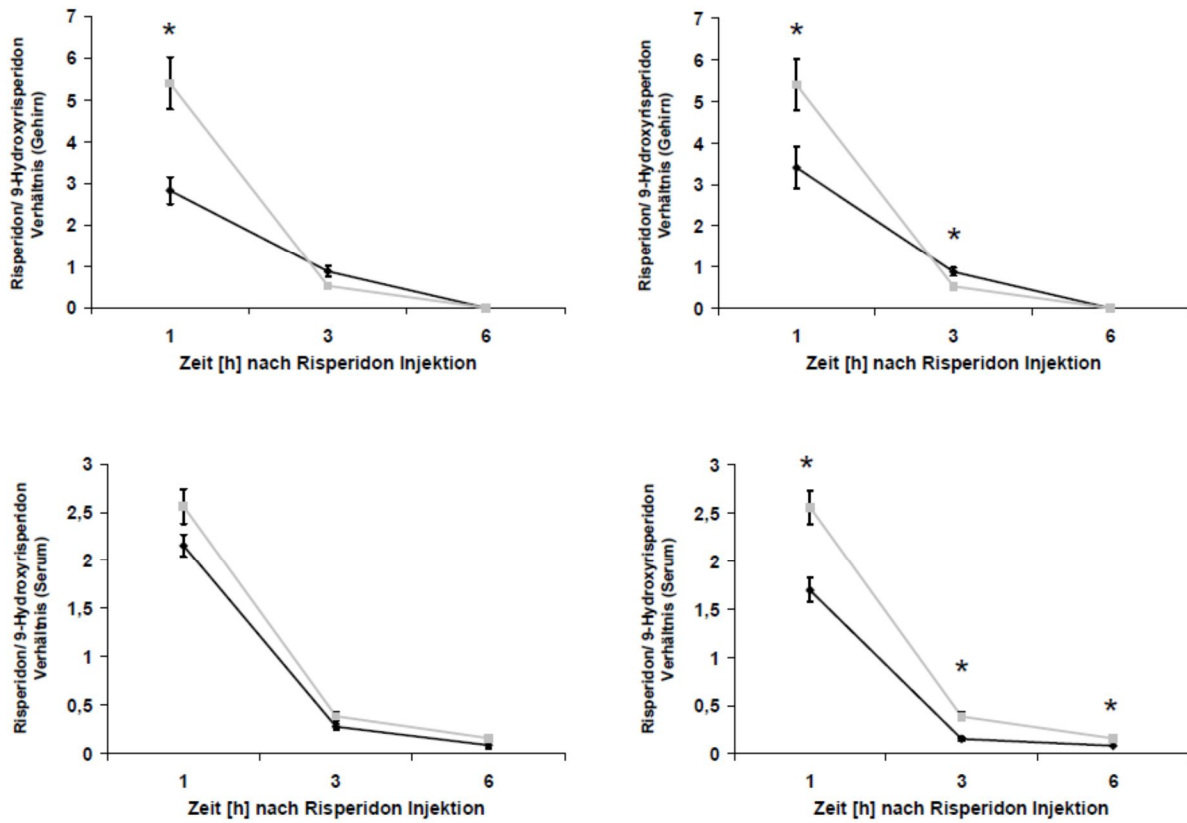


Abb. 3.1.1.1 G: Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Hirngewebe (oben) und Serum (unten) nach 4 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin (links) oder 50 mg/kg/d Dexamethason (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle) ; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

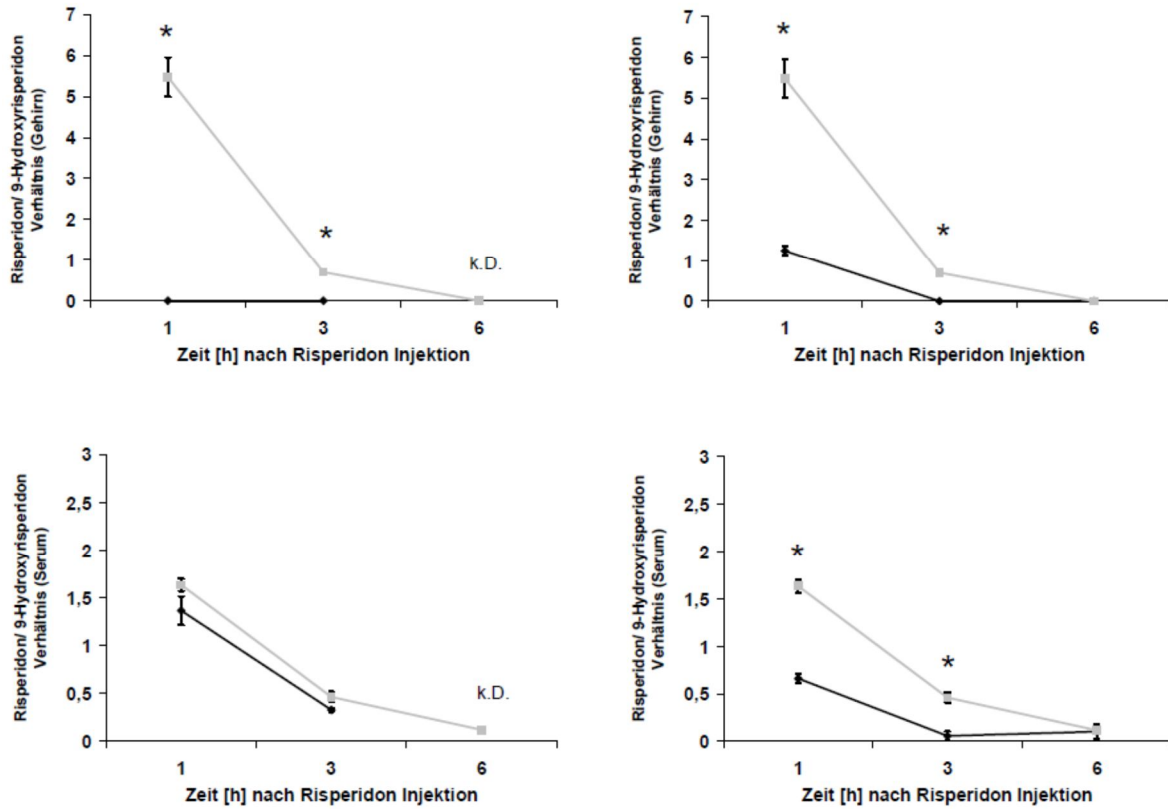


Abb. 3.1.1.1 H : Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Hirngewebe (oben) und Serum (unten) nach 11 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin (links) oder 50 mg/kg/d Dexamethason (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) [schwarze Linien (P-gp Modulator), graue Linien (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; k.D.= keine Daten vorhanden; $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

3.1.1.2 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) und Acitretin

Durch die Behandlung mit PCN oder Acitretin für 4 Tage wurden Hirn- und Serumkonzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon beeinflusst. In der PCN-Gruppe konnte im Gehirn sowohl bei Risperidon, als auch bei 9-Hydroxyrisperidon eine signifikante Reduktion der Hirnkonzentration beobachtet werden, während die Hirnkonzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon in der Acitretin-Gruppe signifikant erhöht waren (Abb. 3.1.1.2 A). Somit war für PCN auch bei der aktiven Summe von Risperidon eine signifikante Reduktion zu beobachten, während in der Acitretin-Gruppe eine signifikante Erhöhung der aktiven Summe im Vergleich zur Kontrollgruppe bei einem beobachteten Zeitpunkt messbar war (Abb. 3.1.1.2 A). Nach Behandlung mit PCN konnten bereits nach 3 h weder Risperidon-/ noch 9-Hydroxyrisperidon-Konzentrationen in den Hirnproben gemessen werden (Abb. 3.1.1.2 A).

Bei den Ergebnissen der Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe im Serum zeigte sich in der PCN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion, während in der Acitretin-Gruppe nur 9-Hydroxyrisperidon 1 h nach Risperidon-Injektion signifikant erhöht war (Abb. 3.1.1.2 B). Ebenso wie für die Hirnkonzentrationen zeigte sich als Folge bei der aktiven Summe von Risperidon in der PCN-Gruppe eine deutliche Erniedrigung der Konzentration im Serum, während bei Acitretin nach 1 h eine signifikant erhöhte Konzentration zu beobachten war (Abb. 3.1.1.2 B).

Nach 11 Tagen Behandlung zeigte sich ein ähnliches Bild bei den Hirnkonzentrationen. In der PCN-Gruppe zeigten sich signifikant reduzierte Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 3.1.1.2 C). Bei den Serumkonzentrationen bestätigten sich diese Ergebnisse für die PCN-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.1.1.2 D). Für den Zeitraum von 11 Tagen Behandlung lagen nur Daten von PCN vor, da die Effekte in der Acitretin-Gruppe nach 4 Tagen zu gering waren. Acitretin war nicht von Beginn an in diese Arbeit eingeplant und wurde zeitlich erst weit nach Abschluss der Untersuchungen der anderen P-gp Modulatoren in diese Arbeit eingeschlossen. Daher wurden aus zeitlichen Gründen nur Werte für eine Behandlungsdauer von 4 Tagen erhoben.

Die Verteilung zwischen Hirngewebe und Serum zeigte in der PCN-Gruppe nach 4 Tagen Behandlung sowohl für Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon, als auch für die aktive Summe von Risperidon eine signifikante Reduktion des Gehirn/ Serum Verhältnisses, während es in der Acitretin-Gruppe keine signifikanten Unterschiede gab (Abb. 3.1.1.2 E). Nach 11 Tagen konnte in der PCN Gruppe nach 1 h eine signifikante Erhöhung des Gehirn/ Serum Verhältnisses von Risperidon gemessen werden, während nach 3 h eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe vorlag. Bei 9-

Hydroxyrisperidon war das Verhältnis an diesen beiden Zeitpunkten signifikant reduziert (Abb. 3.1.1.2 F). Für die Verteilung der aktiven Summe von Risperidon ergab sich dann verglichen zur Kontrollgruppe insgesamt in der PCN-Gruppe eine signifikante Reduktion des Gehirn/ Serum Verhältnisses 3 h nach Risperidon-Injektion (Abb. 3.1.1.2 F).

Das Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis zeigte nach 4 Tagen Behandlung in der PCN-Gruppe im Gehirn und Serum eine signifikante Reduktion, während in der Acitretin-Gruppe nur im Gehirn an einem beobachteten Zeitpunkt eine signifikante Reduktion zu beobachten war (Abb. 3.1.1.2 G). Nach 11 Tagen zeigte sich in der PCN-Gruppe wiederum eine signifikante Abnahme des Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisses in Hirngewebe und Serum (Abb. 3.1.1.2 H).

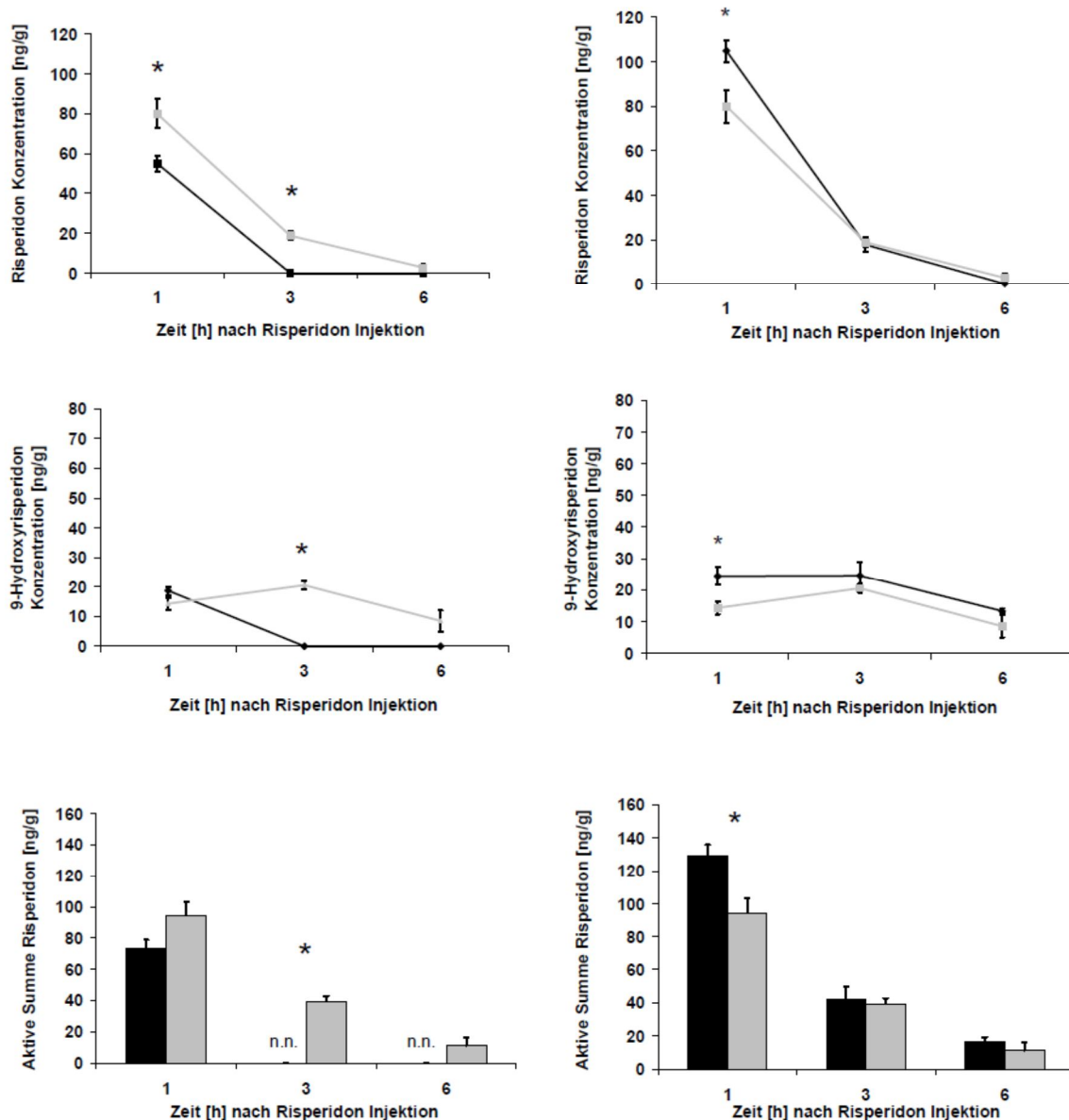


Abb. 3.1.1.2 A: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Hirngewebe nach 4 Tagen Behandlung mit 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; links) oder 5 mg/kg/d Acitretin (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * p<0,05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

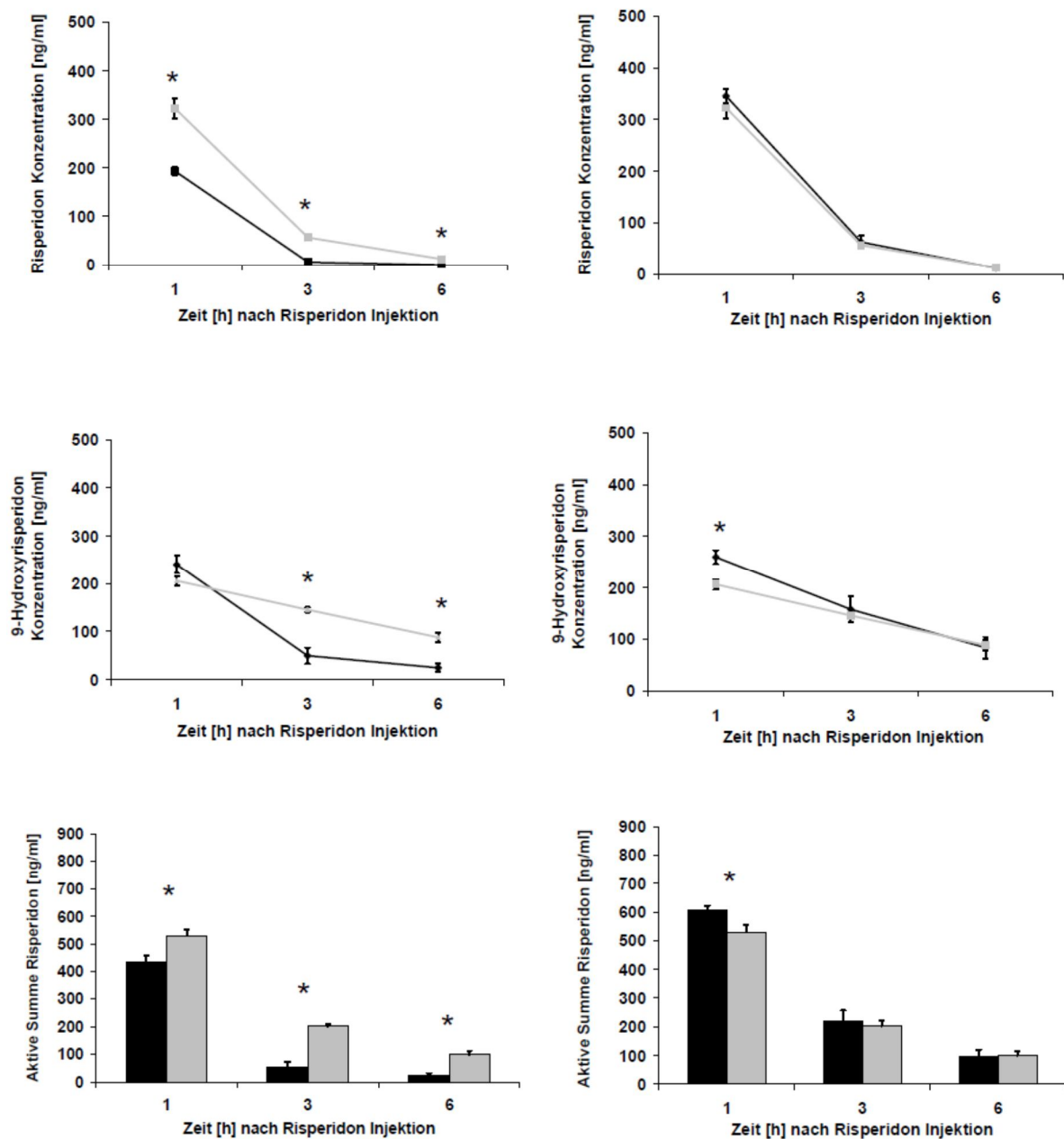


Abb. 3.1.1.2 B: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Serum nach 4 Tagen Behandlung mit 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; links) oder 5 mg/kg/d Acitretin (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

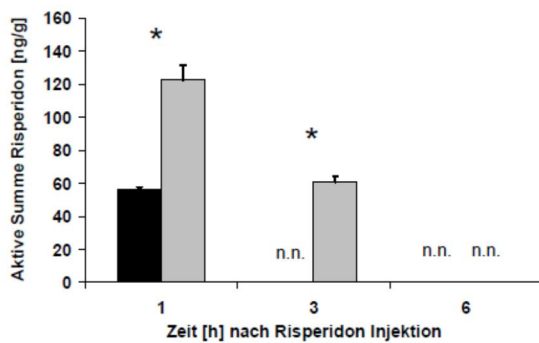
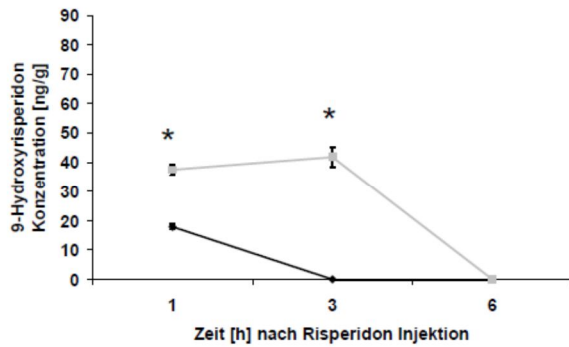
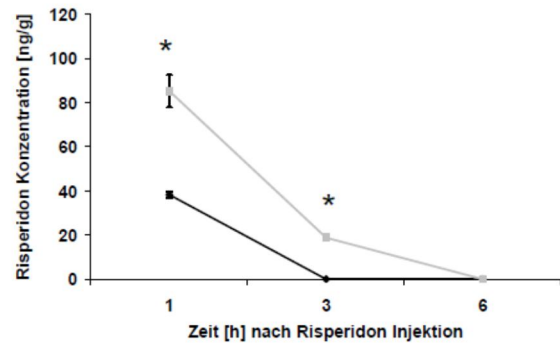


Abb. 3.1.1.2 C: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Hirngewebe nach 11 Tagen Behandlung mit 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0,05$]. Für Acitretin liegen keine Daten vor. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

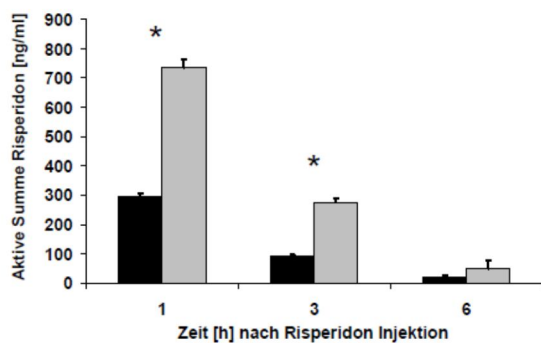
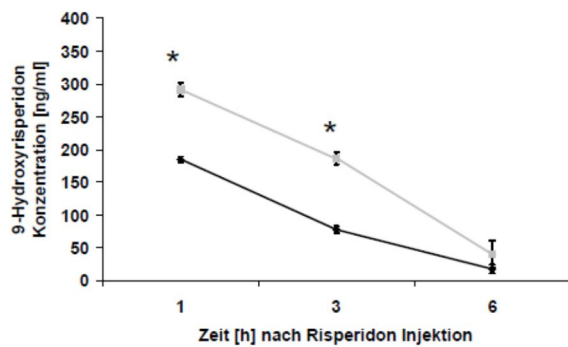
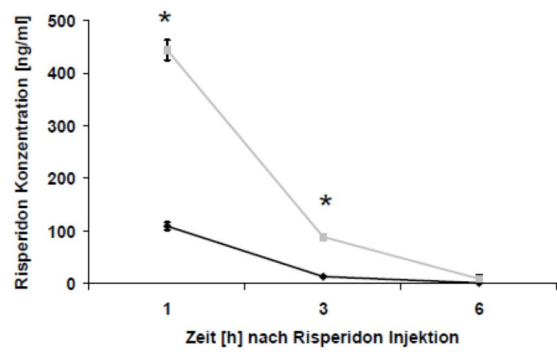


Abb. 3.1.1.2 D: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Serum nach 11 Tagen Behandlung mit 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien (Kontrolle)]; * $p < 0,05$. Für Acitretin liegen keine Daten vor. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

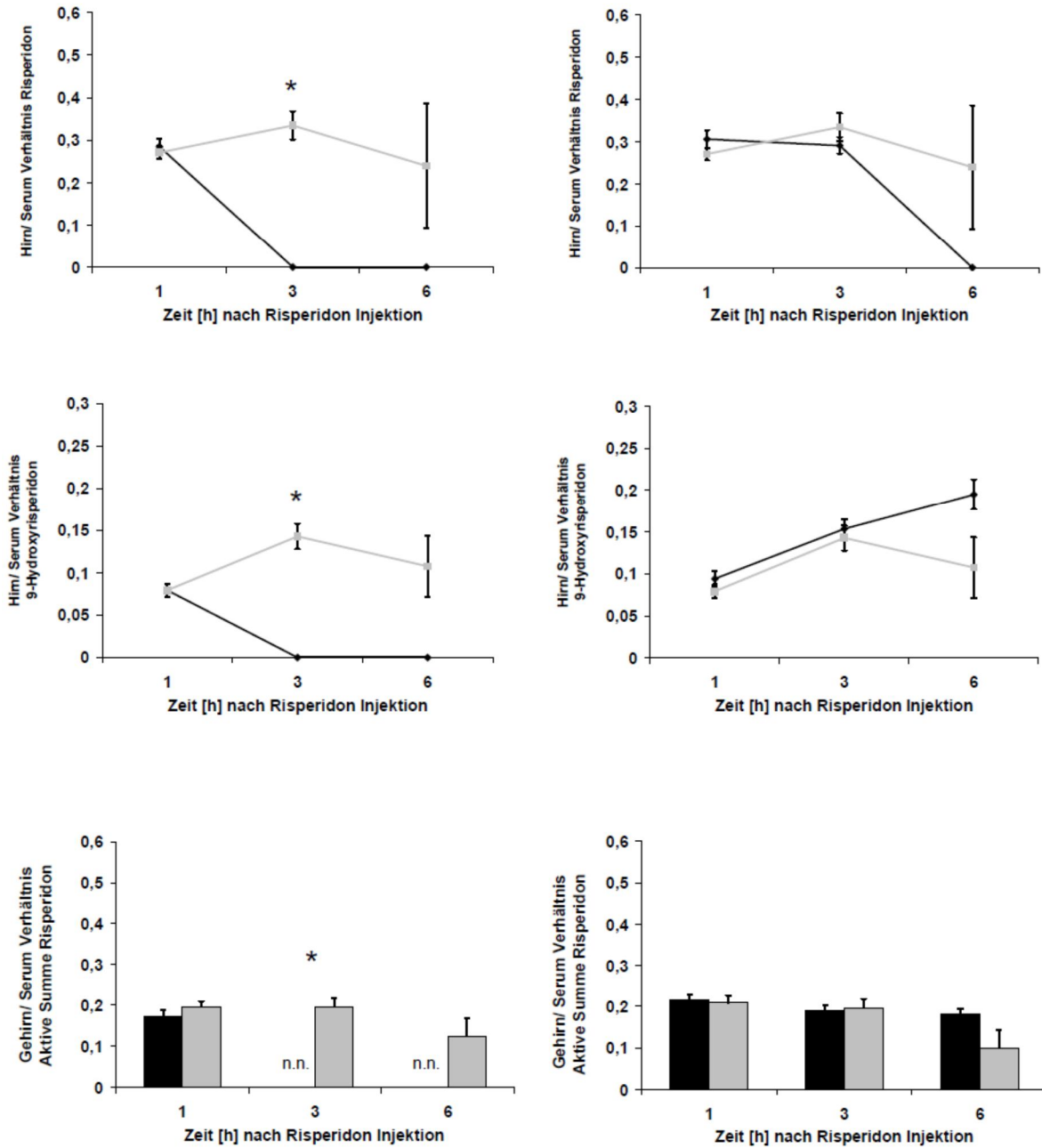


Abb. 3.1.1.2 E : Gehirn/ Serum Verhältnis von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) nach 4 Tagen Behandlung mit 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; links) oder 5 mg/kg/d Acitretin (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * p<0,05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

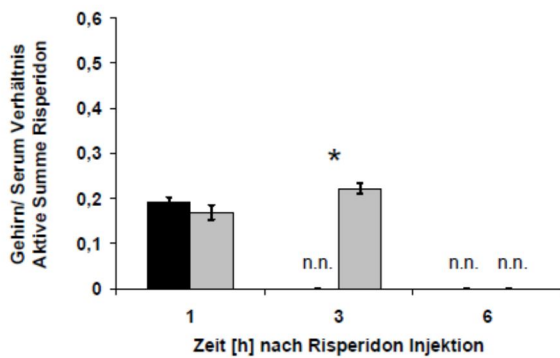
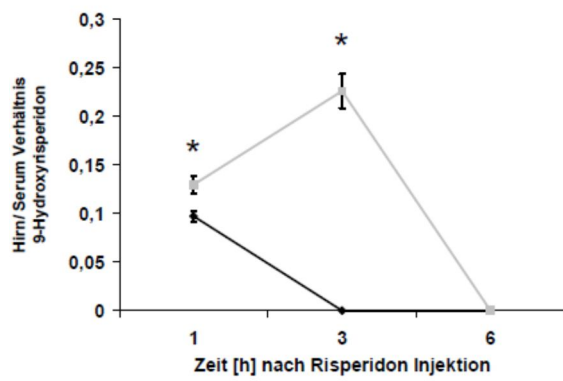
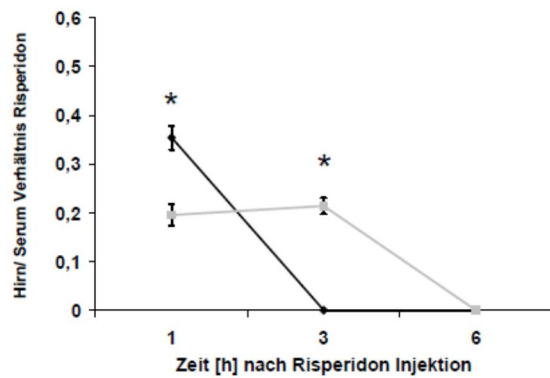


Abb. 3.1.1.2 F: Gehirn/ Serum Verhältnis von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) nach 11 Tagen Behandlung mit 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl). Für Acitretin liegen keine Daten vor [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

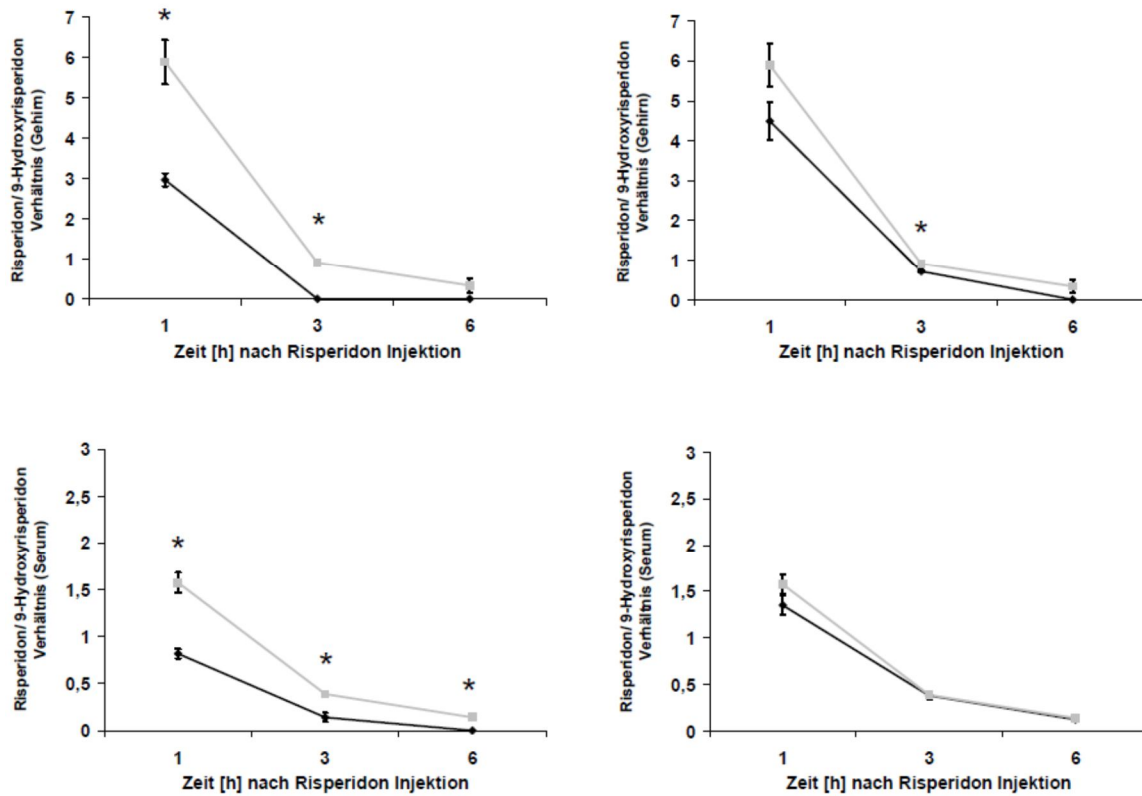


Abb. 3.1.1.2 G: Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Hirngewebe (oben) und Serum (unten) nach 4 Tagen Behandlung mit 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) oder 5 mg/kg/d Acitretin in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien (P-gp Modulator), graue Linien (Kontrolle); * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

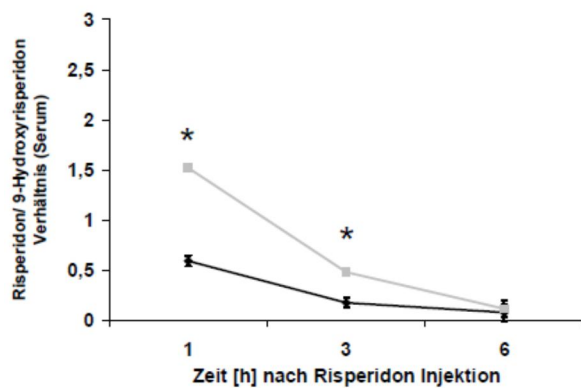
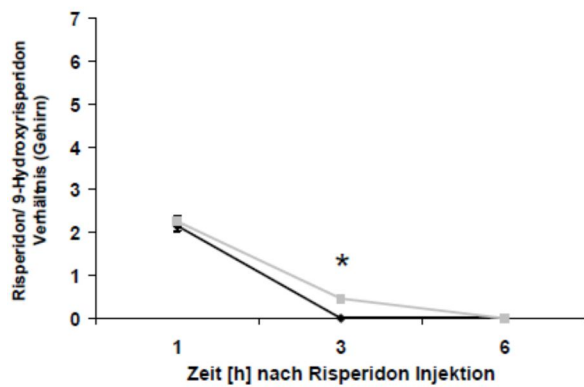


Abb. 3.1.1.2 H: Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Hirngewebe (oben) und Serum (unten) nach 11 Tagen Behandlung mit 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien (P-gp Modulator), graue Linien (Kontrolle); * $p < 0,05$]. Für Acitretin liegen keine Daten vor. Dargestellt werden Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.1.1.3 Quercetin

Bei dem Flavonoid Quercetin wurden zwei verschiedene Konzentrationen verwendet und miteinander verglichen, wie bereits bei Punkt 2.7.5 bei Material und Methoden erläutert.

Nach 4 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin war die Konzentration von Risperidon und der aktiven Summe von Risperidon im Hirngewebe signifikant erhöht, die Konzentration von 9-Hydroxyrisperidon zeigte dagegen keine Unterschiede (Abb. 3.1.1.3 A). Im Vergleich zur Behandlung mit 1,0 mg/kg/d Quercetin zeigte sich für die Konzentration von Risperidon eine signifikante Reduktion und für die Konzentration von 9-Hydroxyrisperidon eine signifikante Erhöhung an zwei der beobachteten Zeitpunkte (Abb. 3.1.1.3 A). Insgesamt zeigten sich in dieser Gruppe für die aktive Summe von Risperidon keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.1.1.3 A).

Im Serum zeigte sich nach 4 Tagen eine signifikante Reduktion der Risperidon-Konzentration und der aktiven Summe von Risperidon bei der Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin (Abb. 3.1.1.3 B). Nach Behandlung mit 1,0 mg/kg/d Quercetin war lediglich die Konzentration von Risperidon signifikant erniedrigt, während sich für die Konzentration von 9-Hydroxyrisperidon und für die aktive Summe von Risperidon keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe zeigten (Abb. 3.1.1.3 B).

Da nach der 4-tägiger Injektion der zwei verschiedenen Quercetin-Konzentrationen die Effekte in der Gruppe in der 0,1 mg/kg Quercetin injiziert wurde etwas deutlicher waren, wurde für den längeren Behandlungszeitraum nur diese Konzentration weiter untersucht, um die Tierzahl so gering wie möglich zu halten. Nach 11 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin war im Hirngewebe die Risperidon-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich, während die Konzentrationen von 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon signifikant erhöht waren (Abb. 3.1.1.3 C). Im Serum zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen der Quercetin-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.1.1.3 D).

Bei der Verteilung zwischen Hirngewebe und Serum (Gehirn/ Serum Verhältnis) zeigten sich nach 4 Tagen Behandlung bei 0,1 mg/kg/d Quercetin keine signifikanten Unterschiede bei der Konzentration von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon oder der aktiven Summe von Risperidon, während bei Gabe von 1,0 mg/kg/d Quercetin eine signifikante Erhöhung nur bei der 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration an einem beobachteten Zeitpunkt messbar war (Abb. 3.1.1.3 E). Nach 11 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin war die Konzentration von 9-Hydroxyrisperidon an zwei der drei beobachteten Zeitpunkte signifikant erhöht, die Konzentration von Risperidon und der aktiven Summe von Risperidon waren nicht signifikant verändert (Abb. 3.1.1.3 F).

Der Einfluss von Quercetin auf metabolische Prozesse, gemessen an der Berechnung des Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisses, zeigte im Gehirn nach 1 h eine signifikante Reduktion und nach 3 h eine signifikante Erhöhung nach Gabe von 0,1 mg/kg/d Quercetin über 4 Tage (Abb. 3.1.1.3 G). In der Gruppe, die mit 1,0 mg/kg/d Quercetin behandelt wurde, zeigte sich nach 4 Tagen im Gehirn eine signifikante Reduktion des Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisses (Abb. 3.1.1.3 G). Im Serum war das Verhältnis nach 4 Tagen sowohl nach Gabe von 0,1 mg/kg/d Quercetin, als auch nach Gabe von 1,0 mg/kg/d Quercetin signifikant erniedrigt (Abb. 3.1.1.3 G).

Nach 11 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin zeigten sich weder im Gehirn noch im Serum Unterschiede beim Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.1.1.3 H).

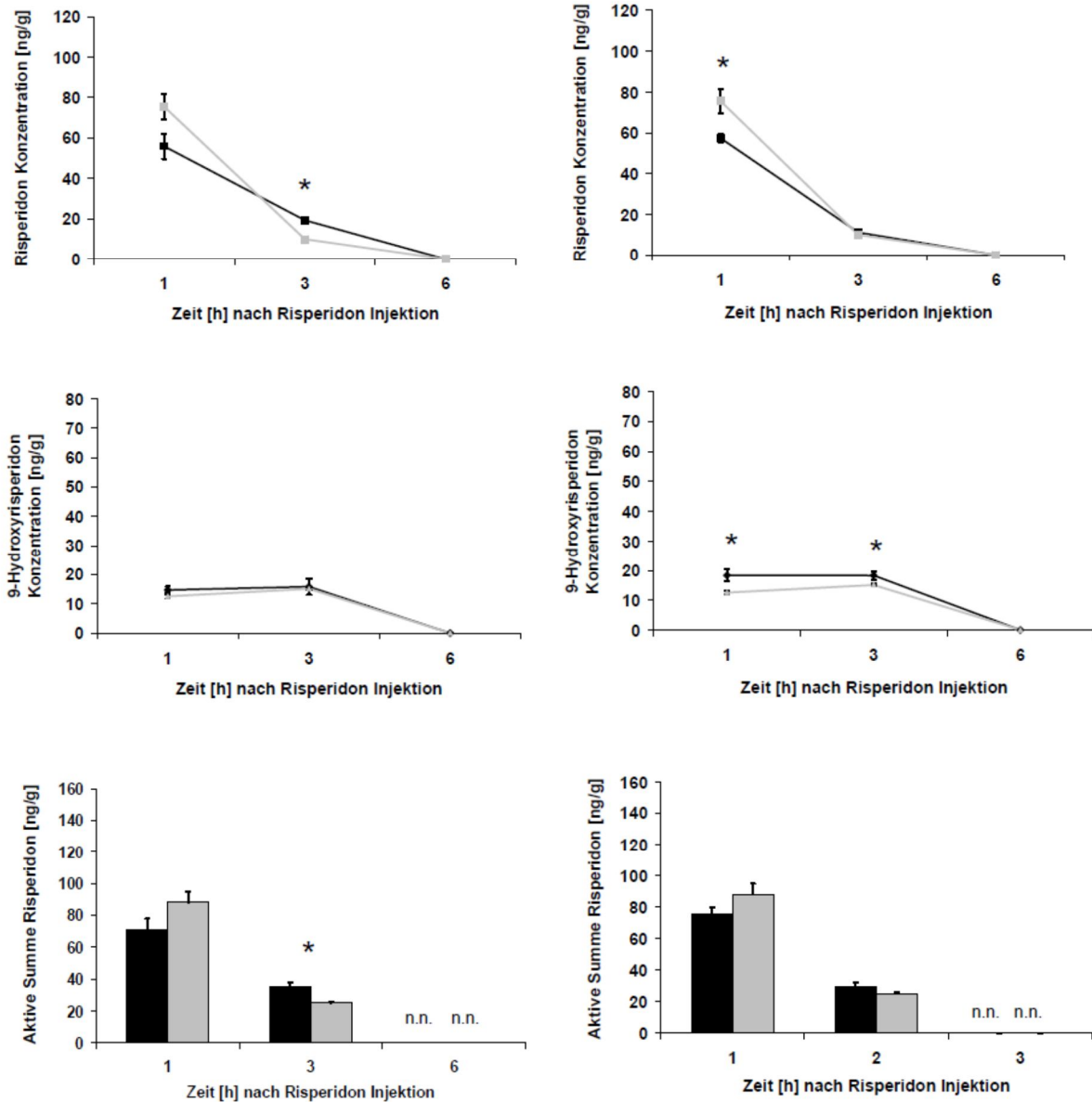


Abb. 3.1.1.3 A: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Hirngewebe nach 4 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin (links) oder 1,0 mg/kg/d Quercetin (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Propandiol) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

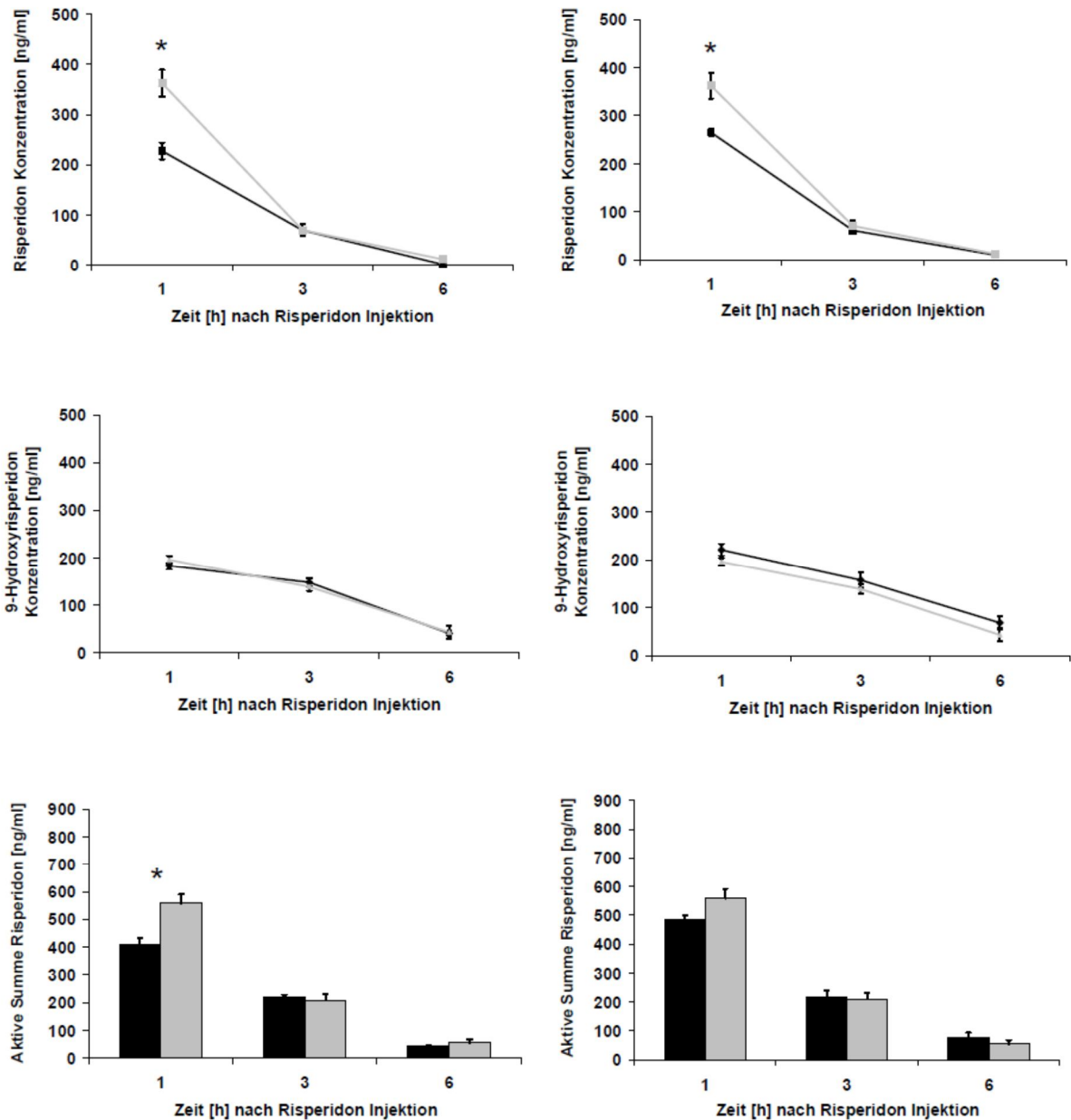


Abb. 3.1.1.3 B: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Serum nach 4 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin (links) oder 1,0 mg/kg/d Quercetin (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Propandiol) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien (Kontrolle)]; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

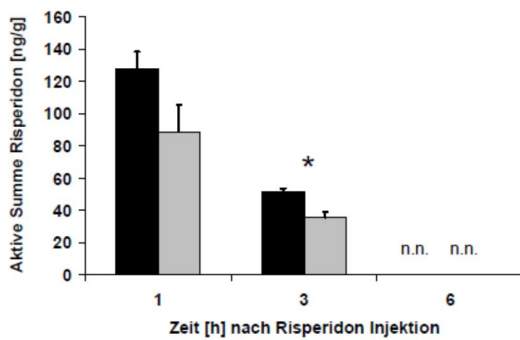
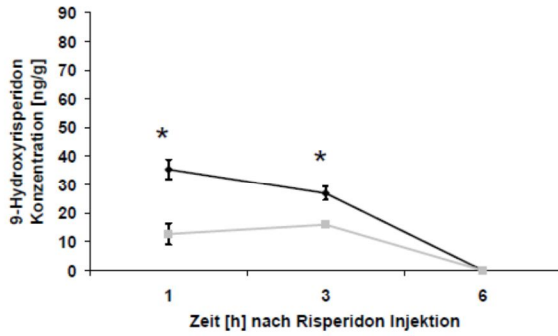
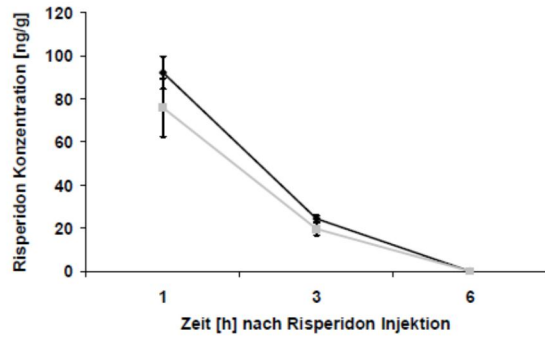


Abb. 3.1.1.3 C: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Hirngewebe nach 11 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Propandiol) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0,05$]. Für 1,0 mg/kg/d Quercetin liegen keine Daten vor. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

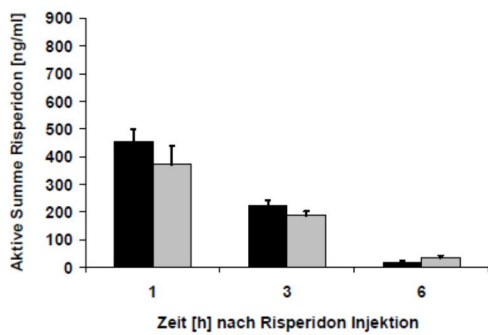
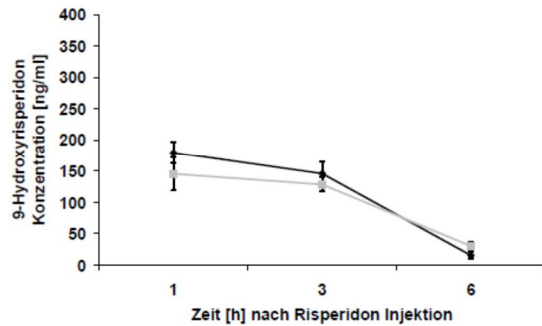
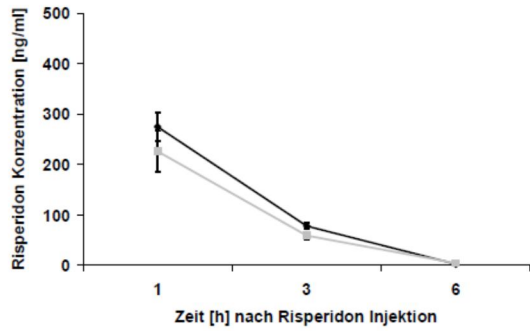


Abb. 3.1.1.3 D: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) im Serum nach 11 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin (links) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Propandiol) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0,05$]. Für 1,0 mg/kg/d Quercetin liegen keine Daten vor. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

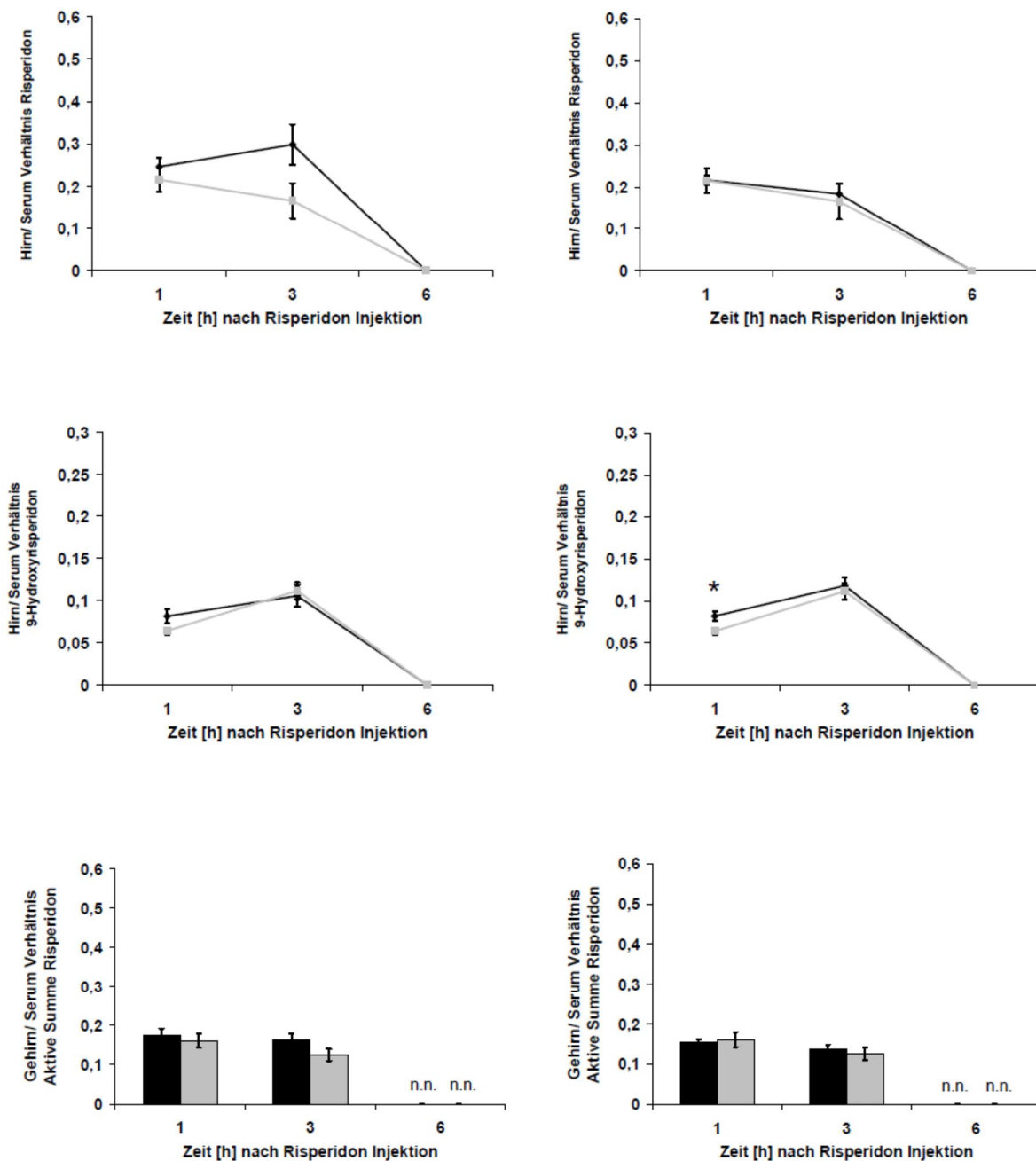


Abb. 3.1.1.3 E: Gehirn/ Serum Verhältnis von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) nach 4 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin (links) oder 1,0 mg/kg/d Quercetin (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Propandiol) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * p<0,05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

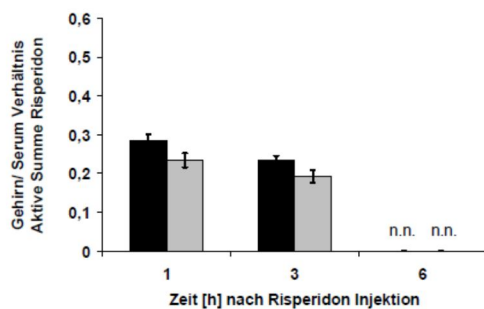
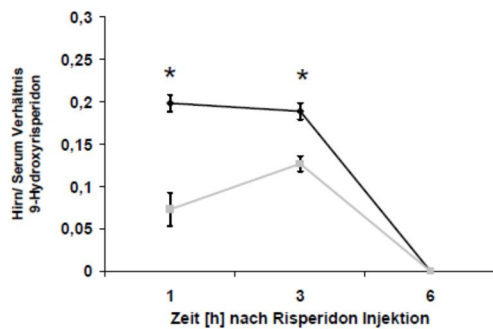
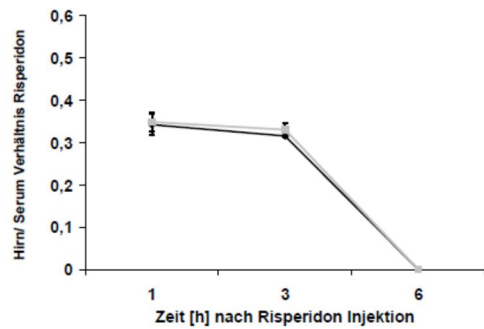


Abb. 3.1.1.3 F: Gehirn/ Serum Verhältnis von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) nach 11 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Propandiol) [schwarze Linien/Balken (P-gp Modulator), graue Linien/Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0,05$]. Für 1,0 mg/kg/d Quercetin liegen keine Daten vor. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

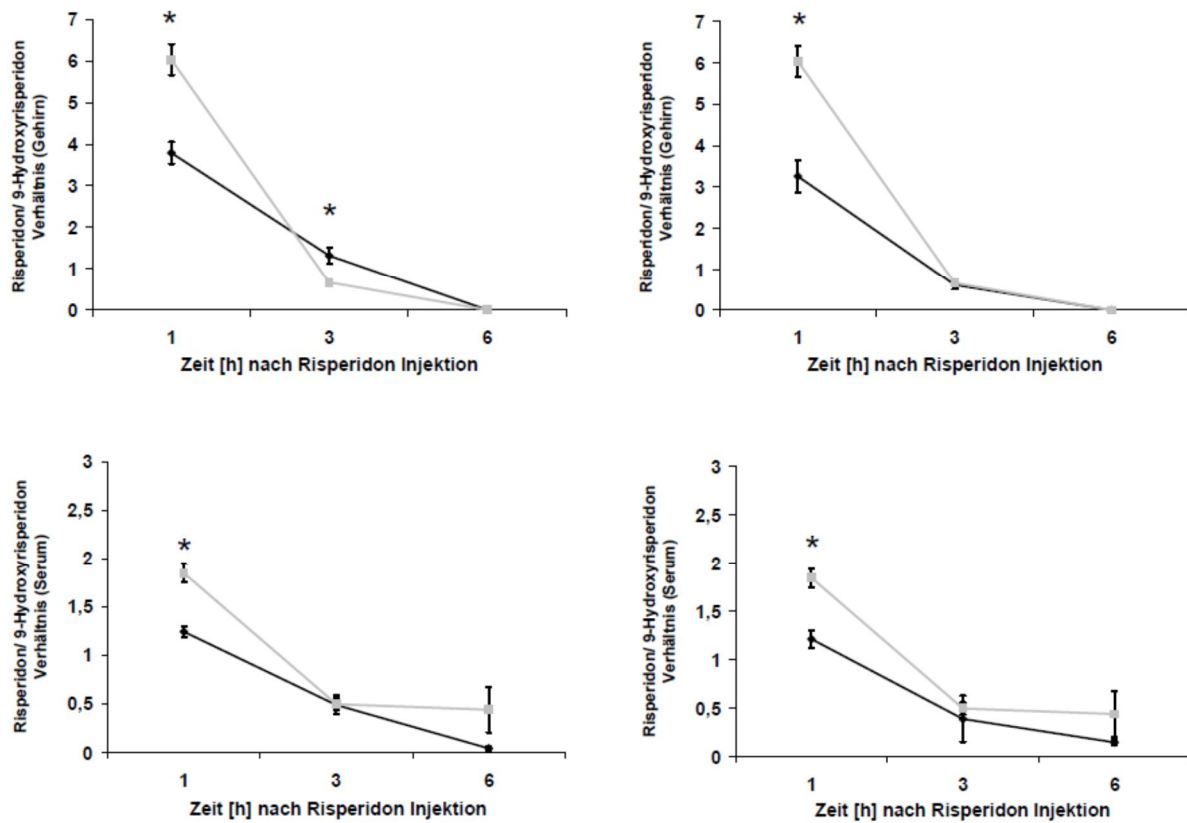


Abb. 3.1.1.3 G: Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Hirngewebe (oben) und Serum (unten) nach 4 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin (links) oder 1,0 mg/kg/d Quercetin (rechts) in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Propandiol) [schwarze Linien (P-gp Modulator), graue Linien (Kontrolle); * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

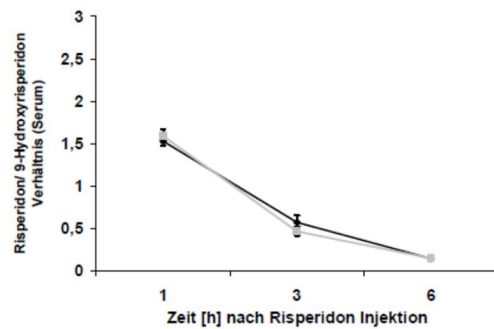
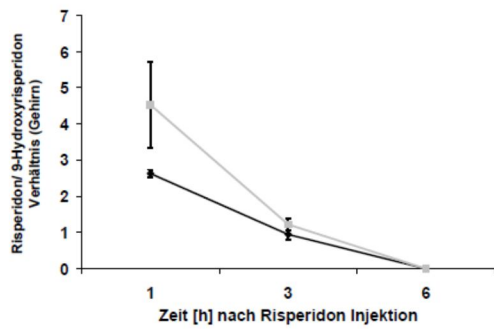


Abb. 3.1.1.3 H: Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Hirngewebe (oben) und Serum (unten) nach 11 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg/d Quercetin in Wildtyp (WT) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Propandiol) [schwarze Linien (P-gp Modulator), graue Linien (Kontrolle); * $p < 0,05$]. Für 1,0 mg/kg/d Quercetin liegen keine Daten vor. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

Tab. 3.1.1.3 A: Zusammenfassung und Überblick der wichtigsten Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen zur P-gp Modulation nach 4 bzw. 11 Tagen Behandlung mit 10 mg/kg/d Rifampicin, 50 mg/kg/d Dexamethason, 25 mg/kg/d PCN, 5 mg/kg/d Acitretin, 0,1 mg/kg/d Quercetin und 1,0 mg/kg/d Quercetin im Vergleich zur Kontrollgruppe und dessen Einfluss auf die Konzentration von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und deren aktiver Summe im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (FVB/N) Mäusen [RIS= Konzentration Risperidon; OH-RIS= Konzentration 9-Hydroxyrisperidon; Akt. Sum= Konzentration der aktiven Summe von Risperidon; G/S RIS= Gehirn/ Serum Verhältnis Risperidon; G/S OH-RIS= Gehirn/ Serum Verhältnis 9-Hydroxyrisperidon; G/S Sum= Gehirn/ Serum Verhältnis aktive Summe Risperidon; RISr Hirn= Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis Gehirn; RISr Ser= Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis Serum; PCN= 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; ↓= signifikant erniedrigt; ↑= signifikant erhöht; ↑ ↓= sowohl signifikante Erhöhung als auch signifikante Reduktion zu beobachten; O= keine signifikanter Unterschied; --- = keine Daten vorhanden].

4 Tage Behandlung	Hirngewebe				Serum				Hirn/ Serum		
	RIS	OH-RIS	Akt. Sum	RISr Hirn	RIS	OH-RIS	Akt. Sum	RISr Ser	G/S RIS	G/S OH-RIS	G/S Sum
Rifampicin	↓	↓↑	↓	↓	O	O	O	O	↓	↓	↓
Dexamethason	↓	↓	↓	↓↑	↓	↓↑	↓	↓	↓	↓	↓
PCN	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Acitretin	↑	↑	↑	↓	O	↑	↑	O	O	O	O
Quercetin 0,1	↑	O	↑	↓↑	↓	O	↓	↓	O	O	O
Quercetin 1,0	↓	↑	O	↓	↓	O	O	↓	O	↑	O
11 Tage Behandlung	Hirngewebe				Serum				Hirn/ Serum		
	RIS	OH-RIS	Akt. Sum	RISr Hirn	RIS	OH-RIS	Akt. Sum	RISr Ser	G/S RIS	G/S OH-RIS	G/S Sum
Rifampicin	↓	↓	↓	↓	↓	O	O	O	↓	↓	↓
Dexamethason	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
PCN	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓↑	↓	↓
Acitretin	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Quercetin 0,1	O	↑	↑	O	O	O	O	O	O	↑	O
Quercetin 1,0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

3.1.2 Vergleich Risperidon und Haloperidol

Nach dem Vorversuch konnten Dexamethason und PCN als die Substanzen mit dem größten Einfluss auf die Verteilung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon identifiziert werden. Im zweiten Teil der pharmakokinetischen Arbeiten sollte nun zwischen P-gp abhängigen Effekten und möglichen anderen Effekten der P-gp Modulatoren unterschieden werden. Dazu wurde erneut die Verteilung von Risperidon und seines aktiven Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon als P-gp Substrate mit der Verteilung von Haloperidol verglichen, welches nicht P-gp abhängig transportiert wird. Es wurden nun an 5 Zeitpunkten Hirn- und Serumproben genommen, um einen größeren Zeitraum zu untersuchen. Ebenso wurde die Anzahl der untersuchten Tiere pro Zeitpunkt erhöht, um umfangreichere Daten zu erhalten. Die Analyse der Proben erfolgte wiederum mit Hilfe der HPLC.

3.1.2.1 Risperidon

In der Dexamethason-Gruppe war im Hirngewebe der Versuchstiere 0,5 h, 1 h, 2 h und 3 h nach der Risperidon-Injektion die Konzentration von Risperidon signifikant reduziert (Abb. 3.1.2.1 A). In der PCN-Gruppe war an allen der 5 beobachteten Zeitpunkte die Konzentration von Risperidon im Hirngewebe signifikant reduziert (Abb. 3.1.2.1 A). Die 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration war im Hirngewebe nach Dexamethason-Gabe 0,5 h und 1 h nach Risperidon-Injektion signifikant erhöht, während 3 h nach Risperidon-Injektion die 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration signifikant reduziert war (Abb. 3.1.2.1 A). In der PCN-Gruppe war die 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration im Hirn 0,5 h nach Risperidon-Injektion signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe, während 2 h, 3 h und 6 h danach dessen Konzentration deutlich reduziert war (Abb. 3.1.2.1 A). Die aktive Summe von Risperidon war im Gehirn der Versuchstiere nach Dexamethason-Gabe an 4 von 5 Zeitpunkten reduziert, während in der PCN-Gruppe die aktive Summe von Risperidon an allen beobachteten Zeitpunkten signifikant reduziert war (Abb. 3.1.2.1 A).

Im Serum waren sowohl in der Dexamethason-Gruppe, als auch in der PCN-Gruppe die Risperidon-Konzentration an allen beobachteten Zeitpunkten signifikant reduziert gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 3.1.2.1 B). Die 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration war in der Dexamethason-Gruppe 2 h, 3 h und 6 h nach Risperidon-Injektion signifikant reduziert, während in der PCN-Gruppe 0,5 h nach Injektion die 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration im Serum signifikant erhöht war und 2 h, 3 h und 6 h nach Risperidon-Injektion signifikant reduziert war (Abb. 3.1.2.1 B). Die aktive Summe von Risperidon war im Serum wiederum sowohl in der Dexamethason-Gruppe, als auch in der PCN-Gruppe gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe an allen beobachteten Zeitpunkten nach der Risperidon-Injektion deutlich reduziert (Abb. 3.1.2.1 B).

Bei der Berechnung des Gehirn/ Serum Verhältnisses ergab sich für Risperidon in der Dexamethason-Gruppe eine signifikante Erhöhung 0,5 h und 1 h nach Risperidon-Injektion und eine signifikante Reduktion 3 h danach (Abb. 3.1.2.1 C). In der PCN-Gruppe war das Gehirn/ Serum Verhältnis 1 h nach Risperidon-Injektion stark erhöht und 6 h danach reduziert (Abb. 3.1.2.1 C). Für 9-Hydroxyrisperidon war das Gehirn/ Serum Verhältnis in der Dexamethason-Gruppe 1 h und 2 h nach der Risperidon-Injektion signifikant erhöht und in der PCN-Gruppe 3 h und 6 h danach reduziert (Abb. 3.1.2.1 C). Insgesamt zeigte sich für die aktive Summe von Risperidon in der Dexamethason-Gruppe eine signifikante Erhöhung an einem Zeitpunkt (2 h nach Risperidon- Injektion), während in der PCN-Gruppe das Gehirn/ Serum Verhältnis der aktiven Summe von Risperidon 3 h und 6 h nach Risperidon-Injektion sichtbar reduziert war (Abb. 3.1.2.1 C).

Der Einfluss der verwendeten P-gp Modulatoren auf den Metabolismus von Risperidon, der durch das Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis beschrieben wird, zeigte im Hirngewebe der Versuchstiere in der Dexamethason-Gruppe 0,5 h, 1 h, 2 h und 3 h nach Risperidon-Injektion und in der PCN-Gruppe an allen beobachteten Zeitpunkten eine signifikante Reduktion (Abb. 3.1.2.1 D). Im Serum zeigte sich ein ähnliches Bild. Während sich in der Dexamethason-Gruppe an allen Zeitpunkten eine deutliche Reduktion des Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisses ergab, war dieses in der PCN-Gruppe 0,5 h, 1 h, 2 h und 3 h nach Risperidon-Injektion der Fall (Abb. 3.1.2.1 D).

Tab. 3.1.2.1 A: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe im Hirngewebe von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede nach 11-tägiger Behandlung mit dem P-gp Induktor Dexamethason (Dexa; Dosis: 50 mg/kg/d) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

<u>Gehirn</u>	Risperidon-Konzentration [ng/g]	9-Hydroxyrisperidon-Konzentration [ng/g]	Aktive Summe [ng/g]
0,5 h Dexa	78 +/- 11 [0,002]	44 +/- 3 [<0,001]	122 +/- 13 [0,048]
0,5 h Kontrolle	154 +/- 17	22 +/- 2	176 +/- 18
1 h Dexa	24 +/- 3 [<0,001]	32 +/- 2 [0,007]	57 +/- 5 [0,001]
1 h Kontrolle	63 +/- 5	26 +/- 1	89 +/- 6
2 h Dexa	4 +/- 1 [<0,001]	22 +/- 2 [0,687]	26 +/- 3 [<0,001]
2 h Kontrolle	23 +/- 2	21 +/- 1	45 +/- 2
3 h Dexa	0 [<0,001]	10 +/- 1 [0,015]	10 +/- 1 [0,001]
3 h Kontrolle	6 +/- 1	16 +/- 1	22 +/- 2
6 h Dexa	0	0	0
6 h Kontrolle	0	0	0

Tab. 3.1.2.1 B: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe im Serum von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede nach 11-tägiger Behandlung mit dem P-gp Induktor Dexamethason (Dexa; Dosis: 50 mg/kg/d) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

<u>Serum</u>	Risperidon-Konzentration [ng/g]	9-Hydroxyrisperidon-Konzentration [ng/g]	Aktive Summe [ng/g]
0,5 h Dexa	190 +/- 27 [<0,001]	241 +/- 45 [0,133]	431 +/- 64 [0,006]
0,5 h Kontrolle	566 +/- 62	163 +/- 11	729 +/- 65
1 h Dexa	66 +/- 11 [<0,001]	168 +/- 17 [0,574]	235 +/- 29 [<0,001]
1 h Kontrolle	212 +/- 8	179 +/- 7	391 +/- 11
2 h Dexa	22 +/- 12 [0,001]	86 +/- 10 [<0,001]	108 +/- 18 [<0,001]
2 h Kontrolle	132 +/- 12	151 +/- 3	283 +/- 14
3 h Dexa	5 +/- 1 [<0,001]	55 +/- 6 [0,001]	60 +/- 7 [<0,001]
3 h Kontrolle	41 +/- 6	122 +/- 13	163 +/- 18
6 h Dexa	0 [<0,001]	23 +/- 14 [0,007]	23 +/- 14 [0,007]
6 h Kontrolle	7 +/- 1	79 +/- 6	86 +/- 6

Tab. 3.1.2.1 C: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe im Hirngewebe von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede nach 11-tägiger Behandlung mit dem P-gp Induktor 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; Dosis: 25 mg/kg/d) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

<u>Gehirn</u>	Risperidon-Konzentration [ng/g]	9-Hydroxyrisperidon-Konzentration [ng/g]	Aktive Summe [ng/g]
0,5 h PCN	68 +/- 4 [<0,001]	20 +/- 2 [0,001]	87 +/- 6 [<0,001]
0,5 h Kontrolle	122 +/- 6	10 +/- 1	132 +/- 7
1 h PCN	29 +/- 1 [0,001]	19 +/- 1 [0,083]	48 +/- 1 [<0,001]
1 h Kontrolle	62 +/- 6	16 +/- 1	78 +/- 6
2 h PCN	8 +/- 1 [<0,001]	14 +/- 1 [0,002]	23 +/- 2 [<0,001]
2 h Kontrolle	36 +/- 1	21 +/- 1	57 +/- 2
3 h PCN	3 +/- 1 [<0,001]	8 +/- 1 [<0,001]	11 +/- 1 [<0,001]
3 h Kontrolle	14 +/- 1	18 +/- 1	31 +/- 2
6 h PCN	0 [0,004]	0 [<0,001]	0 [<0,001]
6 h Kontrolle	6 +/- 2	16 +/- 1	23 +/- 3

Tab. 3.1.2.1 D: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe im Serum von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede nach 11-tägiger Behandlung mit dem P-gp Induktor 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; Dosis: 25 mg/kg/d) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

<u>Serum</u>	Risperidon-Konzentration [ng/g]	9-Hydroxyrisperidon-Konzentration [ng/g]	Aktive Summe [ng/g]
0,5 h PCN	219 +/- 18 [0,001]	201 +/- 9 [0,002]	421 +/- 27 [0,008]
0,5 h Kontrolle	414 +/- 12	153 +/- 7	566 +/- 17
1 h PCN	119 +/- 5 [<0,001]	201 +/- 7 [0,809]	320 +/- 10 [<0,001]
1 h Kontrolle	314 +/- 30	198 +/- 9	511 +/- 37
2 h PCN	32 +/- 2 [<0,001]	101 +/- 7 [0,001]	134 +/- 9 [<0,001]
2 h Kontrolle	128 +/- 9	168 +/- 8	296 +/- 22
3 h PCN	19 +/- 1 [<0,001]	81 +/- 4 [<0,001]	100 +/- 5 [<0,001]
3 h Kontrolle	73 +/- 8	158 +/- 9	232 +/- 14
6 h PCN	7 +/- 1 [0,002]	45 +/- 6 [0,014]	51 +/- 7 [0,008]
6 h Kontrolle	19 +/- 3	87 +/- 12	106 +/- 14

Tab. 3.1.2.1 E: Statistische Bewertung der Gehirn/ Serum Verhältnisse von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und ihrer aktiven Summe in Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden die Signifikanz (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 11-tägiger Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason, 25 mg/kg/d PCN oder Kontrolle (Saline oder Maisöl). Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; ---= Berechnung nicht möglich].

	Gehirn/ Serum Verhältnis Risperidon		Gehirn/ Serum Verhältnis 9-Hydroxyrisperidon		Gehirn/ Serum Verhältnis Aktive Summe	
	Dexa	PCN	Dexa	PCN	Dexa	PCN
0,5 h	0,010	0,557	0,195	0,393	0,161	0,223
1 h	0,007	<0,001	0,001	0,350	0,119	0,657
2 h	0,163	0,122	<0,001	0,264	0,003	0,070
3 h	<0,001	0,283	0,051	0,005	0,114	0,019
6 h	---	0,005	---	<0,001	---	<0,001

Tab. 3.1.2.1 F: Statistische Bewertung der Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisse im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden die Signifikanz (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 11-tägiger Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason, 25 mg/kg/d PCN oder Kontrolle (Saline oder Maisöl). Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; ---= Berechnung nicht möglich].

	Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis (Gehirn)		Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis (Serum)	
	Dexa	PCN	Dexa	PCN
0,5 h	<0,001	0,001	<0,001	0,046
1 h	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
2 h	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
3 h	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
6 h	---	0,008	<0,001	0,092

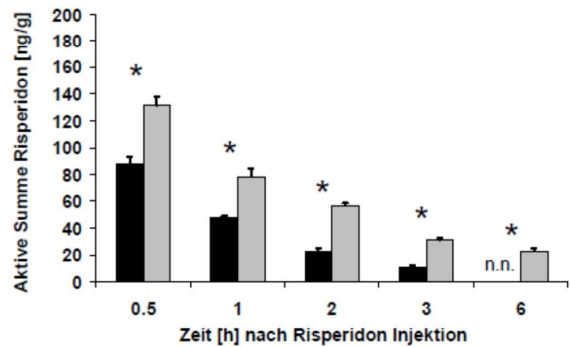
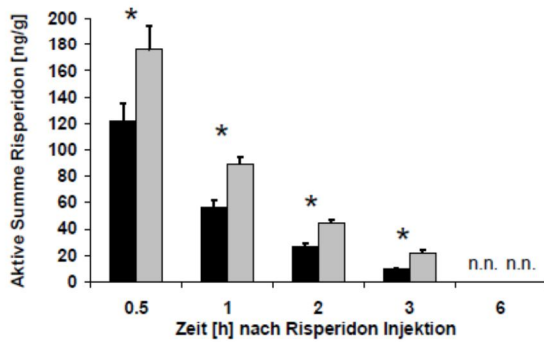
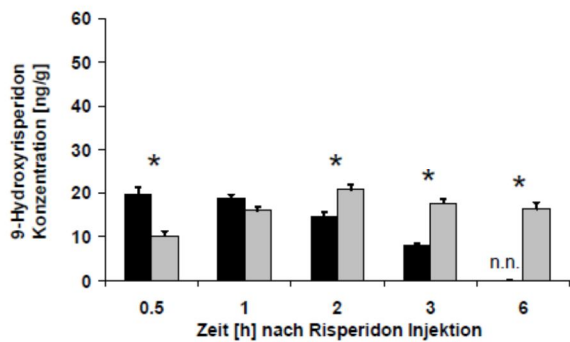
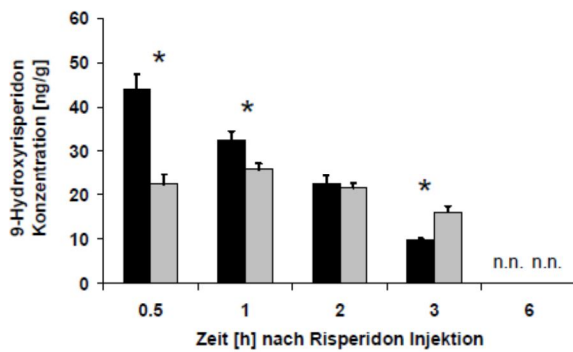
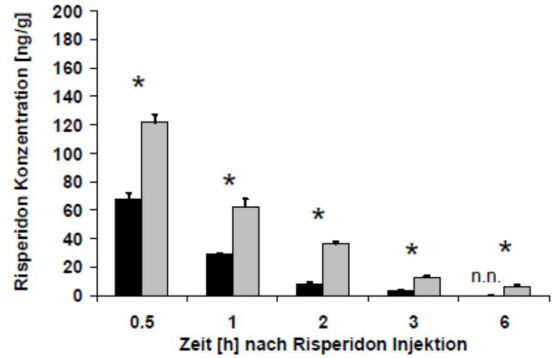
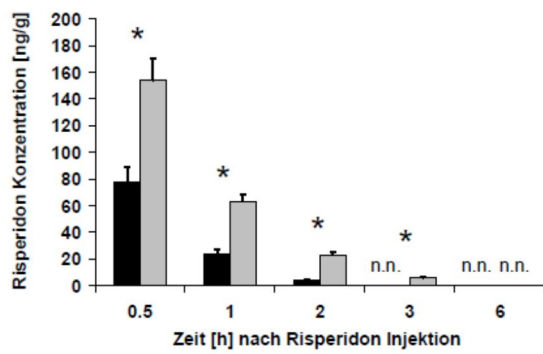


Abb. 3.1.2.1 A: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon im Hirngewebe von Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Balken (P-gp Modulator); graue Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0.05$]. Dargestellt werden Mittelwerte \pm Standardfehler.

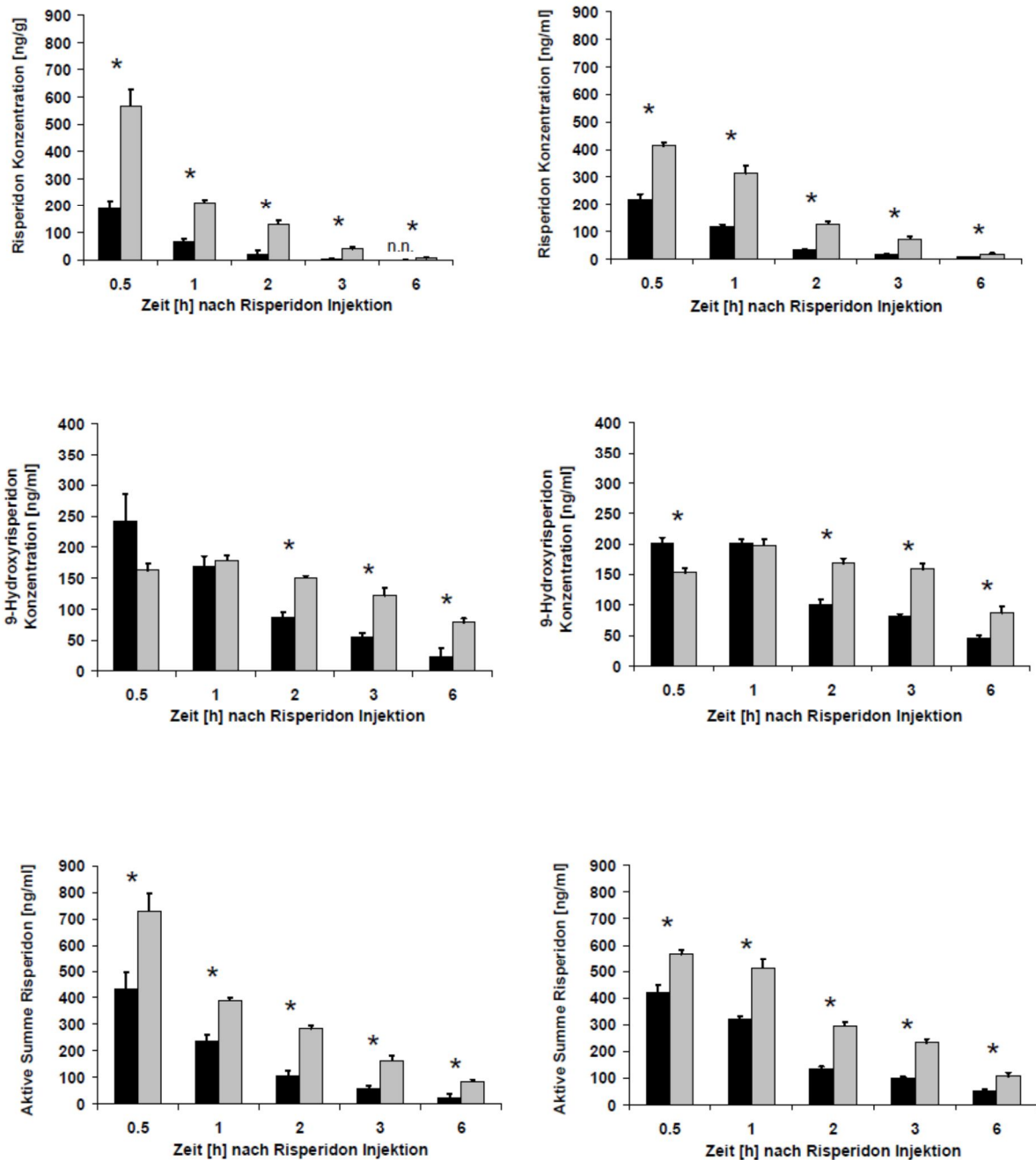


Abb. 3.1.2.1 B: Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon im Serum von Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3β-ol-20-on-16α-Carbonitril (PCN; links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Balken (P-gp Modulator); graue Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * p<0.05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

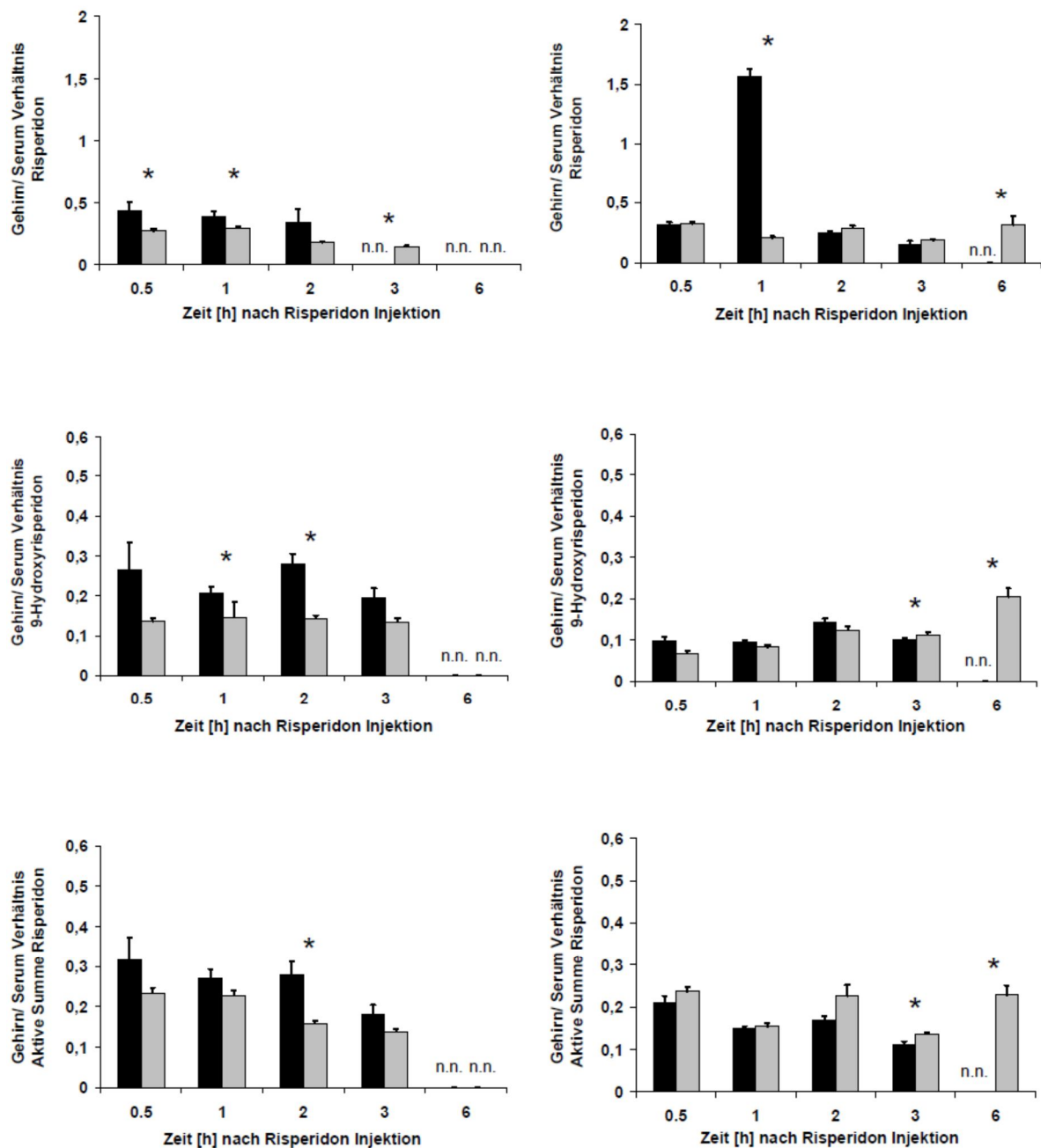


Abb. 3.1.2.1 C: Gehirn/ Serum Verhältnis von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon bei Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Balken (P-gp Modulator); graue Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0.05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

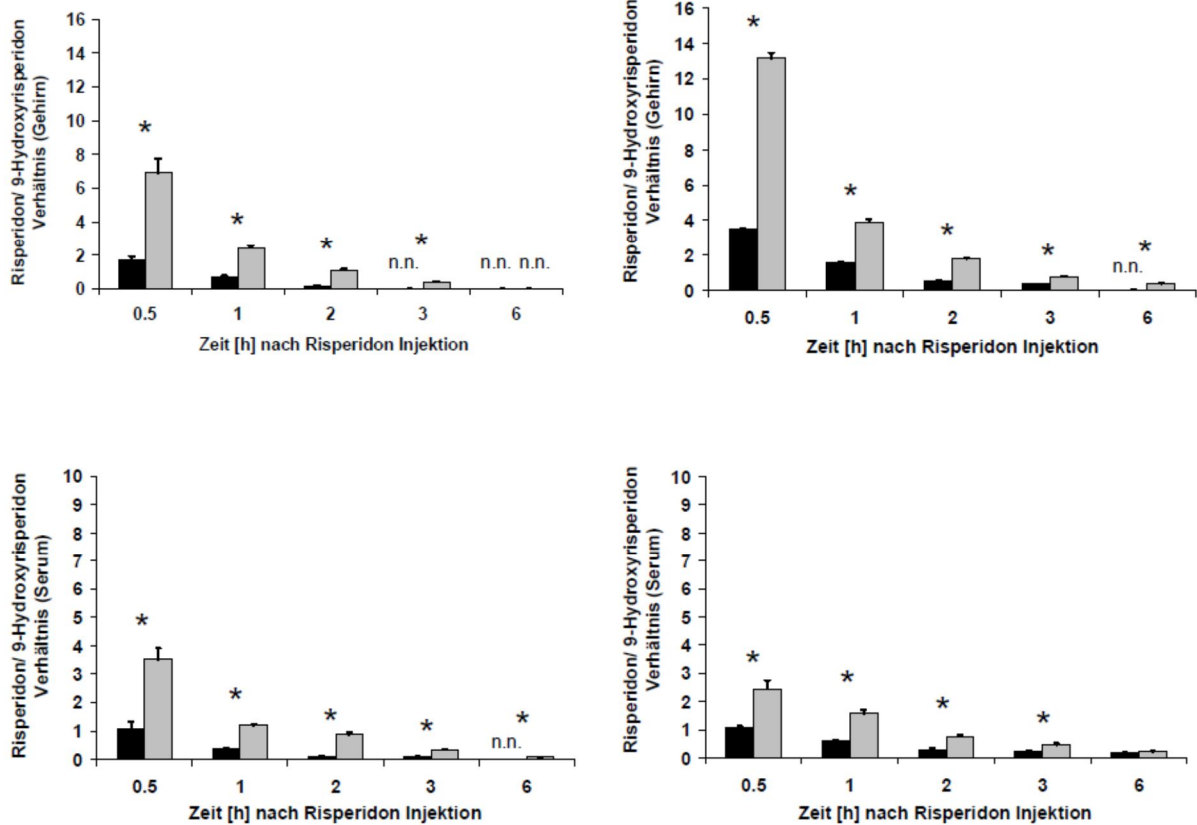


Abb. 3.1.2.1 D: Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis im Gehirn (oben) und Serum (unten) bei Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Balken (P-gp Modulator); graue Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * p<0.05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

3.1.2.2 Haloperidol

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Risperidon zeigte sich sowohl in der Dexamethason-/ , als auch in der PCN-Gruppe eine signifikante Reduktion der Haloperidol-Konzentration an allen beobachteten Zeitpunkten im Hirngewebe (Abb. 3.1.2.2 A) und Serum (Abb. 3.1.2.2 B) der Versuchstiere.

Die Verteilung zwischen Hirngewebe und Serum (Gehirn/ Serum Verhältnis) zeigte in der Dexamethason-Gruppe 0,5 h nach Haloperidol-Injektion eine signifikante Reduktion und 2 h nach Injektion eine signifikante Erhöhung (Abb. 3.1.2.2 C). In der PCN-Gruppe konnten keinerlei Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 3.1.2.2 C).

Tab. 3.1.2.2 A: Konzentrationen von Haloperidol in Hirngewebe- und Serumproben von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede nach 11-tägiger Behandlung mit dem P-gp Induktor Dexamethason (Dexa; Dosis: 50 mg/kg/d) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

	Haloperidol-Konzentration Gehirn [ng/g]	Haloperidol-Konzentration Serum [ng/ml]
0,5 h Dexa	705 +/- 38 [<0,001]	87 +/- 5 [0,001]
0,5 h Kontrolle	2006 +/- 96	203 +/- 8
1 h Dexa	442 +/- 25 [<0,001]	54 +/- 3 [<0,001]
1 h Kontrolle	1641 +/- 82	179 +/- 7
2 h Dexa	172 +/- 30 [<0,001]	20 +/- 3 [<0,001]
2 h Kontrolle	1354 +/- 149	141 +/- 13
3 h Dexa	129 +/- 5 [0,001]	17 +/- 1 [<0,001]
3 h Kontrolle	690 +/- 73	84 +/- 8
6 h Dexa	35 +/- 2 [0,001]	1 +/- 1 [0,001]
6 h Kontrolle	380 +/- 52	54 +/- 10

Tab. 3.1.2.2 B: Konzentrationen von Haloperidol in Hirngewebe- und Serumproben von Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Angaben in Klammern zeigen die statistische Bewertung (p-Wert) der Unterschiede nach 11-tägiger Behandlung mit dem P-gp Induktor 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; Dosis: 25 mg/kg/d) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

		Haloperidol-Konzentration Gehirn [ng/g]	Haloperidol-Konzentration Serum [ng/g]
0,5 h	PCN	880 +/- 53 [$<0,001$]	99 +/- 6 [$<0,001$]
0,5 h	Kontrolle	1882 +/- 60	187 +/- 6
1 h	PCN	678 +/- 37 [$0,002$]	78 +/- 4 [$<0,001$]
1 h	Kontrolle	1519 +/- 127	163 +/- 14
2 h	PCN	268 +/- 17 [$<0,001$]	32 +/- 1 [$<0,001$]
2 h	Kontrolle	1039 +/- 76	125 +/- 5
3 h	PCN	176 +/- 22 [$<0,001$]	19 +/- 2 [$<0,001$]
3 h	Kontrolle	726 +/- 73	94 +/- 6
6 h	PCN	38 +/- 7 [$<0,001$]	4 +/- 1 [$<0,001$]
6 h	Kontrolle	434 +/- 28	54 +/- 3

Tab. 3.1.2.2 C: Statistische Bewertung der Gehirn/ Serum Verhältnisse von Haloperidol in Wildtyp (WT) Mäusen. Dargestellt wird die Signifikanz (p-Wert) der Unterschiede zwischen den P-gp Modulatoren und der jeweiligen Kontrollgruppe nach jeweils 11-tägiger Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason, 25 mg/kg/d PCN oder Kontrolle (Saline oder Maisöl). Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet [Dexa=Dexamethason; PCN=5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril].

Gehirn/ Serum Verhältnis Haloperidol		
	Dexa	PCN
0,5 h	0,004	0,092
1 h	0,161	0,569
2 h	0,034	0,872
3 h	0,510	0,127
6 h	0,249	0,169

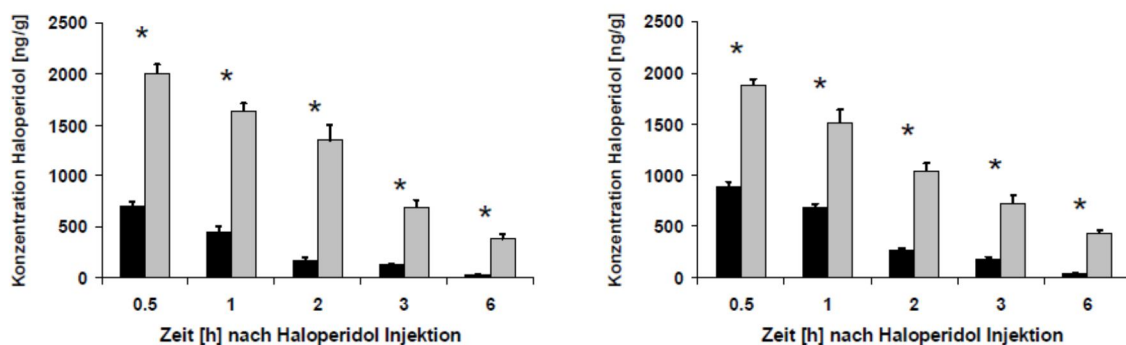


Abb. 3.1.2.2 A: Konzentrationen von Haloperidol im Hirngewebe von Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (links) Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Balken (P-gp Modulator); graue Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * p<0.05]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

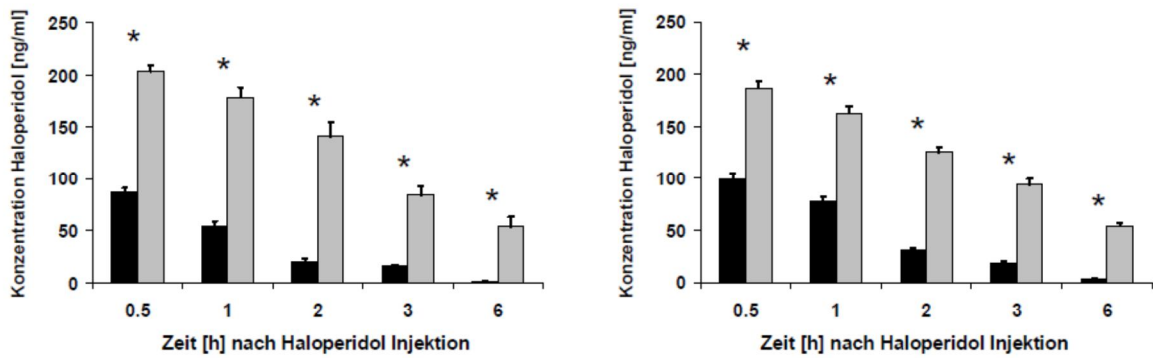


Abb. 3.1.2.2 B: Konzentrationen von Haloperidol im Serum von Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Balken (P-gp Modulator); graue Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0.05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

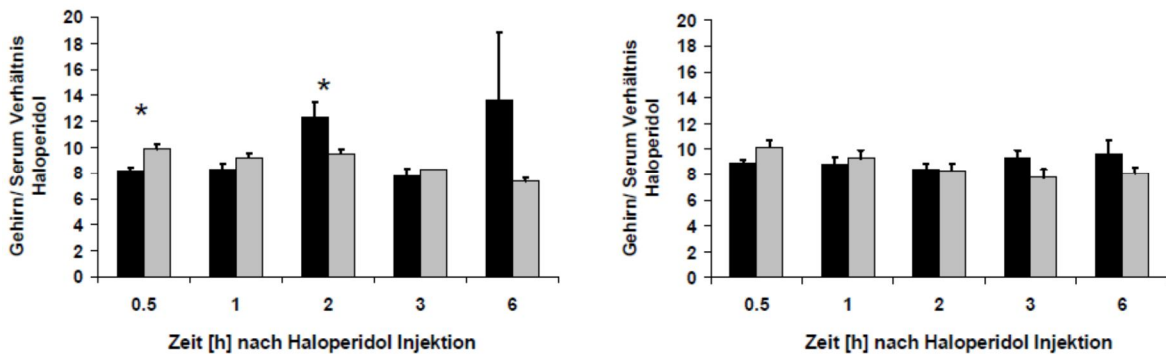


Abb. 3.1.2.2 C: Gehirn/ Serum Verhältnis von Haloperidol bei Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason(links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Balken (P-gp Modulator); graue Balken (Kontrolle); n.n.= nicht nachweisbar; * $p < 0.05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

Tab. 3.1.2.2 D: Zusammenfassung und Überblick der wichtigsten Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen zur P-gp Modulation nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d PCN im Vergleich zur Kontrollgruppe und dessen Einfluss auf die Konzentration von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und deren aktiver Summe im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (FVB/N) Mäusen [RIS= Konzentration Risperidon; OH-RIS= Konzentration 9-Hydroxyrisperidon; Akt. Sum= Konzentration der aktiven Summe von Risperidon; G/S RIS= Gehirn/ Serum Verhältnis Risperidon; G/S OH-RIS= Gehirn/ Serum Verhältnis 9-Hydroxyrisperidon; G/S Sum= Gehirn/ Serum Verhältnis aktive Summe Risperidon; RISr Hirn= Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis Gehirn; RISr Ser= Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis Serum; PCN= 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; \downarrow = signifikant erniedrigt; \uparrow = signifikant erhöht; $\uparrow\downarrow$ = sowohl signifikante Erhöhung als auch signifikante Reduktion zu beobachten].

11 Tage Behandlung	<u>Hirngewebe</u>				<u>Serum</u>				<u>Hirn/ Serum</u>		
	RIS	OH- RIS	Akt. Sum	RISr Hirn	RIS	OH- RIS	Akt. Sum	RISr Ser	G/S RIS	G/S OH- RIS	G/S Sum
Dexamethason	\downarrow	$\downarrow\uparrow$	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	$\downarrow\uparrow$	\uparrow	\uparrow
PCN	\downarrow	$\downarrow\uparrow$	\downarrow	\downarrow	\downarrow	$\downarrow\uparrow$	\downarrow	\downarrow	$\downarrow\uparrow$	\downarrow	\downarrow

Tab. 3.1.2.2 E: Zusammenfassung und Überblick der wichtigsten Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen zur P-gp Modulation nach 11 Tagen Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d PCN und dessen Einfluss auf die Konzentration von Haloperidol in Wildtyp (FVB/N) Mäusen [PCN= 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; \downarrow = signifikant erniedrigt; \uparrow = signifikant erhöht; $\uparrow\downarrow$ = sowohl signifikante Erhöhung als auch signifikante Reduktion zu beobachten; O= keine signifikanter Unterschied].

11 Tage Behandlung	<u>Haloperidol-Konzentration</u>	<u>Haloperidol-Konzentration</u>	<u>Hirn/ Serum</u>
	<u>Hirngewebe</u>	<u>Serum</u>	<u>Verhältnis</u> <u>Haloperidol</u>
Dexamethason	\downarrow	\downarrow	$\downarrow\uparrow$
PCN	\downarrow	\downarrow	O

3.2 Verhaltenspharmakologische Untersuchungen

3.2.1 RotaRod

Die Untersuchungen auf dem RotaRod wurden durchgeführt, um festzustellen, ob eine Behandlung mit den pharmakokinetisch effektiven P-gp Modulatoren Dexamethason oder PCN pharmakodynamische Konsequenzen für die Wirkung von Risperidon bzw. Haloperidol hat. Antipsychotika verursachen durch ihre Dopamin-antagonistische Wirkung motorische Nebenwirkungen, die mit Hilfe des RotaRod Testes erfasst werden können [Kirschbaum et al. (2009)]. Mit Hilfe des RotaRod-Systems sollte ermittelt werden, ob eine Behandlung mit Dexamethason oder PCN die motorischen Nebenwirkungen beeinflussen kann um damit Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen zu ziehen, die die Wirksamkeit der untersuchten Antipsychotika modulieren können. Dazu wurden die Versuchstiere 5 Tage (4 Durchläufe pro Tag) an das RotaRod gewöhnt. Der Mittelwert aus Tag 4 und Tag 5 wurde als Referenzwert zur Beurteilung der Leistung auf dem RotaRod während der folgenden 11-tägigen Trainingsphase verwendet. In dieser Zeit wurden die P-gp Modulatoren injiziert. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die P-gp Modulatoren selbst einen Einfluss auf die Motorik haben können. Der Mittelwert aus der Trainingsphase (Tag 6- Tag 16) wurde wiederum als Referenzwert für die Untersuchungen nach Risperidon-/ bzw. Haloperidol-Injektion an Tag 17 verwendet. An diesem Tag wurde das jeweilige Antipsychotikum in einer Dosis von 3 mg/kg i.p. injiziert und die Leistung auf dem RotaRod nach 0,5, 2, 4, 6, 8 und 10 h untersucht.

3.2.1.1 Risperidon

Die Laufleistung auf dem RotaRod wurde in diesem Versuch herangezogen, um durch Veränderungen der pharmakodynamischen Effekte der verwendeten Antipsychotika einen Rückschluss auf den Einfluss der Behandlung mit P-gp Modulatoren zu erlauben. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d PCN zu einer besseren Laufleistung auf dem RotaRod führt (Abb. 3.2.1.1 B). Nach 11 Tagen Gabe von Dexamethason zeigte sich an allen der beobachteten Zeitpunkte eine signifikant verbesserte Laufleistung gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 3.2.1.1 B). Nach der Gabe von PCN über 11 Tage konnte eine signifikant bessere RotaRod-Leistung 4 h, 6 h und 8 h nach der Injektion von 3 mg/kg Risperidon gemessen werden. Wie aus Abb. 3.2.1.1 A hervorgeht, zeigten die Versuchstiere deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen bei der Lernleistung auf dem RotaRod. Während in der Dexamethason-Gruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe kaum mehr Veränderungen in der Trainingsleistung im Verlauf der Behandlung von 11 Tagen zu verzeichnen war, zeigte sich in der PCN-Gruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe ein deutlicher Lerneffekt über diesen Zeitraum (Abb. 3.2.1.1 A). Beim

Vergleich von Dexamethason und PCN mit der entsprechenden Kontrollgruppe konnte an jeweils zwei Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied gemessen werden. An den anderen Zeitpunkten unterschiedlich sie sich nicht (Abb. 3.2.1.1 A).

Tab.3.2.1.1 A: Veränderung der Laufleistung [%] von Wildtyp (WT) Mäusen auf dem RotaRod während der Trainingszeit über 11 Tage (Tag 6- Tag 16) unter Behandlung mit Dexamethason (50 mg/kg/d), 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; 25 mg/kg/d) oder Kontrolle (Saline oder Maisöl). Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Die prozentuale Abweichung bezieht sich auf die Veränderung zum Mittelwert aus Tag 4 und Tag 5 der Gewöhnungsphase (Tag 1- Tag 5). Werte in Klammern geben den F-Wert und den p-Wert (ANOVA Analyse) der Unterschiede zwischen Modulator Gruppe und Kontrolle an. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

	Dexamethason	Kontrolle [Saline]	PCN	Kontrolle [Maisöl]
Tag 1	11,11 +/- 4,17 [F(1;150)=0,021/ p=0,885]	10,20 +/- 4,70	4,96 +/- 4,68 [F(1;158)=0,308/ p=0,580]	8,68 +/- 4,80
Tag 2	12,51 +/- 4,41 [F(1;150)=1,360/ p=0,245]	4,43 +/- 5,35	30,98 +/- 6,17 [F(1;158)=2,739/ p=0,100]	15,99 +/- 6,63
Tag 3	5,61 +/- 5,23 [F(1;150)=0,754/ p=0,387]	11,93 +/- 5,05	47,12 +/- 7,34 [F(1;154)=0,168/ p=0,683]	51,59 +/- 8,04
Tag 4	5,36 +/- 4,62 [F(1;150)=2,213/ p=0,139]	16,45 +/- 5,85	69,58 +/- 9,37 [F(1;150)=7,425/ p=0,007]	36,69 +/- 7,62
Tag 5	6,70 +/- 4,92 [F(1;150)=2,974/ p=0,087]	20,25 +/- 6,12	61,05 +/- 10,20 [F(1;146)=1,205/ p=0,274]	47,10 +/- 7,71
Tag 6	13,91 +/- 4,44 [F(1;146)=0,666/ p=0,416]	19,86 +/- 5,72	73,42 +/- 10,98 [F(1;146)=1,284/ p=0,259]	57,14 +/- 9,35
Tag 7	8,52 +/- 4,42 [F(1;146)=5,163/ p=0,025]	25,31 +/- 5,85	79,22 +/- 12,07 [F(1;142)=0,143/ p=0,706]	73,48 +/- 9,49
Tag 8	8,50 +/- 4,76 [F(1;146)=7,166/ p=0,008]	29,43 +/- 6,13	91,12 +/- 12,53 [F(1;142)=0,344/ p=0,559]	81,89 +/- 9,80
Tag 9	15,99 +/- 5,74 [F(1;146)=1,662/ p=0,199]	26,97 +/- 6,27	90,80 +/- 12,38 [F(1;142)=0,091/ p=0,763]	86,05 +/- 9,93
Tag 10	13,30 +/- 6,35 [F(1;146)=0,471/ p=0,494]	19,79 +/- 6,97	112,56 +/- 13,10 [F(1;142)=4,222/ p=0,042]	79,40 +/- 9,78
Tag 11	25,35 +/- 5,63 [F(1;146)=1,034/ p=0,311]	34,55 +/- 7,01	87,44 +/- 12,13 [F(1;142)=0,098/ p=0,754]	82,82 +/- 8,73

Tab. 3.2.1.1 B: Laufleistung [in %; Abweichung vom Trainings-Kontrollwert] von Wildtyp (WT) Mäusen auf dem RotaRod nach Risperidon-Injektion (3 mg/kg) nach 11-tägiger Behandlung mit Dexamethason (50 mg/kg), 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; 25 mg/kg) oder Vehikel (Saline oder Maisöl) als Kontrollen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Werte in Klammern geben den F-Wert der ANOVA Auswertung und den p-Wert zur Beurteilung der Unterschiede zwischen der Dexamethason bzw. der PCN Gruppe im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe an. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

Zeitpunkt nach Risperidon-Injektion	Dexamethason [50 mg/kg/d]	Kontrolle [Saline]	PCN [25 mg/d]	Kontrolle [Maisöl]
0,5 h	-79,85 +/- 2,45 [F(1;154)=9,746/ p=0,002]	-89,14 +/- 1,43	-91,79 +/- 1,20 [F(1;142)=0,055/ p=0,814]	-92,16 +/- 1,02
2 h	-59,27 +/- 3,63 [F(1;154)=55,100/ p=<0,001]	-85,47 +/- 1,40	-83,61 +/- 1,58 [F(1;142)=0,248/ p=0,619]	-84,74 +/- 1,62
4 h	-30,44 +/- 4,39 [F(1;154)=83,627/ p=<0,001]	-72,10 +/- 2,30	-49,38 +/- 3,00 [F(1;142)=12,564/ p=0,001]	-63,85 +/- 2,77
6 h	-16,21 +/- 4,60 [F(1;153)=51,033/ p=<0,001]	-52,45 +/- 3,26	-10,64 +/- 4,09 [F(1;142)=50,594/ p=<0,001]	-48,39 +/- 3,44
8 h	-5,73 +/- 4,56 [F(1;153)=19,240/ p=<0,001]	-29,61 +/- 3,10	1,82 +/- 4,28 [F(1;142)=11,914/ p=0,001]	-20,71 +/- 4,84
10 h	-7,80 +/- 3,81 [F(1;149)=4,538/ p=0,035]	-19,45 +/- 3,38	3,54 +/- 3,39 [F(1;142)=1,755/ p=0,187]	-4,28 +/- 4,69

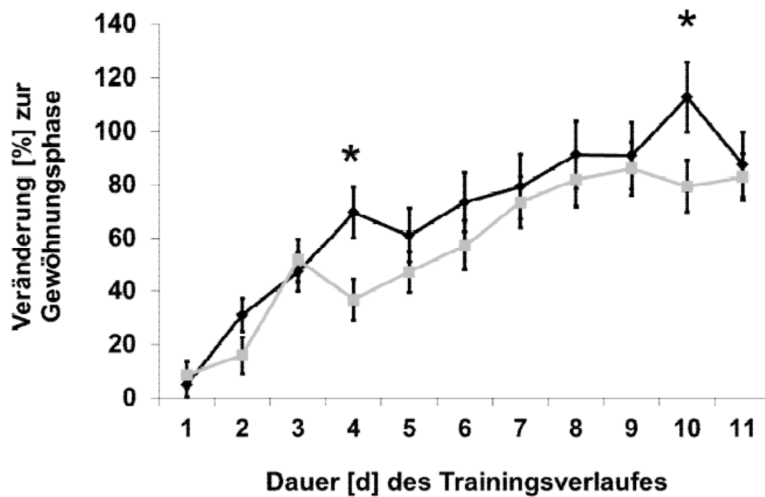
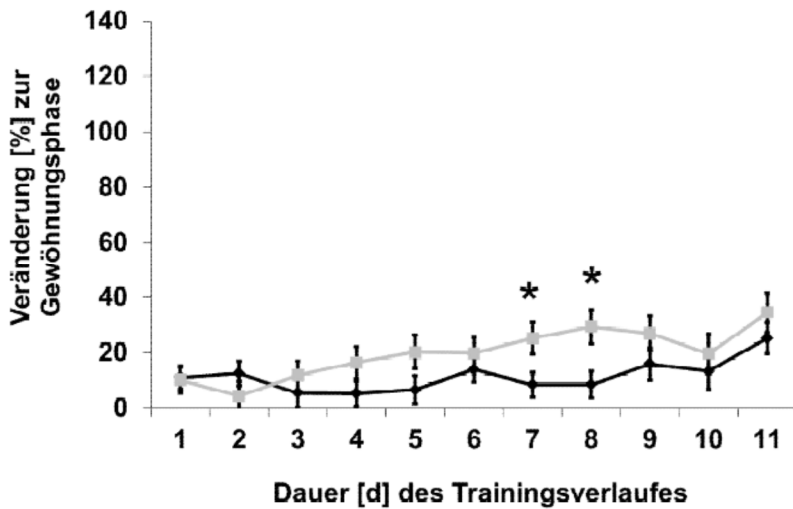


Abb. 3.2.1.1 A: Vergleich des Verlaufs der Trainingsleistung der Wildtyp (WT) Mäuse über den gesamten Trainingszeitraum (11 Tage), zur Beurteilung der Lernleistung, ab Beginn der Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (oben) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; unten) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien= P-gp Modulator, graue Linien= Kontrolle; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Die Veränderung zur Gewöhnungsphase bezieht sich auf den Mittelwert der individuellen Leistung aus Tag 4 und Tag 5 der fünftägigen Gewöhnungsphase vor Beginn des Trainings über 11 Tage.

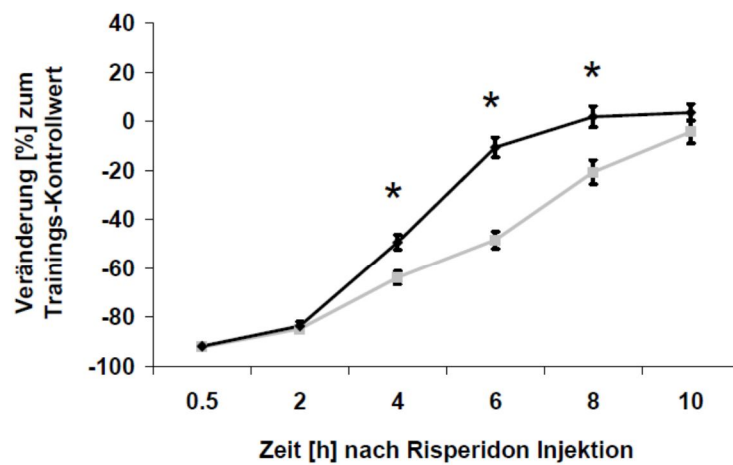
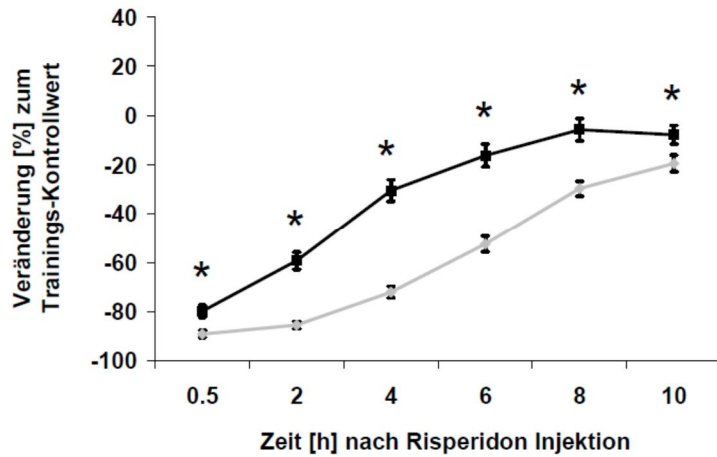


Abb. 3.2.1.1 B: Laufleistung auf dem RotaRod von Wildtyp (WT) Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung mit 3 mg/kg Risperidon an Tag 17, nach 11-tägiger Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (oben) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; unten) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl). Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Der Trainings-Kontrollwert bezieht sich auf den Mittelwert der individuellen Leistung von Tag 6 bis Tag 16.

3.2.1.2 Haloperidol

Zum Vergleich zu den Ergebnissen unter Behandlung mit dem P-gp Substrat Risperidon wurden weitere Untersuchungen auf dem RotaRod unter Behandlung mit Haloperidol durchgeführt, welches kein P-gp Substrat ist. Dies sollte einen direkten Vergleich des Einflusses von Dexamethason und PCN auf P-gp abhängige Transportvorgänge und anderen Faktoren herstellen, die durch die 11-tägige Behandlung mit diesen Substanzen möglicherweise verursacht werden können.

Beim Vergleich der Lernleistung auf dem RotaRod während der Behandlung mit den P-gp Modulatoren Dexamethason und PCN über 11 Tage zeigte sich in der Dexamethason-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe eine deutliche Lernleistung über den Trainingszeitraum, jedoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 3.2.1.2 A). Bei der Gabe von PCN zeigte sich eine moderate Lernleistung und an zwei von 11 Tagen des Trainings waren signifikante Unterschiede zwischen der PCN-Gruppe und dessen Kontrollgruppe messbar (Abb. 3.2.1.2 A). Am Versuchstag (Tag 17) zeigte sich nach 11 Tagen Gabe von 50 mg/kg/d Dexamethason eine signifikante Verbesserung der RotaRod-Leistung 4 h, 6 h, 8 h und 10 h nach Haloperidol-Injektion (3 mg/kg), während nach 11-tägiger Gabe von 25 mg/kg/d PCN 8 h und 10 h nach der Haloperidol-Injektion ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe messbar war (Abb. 3.2.1.2 B).

Tab.3.2.1.2 A: Veränderung der Laufleistung [%] von Wildtyp (WT) Mäusen auf dem RotaRod während der Trainingszeit über 11 Tage (Tag 6- Tag 16) unter Behandlung mit Dexamethason (50 mg/kg/d), 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; 25 mg/kg/d) oder Kontrolle (Saline oder Maisöl). Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Die prozentuale Abweichung bezieht sich auf die Veränderung zum Mittelwert aus Tag 4 und Tag 5 der Gewöhnungsphase (Tag 1- Tag 5). Werte in Klammern geben den F-Wert und den p-Wert (ANOVA Analyse) der Unterschiede zwischen Dexamethason bzw. PCN Gruppe zur jeweiligen Kontrolle an. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

	Dexamethason	Kontrolle [Saline]	PCN	Kontrolle [Maisöl]
Tag 1	12,05 +/- 5,75 [F(1;146)=0,222/ p=0,638]	8,17 +/- 5,86	7,79 +/- 4,76 [F(1;158)=0,470/ p=0,494]	12,27 +/- 4,49
Tag 2	26,96 +/- 6,27 [F(1;146)=2,348/ p=0,128]	11,64 +/- 7,70	17,64 +/- 4,87 [F(1;158)=6,217/ p=0,014]	2,32 +/- 3,75
Tag 3	30,43 +/- 7,34 [F(1;146)=0,652/ p=0,421]	22,33 +/- 6,86	18,81 +/- 5,37 [F(1;158)=4,327/ p=0,039]	3,92 +/- 4,74
Tag 4	51,85 +/- 7,09 [F(1;146)=3,616/ p=0,059]	32,58 +/- 7,21	21,17 +/- 5,69 [F(1;158)=0,824/ p=0,365]	13,37 +/- 6,44
Tag 5	42,11 +/- 6,72 [F(1;146)=0,002/ p=0,967]	42,58 +/- 8,93	17,28 +/- 5,53 [F(1;158)=0,111/ p=0,739]	14,67 +/- 5,53
Tag 6	46,65 +/- 6,81 [F(1;146)=0,081/ p=0,777]	43,42 +/- 8,95	22,97 +/- 6,34 [F(1;158)=0,499/ p=0,481]	16,84 +/- 5,94
Tag 7	60,10 +/- 7,37 [F(1;146)=0,007/ p=0,931]	59,15 +/- 8,20	21,70 +/- 6,48 [F(1;158)=0,124/ p=0,725]	24,69 +/- 5,51
Tag 8	72,69 +/- 7,39 [F(1;146)=0,007/ p=0,935]	73,61 +/- 8,40	28,16 +/- 6,97 [F(1;158)=0,200/ p=0,655]	32,43 +/- 6,54
Tag 9	66,41 +/- 7,53 [F(1;146)=0,191/ p=0,663]	61,15 +/- 9,31	21,53 +/- 6,80 [F(1;158)=0,748/ p=0,388]	29,34 +/- 5,95
Tag 10	65,51 +/- 6,85 [F(1;146)=1,228/ p=0,270]	80,01 +/- 10,96	29,86 +/- 6,95 [F(1;158)=0,007/ p=0,932]	30,67 +/- 6,49
Tag 11	105,29 +/- 9,23 [F(1;146)=2,221/ p=0,138]	84,13 +/- 10,70	31,83 +/- 6,62 [F(1;154)=0,080/ p=0,778]	34,44 +/- 6,43

Tab. 3.2.1.2 B: Laufleistung [in %; Abweichung vom Trainings-Kontrollwert] von Wildtyp (WT) Mäusen auf dem RotaRod nach Haloperidol-Injektion (3 mg/kg) nach 11-tägiger Behandlung mit Dexamethason (50 mg/kg), 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; 25 mg/kg) oder Vehikel (Saline oder Maisöl) als Kontrollen. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Werte in Klammern geben den F-Wert der ANOVA Auswertung und den p-Wert zur Beurteilung der Unterschiede zwischen der Dexamethason bzw. der PCN Gruppe im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe an. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

Zeitpunkt nach Haloperidol-Injektion	Dexamethason [50 mg/kg/d]	Kontrolle [Saline]	PCN [25 mg/d]	Kontrolle [Maisöl]
0,5 h	-61,61 +/- 3,70 [F(1;158)=0,023/ p=0,878]	-62,41 +/- 3,69	-66,44 +/- 3,45 [F(1;150)=0,348/ p=0,556]	-69,00 +/- 2,93
2 h	-46,95 +/- 4,11 [F(1;158)=0,054/ p=0,816]	-48,25 +/- 3,76	-52,15 +/- 3,17 [F(1;143)=1,521/ p=0,219]	-57,84 +/- 3,20
4 h	-24,60 +/- 3,46 [F(1;153)=5,627/ p=0,019]	-37,33 +/- 4,08	-46,27 +/- 3,57 [F(1;150)=0,225/ p=0,636]	-43,87 +/- 3,42
6 h	8,30 +/- 5,21 [F(1;158)=24,711/ p=<0,001]	-25,38 +/- 4,48	-36,47 +/- 4,43 [F(1;150)=0,044/ p=0,833]	-35,36 +/- 3,04
8 h	22,28 +/- 5,01 [F(1;154)=49,300/ p=<0,001]	-21,25 +/- 3,72	-18,39 +/- 4,22 [F(1;150)=7,523/ p=0,007]	-32,94 +/- 3,18
10 h	31,92 +/- 4,99 [F(1;154)=39,665/ p=<0,001]	-8,82 +/- 4,16	-11,00 +/- 5,17 [F(1;150)=5,401/ p=0,021]	-25,02 +/- 3,33

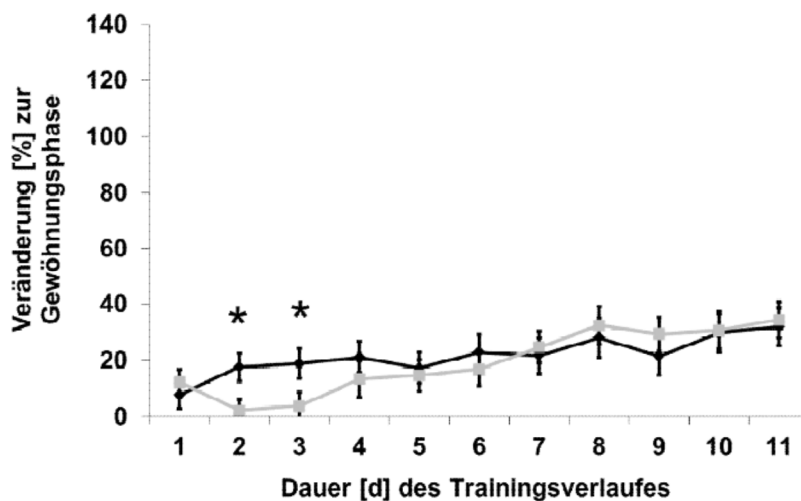
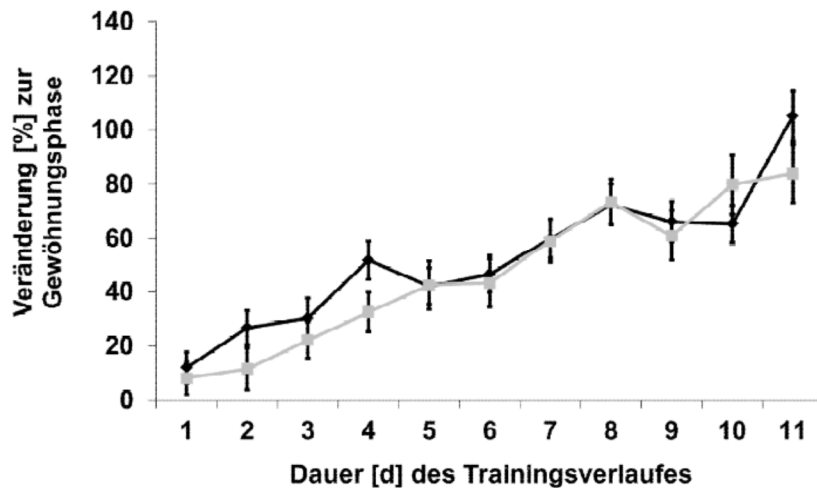


Abb. 3.2.1.2 A: Vergleich des Verlaufs der Trainingsleistung von Wildtyp (WT) Mäusen über den gesamten Trainingszeitraum (11 Tage), zur Beurteilung der Lernleistung, ab Beginn der Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (oben) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3β-ol-20-on-16α-Carbonitril (PCN; unten) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien= P-gp Modulator, graue Linien= Kontrolle; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte \pm Standardfehler. Die Veränderung zur Gewöhnungsphase bezieht sich auf den Mittelwert der individuellen Leistung aus Tag 4 und Tag 5 der fünftägigen Gewöhnungsphase vor Beginn des Trainings über 11 Tage.

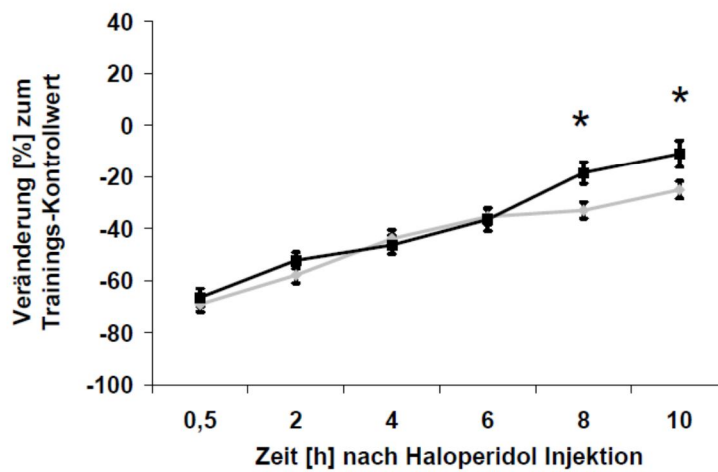
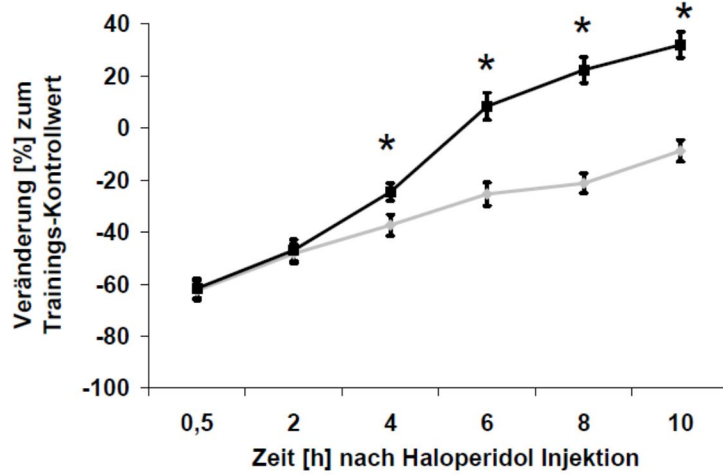


Abb. 3.2.1.2 B: Laufleistung von Wildtyp (WT) Mäusen auf dem RotaRod an verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf nach Behandlung mit 3 mg/kg Haloperidol an Tag 17, nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason (oben) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3β-ol-20-on-16α-Carbonitril (PCN; unten) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl). Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler. Der Trainings-Kontrollwert bezieht sich auf den Mittelwert der individuellen Leistung aus Tag 6 bis Tag 16.

Tab. 3.2.1.2 C: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen zur P-gp Modulation nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d PCN im Vergleich zur Kontrollgruppe und dessen Einfluss auf die Konzentration von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und deren aktiver Summe im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (WT) Mäusen (FVB/N) und dem Zusammenhang mit der Lern-/ und Laufleistung auf dem RotaRod als Maß für den Einfluss der P-gp Modulation auf motorische Nebenwirkungen von Risperidon [RIS= Konzentration Risperidon; OH-RIS= Konzentration 9-Hydroxyrisperidon; Akt. Sum= aktive Summe Risperidon; Dexa= Dexamethason; PCN= 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; \downarrow = signifikant erniedrigt; \uparrow = signifikant erhöht; $\uparrow\downarrow$ = sowohl signifikante Erhöhung als auch signifikante Reduktion zu beobachten; O= kein signifikanter Unterschied].

11 Tage Behandlung	<u>Hirngewebe</u>			<u>Serum</u>			<u>RotaRod Ergebnisse</u>	
	RIS	OH- RIS	Akt. Sum	RIS	OH- RIS	Akt. Sum	<u>Einfluss des P-gp Modulators auf die Lernleistung auf dem RotaRod</u>	<u>Laufleistung RotaRod</u>
Dexa	\downarrow	$\downarrow\uparrow$	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\uparrow
PCN	\downarrow	$\downarrow\uparrow$	\downarrow	\downarrow	$\downarrow\uparrow$	\downarrow	\uparrow	\uparrow

Tab. 3.2.1.2 D: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen zur P-gp Modulation nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d PCN im Vergleich zur Kontrollgruppe und dessen Einfluss auf die Konzentration von Haloperidol im Hirngewebe und Serum von Wildtyp (WT) Mäusen (FVB/N) und dem Zusammenhang mit der Lern-/ und Laufleistung auf dem RotaRod als Maß für den Einfluss der P-gp Modulation auf motorische Nebenwirkungen von Haloperidol [Dexa= Dexamethason; PCN= 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; \downarrow = signifikant erniedrigt; \uparrow = signifikant erhöht; $\uparrow\downarrow$ = sowohl signifikante Erhöhung als auch signifikante Reduktion zu beobachten; O= kein signifikanter Unterschied].

11 Tage Behandlung	<u>Haloperidol- Konzentration Hirngewebe</u>	<u>Haloperidol- Konzentration Serum</u>	<u>Einfluss des P-gp Modulators auf die Lernleistung RotaRod</u>	<u>Laufleistung RotaRod</u>
Dexa	\downarrow	\downarrow	O	\uparrow
PCN	\downarrow	\downarrow	\uparrow	\uparrow

3.2.2 Barnes Maze

Die Barnes Maze wurde verwendet, um Effekte auf die Lernfähigkeit und das Erinnerungsvermögen zu analysieren. Dazu wurden die Versuchstiere über 5 Tage untersucht. Während der Lernphase zwischen Tag 1 und Tag 4 wurde u.a. ermittelt wie schnell die Mäuse unter Behandlung mit Antipsychotika oder Placebo lernen, an welcher Stelle eine Fluchtbox zu finden ist. An Tag 5 wurde dann ohne Behandlung mit Antipsychotika oder Placebo getestet, ob sich die Mäuse an die richtige Stelle der Fluchtbox erinnern und ermittelt, ob die Gabe von Antipsychotika einen Einfluss auf die Erinnerung hat. Dabei wurden die Effekte von Risperidon und Haloperidol im ersten Schritt der Untersuchungen mit Placebo verglichen. Erfasst wurden Fehlerhäufigkeit, gelaufene Strecke und Latenz bis zum Auffinden der Fluchtbox. Im zweiten Schritt der Untersuchungen mit der Barnes Maze wurde der Einfluss der P-gp Modulatoren Dexamethason und PCN auf die Lernleistung analysiert. Dazu wurde über 11 Tage der P-gp Modulator oder das Vehikel zum Vergleich i.p. injiziert. In dem Zeitraum von Tag 8 bis Tag 11 wurde das Lernverhalten der Versuchstiere unter der Behandlung mit Risperidon und Haloperidol untersucht. An Tag 12 wurde ohne vorherige Antipsychotika-Injektion ermittelt, ob die P-gp Induktoren einen Einfluss auf das Lernverhalten der Versuchstiere hatten.

3.2.2.1 Vergleich Risperidon und Haloperidol vs. Placebo

Bei der Auswertung der Ergebnisse für die Versuchstiere der jeweiligen Behandlungsgruppe zeigten sich nach Injektion von 0,1 mg/kg Risperidon, 0,2 mg/kg Haloperidol oder Placebo (Kochsalzlösung 0,9%) keine signifikanten Unterschiede zwischen der Risperidon-Gruppe und Placebo bei der Anzahl der Fehler, der gelaufenen Strecke oder der Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox (Abb. 3.2.2.1 A). Bei Injektion von 0,2 mg/kg Haloperidol zeigte sich gegenüber Placebo kein Unterschied bei der Fehleranzahl oder der gelaufenen Strecke, während sich bei der Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox von Tag 2 bis Tag 4 eine deutliche Erhöhung zeigte (Abb. 3.2.2.1 A). An Tag 5 erfolgte keine Injektion mit Antipsychotika oder Placebo mehr. An diesem Tag sollte das Erinnerungsvermögen der Mäuse untersucht werden. Es wurde untersucht, ob sich die Mäuse an die richtige Stelle der Fluchtbox erinnern konnten. Es zeigte sich, dass in der Placebo-Gruppe nur ein geringer Unterschied bei der Latenz zwischen Tag 4 und Tag 5 zu beobachten war. In der Risperidon- und der Haloperidol-Gruppe war an Tag 5 ein deutlicher Unterschied der Latenz bis zum Auffinden der Fluchtbox zu sehen (s. Abb. 3.2.2.1 A). In der Haloperidol-Gruppe war die Reduktion der Latenz am deutlichsten. Beim Vergleich der Risperidon-Gruppe mit der Haloperidol-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl der Fehler und der gelaufenen Strecke, jedoch trat an den Tagen 2, 3, 4 und 5 eine signifikante Erhöhung der Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox in

der Haloperidol-Gruppe auf (Abb. 3.2.2.1 B). Die Analyse der Laufgeschwindigkeiten der Versuchstiere in der Barnes Maze zeigte, dass während der Gewöhnungs-/ Lernphase (Tag 1- Tag 4) die Geschwindigkeit der Versuchstiere nahezu unverändert blieb (Abb. 3.2.2.1 C). An Tag 5 zeigte die Risperidon-Gruppe die größte Zunahme bei der Laufgeschwindigkeit, während die Versuchstiere in der Haloperidol-Gruppe nur wenig schneller liefen und die Placebo-Gruppe nahezu unverändert blieb (Abb. 3.2.2.1 C).

Der Vergleich der Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox von Tag 1 (Beginn der Gewöhnungs-/ Lernphase) und Tag 4 (Ende der Gewöhnungs-/ Lernphase) zeigte nach Injektion von 0,1 mg/kg Risperidon eine Reduktion der benötigten Zeit, während in der Haloperidol-Gruppe eine Erhöhung der Latenz gezeigt werden konnte (Abb. 3.2.2.1 D). Die Placebo-Gruppe zeigte ebenfalls eine Abnahme der Latenz zwischen Tag 1 und Tag 4 (Abb. 3.2.2.1 D).

Tab. 3.2.2.1 A: Übersicht der ANOVA Auswertung zum Vergleich des Einflusses von 0,1 mg/kg Risperidon und 0,2 mg/kg Haloperidol auf Lerneffekte von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze im Vergleich zu Placebo (angegeben werden F-Wert und p-Wert). Ein p-Wert <0,005 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

	Fehleranzahl	Gelaufene Strecke	Latenz
Tag 1 Risperidon vs. Placebo	F(1;79)=0,214/ p=0,645	F(1;79)=0,945/ p=0,334	F(1;89)=1,875/ p=0,174
Tag 1 Haloperidol vs. Placebo	F(1;81)=2,891/ p=0,093	F(1;81)=3,326/ p=0,072	F(1;88)=1,558/ p=0,215
Tag 2 Risperidon vs. Placebo	F(1;86)=0,369/ p=0,545	F(1;86)=0,385/ p=0,537	F(1;90)=0,622/ p=0,432
Tag 2 Haloperidol vs. Placebo	F(1;74)=2,038/ p=0,158	F(1;74)=0,689/ p=0,409	F(1;90)=8,711/ p=0,004
Tag 3 Risperidon vs. Placebo	F(1;87)=0,053/ p=0,819	F(1;87)=0,808/ p=0,371	F(1;89)=0,184/ p=0,669
Tag 3 Haloperidol	F(1;70)=0,181/ p=0,672	F(1;70)=0,507/ p=0,479	F(1;90)=26,196/ p=<0,001
Tag 4 Risperidon vs. Placebo	F(1;83)=0,421/ p=0,518	F(1;83)=1,181/ p=0,280	F(1;90)=2,128/ p=0,148
Tag 4 Haloperidol vs. Placebo	F(1;68)=0,030/ p=0,862	F(1;68)=0,058/ p=0,810	F(1;90)=45,135/ p=<0,001
Tag 5 Risperidon vs. Placebo	F(1;20)=0,286/ p=0,599	F(1;20)=0,002/ p=0,963	F(1;20)=2,673/ p=0,118
Tag 5 Haloperidol vs. Placebo	F(1;17)=0,187/ p=0,671	F(1;17)=2,998/ p=0,101	F(1;21)=4,158/ p=0,054

Tab. 3.2.2.1 B: Übersicht der ANOVA Auswertung zum Vergleich des Einflusses von 0,1 mg/kg Risperidon im Vergleich zu 0,2 mg/kg Haloperidol auf Lerneffekte von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze (angegeben werden F-Wert und p-Wert). Ein p-Wert <0,005 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

	Fehleranzahl	Gelaufene Strecke	Latenz
Tag 1 Risperidon vs. Haloperidol	F(1;74)=1,258/ p=0,266	F(1;74)=0,494/ p=0,484	F(1;91)=0,002/ p=0,965
Tag 2 Risperidon vs. Haloperidol	F(1;74)=0,643/ p=0,425	F(1;74)=0,035/ p=0,853	F(1;94)=12,948/ p=0,001
Tag 3 Risperidon vs. Haloperidol	F(1;71)=0,061/ p=0,806	F(1;71)=0,004/ p=0,950	F(1;93)=20,599/ p=<0,001
Tag 4 Risperidon vs. Haloperidol	F(1;65)=0,724/ p=0,398	F(1;65)=0,750/ p=0,390	F(1;94)=21,863/ p=<0,001
Tag 5 Risperidon vs. Haloperidol	F(1;17)=0,715/ p=0,410	F(1;17)=2,278/ p=0,150	F(1;21)=17,972/ p=<0,001

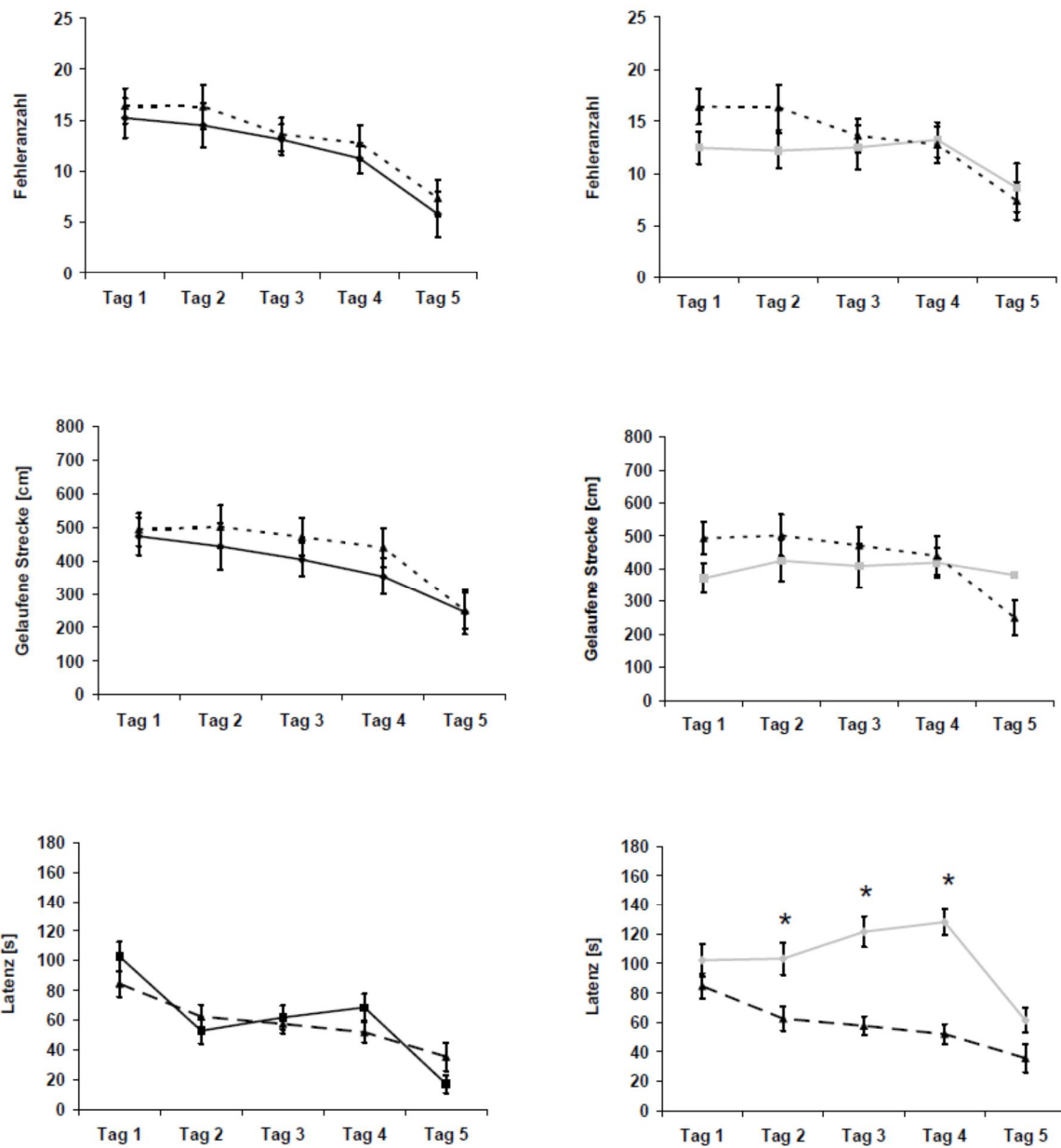


Abb. 3.2.2.1 A: Fehleranzahl (oben), gelaufene Strecke (Mitte) und Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox (unten) von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze unter Behandlung mit 0,1 mg/kg Risperidon (links) oder 0,2 mg/kg Haloperidol (rechts), ohne vorherige Injektion mit einem P-gp Modulator, im Vergleich zu Placebo (Saline Injektion) [schwarze Linien= Risperidon, graue Linien= Haloperidol ; gestrichelte Linien= Placebo; * $p < 0,05$].

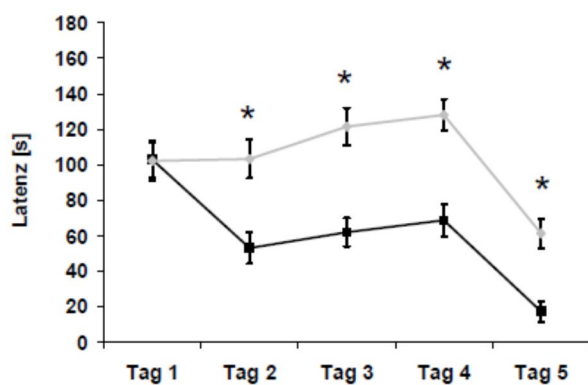
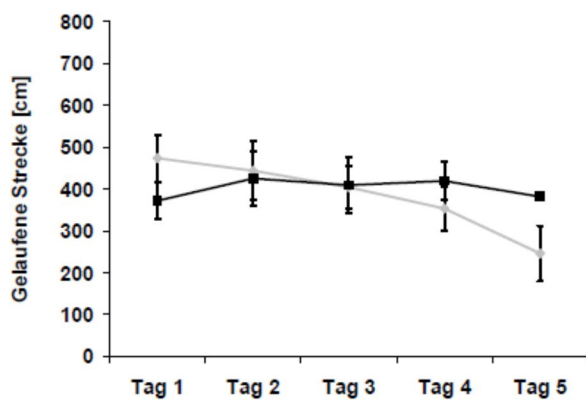
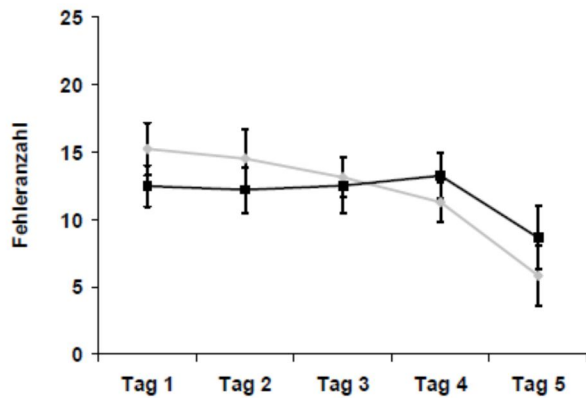


Abb. 3.2.2.1 B: Fehleranzahl (oben), gelaufene Strecke (Mitte) und Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox (unten) von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze unter Behandlung mit 0,1 mg/kg Risperidon oder 0,2 mg/kg Haloperidol (ohne jegliche Vorbehandlung mit einem P-gp Modulator) [schwarze Linien= Risperidon, graue Linien= Haloperidol ; * $p < 0,05$].

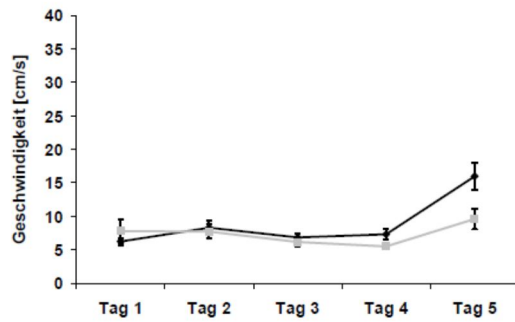
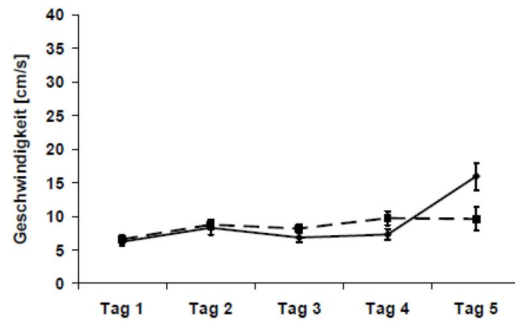
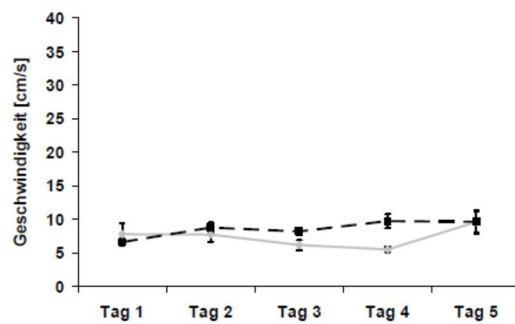
A**B****C**

Abb. 3.2.2.1 C: Geschwindigkeit [cm/s] von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze an den verschiedenen Versuchstagen unter der Behandlung mit 0,1 mg/kg Risperidon oder 0,2 mg/kg Haloperidol (A), 0,1 mg/kg Risperidon oder Placebo (Saline Injektion; B) und 0,2 mg/kg Haloperidol oder Placebo (Saline Injektion; C) [A: schwarze Linie=Risperidon, graue Linie=Haloperidol; schwarze, gestrichelte Linie=Placebo]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

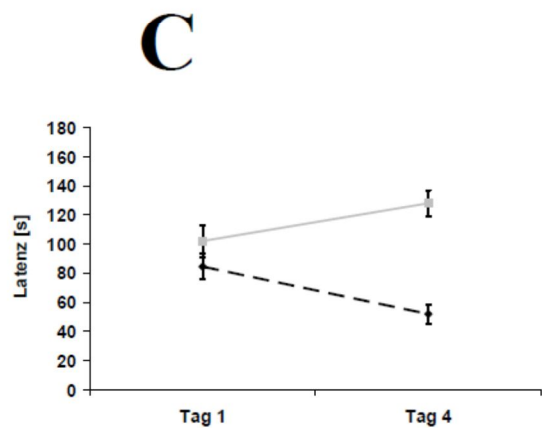
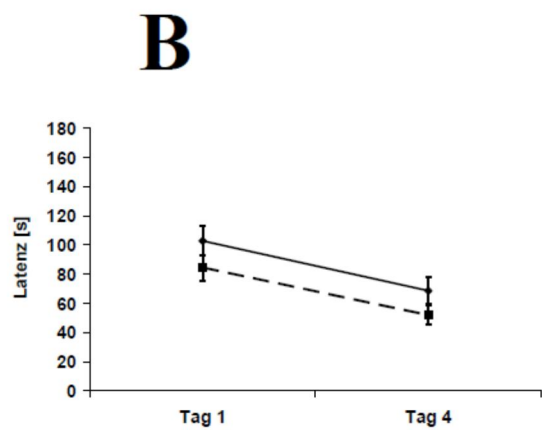
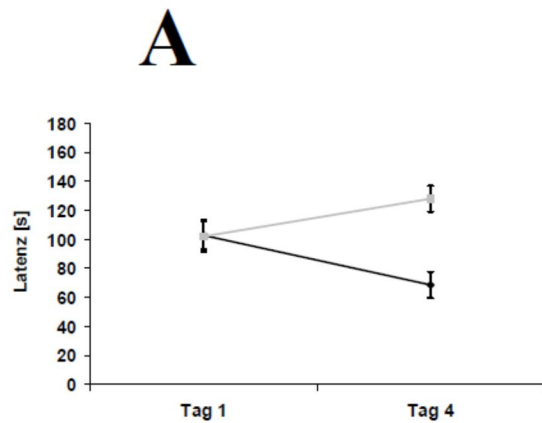


Abb. 3.2.2.1 D: Deskriptiver Vergleich der Latenz [s] bis zum Erreichen der Fluchtbox von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze an den Zeitpunkten Tag 1 (Beginn der Gewöhnungs-/Lernphase) und Tag 4 (Ende der Gewöhnungs-/Lernphase) unter der Behandlung mit 0,1 mg/kg Risperidon oder 0,2 mg/kg Haloperidol (A), 0,1 mg/kg Risperidon oder Placebo (Saline Injektion; B) und 0,2 mg/kg Haloperidol oder Placebo (Saline Injektion; C) [schwarze Linie=Risperidon, graue Linie=Haloperidol; schwarze, gestrichelte Linie=Placebo]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

3.2.2.2 Risperidon

Beim Vergleich des Einflusses der P-gp Modulatoren Dexamethason und PCN zeigten sich nach 11-tägiger Injektion mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d PCN unter der Behandlung mit 0,1 mg/kg Risperidon in der Barnes Maze keine signifikanten Unterschiede bei der Fehleranzahl bzw. der gelaufenen Strecke zwischen der Dexamethason- Gruppe und der Kontrollgruppe (Abb. 3.2.2.2 A). In der PCN-Gruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der Fehler an Tag 4 gegenüber der Kontrollgruppe, bei der gelaufenen Strecke war jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen messbar (Abb. 3.2.2.2 A). Die Analyse der Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox zeigte in der Dexamethason-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung an den Tagen 3, 4 und 5, während nach Behandlung mit PCN nur an Tag 3 eine signifikante Erhöhung der Latenz zu beobachten war (Abb. 3.2.2.2 A).

Die Analyse der Geschwindigkeit der Versuchstiere zeigte, dass diese während der ersten 4 Tage (Gewöhnungs-/ Lernzeitraum) relativ unverändert in allen Behandlungsgruppen blieb, während es an Tag 5 insbesondere in der Dexamethason-Gruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe zu einem deutlichen Anstieg der Laufgeschwindigkeit kam (Abb. 3.2.2.2 B). Allerdings zeigten sich hier hohe interindividuelle Schwankungen. Die PCN-Gruppe zeigte ebenfalls eine Zunahme der Laufgeschwindigkeit an Tag 5, während die Kontrollgruppe kaum Veränderung zeigte [Abb. 3.2.2.2 B).

Beim Vergleich der Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox von Tag 1 und Tag 4, unter Behandlung mit 0,1 mg/kg Risperidon nach 11 Tagen Injektion mit 50 mg/kg Dexamethason oder 25 mg/kg PCN zeigte sich in der PCN-Gruppe und dessen Kontrolle ein Lerneffekt der Versuchstiere. Dies wurde durch die Reduktion der Latenz gemessen. In der Dexamethason-Gruppe war dagegen ein deutlicher Anstieg der Latenz zwischen Tag 1 und Tag 4 zu beobachten und die Latenz in dessen Kontrollgruppe blieb nahezu unverändert (Abb. 3.2.2.2 C).

Tab. 3.2.2.2 A: Übersicht der ANOVA Auswertung zum Vergleich des Einflusses von 0,1 mg/kg Risperidon auf Lerneffekte von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze nach 11-tägiger Behandlung mit Dexamethason (50 mg/kg/d) oder 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; 25 mg/kg/d) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Saline oder Maisöl). Angegeben werden F-Wert und p-Wert. Ein p-Wert <0,005 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

	Fehleranzahl	Gelaufene Strecke	Latenz
Tag 1 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;85)=0,031/ p=0,860	F (1;85)=0,248/ p=0,620	F(1;94)=2,018/ p=0,159
Tag 1 PCN vs. Kontrolle	F(1;87)=2,933/ p=0,090	F(1;87)=1,367/ p=0,245	F(1;94)=0,003/ p=0,956
Tag 2 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;80)=2,024/ p=0,159	F(1;80)=1,086/ p=0,301	F(1;94)=0,515/ p=0,475
Tag 2 PCN vs. Kontrolle	F(1;87)=0,596/ p=0,442	F(1;87)=1,913/ p=0,170	F(1;94)=2,696/ p=0,104
Tag 3 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;76)=2,062/ p=0,155	F(1;76)=2,751/ p=0,101	F(1;95)=16,372/ p=<0,001
Tag 3 PCN vs. Kontrolle	F(1;87)=0,049/ p=0,862	F(1;87)=0,658/ p=0,419	F(1;94)=8,161/ p=0,005
Tag 4 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;76)=2,047/ p=0,157	F(1;76)=1,418/ p=0,237	F(1;95)=8,264/ p=0,005
Tag 4 PCN vs. Kontrolle	F(1;89)=3,987/ p=0,049	F(1;89)=3,191/ p=0,077	F(1;94)=1,050/ p=0,308
Tag 5 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;20)=0,506/ p=0,485	F(1;20)=2,123/ p=0,161	F(1;22)=4,431/ p=0,047
Tag 5 PCN vs. Kontrolle	F(1;22)=3,827/ p=0,063	F(1;22)=1,081/ p=0,310	F(1;22)=2,525/ p=0,126

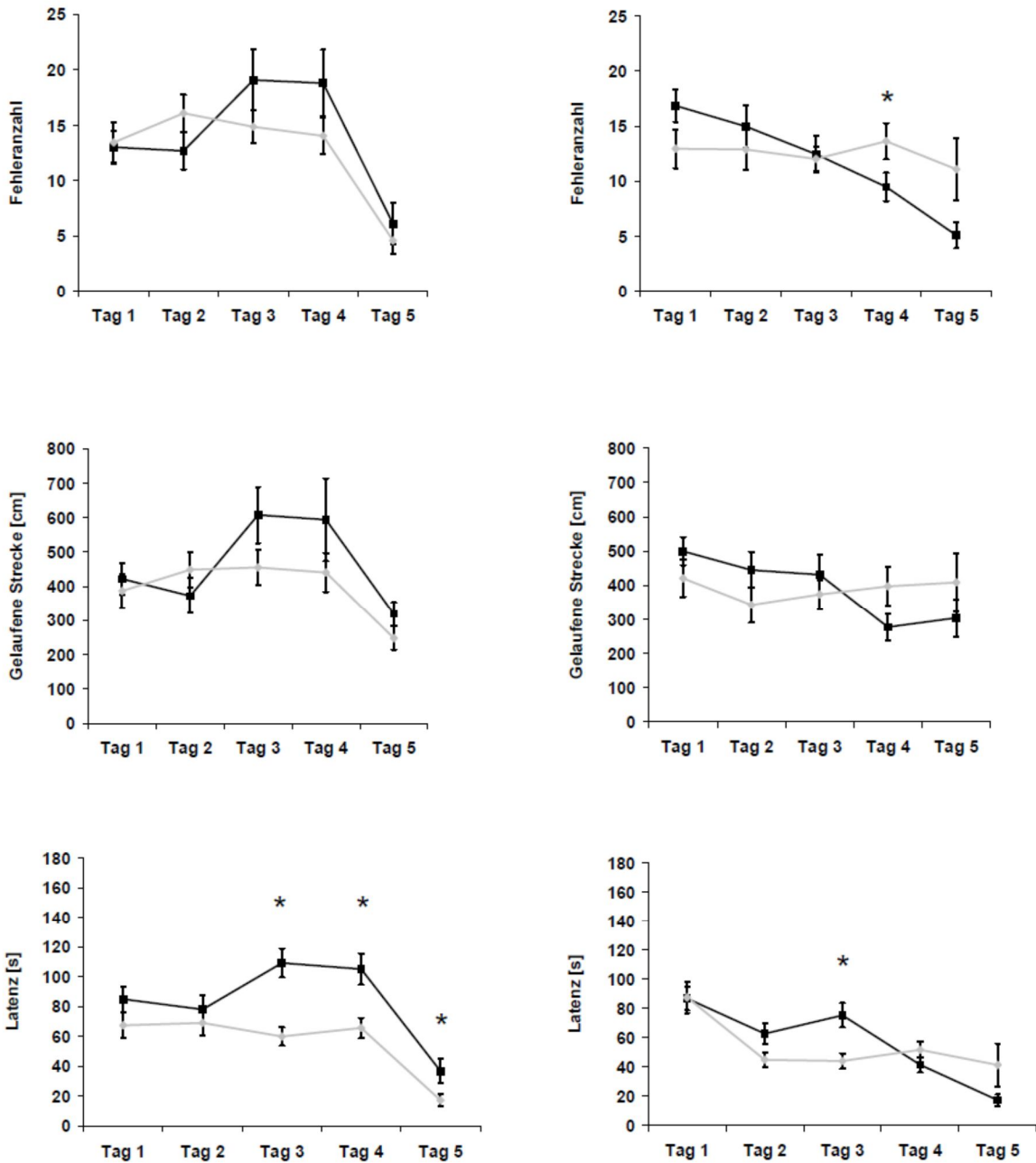


Abb. 3.2.2.2 A: Fehleranzahl (oben), gelaufene Strecke (Mitte) und Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox (unten) von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze unter Behandlung mit 0,1 mg/kg Risperidon nach 11 Tagen Injektion von 50 mg/kg/d Dexamethason (links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien= P-gp Modulator, graue Linien= Kontrolle; * p<0,05].

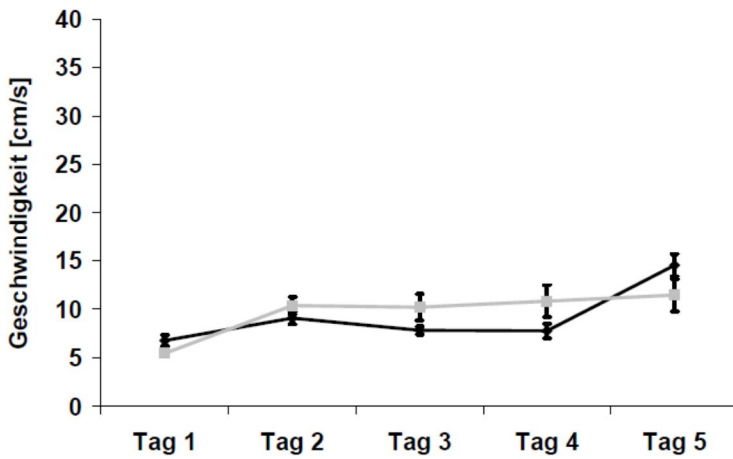
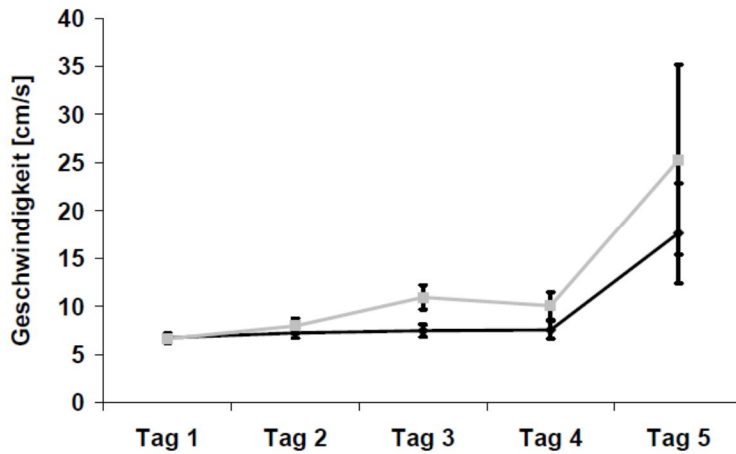


Abb. 3.2.2.2 B: Geschwindigkeit [cm/s] von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze an den verschiedenen Versuchstagen nach 11 Tagen Injektion mit 50 mg/kg/d Dexamethason (oben) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; unten) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) unter der Behandlung mit 0,1 mg/kg Risperidon [schwarze Linien=P-gp Modulator, graue Linien=Kontrolle]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

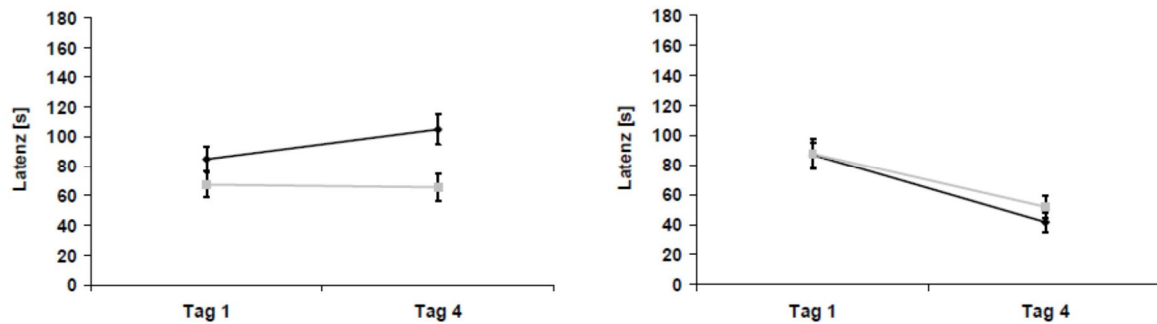


Abb. 3.2.2.2 C: Deskriptiver Vergleich der Latenz [s] bis zum Erreichen der Fluchtbox von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze an den Zeitpunkten Tag 1 (Beginn der Gewöhnungs-/Lernphase) und Tag 4 (Ende der Gewöhnungs-/Lernphase) nach 11 Tagen Injektion mit 50 mg/kg/d Dexamethason (links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) unter der Behandlung mit 0,1 mg/kg [schwarze Linien=P-gp Modulator, graue Linien=Kontrolle]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

3.2.2.3 Haloperidol

Nach 11 Tagen Gabe der P-gp Modulatoren Dexamethason (50 mg/kg/d) oder PCN (25 mg/kg/d) zeigten sich in der Barnes Maze unter 0,2 mg/kg Haloperidol in der Dexamethason-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede bei der Analyse der Fehlerhäufigkeit und der gelaufenen Strecke, während in PCN-Gruppe an Tag 3 bei der Fehleranzahl und an Tag 1 bei der gelaufenen Strecke eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe messbar waren (Abb. 3.2.2.3 A). Die Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox war in der Dexamethason-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe an Tag 3 erhöht (Abb. 3.2.2.3 A). In der PCN-Gruppe zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Latenz an den Tagen 2, 3 und 4 (Abb. 3.2.2.3 A). Bei der Analyse der Laufgeschwindigkeit war in den verschiedenen Behandlungsgruppen zwischen Tag 1 und Tag 4 kaum Veränderungen erkennbar, während an Tag 5 die Geschwindigkeit der Versuchstiere in der Kontrollgruppe von Dexamethason deutlich zunahm (Abb. 3.2.2.3 B). Die PCN-Gruppe zeigte an Tag 5, ebenso wie dessen Kontrollgruppe und die Dexamethason-Gruppe, nur einen leichten Anstieg der Laufgeschwindigkeit (Abb. 3.2.2.3 B). Bei den Unterschieden der Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox von Tag 1 (Beginn der Gewöhnungs-/Lernphase) und Tag 4 (Ende der Gewöhnungs-/Lernphase) konnte weder in der Dexamethason-Gruppe, noch in dessen Kontrollgruppe eine Veränderung der Latenz, als Maß für die Lernleistung in der Barnes Maze, beobachtet werden (Abb. 3.2.2.3 C). In der PCN-Gruppe zeigte sich ebenfalls keine

Veränderung der Latenz, während in der Kontrollgruppe eine Zunahme der benötigten Zeit bis zum Erreichen der Fluchtbox messbar war (Abb. 3.2.2.3 C).

Tab. 3.2.2.3 A: Übersicht der ANOVA Auswertung zum Vergleich des Einflusses von 0,2 mg/kg Haloperidol auf Lerneffekte von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze nach 11-tägiger Behandlung mit Dexamethason (50 mg/kg/d) oder 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; 25 mg/kg/d) im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Saline oder Maisöl). Angegeben werden F-Wert und p-Wert. Ein p-Wert <0,005 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

	Fehleranzahl	Gelaufene Strecke	Latenz
Tag 1 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;68)=0,117/ p=0,734	F(1;68)=0,039/ p=0,844	F(1;84)=1,494/ p=0,225
Tag 1 PCN vs. Kontrolle	F(1;75)=3,808/ p=0,055	F(1;75)=6,967/ p=0,010	F(1;89)=1,550/ p=0,216
Tag 2 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;53)=0,056/ p=0,814	F(1;53)=0,528/ p=0,471	F(1;84)=0,002/ p=0,965
Tag 2 PCN vs. Kontrolle	F(1;61)=0,081/ p=0,777	F(1;60)=0,523/ p=0,472	F(1;90)=14,382/ p=<0,001
Tag 3 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;53)=0,334/ p=0,566	F(1;52)=0,139/ p=0,711	F(1;86)=12,073/ p=0,001
Tag 3 PCN vs. Kontrolle	F(1;51)=8,897/ p=0,004	F(1;51)=2,172/ p=0,147	F(1;85)=8,281/ p=0,005
Tag 4 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;55)=0,006/ p=0,939	F(1;55)=0,795/ p=0,376	F(1;78)=2,895/ p=0,093
Tag 4 PCN vs. Kontrolle	F(1;54)=0,076/ p=0,783	F(1;54)=0,005/ p=0,945	F(1;90)=18,430/ p=<0,001
Tag 5 Dexamethason vs. Kontrolle	F(1;17)=0,451/ p=0,511	F(1;17)=4,130/ p=0,058	F(1;20)=0,586/ p=0,453
Tag 5 PCN vs. Kontrolle	F(1;18)=1,133/ p=0,301	F(1;18)=0,060/ p=0,810	F(1;21)=3,397/ p=0,079

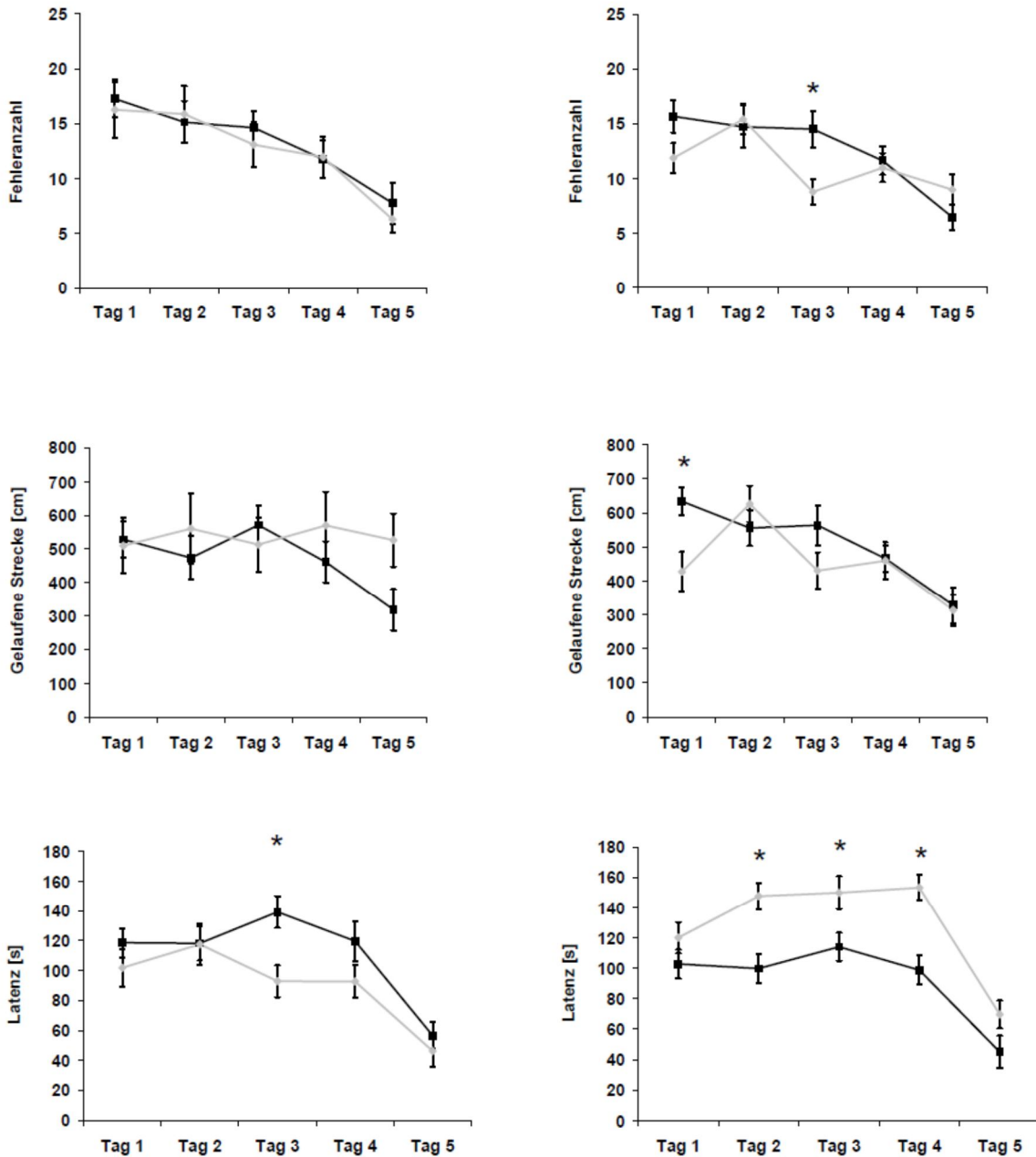


Abb. 3.2.2.3 A: Fehleranzahl (oben), gelaufene Strecke (Mitte) und Latenz bis zum Erreichen der Fluchtbox (unten) von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze unter Behandlung mit 0,2 mg/kg Haloperidol nach 11 Tagen Injektion von 50 mg/kg/d Dexamethason (links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) [schwarze Linien= P-gp Modulator, graue Linien= Kontrolle; * $p < 0,05$].

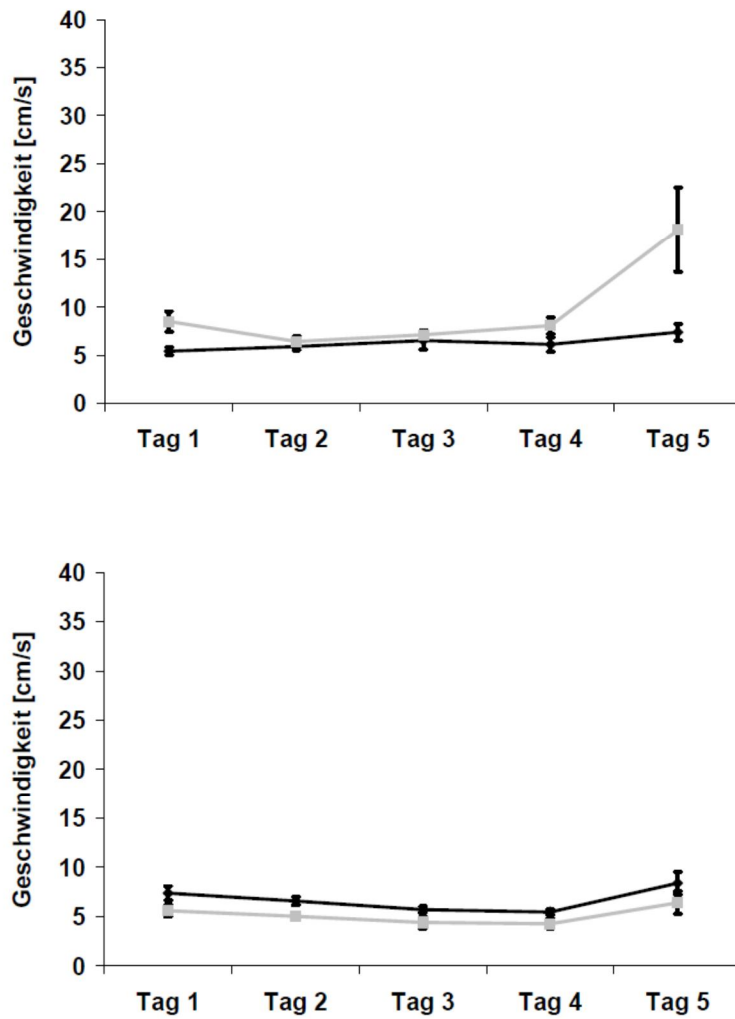


Abb. 3.2.2.3 B: Geschwindigkeit [cm/s] von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze an den verschiedenen Versuchstagen nach 11-tägiger Injektion mit 50 mg/kg/d Dexamethason (oben) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; unten) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) unter der Behandlung mit 0,2 mg/kg Haloperidol [schwarze Linien=P-gp Modulatoren, graue Linien=Kontrollen]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

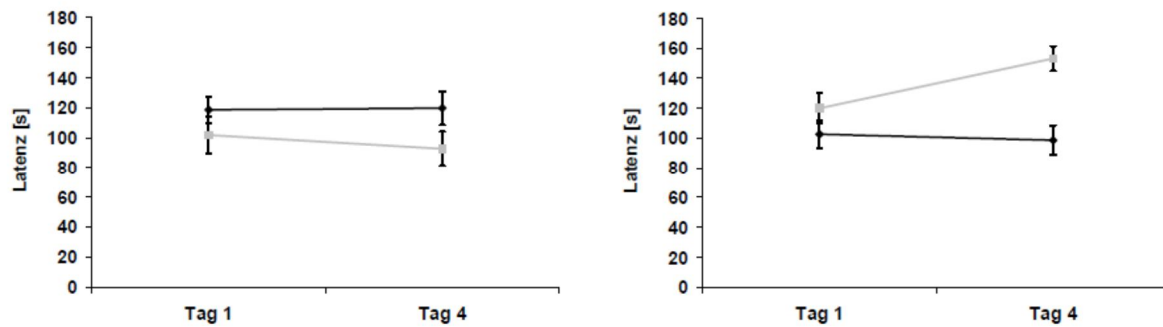


Abb. 3.2.2.3 C: Deskriptiver Vergleich der Latenz [s] bis zum Erreichen der Fluchtbox von Wildtyp (WT) Mäusen in der Barnes Maze an den Zeitpunkten Tag 1 (Beginn der Gewöhnungs-/Lernphase) und Tag 4 (Ende der Gewöhnungs-/Lernphase) nach 11 Tagen Injektion mit 50 mg/kg/d Dexamethason (links) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Saline) oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN; rechts) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Maisöl) unter der Behandlung mit 0,2 mg/kg Haloperidol [schwarze Linien=P-gp Modulator, graue Linien=Kontrolle]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

Tab. 3.2.2.3 B: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen zur P-gp Modulation nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d PCN im Vergleich zur Kontrollgruppe und dessen Einfluss auf die Konzentration von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und deren aktiver Summe im Hirngewebe und Serum von WT Mäusen (FVB/N) und dem Zusammenhang mit der Lernleistung in der Barnes Maze als Maß für den Einfluss einer P-gp Modulation auf die Kognition in Abhängigkeit zu einer Risperidon Behandlung [RIS= Konzentration Risperidon; OH-RIS= Konzentration 9-Hydroxyrisperidon; Akt. Sum= Konzentration der aktiven Summe von Risperidon; Dexa= Dexamethason; PCN= 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; gel. Strecke= gelaufene Strecke; Geschw. = Geschwindigkeit; ↓= signifikant erniedrigt; ↑= signifikant erhöht; ↑↓= sowohl signifikante Erhöhung als auch signifikante Reduktion zu beobachten; O= kein signifikanter Unterschied].

11 Tage Behandlung	<u>Hirngewebe</u>			<u>Serum</u>			<u>Barnes Maze Ergebnisse</u>		
	RIS	OH- RIS	Akt. Sum	RIS	OH- RIS	Akt. Sum	<u>Fehler</u>	<u>gel. Strecke</u>	<u>Latenz</u>
Dexa	↓	↓↑	↓	↓	↓	↓	O	O	↑
PCN	↓	↓↑	↓	↓	↓↑	↓	↓	O	↑

Tab. 3.2.2.3 C: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen zur P-gp Modulation nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d PCN im Vergleich zur Kontrollgruppe und dessen Einfluss auf die Konzentration von Haloperidol im Hirngewebe und Serum von Wildtyp Mäusen (FVB/N) und dem Zusammenhang mit der Lernleistung in der Barnes Maze als Maß für den Einfluss einer P-gp Modulation auf die Kognition in Abhängigkeit zu einer Haloperidol Behandlung [Dexa= Dexamethason; PCN= 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril; gel. Strecke= gelaufene Strecke; Geschw. = Geschwindigkeit; ↓= signifikant erniedrigt; ↑= signifikant erhöht; ↑↓= sowohl signifikante Erhöhung als auch signifikante Reduktion zu beobachten; O= kein signifikanter Unterschied].

11 Tage Behandlung	<u>Hirngewebe</u>	<u>Serum</u>	<u>Barnes Maze Ergebnisse</u>		
	<u>Haloperidol - Konzentration</u>	<u>Haloperidol - Konzentration</u>	<u>Fehler</u>	<u>gel. Strecke</u>	<u>Latenz</u>
Dexa	↓	↓	O	O	↑
PCN	↓	↓	↑	↑	↓

3.3 Untersuchungen zur Hirngängigkeit von Acitretin

3.3.1 Validierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben

Um die Hirngängigkeit von Acitretin untersuchen zu können musste zunächst eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben im Labor etabliert und validiert werden. Dazu wurde eine bereits von Decker und Zimmermann (1995) etablierte Methode ausgewählt und modifiziert, um diese an die Laborroutine anzupassen (Tab. 3.3.1).

Tab. 3.3.1: Vergleich der HPLC-Methoden zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben.

	HPLC-Methode Decker und Zimmermann	HPLC-Methode modifiziert
Analytische Säule	Supelcosil LC-18; 5 µm (150x 4,6 mm)	PerfectBond ODS-H; 5 µm (200x4,6 mm)
Vorsäule/ Anreicherungssäule	Supelcosil LC-18 guard column (10 mm)	PerfectBond C18, 20 µm, (10x4,0 mm)
Fließmittel	Acetonitril/Wasser 80/20 (V/V) (mit 0,8 g Ammoniumacetat und 10 ml Eisessig/l)	Acetonitril/Wasser 80/20 (V/V) (mit 0,8 g Ammoniumacetat und 10 ml Eisessig/l)
Temperatur	50°C	50°C
Detektionswellenlänge (UV-Detektor)	350 nm	350 nm
Analysendauer	12 min	21 min
Stabilisierung der Proben	50 µg/ml BHT	50 µg/ml BHT

Es wurden zwei verschiedene Konzentrationsbereiche validiert, für hohe und niedrige Konzentrationen. Im ersten Schritt des Validierungsprozesses wurde die intra-day Variabilität geprüft. Dafür wurde eine Kalibrationsreihe von insgesamt fünf verschiedenen Acitretin-Konzentrationen (5 ng/ ml; 10 ng/ ml; 20 ng/ml; 40 ng/ml und 50 ng/ml bzw. 50 ng/ml; 100 ng/ml; 200 ng/ml; 300 ng/ml und 500 ng/ml) in Humanserum hergestellt und sechsmal hintereinander innerhalb einer HPLC-Analyse an einem Tag vermessen. Zwischen den Analysen der Kalibrationsreihe

wurde jeweils ein Leerplasma als Kontrolle gemessen. Die dabei erhaltenen Chromatogramme wurden manuell ausgewertet und die Peakhöhen in die Software Valistat Version 1.0 zur Validierung eingetragen. Dieses Programm berechnete auf Grundlage dieser Daten die Linearität und Konformität der Kalibrationsreihe [Mandel-Test auf Linearität (Signifikanz 99 %); F-Test auf Varianzhomogenität (Signifikanz 99 %)]. Nachdem die intra-day Ergebnisse den Vorgaben des Validierungsprogramms entsprachen konnte im zweiten Schritt des Validierungsprozesses die inter-day Variabilität ermittelt werden. Hierbei wurden drei Acitretin-Konzentrationen [niedrig (5 ng/ml), mittel (20 ng/ml) und hoch (50 ng/ml) bzw. niedrig (50 ng/ml), mittel (200 ng/ml) und hoch (500 ng/ml)] im Humanserum in einer Doppelbestimmung an 8 aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Die manuell ausgewerteten HPLC-Ergebnisse [gefundene Konzentration in ng/ml] wurden wiederum in Valistat Version 1.0 eingegeben. Das Validierungsprogramm berechnete auf Grundlage der eingegeben Daten die Bestimmungsgrenze, die Richtigkeit und Wiederholpräzision der Methode. Diese mussten den Anforderungen (< 15 %) entsprechen. Nach Abschluss dieses Teils der Validierung wurde die Wiederfindung bestimmt. Dazu wurden zwei Konzentrationen [niedrig (10 ng/ml) und hoch (50 ng/ml)] im Lösungsmittel THF jeweils sechsmal vermessen, unter zwei verschiedenen HPLC-Bedingungen. Im ersten Schritt wurde die Acitretin-Konzentration im Lösungsmittel direkt analysiert, ohne Zuschaltung der Vorsäule. Im zweiten Schritt wurde die Acitretin-Konzentration im Lösungsmittel unter Verwendung des Schaltventils mit Vorsäule gemessen. Die Differenz der gefundenen Konzentrationen [Peakhöhen] wurde manuell mit der Computersoftware ausgewertet und in Valistat Version 1.0 eingetragen. Die Wiederfindung sollte bei > 50 % liegen.

Die Etablierung und Validierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben, modifiziert nach der Methode von Decker und Zimmermann (1995), zeigte Linearität im Bestimmungsbereich von 5- 50 ng/ml und 50-500 ng/ml. Wie das beispielhafte Chromatogramm in Abb. 3.3.1 A zeigt lag die Retentionszeit bei 9,8 +/- 0,3 Minuten. Die errechnete Nachweisgrenze von Acitretin lag bei 3 ng/ml. Die Richtigkeit der Methode lag für Konzentrationen von 5, 20, 50, 200 und 500 ng/ml bei unter 3,4 % (Soll: <15 %), die Wiederholpräzision lag bei <2,9 % (Soll: < 15%) und die Wiederfindung lag im Bereich zwischen 88- 98 % (Soll: >50 %). Somit erfüllte die Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben alle international festgelegten Anforderungen zur quantitativen Bestimmung von Medikamenten.

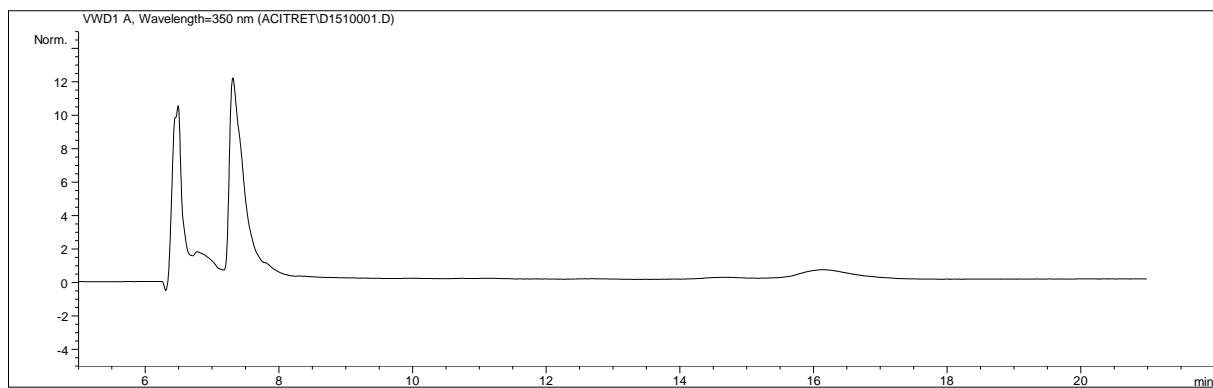
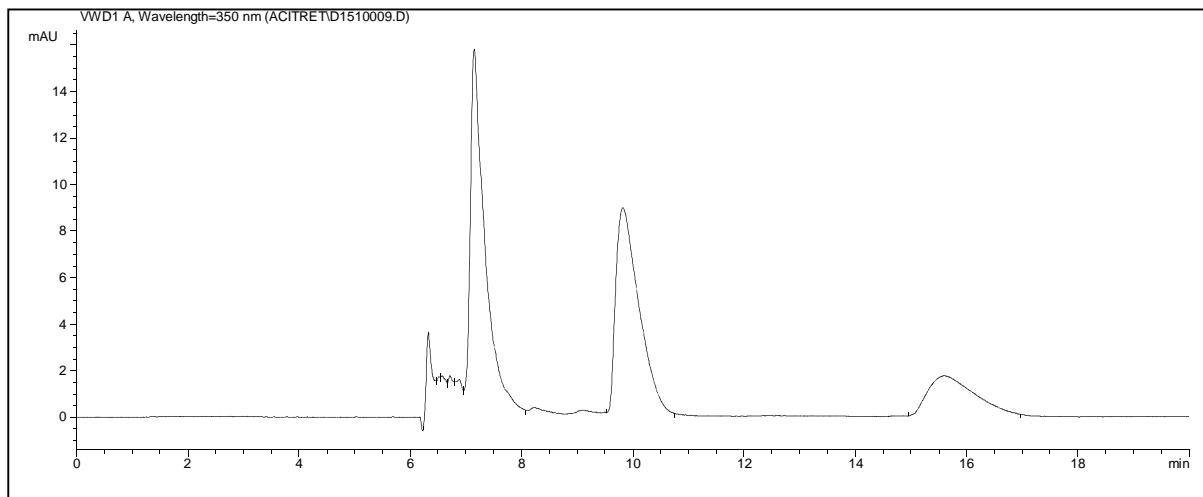
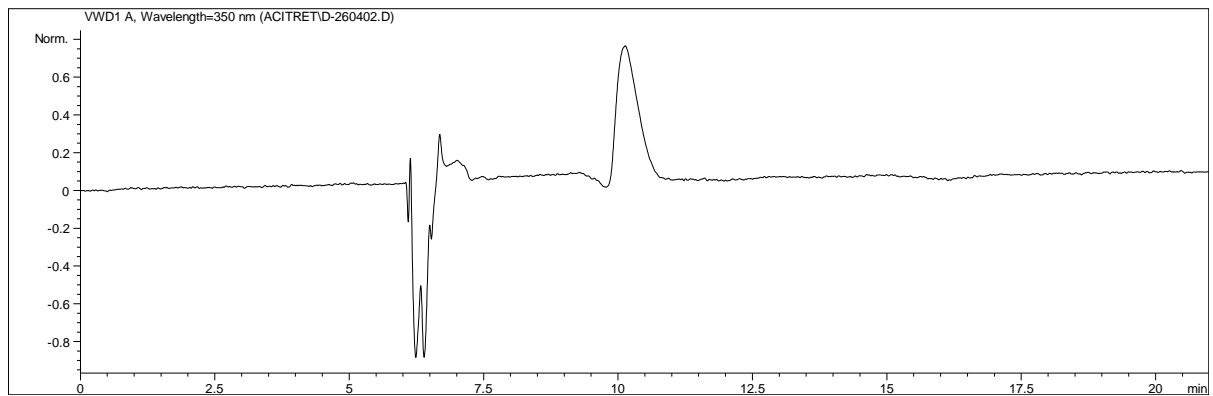


Abb. 3.3.1 A: Beispiel eines Chromatogramms aus der Bestimmung von 50 ng/ml Acitretin in Tetrahydrofuran (THF, oben), eines Chromatogramms einer Acitretin Bestimmung in biologischen Proben (Humanplasma, Mitte) und eines Chromatogramms eines Leerplasmas (Humanplasma, unten) mittels HPLC [Signalintensität (y-Achse; in mAU = Milli Absorption Units = Milliextinktionen) gegen die Zeit (x-Achse; in Minuten)].

3.3.2 Verteilung von Acitretin in Gehirn und Serum bei Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Mäusen

Zur Beurteilung der Hirngängigkeit von Acitretin, die Voraussetzung für eine klinische Anwendung von Acitretin in der Behandlung der Alzheimer Krankheit ist, wurde die Verteilung von Acitretin in Hirngewebe- und Serumproben gemessen. Dabei wurden gleichzeitig Unterschiede bei der Verteilung von Acitretin zwischen P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Mäusen analysiert, um bewerten zu können, ob Acitretin ein P-gp Substrat ist und somit einen Einfluss auf die Verteilung des Retinoids haben kann.

Durch die pharmakokinetischen Untersuchungen zur Verteilung von Acitretin in Hirngewebe und Serum bei WT bzw. P-gp KO Mäusen konnte gezeigt werden, dass Acitretin als lipophiler Arzneistoff mit einem experimentell-bestimmten Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten von 6,40 [Singh (2005)] die Blut-Hirn Schranke passieren kann und im Hirngewebe nachgewiesen werden kann (Abb. 3.3.2 A). Beim Vergleich der beiden Mausstämme zeigte sich 1 h nach der Acitretin-Injektion eine signifikante Erhöhung der Hirnkonzentration in den KO Mäusen verglichen mit dem WT, während nach 6 h die Acitretin-Konzentration in den KO Mäusen signifikant gegenüber dem WT reduziert waren (Abb. 3.3.2 A). Bei der Verteilung im Serum zeigte sich 6 h nach der Acitretin-Injektion eine signifikante Reduktion in den KO Mäusen verglichen mit dem WT (Abb. 3.3.2 B). Bei der Berechnung des Gehirn/ Serum Verhältnisses von Acitretin bei WT und P-gp KO Mäusen zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung 1 h nach Acitretin-Injektion bei den KO Mäusen gegenüber den WT Mäusen (Abb. 3.3.2 C), während bei der Auswertung des Mittelwertes aller untersuchter Zeitpunkte zwischen KO und WT Mäusen kein Unterschied messbar war (Abb. 3.3.2 D).

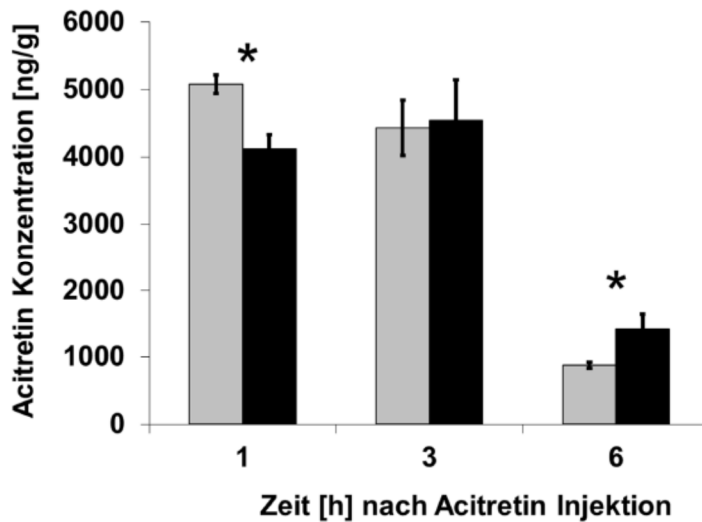


Abb. 3.3.2 A: Acitretin-Konzentration im Hirngewebe von Wildtyp (WT) bzw. P-gp doppel knockout (KO) Mäusen nach akuter Behandlung mit 5 mg/kg Acitretin an verschiedenen Zeitpunkten nach Acitretin-Injektion [schwarze Balken=WT; graue Balken=KO; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

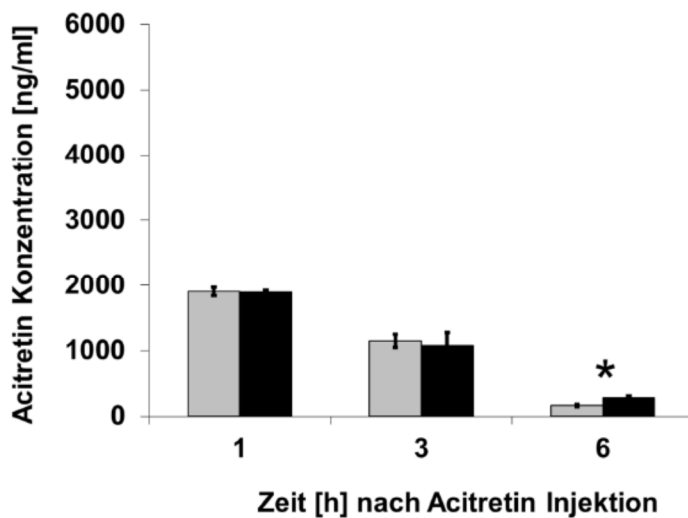


Abb. 3.3.2 B: Acitretin-Konzentration im Serum von Wildtyp (WT) bzw. P-gp doppel knockout (KO) Mäusen nach akuter Behandlung mit 5 mg/kg Acitretin an verschiedenen Zeitpunkten nach Acitretin-Injektion [schwarze Balken=WT; graue Balken=KO; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

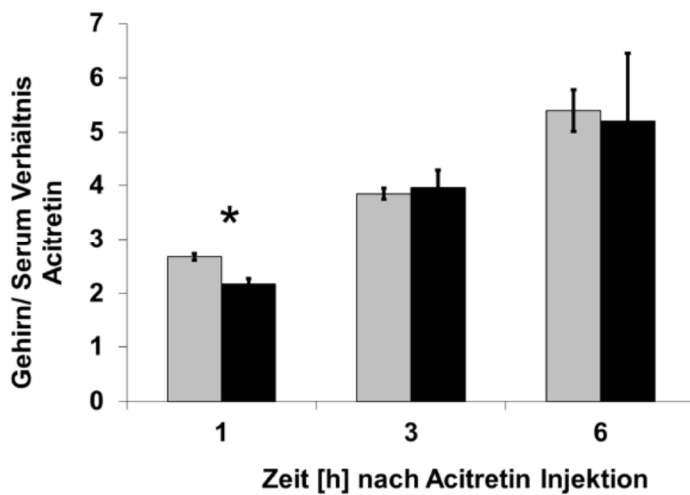


Abb. 3.3.2 C: Gehirn/ Serum Verhältnis von Acitretin bei Wildtyp (WT) bzw. P-gp doppel knockout (KO) Mäusen nach akuter Behandlung mit 5 mg/kg Acitretin an verschiedenen Zeitpunkten nach Acitretin-Injektion [schwarze Balken=WT; graue Balken=KO; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler.

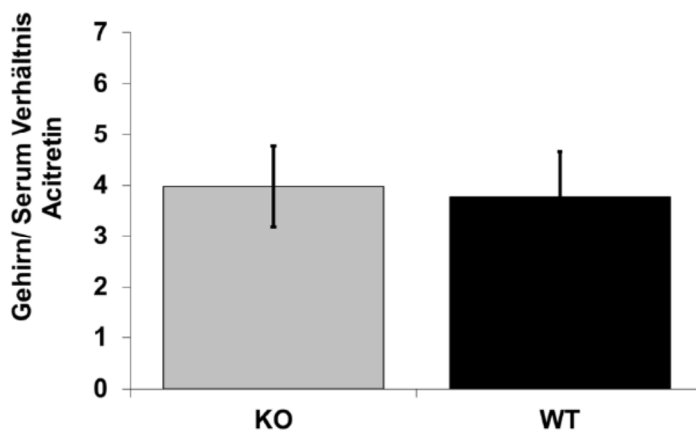


Abb. 3.3.2 D: Durchschnittliches Gehirn/ Serum Verhältnis von Acitretin bei Wildtyp (WT) bzw. P-gp doppel knockout (KO) Mäusen nach akuter Behandlung mit 5 mg/kg Acitretin [schwarzer Balken=WT; grauer Balken=KO; * $p < 0,05$]. Dargestellt werden die Mittelwerte aus allen untersuchten Zeitpunkten (1 h, 3 h und 6 h nach Acitretin-Injektion; s. Abb. 3.3.3 C) +/- Standardfehler.

3.4 Biochemische Untersuchungen

3.4.1 P-gp Expression

Im ersten Schritt der biochemischen Untersuchung sollte der Einfluss der P-gp Induktoren Dexamethason und PCN auf die P-gp Expression im Hirngewebe untersucht werden. Dazu wurde WT Mäusen entweder Dexamethason (50 mg/kg/d), PCN (25 mg/kg/d) oder das Vehikel als Kontrolle über 11 Tage i.p. injiziert. An Tag 12 wurden Hirngewebeproben entnommen und aufbereitet (s. 2.10.3.1). Für die Analyse der P-gp Expression in Hirngewebe-Homogenaten wurde die Fraktion der membranständigen Proteine verwendet. Die Quantifizierung erfolgte hierbei an Hand der detektierten Aktin-Menge als Auftragekontrolle.

Nach 11 Tagen Verabreichung von täglich 50 mg/kg Dexamethason bzw. 25 mg/kg/d PCN konnte durch Western Blot Analyse nachgewiesen werden, dass es zu einer sichtbar verstärkten Expression von P-gp im Hirngewebe von WT Mäusen kommt. Wie Abb. 3.4.1 A zeigt ist die Expression von P-gp in der Membranfraktion der Hirngewebe-Homogenate von Mäusen nach Behandlung mit Dexamethason bzw. PCN gegenüber Kontrolltieren, die nur das Vehikel erhalten haben, tendenziell erhöht. Die Grauwertanalyse aller untersuchten Proben zur Quantifizierung der Proteinmenge ergab jedoch keine signifikante Veränderung der P-gp Expression zwischen den Gruppen (Abb. 3.4.1 B). Es wurden mehrere Banden im Zielbereich von 170 kDa detektiert, die durch verschiedene posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen, entstehen können (Abb. 3.4.1 A). Dies konnte unter Verwendung desselben Antikörpers auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden [Yamada et al. (2003)]. Die Spezifität des Antikörpers konnte jedoch im Vergleich zu einer P-gp knockout Kontrolle gezeigt werden (s. Abb. 3.4.1 A).

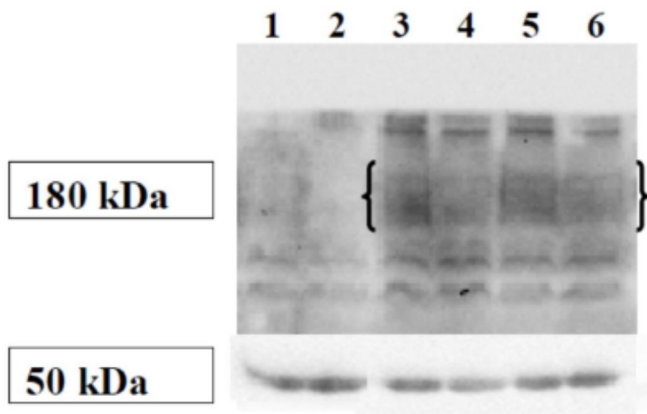


Abb. 3.4.1 A: Beispiel für einen Western Blot zur Bestimmung der P-gp Expression im Hirngewebe von Wildtyp (WT) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason oder 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) oder Vehikel (Saline bzw. Maisöl) und P-gp doppel knockout (KO) Kontrollen. Die spezifische Bande für P-gp liegt bei 170 kDa, die spezifische Bande für β -Aktin liegt bei 48 kDa [Auftragemenge: 60 μ g Protein/ Spur; Spur 1/ Spur 2: KO Kontrollen, Spur 3: Dexamethason, Spur 4: Kontrolle (Saline); Spur 5: PCN, Spur 6: Kontrolle (Maisöl)]. Es wurde jeweils die Fraktion der membranständigen Proteine aufgetragen und auf einem 8 %igen SDS Gel getrennt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran 2 h mit dem P-gp Primärantikörper inkubiert und anschließend 1 h mit dem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach Zugabe des entsprechenden Substrates (5 Minuten Entwicklungszeit) wurde unter Verwendung einer CCD Kamera entwickelt. Die für die Auswertung relevanten Signale sind mit einer geschweiften Klammer markiert.

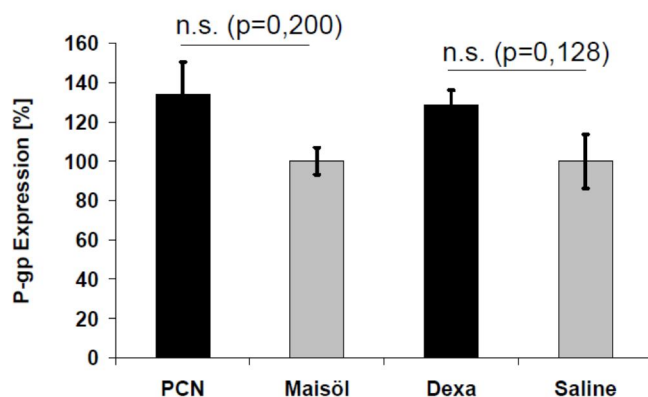


Abb. 3.4.1 B: Grauwertanalyse der Western Blot Untersuchungen zur P-gp Expression im Hirngewebe von Wildtyp (WT; FVB/N Stamm) Mäusen nach 11 Tagen Behandlung mit 50 mg/kg/d Dexamethason, 25 mg/kg/d 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) oder Vehikel (Saline bzw. Maisöl). Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler der P-gp Expression im Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle, normiert auf die Aktin-Menge als Auftragekontrolle (jeweils n=5). Ein p-Wert (s. Angabe in Grafik) von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet [n.s.= nicht signifikant].

3.4.2 ADAM10 Expression

In einem weiteren Teil der biochemischen Untersuchungen wurde analysiert, ob eine Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin über 4 Tage bei Mäusen zu einer veränderten Expression von ADAM10, der physiologischen Form der α -Sekretase, führt. Dazu wurde die ADAM10 Menge in den Thrombozyten analysiert, die aus dem sog. „Platelet-rich Plasma“ gewonnen wurden (s. Punkt 2.10.3.2; Material und Methoden). Die Quantifizierung erfolgte an Hand der detektierten Menge des Oberflächenmarkers CD61 (cluster of differentiation) von Thrombozyten. Diese *in vivo* Arbeiten sollten einen Hinweis auf den potenziellen therapeutischen Nutzen von Acitretin als ADAM10 Aktivator bei der Alzheimer Krankheit liefern. Zum Vergleich wurde die ADAM10 Expression zusätzlich im Hirngewebe gemessen. Dazu wurden die aufbereiteten Hirngewebeproben (s. Punkt 2.10.3.1; Material und Methoden) verwendet. Für die Analyse der ADAM10 Expression im Hirngewebe wurde die Proteinfraction der membranständigen Proteine verwendet. Die Quantifizierung erfolgte hierbei an Hand der detektierten Aktin-Menge als Auftragekontrolle.

Nach Gabe von 5 mg/kg/d Acitretin über 4 Tage an P-gp WT und P-gp KO Mäuse zeigte sich im Western Blot weder, im WT noch in P-gp KO Mäusen eine Erhöhung der Expression der reifen Form der α -Sekretase ADAM10 in den Thrombozyten (Abb. 3.4.2 A). Dies bestätigte sich bei der Grauwertanalyse zur Quantifizierung. Im Vergleich zu den Kontrollen, die über 4 Tage nur das Vehikel erhalten hatten, war keine signifikante Zunahme der ADAM10 Expression in den Thrombozyten bei WT und P-gp KO Mäusen zu beobachten (Abb. 3.4.2 B).

Im Gegensatz zur Analyse der ADAM10 Expression in Thrombozyten konnte im Hirngewebe auch die unreife Form von ADAM10 in allen Proben detektiert und quantifiziert werden (Abb. 3.4.2 C). Zur Bildung der aktiven (reifen) Form von ADAM10 muss mit Hilfe einer Konvertase eine Prodomäne abgespalten werden, wodurch ein zinkhaltiges katalytisches Zentrum freigegeben wird [Lammich et al. (1999)]. Daher ist es möglich in manchen Geweben sowohl die unreife, als auch die reife Form von ADAM10 nachzuweisen. Es zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle jedoch auch hier keine signifikante Erhöhung der ADAM10 Expression nach Behandlung mit Acitretin über 4 Tage. Weder bei der reifen Form von ADAM10 (Abb. 3.4.2 D), noch bei der unreifen Form von ADAM10 (Abb. 3.4.2 E) konnte ein Einfluss von Acitretin festgestellt werden. Die Auswertung des Verhältnisses zwischen reifer und unreifer ADAM10 Form zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen Acitretin-Gabe und Kontrollen (Abb. 3.4.2 F).

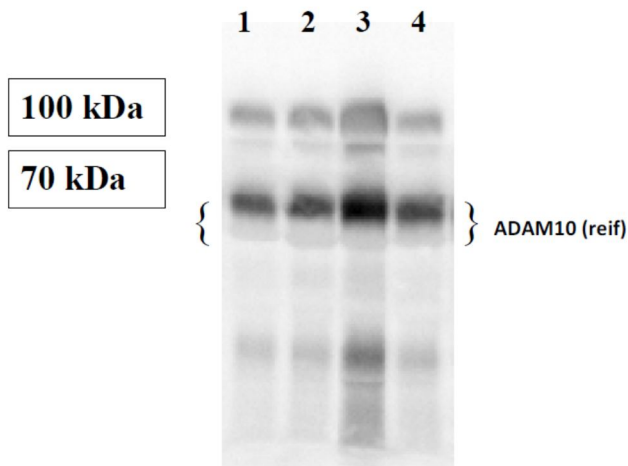


Abb. 3.4.2 A: Beispiel für einen Western Blot der ADAM10 Expression in Thrombozyten von P-gp Wildtyp (WT) Mäusen und P-gp doppel knockout (KO) Kontrollen nach 4 Tagen Injektion von 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle). Die spezifische Bande für ADAM10 liegt bei 64 kDa, die Bande für CD61 bei 110 kDa [Auftragemenge jeweils 15 µl Homogenisat/ Spur (s. 2.10.3.2; eine Proteinbestimmung war auf Grund des geringen Probenvolumens nicht möglich)]; Spur 1: Kontrolle KO; Spur 2: Acitretin KO WT; Spur 3: Kontrolle WT; Spur 4: Acitretin WT]. Eine weitere Bande bei 98 kDa (unreife Form von ADAM10) konnte nicht in allen Proben detektiert werden und wurde somit nicht ausgewertet. Es wurde jeweils die Fraktion der Thrombozyten-Gewinnung verwendet und mit einem 8 %igen SDS Gel getrennt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran über Nacht mit dem ADAM10 Primärantikörper inkubiert und anschließend 1 h mit dem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach Zugabe des entsprechenden Substrates (5 Minuten Entwicklungszeit) wurde unter Verwendung einer CCD Kamera entwickelt. Die für die Auswertung relevanten Signale sind mit einer geschweiften Klammer markiert.

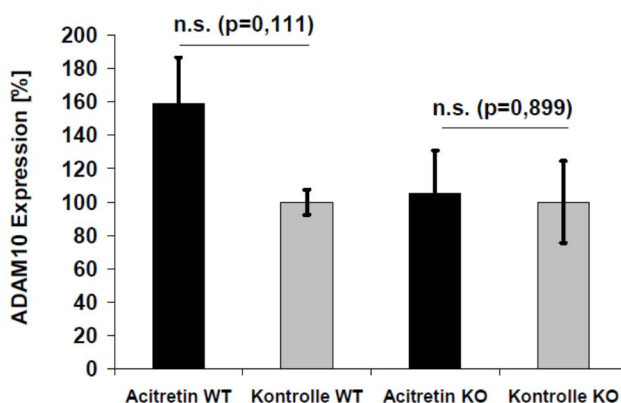


Abb. 3.4.2 B: Grauwertanalyse der Western Blot Untersuchungen zur ADAM10 Expression in Thrombozyten von P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Kontrollen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle) [Auftragemenge: 15 µl Homogenisat/ Spur; s. 2.10.3.2]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler (jeweils n=3). Da auf Grund des geringen Probenvolumens keine Proteinbestimmung möglich war, erfolgte die Quantifizierung auf Grundlage der CD61-Menge als Auftragkontrolle. Ein p-Wert (s. Angabe in Grafik) von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet [n.s.= nicht signifikant].

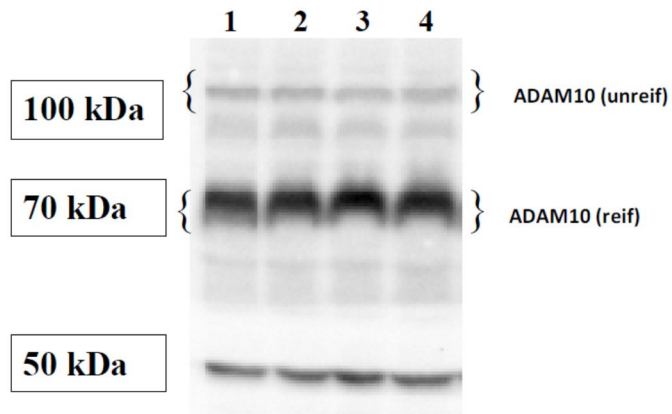


Abb. 3.4.2 C: Beispiel für einen Western Blot der ADAM10 Expression im Hirngewebe von P-gp Wildtyp (WT) Mäusen und P-gp doppel knockout (KO) Kontrollen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle). Die spezifische Bande für ADAM10 (reif) liegt bei 64 kDa, die Bande für ADAM10 (unreif) liegt bei 98 kDa und die Bande für β -Aktin liegt bei 48 kDa [Auftragemenge jeweils 60 μ g; Spur 1: Acitretin WT; Spur 2: Kontrolle WT; Spur 3: Acitretin KO; Spur 4: Kontrolle KO]. Es wurde jeweils die Fraktion der membranständigen Proteine verwendet und mit einem 8 %igen SDS Gel getrennt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran über Nacht mit dem ADAM10 Primärantikörper inkubiert und anschließend 1 h mit dem Enzymgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach Zugabe des entsprechenden Substrates (5 Minuten Entwicklungszeit) wurde unter Verwendung einer CCD Kamera entwickelt. Die für die Auswertung relevanten Signale sind mit einer geschweiften Klammer markiert.

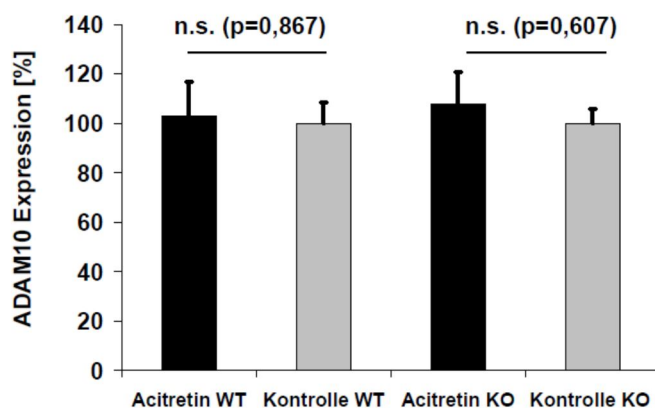


Abb. 3.4.2 D: Grauwertanalyse der Western Blot Untersuchungen zur ADAM10 Expression im Hirngewebe von P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Kontrollen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle) [Auftragemenge: 60 μ g Protein/Spur]. Ausgewertet wurde die Expression der reifen Form von ADAM10 (Bande bei 64 kDa) Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler [Acitretin WT (n=5); Kontrolle WT (n=4); Acitretin KO (n=5); Kontrolle KO (n=4)]. Die Quantifizierung erfolgte auf Grundlage der Aktin-Menge als Auftragkontrolle. Ein p-Wert (s. Angabe in Grafik) von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet [n.s. =nicht signifikant].

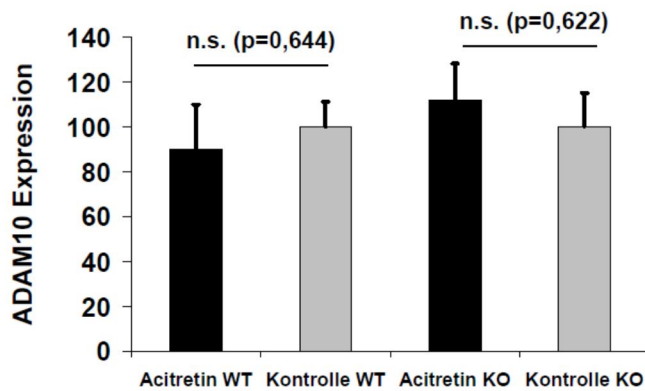


Abb. 3.4.2 E: Grauwertanalyse der Western Blot Untersuchungen zur ADAM10 Expression im Hirngewebe von P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Kontrollen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle) [Auftragemenge: 60 µg Protein/ Spur]. Ausgewertet wurde die Expression der unreifen Form von ADAM10 (Bande bei 98 kDa) Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler [Acitretin WT (n=5); Kontrolle WT (n=4); Acitretin KO (n=5); Kontrolle KO (n=4)]. Die Quantifizierung erfolgte auf Grundlage der Aktin-Menge als Auftragekontrolle. Ein p-Wert (s. Angabe in Grafik) von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet [n.s. =nicht signifikant].

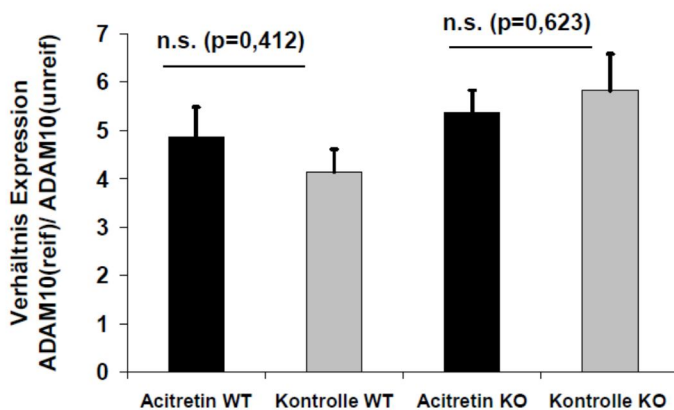


Abb. 3.4.2 F: Grauwertanalyse der Western Blot Untersuchungen zur ADAM10 Expression im Hirngewebe von P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Kontrollen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle) [Auftragemenge: 60 µg Protein/ Spur]. Ausgewertet wurde das Verhältnis der Expression der reifen Form von ADAM10 (Bande bei 64 kDa) zur Expression der unreifen Form von ADAM10 (Bande bei 98 kDa). Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler [Acitretin WT (n=5); Kontrolle WT (n=4); Acitretin KO (n=5); Kontrolle KO (n=4)]. Die Quantifizierung erfolgte auf Grundlage der Aktin-Menge als Auftragekontrolle. Ein p-Wert (s. Angabe in Grafik) von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet [n.s. =nicht signifikant].

3.4.3 APP α Sekretion

Neben der Bestimmung der ADAM10 Expression sollte die Sekretion von APP α bestimmt werden. Es ist ein Spaltprodukt des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP), welches durch ADAM10 gebildet wird. Eine Zunahme der APP α Sekretion ist ein Hinweis auf eine Steigerung des nicht-amyloidogenen Abbaus von APP. Diese Untersuchungen sollten die Ergebnisse zur *in vivo* Wirkung von Acitretin in Mäusen vervollständigen. Die Quantifizierung erfolgte hierbei an Hand der detektierten Menge des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Auftragekontrolle.

Der Western Blot zeigte keine sichtbaren Veränderungen der APP α Sekretion im Hirngewebe nach der Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin über den Zeitraum von 4 Tagen (Abb. 3.4.3 A). Die Quantifizierung durch Grauwertanalyse ergab ebenfalls, dass die Behandlung mit Acitretin zu keiner signifikanten Zunahme der APP α Sekretion im Hirngewebe von WT bzw. P-gp KO Mäusen gegenüber den Kontrollen geführt hatte (Abb. 3.4.3 B).

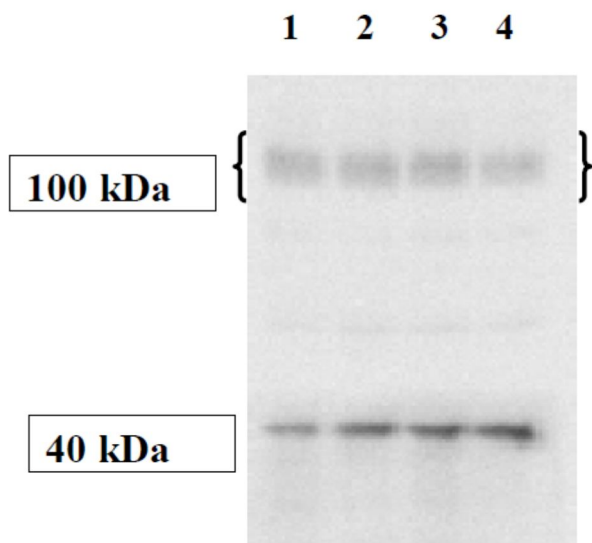


Abb. 3.4.3 A: Beispiel für einen Western Blot der APP α Sekretion im Hirngewebe von P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Kontrollen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle). Die spezifische Bande für APP α liegt bei 98 kDa, die spezifische Bande für GAPDH liegt bei 37 kDa [Auftragemenge: 30 μ g Protein/ Spur; Spur 1: Acitretin WT, Spur 2: Kontrolle WT, Spur 3: Acitretin KO, Spur 4: Kontrolle KO]. Es wurden jeweils die Fraktionen der löslichen Proteine verwendet und mit einem 8 %igen SDS Gel getrennt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran über Nacht mit dem APP α Primärantikörper inkubiert und anschließend 1 h mit dem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach Zugabe des entsprechenden Substrates wurde unter Verwendung einer CCD Kamera entwickelt. Die für die Auswertung relevanten Signale sind mit einer geschweiften Klammer markiert.

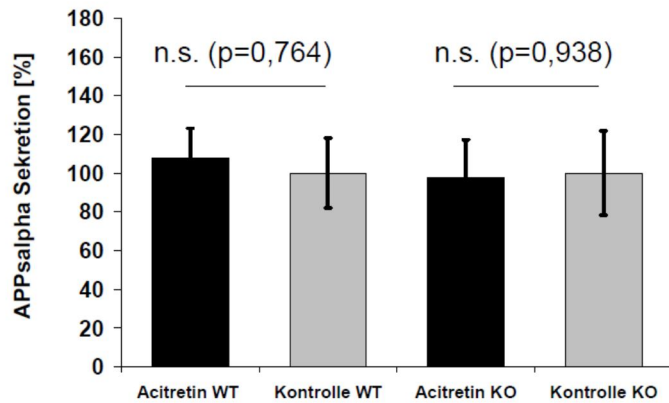


Abb. 3.4.3 B: Grauwertanalyse der Western Blot Untersuchungen zur APPs α Sekretion im Hirngewebe von P-gp Wildtyp (WT) und P-gp doppel knockout (KO) Kontrollen nach 4 Tagen Behandlung mit 5 mg/kg/d Acitretin oder Vehikel (Kontrolle) [Auftragemenge: 30 μ g Protein/Spur]. Dargestellt werden Mittelwerte +/- Standardfehler (jeweils n=5). Die Quantifizierung erfolgte auf Grundlage der GAPDH-Menge als Auftragekontrolle. Ein p-Wert (s. Angabe in Grafik) von <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet [n.s.=nicht signifikant].

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer P-gp Modulation auf die Verteilung und Pharmakodynamik verschiedener Antipsychotika in einem Tiermodell untersucht. Dabei wurde untersucht inwieweit pharmakokinetische Interaktionen mit einem P-gp abhängigen Transport an der Blut-Hirn Schranke die Wirksamkeit von Medikamenten zur Behandlung psychiatrischer Erkrankungen einschränken können. Dabei wurde im ersten Schritt zunächst die Auswirkung einer P-gp Modulation auf die Verteilung von Risperidon und seines aktiven Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon als P-gp Modellsubstrate untersucht. Haloperidol, welches kein P-gp Substrat ist, wurde als Vergleichssubstanz ebenfalls untersucht. Im zweiten Schritt wurden sowohl motorische, als auch kognitive Effekte einer P-gp Modulation durch verhaltenspharmakologische Untersuchungen analysiert, die durch Western Blot Analysen der P-gp Expression vervollständigt wurden. Als weitere Substanz wurde Acitretin, ein Retinoid, welches möglicherweise in der Behandlung der Alzheimer Krankheit Anwendung findet, untersucht, um festzustellen, ob diese Substanz hirngängig ist und eine P-gp abhängige Verteilung zeigt. Abschließende Western Blot Analysen zur Expression von ADAM10 und APP-Prozessierung wurden durchgeführt, um den therapeutischen Nutzen einer Acitretin-Behandlung der Demenz *in vivo* zu charakterisieren.

4.1 Charakterisierung verschiedener P-gp Modulatoren (Vorversuch)

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen im Rahmen des Vorversuches, konnten zeigen, dass durch eine Behandlung mit P-gp Modulatoren die Verteilung von Risperidon und seinem aktiven Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon im Hirngewebe und Serum beeinflusst werden kann. In mehreren Arbeiten konnte bereits belegt werden, dass Risperidon und sein Metabolit Substrate von P-gp sind [Doran et al. (2005); Kirschbaum et. al (2008)]. Daher wurden diese als Modellsubstanzen für den P-gp abhängigen Transport an der Blut-Hirn Schranke verwendet. Pharmakokinetische Interaktionen zwischen verschiedenen gleichzeitig verabreichten Medikamenten sind gängige klinische Praxis. Unklar ist diesbezüglich, ob pharmakokinetische Interaktionen auf der Ebene von P-gp klinisch relevant sind. Die Bedeutung der P-gp Aktivität für die Behandlung psychiatrischer Erkrankungen konnte bereits mehrfach in klinischen Studien gezeigt werden. So konnte in einer klinischen Studie der Einfluss von P-gp Polymorphismen auf Plasmaspiegel von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon gezeigt werden [Gunes et al. (2008)]. In einer weiteren Arbeit wurde das Interaktionspotential des P-gp/ CYP3A4-Induktors Rifampicin mit Risperidon, dessen Metabolisierung und den resultierenden Plasmaspiegeln beschrieben [Kim et al. (2008)].

In dieser Arbeit sollte der Effekt von verschiedenen Substanzen mit potenziell P-gp induzierender Wirkung untersucht werden. So konnte insbesondere für die P-gp Induktoren Dexamethason, PCN und Rifampicin nachgewiesen werden, dass eine Koapplikation dieser Substanzen zu reduzierten Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon (Summe aus beiden) bereits nach 4 Tagen Behandlung im Hirngewebe führt (s. Abb. 3.1.1.1 A und Abb. 3.1.1.2 A). Dieser Effekt war nach 11 Tagen Behandlung noch deutlicher (s. Abb. 3.1.1.1 C und Abb. 3.1.1.2 C). Während im Serum nach Rifampicin-Gabe über 4 bzw. 11 Tage keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Verteilung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon zu beobachten waren, wurden durch die Injektion von Dexamethason oder PCN auch die Serumkonzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon signifikant reduziert (s. Abb. 3.1.1.1 B; Abb. 3.1.1.2 B; Abb. 3.1.1.1 D und Abb. 3.1.1.2 D). Es konnte jedoch mit diesen Ergebnissen nicht bestätigt werden, dass 9-Hydroxyrisperidon eine höhere Affinität zu P-gp hat als die Muttersubstanz Risperidon [Doran et al. (2005)]. Insbesondere die Betrachtung der klinisch relevanten aktiven Fraktion (Summe aus Risperidon plus 9-Hydroxyrisperidon) schien daher am aussagekräftigsten zu sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten auch, dass nicht allein die Modulation von P-gp für die beobachteten Unterschiede bei der Verteilung der Antipsychotika im Hirngewebe und Serum verantwortlich sein kann. Betrachtet man die Ergebnisse der Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisse nach Dexamethason-/ und PCN-Gabe über 4 Tage (s. Abb. 3.1.1.1 G und Abb. 3.1.1.2 G) und über 11 Tage (s. Abb. 3.1.1.1 H und Abb. 3.1.1.2 H), zeigte sich deutlich, dass ebenso eine Induktion von metabolischen Prozessen, vermutlich auf der Basis von CYP-Enzymen, durch die P-gp Modulatoren stattgefunden haben muss. Dafür sprach der Anstieg der Konzentration des Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon im Verhältnis zur Konzentration von Risperidon. Für die Rifampicin-Gruppe konnte dieser Effekt jedoch nur im Hirngewebe gezeigt werden, im Serum waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Rifampicin-Gruppe und Kontrolle zu beobachten, weder nach 4 Tagen, noch nach 11 Tagen Gabe (s. 3.1.1.1 G und Abb. 3.1.1.1 H). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Rifampicin nicht den Transkriptionsfaktor PXR (Pregnan-X-Rezeptor) in Mäusen aktiviert, und Spezies-Unterschiede bezüglich der Regulierung von P-gp und CYP-Enzymen durch PXR bestehen [Kliwer et al. (2002)]. Durch eine Induktion von CYP-abhängigen Biotransformationen müsste insbesondere auch ein Effekt im Serum sichtbar sein. Dies war jedoch bei Rifampicin-Gabe nicht der Fall. Hinzu kommt die Tatsache, dass Rifampicin eine ausgeprägte Toxizität zeigte und auf Grund der Letalität der Versuchstiere unklarer Ursache die Versuche zur chronischen Gabe von Rifampicin abgebrochen werden mussten.

Man konnte insgesamt betrachtet jedoch feststellen, dass in den Kontrollgruppen ein Anstieg der 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration im Hirngewebe zu sehen war, die in den Gruppen, die mit einem P-gp Modulator behandelt wurden, nicht zu beobachten war. Dies lässt den Schluss zu, dass Transportprozesse an der Blut-Hirn Schranke einen Einfluss auf die Biodistribution von Muttersubstanz und insbesondere auch des Metaboliten haben. Es ist bekannt, dass CYP3A4 und P-gp eine starke Koexpression zeigen [Kivistö et al. (2004); Pal et al. (2006)]. Bei der Maus ist CYP3A11 das analoge Enzym zum humanen CYP3A4 und ebenso induzierbar [Martignoni et al. (2006)]. Dies zeigt deutlich, dass ein physiologisches Zusammenwirken zwischen Metabolismus und Transportproteinen besteht. Viele Metabolite, wie z.B. 9-Hydroxyrisperidon [Doran et al. (2005)] zeigen eine höhere Affinität zu P-gp als die Muttersubstanz. Mit einem verstärkten Efflux der Metaboliten geht somit ein Schutz vor toxischen Wirkungen der Abbauprodukte einher. Was physiologisch als Schutzmechanismus effektiv ist, kann in der Pharmakotherapie jedoch zu klinisch relevanten Interaktionen führen, welches insbesondere für das Zusammenwirken von P-gp und CYP3A4 zutrifft [Martin-Facklam und Haefeli (2000)]. Daher sind Untersuchungen zu pharmakokinetischen Interaktionen auf Basis von Transportvorgängen wichtig, z.B. durch P-gp, und auf Basis von metabolischen Prozessen, z.B. durch CYP-Enzyme. Rifampicin scheint jedoch auf Grund der beobachteten Toxizität kein geeigneter Kandidat für *in vivo* Untersuchungen in der Maus zu sein. Bei den anderen P-gp Induktoren Dexamethason und PCN konnte man sowohl im Gehirn, als auch im Serum einen Effekt auf die Konzentrationen von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe beobachten. Alle drei Substanzen (Rifampicin, Dexamethason und PCN) zeigten eine signifikante Reduktion des Gehirn/ Serum Verhältnisses von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und auch der aktiven Summe von Risperidon als Maß für eine verringerte Penetration dieser Substanzen ins Hirngewebe (s. Abb. 3.1.1.1 E, Abb. 3.1.1.1 F, Abb. 3.1.1.2 E und Abb. 3.1.1.2 F). Somit konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass P-gp Induktoren eine Behandlung mit Psychopharmaka beeinflussen, wenn sie Substrate von P-gp sind.

Die Befunde, dass die Effekte im Hirngewebe ausgeprägter als im Serum waren, machen deutlich, dass insbesondere durch TDM von Psychopharmaka Interaktionen an der Blut-Hirn Schranke möglicherweise nicht ausreichend erkennbar sind. Die Analyse von Plasmaspiegeln könnte in manchen Fällen weniger geeignet zu sein, die Verhältnisse im Hirngewebe zu bewerten. Bei den Untersuchungen der Effekte von Acitretin und Quercetin zeigte sich ein von den Ergebnissen von Rifampicin, Dexamethason und PCN abweichendes Bild. Eine Behandlung über 4 Tage mit Acitretin führte zu einer signifikanten Erhöhung von Risperidon- und 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration im Hirngewebe, während im Serum nur die 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration signifikant erhöht war (s. Abb. 3.1.1.2 A und Abb. 3.1.1.2 B). Das Gehirn/ Serum Verhältnis war nach dem gleichen Zeitraum der Behandlung nicht signifikant unterschiedlich zwischen Acitretin- und Kontrollgruppe und das

Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon- Verhältnis zeigte nur an einem beobachteten Zeitpunkt eine signifikante Reduktion (s. Abb. 3.1.1.2 E und Abb. 3.1.1.2 G). Acitretin erwies sich im Gegensatz zu Rifampicin, Dexamethason und PCN nicht als P-gp Induktor. Das synthetische Retinoid wurde in diese Arbeit eingeschlossen, da Acitretin indirekt mit dem Transkriptionsfaktor PXR interagieren kann. Acitretin könnte somit einen Einfluss auf die Expression von P-gp haben. Acitretin entfaltet seine therapeutische Wirkung bei Psoriasis durch eine Verdrängung der all-trans Retinsäure (atRA) von ihrem zytosolischen Bindungsprotein CRABP [=cellular retinoic acid binding protein; Armstrong et al. (2005)]. Erst atRA ist die wirksame Form im Körper, die durch Aktivierung des Retinsäure-Rezeptors (RAR) oder des Retinoid-X-Rezeptors (RXR) verschiedene Heterodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren bilden kann [Tippmann et al. (2009)]. Auch PXR ist ein möglicher Interaktionspartner. Dadurch besteht ein mögliches Interaktionspotential mit durch eine PXR-Aktivierung verbundenen Prozessen, z.B. einer Modulation der Expression und Aktivität von P-gp und CYP-Enzymen. Diese Effekte sind bislang noch nicht ausreichend in *in vivo* Modellen getestet worden. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen ersten Hinweis, dass Acitretin wahrscheinlich keinen bedeutsamen Einfluss auf den P-gp abhängigen Transport von Risperidon und seinem aktiven Metaboliten hat. Ob dies auch für andere Substanzen gilt müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Auch die Beeinflussung von CYP-abhängigen Biotransformationen scheint für eine pharmakokinetische Interaktion mit Risperidon vernachlässigbar im Vergleich zu den Ergebnissen von Dexamethason und PCN. Da die Effekte auf die Verteilung von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe im Gehirn und Serum so gering waren, wurde auf eine weitere Untersuchung von Acitretin im Rahmen der pharmakokinetischen Analysen verzichtet. Neben Acitretin wurde auch Quercetin im Vorversuch getestet. Es sollte u.a. untersucht werden, ob es einen dosisabhängigen Effekt auf die Aktivität von P-gp gibt. In der Literatur gibt es Hinweise, die zeigen, dass insbesondere die Hirnkinetik von P-gp Substraten, wie z.B. Vincristin, durch Quercetin beeinflusst werden kann [Mitsunaga et al. (2000)]. In einer Dosierung von 0,1 mg/kg konnte Quercetin in einem *in vivo* Mausmodell durch eine Induktion von P-gp die Hirnspiegel von Vincristin reduzieren, während durch 1,0 mg/kg Quercetin eine Erhöhung der Vincristin-Konzentration im Hirngewebe erreicht werden konnte, vermutlich durch eine P-gp Inhibition. Diese Daten konnten jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Konzentration von Risperidon waren im Hirngewebe nach 4 Tagen Behandlung bei einer Dosis von 0,1 mg/kg Quercetin signifikant erhöht, während sie durch die Dosis von 1,0 mg/kg Quercetin signifikant erniedrigt wurden (s. Abb. 3.1.1.3 A). Die Konzentration von 9-Hydroxyrisperidon zeigte hingegen bei der niedrigeren Konzentration keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe, während die höhere Quercetin-Konzentration zu einer signifikanten Erhöhung führte (s. Abb. 3.1.1.3 A). Im Serum waren in beiden Gruppen nur die Konzentration von Risperidon signifikant erhöht (s. Abb. 3.1.1.3 B). Auf Grund der stärkeren Effekte

von 1,0 mg/kg Quercetin wurde nur diese Konzentration auch über 11 Tage Behandlung getestet. Während im Serum keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren, war im Hirngewebe ausschließlich die 9-Hydroxyrisperidon Konzentration signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abb. 3.1.1.3 C und Abb. 3.1.1.3 D).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors PXR eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Transportvorgängen durch P-gp bzw. bei der Steuerung von metabolischen Prozessen zukommt. In einer *in vitro* Arbeit von Kluth et al. (2007) konnte bereits gezeigt werden, dass Quercetin in der Lage ist, den CYP3A4-Promoter zu aktivieren, jedoch keinen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PXR ausübt. Während nach 4 Tagen Gabe von 1,0 mg/kg Quercetin nur das Gehirn/ Serum Verhältnis von 9-Hydroxyrisperidon signifikant erhöht war, konnte dies durch 11 Tage Gabe von 0,1 mg/kg Quercetin noch verstärkt werden (s. Abb. 3.1.1.3 E und Abb. 3.1.1.3 F). Dies weist darauf hin, dass durch Quercetin hauptsächlich eine P-gp Inhibition vermittelt wird. Dies ist konsistent mit Daten aus der Literatur, die belegen, dass durch Flavonoide ABC-Transporter (P-gp, MRP2 oder BCRP) beeinflusst werden können und möglicherweise therapeutisch genutzt werden können [Alvarez et al. (2009)]. Auf der anderen Seite besteht dadurch ein mögliches Risiko bei Substanzen mit einem engen therapeutischen Fenster. Bei der Hemmung von aktiven Efflux-Transportern ist mit Intoxikationen zu rechnen.

Eine mögliche Erklärung der, auch in dieser Arbeit festgestellten, P-gp Inhibition könnte die Blockade der ATP-Bindestelle von ABC- Transportern sein. Mit Hilfe des Molecular Modeling konnte gezeigt werden, dass Quercetin durch seine polyphenolische Struktur und die Ladungsverteilung innerhalb des Moleküls möglicherweise ATP verdrängen kann. Dadurch ist es in der Lage die ATPase-Aktivität zu hemmen, die für den aktiven Transportmechanismus der ABC-Proteine essentiell ist [Qian et al. (2006)]. Die von Kluth et al. (2007) vorgestellten Ergebnisse könnten eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit gezeigten Veränderungen des Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisses sein. Mehrheitlich kann man bei den Ergebnissen nach 4 Tagen Quercetin-Gabe, unabhängig von der Dosis, eine signifikante Reduktion des Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisses erkennen, sowohl im Hirngewebe als auch im Serum (s. Abb. 3.1.1.3 G). Dieser Effekt war jedoch nach 11 Tagen Behandlung mit 0,1 mg/kg Quercetin nicht mehr zu sehen. Dies unterstützt die Hypothese, dass von Quercetin in den hier eingesetzten Konzentrationen eher ein inhibitorisches Potential ausgeht, in Bezug auf Transportvorgänge. Da die beobachteten Effekte im Gegensatz zu den PXR-Aktivatoren Dexamethason und PCN jedoch relativ schwach und uneinheitlich waren, wurden Quercetin und Acitretin nicht für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Der Vorversuch diente zur Identifikation der stärksten P-gp Modulatoren. Nach Auswertung aller Analysen zeigte sich daher, dass Dexamethason und PCN, die bereits auch in anderen *in vivo* Studien an Nagern zur P-gp Induktion eingesetzt wurden [Bauer et al. (2005)], die deutlichsten Effekte auf die Verteilung von Risperidon und seinem aktiven Metaboliten zeigten. Daher wurden für die weiteren pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Untersuchungen nur noch diese zwei Substanzen verwendet. Man muss jedoch beachten, dass Dexamethason und PCN nicht selektiv auf die Expression und Aktivität von P-gp wirken. Eine Aktivierung von PXR kann ebenso an der Transkriptionskontrolle anderer Transportproteine beteiligt sein. P-gp spielt zwar die dominierende Rolle an der Blut-Hirn Schranke [Schinkel (1999)], jedoch werden auch weitere ABC-Transporter an der apikalen Membran an der Blut-Hirn Schranke exprimiert, wie z.B. MRP2 und BCRP [Bauer et al. (2005); Breedveld et al. (2006)]. Neben PXR spielt auch der Transkriptionsfaktor CAR (Constitutive-Androstan-Rezeptor) eine Rolle bei der Expression von ABC-Transportern [Miller (2010)], während der Glukokortikoid-Rezeptor (GR) zusätzlich einen Einfluss auf die Aktivität von BCRP und P-gp, nicht jedoch von MRP2 hat [Narang et al. (2008)]. Durch eine Behandlung mit Dexamethason und PCN ist daher auch eine Induktion von anderen Transportproteinen möglich [Sonoda et al. (2003); Teng et al. (2003)]. Ob dies möglicherweise einen Einfluss auf die Verteilung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon haben kann, ist bislang nicht untersucht.

Es gibt keine Daten in der Literatur zur Substratspezifität von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon zu anderen Transportern neben P-gp. Eine gegenseitige Beeinflussung zwischen den verschiedenen Transkriptionsfaktoren ist daher denkbar und muss evtl. auch berücksichtigt werden [Köhle und Bock (2009)]. Beispielsweise gibt es Daten, die zeigen, dass bei MRP2-defizienten Ratten die Expression von P-gp im Gehirn dauerhaft hochreguliert wird [Hoffmann und Löscher (2007)]. Diese Ergebnisse geben Hinweise, dass es vermutlich Substratüberlappungen zwischen verschiedenen Transportproteinen gibt. Untersuchungen anderer Transportproteine neben P-gp waren nicht Teil dieser Arbeit. Durch die Dominanz von P-gp an der Blut-Hirn Schranke ist davon auszugehen, dass pharmakokinetische Interaktionen im Bereich der Psychopharmaka mit diesem ABC-Transporter die größte Bedeutung zukommt. Ebenso muss davon ausgegangen werden, dass auch in anderen Geweben wie Leber oder Niere eine P-gp modulierende Wirkung der eingesetzten Substanzen erreicht wird, da die verwendeten P-gp Modulatoren nicht gewebespezifisch wirken. Durch eine Zunahme der P-gp Expression in Leber und Niere durch P-gp induzierende Substanzen kann die Verteilung von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon verändert werden, in gleichem Maße wie durch eine Inhibition von P-gp abhängigen Transportprozessen.

Wie der Vergleich der Risperidon/9-Hydroxyrisperidon Verhältnisse zeigt, haben insbesondere Dexamethason und PCN einen Einfluss auf den Metabolismus von Risperidon, vermutlich durch eine CYP-Induktion in der Leber. Daher ist auch eine Induktion von P-gp in der Leber und der Niere wahrscheinlich, die zu einer verstärkten Ausscheidung und Elimination von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon führen kann. Auch in diesen Geweben hat P-gp eine dominierende Rolle bei aktiven Transportprozessen [Lagas et al. (2009)]. Bauer et al. (2005) konnten in einem *in vivo* Rattenmodell zeigen, dass die Gabe von Dexamethason und PCN zu einer Zunahme der P-gp Expression in Hirnkapillaren, Leber und Niere führte. Dies kann daher auch für die Maus angenommen werden. In dieser Arbeit ging es insgesamt um die Charakterisierung von möglichen Interaktionen zwischen P-gp Modulatoren und dem P-gp Substrat Risperidon. Dies konnte anhand der untersuchten Substanzen belegt werden. Es könnte für weiterführende Arbeiten in Betracht gezogen werden, die Affinität von Psychopharmaka zu anderen ABC-Transportern zu untersuchen bzw. auch Untersuchungen in anderen Geweben einzuschließen.

4.2 Untersuchungen zur veränderten Verteilung von Antipsychotika in Gehirn und Serum

Nach den Ergebnissen des Vorversuches wurden Dexamethason und PCN als stärkste P-gp Modulatoren identifiziert. Bei dem zweiten Teil der pharmakokinetischen Untersuchungen wurden die Unterschiede der Effekte dieser Substanzen auf die Verteilung der P-gp Substrate Risperidon und seines aktiven Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon mit den Effekten auf die Verteilung von Haloperidol verglichen werden. Haloperidol ist kein Substrat von P-gp. Dadurch sollte festgestellt werden, welche Unterschiede zwischen der Beeinflussung von P-gp abhängigen Transportprozessen und anderen davon unabhängigen Wirkungen der eingesetzten P-gp Modulatoren bestehen.

Es zeigte sich, dass durch die Gabe von Dexamethason oder PCN über 11 Tage die Risperidon-Konzentration in Blut und Serum signifikant reduziert wurde, während die 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration zu Beginn zunächst erhöht war bevor eine signifikante Reduktion zu beobachten war (s. Abb. 3.1.2.1 A und Abb. 3.1.2.1 B). Dies belegte erneut, dass beide Substanzen die Biotransformation von Risperidon beschleunigen, vermutlich durch CYP-Induktion. Im menschlichen Stoffwechsel wird Risperidon hauptsächlich über CYP2D6 und CYP3A4 abgebaut [Fang et al. (1999); de Leon et al. (2007)]. Neben dem Hauptmetabolit 9-Hydroxyrisperidon entstehen dabei 7-Hydroxyrisperidon und weitere Metabolite. Nager besitzen die zwei analogen Enzyme CYP3A11 und CYP2D22, die eine hohe Aminosäuresequenz-Homologie zeigen [Martignoni et al. (2006)]. Es hat sich in *in vivo* Studien mit Risperidon in Nagern gezeigt, dass offensichtlich auch dort der Hauptmetabolit

9-Hydroxyrisperidon ist [Wang et al. (2004); Kirschbaum et al. (2008)]. Somit ist es wahrscheinlich, dass hier ebenso ein Einfluss der P-gp Modulatoren auf die Metabolisierung von Risperidon bedeutsam sein kann. Unter Dexamethason war der Effekt auf die Biotransformation deutlicher als bei PCN. Insgesamt wurde durch die Gabe von Dexamethason oder PCN die aktive Summe von Risperidon im Hirngewebe und Serum signifikant reduziert (s. Abb. 3.1.2.1 A und Abb. 3.1.2.1 B). Interessanterweise verschob sich durch den Anstieg der 9-Hydroxyrisperidon-Konzentration das Gehirn/ Serum Verhältnis von Risperidon, 9-Hydroxyrisperidon und der aktiven Summe von Risperidon. Nach Dexamethason-Gabe war, anders als erwartet, eine signifikante Erhöhung der Gehirn/ Serum Verhältnisse zu beobachten, während die Behandlung mit PCN meist zu der erwarteten signifikanten Reduktion der Gehirn/ Serum Verhältnisse im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (s. Abb. 3.1.2.1 C). Dies erweckte den Anschein, dass durch die Behandlung mit den P-gp Modulatoren die Penetration von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon ins Gehirn verbessert wurde. Dies widerspricht zwar den Ergebnissen der signifikanten Reduktion der Hirn- und Serum-Konzentrationen der aktiven Summe von Risperidon, lässt sich aber durch die stärkere Reduktion der Risperidon-Konzentration im Serum im Vergleich zum Hirngewebe erklären.

Der Metabolismus von Risperidon findet nicht im Hirngewebe statt, sondern hauptsächlich bei der Leberpassage. Daher wirkten sich die induktiven Effekte von Dexamethason und PCN stärker auf die Konzentrationen im Serum als auf die Konzentrationen im Hirngewebe aus. Andererseits hat 9-Hydroxyrisperidon den größeren Anteil an der aktiven Summe. Risperidon hat beim Menschen nur eine kurze Halbwertszeit von 3 h, während der Metabolit eine Halbwertszeit von 24 h hat [Spina und de Leon (2007)]. Insbesondere bei der Betrachtung der Konzentrationen der aktiven Summe von Risperidon in Serum und Gehirn kann man erkennen, dass PCN den stärkeren Effekt auf die Hirnkonzentrationen hat, während Dexamethason die Serumkonzentrationen deutlicher reduziert. Bestätigt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse der Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnisse (s. Abb. 3.1.2.1 D). Beide P-gp Modulatoren, Dexamethason und PCN, reduzierten das Risperidon/ 9-Hydroxyrisperidon Verhältnis in Hirngewebe und Serum (s. Abb. 3.1.2.1 D). Es konnte somit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Vorversuches gezeigt werden, dass Dexamethason über P-gp die Konzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon reduzieren konnte und durch Effekte auf die Biotransformation zusätzlich deren Verteilung beeinflussen konnte.

Besonders interessant war nun der Vergleich mit der Verteilung von Haloperidol, welches nicht P-gp abhängig transportiert wird. Wie Kirschbaum et al. (2008) zeigen konnten, gibt es zwischen WT Mäusen und P-gp KO Mäusen nur geringe Unterschiede bei der Verteilung von Haloperidol im Hirngewebe bzw. Serum, während die Konzentration von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon im Gehirn von P-gp KO Mäusen deutlich erhöht ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch schon von Doran

et al. (2005) präsentiert. Somit ist ein direkter Vergleich beider Substanzen besonders interessant. Während sich die Verteilung von Haloperidol zwischen Hirngewebe und Plasma im direkten Vergleich der beiden Genotypen nur um den Faktor 1,4 unterschied, konnte für Risperidon der Faktor 10 und für 9-Hydroxyrisperidon der Faktor 17 ermittelt werden [Doran et al. (2005)]. Dennoch zeigen die Ergebnisse der eigenen Arbeit eine signifikante Reduktion der Haloperidol-Konzentration in Gehirn und Serum sowohl durch Dexamethason-Behandlung, als auch nach PCN-Gabe an allen beobachteten Zeitpunkten (s. Abb. 3.1.2.2 A und Abb. 3.1.2.2 B). Dadurch, dass mit der in dieser Arbeit verwendeten HPLC-Methode keine Metaboliten von Haloperidol erfasst wurden, kann ein möglicher Effekt auf die Metabolisierung hier nicht direkt durch Vergleich der Muttersubstanz mit einem Metaboliten dargestellt werden. Da jedoch ausgeschlossen werden kann, dass eine Induktion von P-gp als Erklärung dienen kann, ist der Grund der signifikanten Reduktion der Haloperidol-Konzentration vermutlich eine verstärkte Metabolisierung durch CYP-Enzyme.

Haloperidol wird über CYP3A4 metabolisiert [Brockmöller et al. (2002); Tateishi et al. (2000)], welches gemessen an der Expression den größten Anteil der metabolischen Enzyme in der Leber mit etwa 30 % ausmacht [Dresser et al. (2000)]. Da CYP3A4 induzierbar ist, sind klinisch relevante pharmakokinetische Interaktionen durch CYP3A4-Inhibition oder -Induktion nicht selten [Ogu and Maxa (2000); Galetin et al. (2005)]. Sowohl für Rifampicin, als auch für PCN und Dexamethason sind induktive Effekte auf die Expression von CYP3A4 beim Menschen bzw. CYP3A11 bei Nagern beschrieben worden [Kirn et al. (1999); Matheny et al. (2004); Xu et al. (2005); Cheng and Klaassen (2006); Guzelian et al. (2006); Martin et al. (2010)]. Dass dadurch ein mögliches pharmakokinetisches Interaktionspotential besteht, konnte in dieser Arbeit durch die deutlichen Effekte auf die Hirn- und Serumkonzentrationen von Haloperidol bestätigt werden. Gleichzeitig bestätigte sich dadurch, dass man bei den Effekten auf Hirn- und Serumkonzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon, neben der Induktion von P-gp auch die Induktion von CYP3A4 durch die verwendeten Substanzen berücksichtigen muss. Im Gegensatz zu Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon zeigte sich eine etwa gleiche Reduktion von Haloperidol im Hirngewebe und Serum, so dass das Gehirn/ Serum Verhältnis von Haloperidol nach PCN-Gabe keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigte, während nach Gabe von Dexamethason sowohl eine signifikante Reduktion, als auch eine Erhöhung des Gehirn/ Serum Verhältnisses zu beobachten war (s. Abb. 3.1.2.2 C). Zusammenfassend hat sich damit die Hypothese bekräftigt, dass dem P-gp abhängigen Transport, neben der Beeinflussung der Biotransformation an der Blut-Hirn Schranke, eine zusätzliche Bedeutung bei pharmakokinetischen Interaktionen zukommt.

4.3 Verhaltenspharmakologische Untersuchungen

-Pharmakodynamische Konsequenzen der P-gp Induktion-

4.3.1 RotaRod

Nach Abschluss der pharmakokinetischen Analysen wurden Untersuchungen zu den pharmakodynamischen Effekten einer durch Dexamethason und PCN vermittelten Modulation von P-gp durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe des RotaRod-Systems untersucht, ob die Gabe von Dexamethason oder PCN einen Einfluss auf das motorische Verhalten von Mäusen hatte. Der RotaRod-Test eignet sich gut zur Erfassung von motorischen Nebenwirkungen wie extrapyramidal-motorischen Störungen (EPMS), wie sie durch die dopaminantagonistische Wirkung von Antipsychotika verursacht werden [Correll et al. (2004)]. Mit dieser Methode lassen sich sowohl Antipsychotika der ersten, als auch der zweiten Generation auf Ihre Effekte bezüglich der Motorik bewerten [Kirschbaum et al. (2009)]. Während für die antipsychotische Wirkung wahrscheinlich ein Dopaminantagonismus in mesolimbischen Hirnarealen verantwortlich ist, werden durch eine striatale Dopaminrezeptor-Blockade motorische Nebenwirkungen ausgelöst [Köhler et al. (1979)].

Durch Analyse der Laufleistung auf dem RotaRod konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Dexamethason oder PCN die motorischen Effekte von Antipsychotika reduzieren kann. Nach 11 Tagen Gabe von Dexamethason verbesserte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl unter Risperidon als auch unter Haloperidol die Laufleistung signifikant (s. Abb. 3.2.1.1 B und Abb. 3.2.1.2 B). Dies war nicht auf eine unterschiedliche Lernleistung der Versuchstiere in den verschiedenen Gruppen zurückzuführen. Wie in Abb. 3.2.1.1 A und Abb. 3.2.1.2 A dargestellt, zeigten sich nur an maximal 2 Tagen des 11-tägigen Trainingsverlaufes unter Dexamethason signifikante Unterschiede bei der Trainingsleistung zur Kontrollgruppe. Nach Risperidon-Injektion war kaum eine Verbesserung bei der RotaRod-Leistung zu beobachten. Allerdings konnte nach Haloperidol-Injektion die RotaRod-Leistung im Verlauf der 11 Tage in beiden Gruppen um 100 % verbessert werden (s. Abb. 3.2.1.1 A und Abb. 3.2.1.2 A). Jedoch war diese Entwicklung zwischen Modulator-Gruppe und Kontrolle jeweils vergleichbar. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede aus der Lernleistung resultierten. Dies bestätigte sich ebenfalls bei der Behandlung über 11 Tage mit PCN. Auch hier war ein signifikanter Unterschied der Lernleistung nur an maximal 2 Tagen der 11-tägigen Trainingsphase zu sehen (s. Abb. 3.2.1.1 A und Abb. 3.2.1.2 A). Anders als bei der Dexamethason Gabe, war hier unter Risperidon ein Anstieg der RotaRod-Leistung im Verlauf der Trainingsphase zu beobachten, während unter Haloperidol die Lernleistung relativ konstant blieb. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Anpassung an das RotaRod von dem eingesetzten P-gp Modulator (Dexamethason oder PCN) oder dem verwendeten Antipsychotikum (Risperidon oder Haloperidol)

abhängig war. Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch bei den motorischen Nebenwirkungen zwischen Risperidon- und Haloperidol-Behandlung. Während die Kontrollgruppe nach Haloperidol-Gabe nur eine langsame Verbesserung der motorischen Einschränkungen zeigte, konnte nach Risperidon-Gabe eine raschere Verbesserung der Laufleistung auf dem RotaRod beobachtet werden (s. Abb. 3.2.1.1 B und Abb. 3.2.1.2 B).

Während der Versuche konnte man deutlich sehen, dass neben den motorischen Nebenwirkungen, insbesondere die sedativen Effekte von Risperidon das Verhalten der Mäuse zusätzlich beeinträchtigte. Dieser sedative Effekt verbesserte sich zunehmend mit jedem Zeitpunkt der Testung. Dies ist konsistent mit klinischen Daten, die belegen, dass Antipsychotika der ersten Generation ein höheres Potential für motorische Nebenwirkungen haben als atypische Antipsychotika wie Clozapin oder Risperidon [Casey (1996)]. Andererseits sind diese auch dosisabhängig. Die in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen sind recht hoch und daher sind auch die motorischen Nebenwirkungen deutlich ausgeprägt. Für Haloperidol und Risperidon sind Veränderungen der motorischen Fähigkeiten schon unter geringen Dosen beschrieben [Bardin et al. (2006)]. Beim Menschen treten diese Nebenwirkungen meist erst ab einer Dopaminrezeptor-Blockade von > 80 % auf und das Auftreten steigt mit zunehmendem Alter an [Uchida et al. (2009)].

Durch die Behandlung mit Dexamethason und PCN konnte unter Risperidon eine schnellere Erholung der Tiere von den motorischen Nebenwirkungen erreicht werden (s. Abb. 3.2.1.1 B). Dieser Effekt war jedoch in der Dexamethason-Gruppe stärker ausgeprägt als in der PCN-Gruppe. So konnte durch die P-gp Modulation von Dexamethason und PCN bereits nach 8 h wieder nahezu dieselbe Leistung wie vor der Risperidon-Injektion auf dem RotaRod erreicht werden, während die Kontrollgruppen meist längere Zeit dafür benötigten. Somit konnte ein Zusammenhang zwischen den reduzierten Gehirnkonzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon und den reduzierten motorischen Nebenwirkungen auf dem RotaRod belegt werden. Im Fall von Haloperidol konnte dagegen nach PCN-Gabe über 11 Tage erst nach 8 h bzw. 10 h ein signifikanter Unterschied bei der Laufleistung festgestellt werden. Nach Dexamethason-Gabe war bereits 4 h nach Haloperidol-Injektion und an allen nachfolgenden Zeitpunkten eine signifikante Verbesserung zu erkennen (Abb. 3.2.1.2 B). Dies zeigt, dass Haloperidol stärkere motorische Nebenwirkungen verursacht als Risperidon.

Haloperidol zeigte ein vielfach höheres Gehirn/ Serum-Verhältnis als Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon (s. Abb. 3.1.2.1 C und Abb. 3.1.2.2 C). Somit ist anzunehmen, dass Haloperidol schnell Dopaminrezeptoren besetzt und motorische Nebenwirkungen verursachen kann. Zum anderen erkennt man wiederum, dass die Effekte bei dem P-gp Substrat Risperidon stärker waren als die Effekte bei Haloperidol, welches nicht P-gp abhängig transportiert wird. Es scheint trotz der starken Reduktion der Haloperidol-Konzentration im Gehirn immer noch eine für motorische

Nebenwirkungen ausreichende Konzentration am Dopaminrezeptor vorzuliegen. Die Hirnkonzentrationen von Haloperidol wurden durch Dexamethason stärker reduziert als durch PCN (s. Abb. 3.1.2.2 A). Als Konsequenz konnte auch unter Dexamethason eine stärkere Reduktion der motorischen Nebenwirkungen beobachtet werden (s. Abb. 3.2.1.2 B). Insgesamt zeigt sich auch in diesem Versuch, dass der P-gp abhängige Transport einer Substanz auch Einfluss auf Wirkungen bzw. Nebenwirkungen haben kann. Die Effekte unter Risperidon waren deutlicher als unter Haloperidol. Es bestätigen sich hier auch die Ergebnisse von Kirschbaum et al. (2009), dass das atypische Antipsychotikum Risperidon deutliche motorische Nebenwirkungen verursacht. Im Vergleich mit Amisulprid und Aripiprazol zeigte sich, dass nicht generell ein Vorteil der Atypika im Bereich motorischer Nebenwirkungen besteht [Correll et al. (2004)]. Motorische Nebenwirkungen können auch unter diesen Medikamenten noch häufig beobachtet werden. Man muss jedoch ebenfalls in Betracht ziehen, dass der RotaRod-Test nicht spezifisch für motorische Nebenwirkungen ist. Die Laufleistung ist beispielsweise ebenso von möglichen sedierenden Effekten der verwendeten Medikamente abhängig. Die sedativen Effekte von Benzodiazepinen waren jedoch im RotaRod kaum messbar [Kirschbaum et al. (2009)]. Daher kann angenommen werden, dass sedativen Effekten eher eine untergeordnete Rolle bei den Untersuchungen auf dem RotaRod zukommt und die Effekte auf die motorischen Fähigkeiten vordergründig sind.

Es zeigten sich für Risperidon stärkere sedierende Effekte als für Haloperidol. Dies ist konsistent mit dem Rezeptorprofil der Substanzen und klinischen Daten, die belegen, dass unter Risperidon Therapie vor allem in der Anfangsphase einer Behandlung deutliche sedierende Effekte auftreten können, während Haloperidol wenig sedierende Eigenschaften zeigt [Benkert und Hippus (2007)]. Dies hängt vermutlich mit der hohen Affinität von Risperidon zum Histamin H₁ Rezeptor zusammen, während Haloperidol keine solche Affinität besitzt [Benkert und Hippus (2007)]. Durch eine Sedation kann die Fähigkeit, Balance zu halten ebenso beeinflusst werden, wie durch eine Einschränkung der motorischen Fähigkeiten. Letztlich zeigte eine Verbesserung der Laufleistung auf dem RotaRod eine Abschwächung von sowohl Sedation, als auch von motorischen Effekten an. Somit erwies sich der Ansatz als gut geeignet, um pharmakodynamische Effekte von Antipsychotika zu untersuchen. Es war nachgewiesen worden, dass das RotaRod im Vergleich zu anderen Verhaltenstests weniger sensitiv für sedative Effekte ist [Stanley et al. (2005)].

Daher liegt es nah, anzunehmen, dass die beobachteten Wirkungen der Antipsychotika auf dem RotaRod eher auf dem jeweiligen spezifischen Rezeptorprofil beruhen. Daraus ergeben sich unterschiedliche Wirkungen auf die motorischen Fähigkeiten. Die in der eigenen Arbeit festgestellten Unterschiede der Laufleistung auf dem RotaRod unter Behandlung mit Dexamethason und PCN im Vergleich zu den Kontrollgruppen ist daher ein Indikator für die reduzierte Verfügbarkeit der

verwendeten Antipsychotika an Dopamin- und Serotoninrezeptoren [Kelly et al. (1998)]. Eine Modulation von P-gp kann somit auch mit der pharmakodynamischen Wirksamkeit von Risperidon in Verbindung gebracht werden. Eine Reduktion der Medikamenteneffekte, verursacht durch verringerte Konzentrationen von Antipsychotika, geht vermutlich auch mit einer verringerten antipsychotischen Wirksamkeit einher, die jedoch mit diesem Tiermodell nicht untersucht werden konnte. Insgesamt ließ sich die Hypothese bestätigen, dass eine Induktion von P-gp nicht nur pharmakokinetische, sondern auch pharmakodynamische Effekte verändern kann.

4.3.2 Barnes Maze

Ziel der Behandlung der Schizophrenie ist, neben der Therapie der Positivsymptome wie Wahn und Halluzinationen, auch die Beeinflussung der Negativsymptomatik wie Antriebslosigkeit und kognitive Einschränkungen. Während die Positivsymptomatik sowohl durch typische, als auch durch atypische Antipsychotika verbessert werden kann, scheinen atypische Antipsychotika Vorteile bei der Behandlung der Negativsymptomatik gegenüber Typika zu haben [Correll et al. (2004)]. Aripiprazol, ein Antipsychotikum der dritten Generation mit partieller agonistischer und antagonistischer Wirkung an Dopamin D₂-Rezeptoren und antagonistischer Wirkung an den Serotoninrezeptoren der Subtypen 5-HT_{1A} und 5-HT_{2A} [Green (2004)], wurde entwickelt, um eine stärkere Verbesserung der Negativsymptomatik zu erreichen. Durch eine antagonistische D₂-Aktivität in Hirnarealen mit dopaminergem Hyperaktivität z.B. im limbischen System und agonistischer D₂-Wirkung in Bereichen mit dopaminergem Hypoaktivität wie z.B. dem frontalen Kortex, wurde sowohl eine Beeinflussung von Positiv-/- wie Negativsymptomatik bei wenig motorischen Nebenwirkungen erwartet [Kikuchi et al. (1995); Marder et al. (2003)]. Die Überlegenheit von atypischen Antipsychotika gegenüber Typika bei der Negativsymptomatik, insbesondere der kognitiven Beeinträchtigungen, konnte bislang jedoch nicht überzeugend belegt werden. Man fand bislang nur geringe Unterschiede [Weiss et al. (2002); Woodward et al. (2005)]. Lediglich eine klinische Studie konnte durch die Kombination von bildgebenden Verfahren und neuropsychologischer Testung zeigen, dass ein Wechsel von Typika auf Aripiprazol mit einer Verbesserung der kognitiven Leistung verbunden ist [Schlangenhaut et al. (2010)]. Da eine Einschränkung der kognitiven Fähigkeiten für die Patienten sehr belastend ist und dadurch auch die Alltagskompetenz verringert wird, ist die Beeinflussung kognitiver Defizite von großer therapeutischer Bedeutung [Green et al. (1996)].

In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Antipsychotika selbst die Kognition beeinflussen können und somit einen Effekt auf die Negativsymptomatik haben können. Dafür wurde wiederum das atypische Antipsychotikum Risperidon und das Typikum Haloperidol im Vergleich zu Placebo

untersucht. In einer klinischen Studie konnte unter Verwendung von bildgebenden Verfahren ein Unterschied im Arbeitsgedächtnis von Schizophrenie-Patienten beim Wechsel von Haloperidol zu Risperidon beobachtet werden [Honey et al. (1999)]. In dem Mausmodell, das in dieser Arbeit verwendet wurde, konnte kein signifikanter Unterschied beim Lernverhalten der Versuchstiere zwischen Risperidon und Placebo festgestellt werden (s. Abb. 3.2.2.1 A). Weder bei der Fehleranzahl oder der gelaufenen Strecke, noch bei der Latenz bis zum Auffinden der Fluchtbox zeigten sich Unterschiede zur Placebo-Gruppe. Bei der Behandlung mit Haloperidol zeigten sich dagegen während der Lernphase an Tag 2, Tag 3 und Tag 4 eine signifikant längere Latenz bis zum Auffinden der Fluchtbox (s. Abb. 3.2.2.1 A). Dieser Unterschied wurde noch einmal deutlicher beim direkten Vergleich zwischen Risperidon und Haloperidol (s. 3.2.2.1 B). Man konnte dort zusätzlich auch an Tag 5 einen deutlichen Unterschied zwischen beiden Gruppen messen, an dem keine Behandlung mit dem Antipsychotikum mehr erfolgte. Der Tag 5 diente als Kontrolle des Lerngedächtnisses der Versuchstiere. Damit sollte gezeigt werden, ob die Antipsychotika-Behandlung nicht nur das Lernen, sondern auch das Gedächtnis beeinflusst. Es wurde wahrscheinlich gemacht, dass sich Haloperidol vermutlich stärker auf Lernprozesse und das Gedächtnis auswirkt als Risperidon.

Die Effekte waren insgesamt gering ausgeprägt und bedürfen noch weiterer Kontrollen. Man konnte bei Haloperidol eine Tendenz zur Beeinträchtigung des Lernverhaltens erkennen, gezeigt durch eine gleichbleibende bzw. erhöhte Latenz bis zum Auffinden der Fluchtbox zwischen Tag 1 und Tag 4 (s. Abb. 3.2.2.1 D). Im Gegensatz dazu zeigte sich unter Risperidon und Placebo eine stetige Abnahme der Latenz, die den Schluss nahe legt, dass die Mäuse schneller lernten, wo sich die Fluchtbox befindet (s. Abb. 3.2.2.1 D). Unter Haloperidol und Risperidon zeigte sich jedoch an Tag 5 eine deutliche Reduktion der Latenz (s. Abb. 3.2.2.1 B). Da an diesem Tag keine Antipsychotika-Behandlung mehr erfolgte, ist dies ein Anzeichen für anhaltende kognitive Beeinträchtigungen unter akuter Risperidon- und Haloperidol-Behandlung. Es bestätigte sich in den Barnes Maze-Versuchen, dass trotz einer geringen Dosis von 0,1 mg/kg Risperidon und 0,2 mg/kg Haloperidol die Lernfähigkeit von Mäusen beeinträchtigt werden kann, was auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt worden war [Browman et al. (2008); Rinaldi et al. (2007)].

Im Gegensatz zu den Untersuchungen auf dem RotaRod könnten bei der Barnes Maze auch sedierende Effekte einen relevanten Effekt gehabt haben. Während beim RotaRod beispielsweise erst hohe Dosen von Diazepam einen Einfluss auf die Laufleistung zeigen, konnte für andere Verhaltensuntersuchungen wie z.B. open field schon ein Einfluss einer Sedierung bei geringen Dosen beobachtet werden [Stanley et al. (2005); Kralic et al. (2002)]. Dies konnte auch bei den eigenen Untersuchungen festgestellt werden. Durch die Injektion der Antipsychotika wurde die Motivation der Mäuse nach der Fluchtbox zu suchen deutlich reduziert. Bei den verwendeten Dosierungen

blieben manche Versuchstiere bewegungslos in der Mitte der Maze sitzen. Insbesondere beim Vergleich von Haloperidol und Placebo zeigte sich eine deutliche Verlängerung der Latenz bis zum Auffinden der Fluchtbox von Tag 1 bis Tag 4 (Abb. 3.2.2.1 A). Da dieser Effekt bei Haloperidol nicht auf eine Sedierung zurückzuführen ist, könnten möglicherweise auch wiederum motorische Beeinträchtigungen durch dopaminantagonistische Wirkungen dafür verantwortlich gewesen sein. Dass eine Zunahme der Laufgeschwindigkeit in der Maus für die Abnahme von Fehlerhäufigkeit und Latenz verantwortlich ist, konnte ausgeschlossen werden, da diese über die 4 Tage der Lernphase relativ konstant blieb und sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Haloperidol, Risperidon und Placebo zeigten (s. Abb. 3.2.2.1 C). Dabei konnte man insbesondere erkennen, dass an Tag 5 die Laufgeschwindigkeit bei Risperidon und besonders deutlich bei Haloperidol anstieg, während sich in der Placebo-Gruppe keine Veränderung zeigte (s. Abb. 3.2.2.1 C). Dies macht erneut deutlich, dass möglicherweise eine Beeinträchtigung motorischer Fähigkeiten die Ergebnisse in der Barnes Maze beeinflusst hat.

Im zweiten Teil der Untersuchungen in der Barnes Maze wurde ein möglicher Effekt der P-gp Induktoren Dexamethason und PCN auf das Lernverhalten unter Behandlung mit Risperidon oder Haloperidol analysiert. Während man nach Dexamethason-Injektion über 11 Tage unter Risperidon-Behandlung eine Zunahme der Latenz bis zum Auffinden der Fluchtbox fand, zeigte sich nach PCN Behandlung eine Abnahme der Latenz zwischen Tag 1 und Tag 4 (s. Abb. 3.2.2.2 A). Unter Haloperidol-Behandlung konnte weder in der Dexamethason-Gruppe, noch in der PCN-Gruppe eine deutliche Veränderung der Latenz zwischen Tag 1 und Tag 4 beobachtet werden (s. Abb. 3.2.2.3 A). Da in beiden Fällen auch hier nicht die Laufgeschwindigkeit für die beobachteten Effekte verantwortlich sein konnten, die über die Lernphase konstant blieben (s. Abb. 3.2.2.2 B und Abb. 3.2.2.3 B), müssen andere Gründe für diese Ergebnisse vorliegen.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass das Lernverhalten unter Stress verändert ist. Dawood et al. (2004) berichteten, dass verschiedene Arten von Stress zu einer Verschlechterung der Lernleistung bei Mäusen führt. Dexamethason als Glukokortikoid könnte nach dieser Theorie somit möglicherweise durch einen Effekt an der Regulation der endogenen Stressantwort, reguliert durch Hypophyse, Hypothalamus und der Nebennierenrinde, zu ähnlichen Effekten führen. Eine Verschlechterung des Lernverhaltens unter Dexamethason konnte in Mäusen bereits gezeigt werden, wobei auch eine Abhängigkeit vom Alter der Mäuse diskutiert wurde [Yao et al. (2007)]. In dieser Arbeit wurde jedoch nicht die Barnes Maze verwendet. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen unterstützt, die eine Beteiligung von Glukokortikoiden an der Progression der Alzheimer Krankheit und den damit verbundenen kognitiven Defiziten diskutieren [Green et al. (2006)]. Eine chronische Gabe von Dexamethason über 10 Tage führte in einer anderen Studie ebenfalls zu einer signifikanten

Verschlechterung der Lernleistung, vermutlich durch neurotoxische Effekte [Danilczuk et al. (2005)]. Aber auch hier wurde nicht die Barnes Maze verwendet. Dass Dexamethason möglicherweise selbst die Lernfähigkeit beeinträchtigt, bestätigte sich ebenso unter der Behandlung mit Haloperidol, wobei hier der Effekt weniger stark ausgeprägt war als unter Risperidon-Behandlung (s. Abb. 3.2.2.2 A und Abb. 3.2.2.3 A). Untersuchungen nur unter Behandlung von Dexamethason und PCN ohne Antipsychotikum wurden allerdings nicht durchgeführt. Die Befunde machen deutlich, dass bei Verwendung mehrerer Substanzen gleichzeitig eine aussagekräftige Analyse für die Wirkungsweise einer Einzelsubstanz manchmal nicht möglich ist. Die Effekte der P-gp Modulatoren können möglicherweise die ohnehin geringen Effekte der niedrig dosierten Antipsychotika zusätzlich verändern.

Insgesamt waren die in der Barnes Maze gemessenen Verhaltenseffekte sehr klein. Da dieser Verhaltenstest neu etabliert worden ist, müssen weitere Untersuchungen angestellt werden, um die Verwendung der Barnes Maze zur Beurteilung von Antipsychotikaeffekten zu erweitern. Dazu ist es unerlässlich, auch andere Mausstämme in der Barnes Maze zu testen. Die in dieser Arbeit untersuchten FVB/N Mäuse waren Albinos. Man weiß, dass Mäuse vom FVB/N Stamm einen Retina-Defekt haben, der die visuelle Fähigkeit beeinträchtigt [Errijgers et al. (2007)]. Da in der Barnes Maze die Orientierung der Mäuse die Wahrnehmung optischer Hinweise erforderte, muss angenommen werden, dass ein visueller Defekt das Lernen beeinträchtigt. Durch die eingeschränkte Sehfähigkeit ist es für die Mäuse schwieriger sich in der Maze zu orientieren und sich an die genaue Lokalisation der Fluchtbox zu erinnern. Daher wären für weitere Untersuchungen farbige Mäuse, z.B. des Black 6 (B6) Stammes, zu bevorzugen, um festzustellen, ob Effekte von Antipsychotika auf das Lernverhalten in diesem Stamm ausgeprägter sind als die hier berichteten. Somit kann man noch nicht abschließend sagen, ob die Barnes Maze geeignet ist, um Effekte von Antipsychotika auf das Lernverhalten zu untersuchen. Auch der Einfluss von P-gp auf das Lernen bleibt daher leider unklar.

4.4 Validierung der HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin in biologischen Proben

Die Etablierung und Validierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Acitretin war für die *in vivo* Untersuchungen zur Verteilung und Hirngängigkeit von Acitretin notwendig. Eine bereits publizierte Methode von Decker und Zimmermann (1995) konnte erfolgreich an die Laborroutine angepasst werden, nachdem die Methode alle Kriterien der von der Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie empfohlenen Validierungssoftware Valistat (Version 1.0) erfüllte (s. 3.3.1). Im Gegensatz zu Decker und Zimmermann (1995) wurde vor der HPLC-Analyse der Proben keine Flüssig-

Flüssig-Extraktion durchgeführt. Zur Entfernung von störenden Plasmabestandteilen wurde eine online-Festphasenextraktion mit einer speziellen Vorsäule/ Extraktionssäule verwendet. Wie die Chromatogramme zeigten (s. Abb. 3.3.1 A), war dies ausreichend, um eine störungsfreie Analyse zu gewährleisten. Die Ergebnisse zur Wiederfindung haben darüber hinaus gezeigt, dass die Verwendung einer Vorsäule zur Konzentrierung der Probe und zur Abtrennung von störenden Plasmabestandteilen eine geeignete Methode darstellt, um aufwendige Extraktionsverfahren zu umgehen. Während der HPLC-Analysen traten keine Interferenzen mit anderen Bestandteilen der verschiedenen Proben auf. In dieser Arbeit lag der Validierungsbereich deutlich unter dem in der Arbeit von Decker und Zimmermann (1995) vorgestellten Bereich. Dies war notwendig für die Anwendung der Methode. Es konnte gezeigt werden, dass die Nachweisgrenze von Acitretin bei 4 ng/ml liegt und eine Bestimmung in den Bereichen von 5- 50 ng/ml und 50-500 ng/ml linear war. Somit war die HPLC-Methode über einen in der klinische Anwendung ausreichenden Bereich validiert, da bei einer Behandlung mit 50 mg/d Acitretin ein Plasmaspiegel im Fließgleichgewicht von etwa 22 ng/ml zu erwarten ist [Fachinformation Neotigason].

4.5 Untersuchungen zur Hirngängigkeit von Acitretin

Für die Analyse von Acitretin in der Maus lagen bislang keine Daten vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Hirngängigkeit von Acitretin näher untersucht werden. Der Vergleich von WT und P-gp doppel knockout Mäusen sollte darüber hinaus klären, ob ein P-gp abhängiger Transport die Verteilung von Acitretin beeinflussen kann. Acitretin konnte nach einer i.p Injektion von 5 mg/kg bei beiden Genotypen in einer hohen Konzentration im Hirngewebe im Vergleich zur Konzentration im Serum nachgewiesen werden (s. Abb. 3.3.2 A). Die Konzentration von Acitretin zeigte sowohl bei den Konzentrationen im Gehirn, als auch bei den Konzentrationen im Serum einen deutlichen Abfall über den beobachteten Zeitraum von 6 h nach Acitretin-Injektion (s. Abb. 3.3.2 A und Abb. 3.3.2 B), was für eine rasche Elimination spricht. Wie bereits in einer pharmakokinetischen Studie an Ratten gezeigt, findet nach einem schnellen initialen Konzentrationsanstieg der Substanz in verschiedenen Geweben eine starke Umverteilung von Acitretin vor allen ins Fettgewebe statt [Eisenhardt und Bickel (1994)]. In dieser Arbeit wurde eine 2,2-fach höhere Konzentration im Hirngewebe im Vergleich zum Plasma ermittelt. Dies stimmt mit den hier vorgestellten Ergebnissen überein, die ebenfalls höhere Konzentrationen im Gehirn verglichen mit dem Serum zeigen konnten. Andere Gewebe als Hirn oder Blut wurden nicht analysiert, da bei der Verwendung von Acitretin als neuer Ansatz zur Therapie der Alzheimer Krankheit in erster Linie die Konzentration von Acitretin im Hirngewebe interessant erschien. Die Halbwertszeit von Acitretin im Menschen ist mit 50- 60 h relativ lang [Fachinformation Neotigason]. Daten zur Halbwertszeit in der Maus liegen jedoch nicht

vor, während die Eliminationshalbwertszeit in der Ratte mit etwa 70 min angegeben wird [Eisenhardt und Bickel (1994)]. Der Vergleich der beiden P-gp Genotypen im Mausmodell konnte darüber hinaus zeigen, dass Acitretin vermutlich kein Substrat von P-gp ist. Im Hirngewebe konnte 1 h nach Acitretin-Injektion eine signifikante Erhöhung der Acitretin-Konzentration bei P-gp doppel knockout Mäusen im Vergleich zum WT festgestellt werden, während nach 6 h die Konzentration signifikant erniedrigt war (s. Abb. 3.3.2 A). Im Serum war die Acitretin-Konzentration bei den P-gp doppel knockout Mäusen 6 h nach Injektion signifikant erniedrigt (s. Abb. 3.3.2 B). Insgesamt betrachtet spricht dies für eine mögliche Beteiligung von P-gp bei hohen Acitretin-Konzentrationen. Bei der Berechnung der Mittelwerte des Gehirn/ Serum Verhältnisses über alle beobachteten Zeitpunkte zeigte sich jedoch, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen gab (s. Abb. 3.3.2 D). Die Zunahme des Gehirn/ Serum Verhältnisses über den beobachteten Zeitraum könnte ein Hinweis für eine Akkumulation von Acitretin bei chronischer Gabe sein. Nach einer Definition von Doran et al. (2005) scheint ein Unterschied des Gehirn/ Serum Verhältnisses zwischen den Genotypen erst ab einem Faktor von 2-3 klinisch relevant zu sein. Dieser Annahme folgend kann aus den hier vorgestellten Ergebnissen geschlossen werden, dass die minimalen Unterschiede zwischen den Genotypen nicht bedeutsam für die Verteilung und Wirkung von Acitretin sind. Der Einfluss von P-gp auf die Verteilung von Acitretin scheint marginal zu sein. Dies ist konsistent mit den *in silico* Untersuchungen von Chang et al. (2006). Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass für Acitretin im Gegensatz zu dem bekannten P-gp Substrat Digoxin ein deutlich geringerer P-gp abhängiger Efflux in Maddin-Darby canine kidney (MDCK) Zellkultur messbar war. Somit scheint die Expression von P-gp für die Verteilung von Acitretin eine untergeordnete Rolle zu spielen. Weitere Untersuchungen sollten folgen, die die Beobachtung der Verteilung von Acitretin über einen längeren Beobachtungszeitraum beinhalten und ggf. die Verteilung in weiteren Geweben analysieren. Da in dieser Arbeit nur eine akute Injektion mit Acitretin untersucht wurde, sollten Daten zur chronischen Applikation über mehrere Tage erhoben werden.

4.6 Biochemische Untersuchungen

Mit Hilfe der Western Blot Technik wurde auf molekularer Ebene der Einfluss von Dexamethason und PCN auf die P-gp Expression untersucht. Diese Untersuchungen sollten herausfinden, ob die eingesetzten P-gp Induktoren zu einer Zunahme der P-gp Expression im Hirngewebe führen. Die Untersuchungen wurden an die von Kirschbaum et al. (2010) vorgestellte Vorgehensweise zur Darstellung möglicher P-gp modulierender Effekte einer Aripiprazol Behandlung angepasst. Die eigenen Ergebnisse belegten, dass eine Gabe von Dexamethason bzw. PCN über 11 Tage zu einer sichtbaren Zunahme der P-gp Expression im Hirngewebe führt (Abb. 3.4.1 A). Wie bereits von Bauer

et al. (2005) dargestellt, induzieren Dexamethason oder PCN die Expression von P-gp in isolierten Rattenhirnkapillaren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Analysen jedoch mit einem Gesamthirnhomogenat durchgeführt. Eine Isolierung von Hirnendothelzellen bzw. Hirnkapillaren erfolgte nicht. Da P-gp hauptsächlich in der apikalen Membran der Hirnepithelzellen exprimiert wird [Breedveld et al. (2006)], kommt es somit zu einem starken Verdünnungseffekt. Möglicherweise ist dies der Grund, warum die Grauwertanalyse keinen signifikanten Unterschied bei der P-gp Expression gezeigt hat (3.4.1 B). Man sieht sowohl bei Dexamethason-Gabe, als auch bei der PCN-Behandlung im Gegensatz zur Kontrollgruppe einen Trend zu einer höheren P-gp Expression, der jedoch nicht signifikant unterschiedlich war. Die Analyse der P-gp Expression konnte nur durch die verwendete hochauflösende CD-Kamera ermöglicht werden und bedurfte einer langen Belichtungszeit. Dies macht deutlich, dass das Signal der P-gp Detektion relativ schwach war, obwohl sogar jeweils 60 µg Protein pro Spur bei einem kleinen Gel aufgetragen wurden. Bei der verwendeten Gelgröße reichten bei anderen Analysen i.d.R. 30 µg Protein/ Bahn. Durch die hohe Proteinmenge sind daher auch die detektierten Banden nicht so deutlich abgegrenzt. Dies ist ein Hinweis, dass vermutlich für eine genaue Quantifizierung die Isolation von Hirnkapillaren die bessere Alternative ist.

Nicht auszuschließen ist eine mögliche Degradation von P-gp durch die lange Lagerungszeit der Proben. Obwohl den Proben ein Protease-Inhibitor zugesetzt worden war, kann eine Degradation nicht völlig ausgeschlossen werden. Dadurch, dass die Probenaufbereitung auf Grund fehlender Ausstattung z.T. extern stattfand, lagen zwischen Probengenerierung und Analyse der Proben etwa 6 Monate. Im Labor war bislang noch keine etablierte Methode zur Western Blot Bestimmung von P-gp etabliert. Trotz Lagerung bei -80°C könnte die P-gp Menge durch das notwendige mehrmalige Auftauen und Einfrieren reduziert worden sein. Dies war jedoch für die Aufbereitung, Zentrifugation und die Proteinbestimmung der Proben erforderlich. Die hier vorgestellten Ergebnisse waren die ersten Untersuchungen auf Proteinebene in unserem Labor mit der vorgestellten Methode. Weitere Analysen müssen folgen, um diese Methode zu optimieren. Die Etablierung der Methode hat sehr viel Zeit in Anspruch genommen, da verschiedene getestete P-gp Antikörper nicht ausreichend sensitiv waren. Vermutlich lag dies z.T. ebenso an der geringen P-gp Menge und macht deutlich, dass eine Analyse aus dem Gesamthirnextrakt keine optimale Wahl darstellt. Der Einsatz des P-gp Primärantikörpers musste mit der vom Hersteller angegebenen niedrigsten Verdünnung von 1:200 erfolgen, um P-gp detektieren zu können. Auf der anderen Seite muss man jedoch sagen, dass der in dieser Arbeit verwendete P-gp Antikörper den Unterschied zwischen P-gp knockout und Wildtyp zeigen konnte (s. Abb. 3.4.1 A). Somit konnte zumindest eine ausreichende Spezifität dieses Antikörpers nachgewiesen werden.

Neben der P-gp Expression wurde noch die ADAM10 Expression in Thrombozyten und Hirngewebe, sowie die APP α Sekretion im Gehirn von P-gp Wildtyp und P-gp Knockout Mäusen mit der Western Blot Technik untersucht. Diese Arbeiten waren als präklinische Vorarbeiten zu einer klinischen Studie zum therapeutischen Nutzen von Acitretin gedacht, als neuer Ansatz für die Behandlung der Alzheimer Krankheit. Die Bestimmung der Hirngängigkeit von Acitretin mit Hilfe von *in vivo* Untersuchungen, sollte Hinweise liefern, dass eine systemische Behandlung mit Acitretin zu einer Zunahme der ADAM10 Expression führt und mit einer verstärkten APP α Sekretion einhergeht. Dadurch sollte die Zunahme des nicht-amyloidogenen Abbaus von APP nachgewiesen werden. Nach 4 Tagen i.p. Injektion mit 5 mg/kg/d Acitretin konnte jedoch keine Zunahme der ADAM10 Expression in den Thrombozyten von WT und P-gp doppel knockout Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet werden (s. 3.4.2 A). Die Quantifizierung der P-gp Expression bestätigte dies (s. 3.4.2 B). Auch die Bestimmung der ADAM10 Expression im Hirngewebe zeigte keinen signifikanten Einfluss einer Acitretin-Gabe auf die ADAM10 Expression, weder der reifen noch der unreifen Form (s. Abb. 3.4.2 C-F).

Die Aufbereitung der Proben erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Colciaghi et al. (2002). Diese Aufbereitung ist jedoch für humane Proben entwickelt worden. Das geringe Blutvolumen, das bei der Dekapitierung der Versuchstiere gewonnen werden konnte, machte die Aufbereitung sehr schwierig. Daher ist nicht auszuschließen, dass durch die verschiedenen Waschvorgänge mit einem Verlust von Proteinen zu rechnen ist. Wie von Tippmann et al. (2009) gezeigt, führte eine stereotaktische Acitretin-Injektion in den Hippocampus zu einer Zunahme der APP α Sekretion und einer Abnahme der A β ₄₀-/ und A β ₄₂-Menge im Mäusehirn. In der hier vorgestellten Arbeit wurde jedoch die systemische Applikation von Acitretin untersucht. Es ist interessant, dass weder beim P-gp WT, noch beim P-gp doppel knockout Genotyp ein signifikanter Unterschied bei der ADAM10 Expression zu beobachten war. Die Untersuchungen zur Hirngängigkeit konnte bereits belegen, dass Acitretin vermutlich nicht P-gp abhängig transportiert wird. Somit sind pharmakokinetische Interaktionen unwahrscheinlich, die die Verteilung und Hirnpenetration von Acitretin beeinflussen könnten. Selbst wenn Acitretin eine Affinität zu P-gp gezeigt hätte, würde man mit höheren Acitretin-Konzentrationen beim P-gp knockout rechnen und somit müsste auch dort der Effekt auf die ADAM10 Expression größer sein. Dies war jedoch nicht der Fall.

Man muss jedoch bedenken, dass der Stichprobenumfang mit n= 4-5 Proben gering war. Der Versuch sollte daher mit einem größeren Stichprobenumfang noch einmal wiederholt werden. Insbesondere die Größe der Standardfehler zeigt an, dass eine deutliche Varianz der einzelnen Messwerte vorliegt (s. 3.4.2 B). Am aussagekräftigsten ist vermutlich auch die ADAM10 Expression direkt im Hirngewebe. Die Expression in Thrombozyten ist zwar für die klinische Anwendung am besten geeignet, für die

präklinischen Untersuchungen in Mäusen ist jedoch eine Untersuchung im Hirngewebe interessanter. Mit einem größeren Stichprobenumfang könnte man die Untersuchungen noch einmal wiederholen, um die Ergebnisse der ADAM10 Expression in Thrombozyten und Hirngewebe zu vergleichen. Dies ist notwendig, um Unterschiede zwischen der Expression in peripheren Geweben und des ZNS erkennen zu können. Dabei ist jedoch zu beachten, dass es Unterschiede bei den gewebespezifischen Effekten von Acitretin und der all-trans Retinsäure (atRA) gibt [Tippmann et al. (2009)].

Die Bestimmung der APPs α Sekretion im Hirngewebe von P-gp WT und KO Mäusen wurde ergänzend zur Bestimmung der ADAM10 Expression durchgeführt. Die Ergebnisse konnten jedoch nicht belegen, dass durch eine Acitretin-Gabe die APPs α Sekretion signifikant zunimmt. Die Injektion von Acitretin über 4 Tage in einer Dosis von 5 mg/kg/d führte im Mäusehirn zu keinem sichtbaren Unterschied der APPs α Sekretion zwischen P-gp WT bzw. P-gp KO Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen (s. Abb. 3.4.3 A). Die Grauwertanalyse zur Quantifizierung der Proben ergab keinen signifikanten Unterschied (s. 3.4.3 B). Wie bei der Bestimmung der ADAM10 Expression war auch hier der Stichprobenumfang relativ klein. Es wurden nur 5 Tiere pro Gruppe untersucht. Dies reicht jedoch als Erklärung nicht aus, wenn man bedenkt, dass die gemessenen Hirnkonzentrationen von Acitretin recht hoch waren (s. 3.3.2 A). Dies sind jedoch Daten einer akuten Injektion mit 5 mg/mg Acitretin. Es liegen keine Daten zur Verteilung von Acitretin im Hirngewebe bei chronischer Injektion über 4 Tage vor. Wie aus den Daten zur Verteilung von Acitretin hervorgeht, zeigte sich bei einem Beobachtungszeitraum über 6 h nach einer akuten Injektion mit Acitretin ein recht schnelles Absinken der Konzentrationen in Hirngewebe und Serum (s. Abb. 3.3.2 A und Abb. 3.3.2 B). Zum einem könnte dies mit einer Umverteilung erklärt werden, zum anderen könnte jedoch auch in der Maus eine andere Pharmakokinetik als beim Menschen vorliegen. Möglicherweise ist die Halbwertszeit von Acitretin hier viel kürzer. Dazu fehlen Daten, die in einem stabilen Fließgleichgewicht in der Maus erhoben werden müssten. Nur so kann geklärt werden, ob über längere Zeit ausreichende Konzentrationen von Acitretin im Gehirn vorliegen. Die Verwendung eines transgenen Alzheimer Mausmodells könnte darüber hinaus in weiteren Untersuchungen sinnvoll sein, beispielsweise durch eine Überexpression von APP evtl. in Verbindung mit einer Modifikation der ADAM10 Aktivität, wie von Postina et al. (2004) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass ein ADAM10 Defekt zu einer verstärkten Ablagerung von Amyloid-Plaques führt und durch eine ADAM10 Überexpression eine deutliche Reduktion von Plaques erreicht werden kann. Die in meiner Arbeit verwendeten Mäuse stellen somit kein optimales Modell zur Untersuchung der molekularen Effekte von Acitretin dar. Die Unterschiede in der Sekretion von APPs α bzw. der ADAM10 Expression könnten mit einem Alzheimer Mausmodell aussagekräftiger sein.

Es ist auch nicht auszuschließen, dass der Behandlungszeitraum von 4 Tagen für einen deutlichen Effekt noch zu kurz war. Durch die systemische Injektion von Acitretin ist mit geringeren Konzentrationen von Acitretin im Hirngewebe im Vergleich zur stereotaktischen Injektion zu rechnen. So sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu belegen, ob es einen zeitabhängigen Effekt der Acitretin-Behandlung gibt. Neue Ansätze in der Behandlung der Alzheimer Krankheit sind dringend notwendig, da eine kausale Therapie bislang nicht möglich ist. Eine klinische Studie mit einem γ -Sekretase Hemmstoff zur Inhibition des amyloidogenen Abbaus von APP, konnte keinen klinisch relevanten Einfluss der 18-monatigen Behandlung gegenüber Placebo feststellen [Green et al. (2009)]. Diese Ergebnisse zeigen, dass es notwendig weiter nach besseren Behandlungsstrategien der Demenz zu suchen. Klinische Daten müssen zeigen, ob eine Aktivierung der ADAM10 Expression ein möglicher neuer Ansatzpunkt sein kann kognitive Defizite zu verbessern.

4.7 Zusammenfassung

P-Glykoprotein (P-gp) ist ein ATP-verbrauchender Transporter, der in Organschranken exprimiert wird, um Fremdstoffe auszuschleusen, darunter auch Psychopharmaka. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Tiermodell der Maus untersucht, welche pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Konsequenzen sich bei Verabreichung von Risperidon als P-gp Modellsubstrat ergeben, wenn die Expression von P-gp induziert wird. Als potenzielle Induktoren wurden Dexamethason, Rifampicin, Quercetin, 5-Pregnen-3 β -ol-20-on-16 α -Carbonitril (PCN) und Acitretin geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass alle Substanzen die Verteilung von Risperidon und seinem aktiven Metaboliten 9-Hydroxyrisperidon beeinflussten. Während sich für Quercetin und Acitretin leichte P-gp inhibitorische Eigenschaften ergaben, die an Hand von erhöhten Konzentrationen von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon gezeigt werden konnten, führten die bekannten P-gp Induktoren Rifampicin, Dexamethason und PCN zu verringerten Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch Western Blot Untersuchungen wurde bestätigt, dass die Induktoren die P-gp Expression im Hirngewebe tendenziell steigerten. Dies sprach dafür, dass bei Verabreichung einer Komedikation, die P-gp induziert, mit einer veränderten Verteilung von P-gp Substraten zu rechnen ist. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass durch eine Hemmung bzw. Induktion von P-gp nicht nur die Pharmakokinetik, sondern auch die Pharmakodynamik von Risperidon und 9-Hydroxyrisperidon verändert wird. Dies wurde durch verhaltenspharmakologische Untersuchungen gezeigt. Durch Risperidon induzierte motorische Effekte auf dem RotaRod waren nach Induktion von P-gp abgeschwächt. Dies zeigte sich auch für Haloperidol, welches kein Substrat ist. Da P-gp abhängige Effekte in diesem Fall keine bedeutende Rolle spielen, ist davon auszugehen, dass neben der Induktion von P-gp an der Blut-Hirn Schranke auch andere Mechanismen wie z.B. eine Induktion von Enzymen der CYP-Familie an den beobachteten Effekten beteiligt sind. Bei Untersuchungen von kognitiven Leistungen in der Barnes Maze konnte gezeigt werden, dass Haloperidol im Gegensatz zu Risperidon das Lernverhalten negativ beeinflussen kann. Eine P-gp Induktion schien jedoch keinen deutlichen Einfluss auf das Lernverhalten unter Antipsychotika-Gabe zu haben und sprach vielmehr für substanzabhängige Effekte der einzelnen Antipsychotika bzw. P-gp Modulatoren. Zusatzuntersuchungen zur Hirngängigkeit von Acitretin, einem synthetischen Retinoid, welches derzeit als potenzielles Antidementivum geprüft wird, konnten belegen, dass es die Blut-Hirn Schranke überwindet. Bereits 1h nach Injektion war Acitretin in hoher Konzentration im Gehirn nachweisbar. Durch die Analyse zur Verteilung von Acitretin in Hirngewebe und Serum von P-gp Wildtyp und P-gp doppel knockout Mäusen konnte belegt werden, dass Acitretin nicht P-gp abhängig transportiert wird. Die Daten insgesamt betrachtet, lassen den Schluss zu, dass durch Verabreichung von Medikamenten, die P-gp Modulatoren sind, bei Antipsychotika mit pharmakokinetischen Interaktionen zu rechnen ist, welche die Wirksamkeit der Medikamente einschränken können.

4.8 Summary

P-Glycoprotein (P-gp) is an ATP-dependent transporter expressed in different blood-tissue barriers. Its major physiological function is the efflux of toxic endogenous and xenobiotic substances, including psychoactive drugs. In this study the pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences of different P-gp modulators [acitretin, dexamethasone, rifampicin, quercetin and 5-pregnene-3 β -ol-20-one-16 α -carbonitrile (PCN)] for the P-gp model substrates risperidone and its active metabolite 9-hydroxyrisperidone have been tested in an *in vivo* mouse model. It could be demonstrated that all used substances affected the distribution of risperidone and 9-hydroxyrisperidone. While quercetin and acitretin showed moderate inhibitory effects on P-gp activity, demonstrated by elevated risperidone and 9-hydroxyrisperidone concentrations in brain and serum, the application of the known P-gp inducers rifampicin, dexamethasone and PCN led to significantly decreased concentrations of risperidone and 9-hydroxyrisperidone. Western Blot analyses confirmed that the injection of P-gp inducers increased P-gp expression levels in brain tissue by trend. Thus, it could be demonstrated that a co-application of P-gp modulators have an impact on the distribution of P-gp substrates. Furthermore the data of behavioural testings gave evidence that the inhibition or induction of P-gp could not only have an impact on the pharmacokinetics, but could also have pharmacodynamic consequences in case of risperidone and 9-hydroxyrisperidone. Risperidone-induced motor side effects were less pronounced after P-gp induction. By comparing these results with those of haloperidol, which shows no P-gp dependent transport activity, we were able to give evidence that other effects of the used P-gp modulators should also be considered, like induction of CYP enzymes. Investigations with the Barnes Maze were included in this study for cognitive testing. In contrast to risperidone, haloperidol adversely affected spatial memory. However, an induction of P-gp had no clear impact on learning and memory during the testing interval of 5 days. Effects of the antipsychotics could not be clearly distinguished from effects caused by the P-gp modulators themselves. Additionally, the analysis of the distribution of acitretin, a synthetic retinoid, which currently is tested as a new approach to treat dementia, showed that it is able to cross the blood-brain barrier. By comparing brain and serum distribution of acitretin in P-gp wildtype and P-gp double knockout mice, we could demonstrate that acitretin did not show a P-gp dependent transport activity. Unfortunately, acitretin treatment had no *in vivo* effect on APP cleavage in the brain, shown by Western Blot analyses of ADAM10 expression and APP α secretion. In conclusion, this study underlines the important role of drug-drug interactions in pharmacological treatment of psychiatric diseases. P-gp can influence pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychoactive drugs and the modulation of P-gp is able to reduce the therapeutic effect of antipsychotics.

Anhang

I Verzeichnis der verwendeten Literatur

Abou El-Ela A, Haertter S, Schmitt U et al. (2004) Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds- Implications for pharmacokinetics of selected substrates. *J Pharmacy and Pharmacol* 56: 1-9.

Abutkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE et al. (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22: 7468-7485.

Alvarez AI, Real R, Pérez M et al. (2009) Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *J Pharm Sci* 99: 598-617.

Armstrong JL, Ruiz M, Boddy AV et al. (2005) Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br J Cancer* 92: 696-704.

Bandyopadhyay S, Hartley DM, Cahill CM et al. (2006) Interleukin-1 α stimulates non-amyloidogenic pathway by α -secretase (ADAM-10 and ADAM-17) cleavage of APP in human astrocytic cells involving p38 MAP kinase. *J Neurosci Res* 84: 106-118.

Bardin L, Kleven MS, Barret-Grevoz C et al. (2006). Antipsychotic-like vs. cataleptogenic actions in mice of novel antipsychotics having D₂ antagonist and 5-HT_{1A} agonist properties. *Neuropsychopharmacol* 31: 1869–1879.

Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93: 74-104.

Bartels AL, Kortekaas R, Bart J et al. (2009) Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: a possible role in progressive neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 30: 1818-1824.

Bauer B, Hartz AMS, Fricker G et al. (2004) Pregnane X Receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* 66: 413-419.

Bauer B, Hartz AMS, Fricker G et al. (2005) Modulation of P-glycoprotein transport at the blood-brain barrier. *Exp Biol Med* 230: 118-127.

Bebawy M und Chetty M (2008) Differential pharmacological regulation of drug efflux and pharmaco-resistant schizophrenia. *BioEssays* 30: 183-188.

- Bendayan R, Ronaldson PT, Gingras D et al. (2006) In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *J Histochem Cytochem* 54: 1159-1167.
- Benkert O und Hippus H (2007) *Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie*. 6. Auflage, Springer Verlag.
- Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B et al. (1997) Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev* 21: 55-84.
- Borrioni B, Agosti C, Marcello E et al. (2010) Blood cell markers in Alzheimer Disease: Amyloid Precursor Protein form ratio in platelets. *Exp Gerontol* 45: 53-56.
- Boulton DW, deVane CL, Liston HL et al. (2002) In vitro P-glycoprotein affinity for atypical and conventional antipsychotics. *Life Sci* 71: 163-169.
- Bozina N, Kuzman MR, Medved V et al. (2006) Associations between MDR1 gene polymorphisms and schizophrenia and therapeutic response to olanzapine in female schizophrenic patients. *J Psychiatric Res* 42: 89-97.
- Bradbury MW (1985) The blood-brain barrier. Transport across the cerebral endothelium. *Circ Res* 57: 213-222.
- Bradbury MW (1993) The blood-brain barrier. *Exp Physiol* 78: 453-472.
- Breedveld P, Beijnen JS, Schellens JHM (2006) Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci* 27: 17-24.
- Brockmöller J, Kirchheiner J, Schmider J et al. (2002) The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther* 72: 438-452.
- Browman KE, Komater VA, Drescher KU et al. (2004) D₂receptor-, but not D₃ receptor-antagonists impair spatial learning in mice. Poster beim XXIVth Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP) Congress, Paris (Frankreich).
- Butt AM, Jones HC und Abbott NJ (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol* 429: 47-62.
- Casey DE (1996) Side effect profiles of new antipsychotic agents. *J Clin Psychiatry* 57 (Suppl. 11): 40-52.

- Chang C, Bahadduri PM, Polli JE et al. (2006) Rapid identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Drug Metab Dispos* 34: 1976-1984.
- Cheng X and Klaassen CD (2006) Regulation of mRNA expression of xenobiotic transporters by the Pregnane X Receptor in mouse liver, kidney and intestine. *Drug Metab Dispos* 34: 1863-1867.
- Cirrito JJR, Deane R, Fagan AM et al. (2005) P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid- β deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 115: 3285-3290.
- Clark DE (2001) Prediction of intestinal absorption and blood-brain barrier penetration by computational methods. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 4: 477-496.
- Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L (2002) α -Secretase ADAM10 as well as α APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Mol Med* 8: 67-74.
- Correll CU, Leucht S und Kane JM (2004) Lower risk for tardive dyskinesia associated with second-generation antipsychotics: A systematic review of 1-year studies. *Am J Psychiatry* 16: 414-425.
- Dallas S, Miller DS und Bendayan R (2006) Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 58: 140-161.
- Danilczuk Z, Ossowa G, Lupina T et al. (2005) Effect of NMDA receptor antagonists on behavioral impairment induced by chronic treatment with dexamethasone. *Pharmacological Reports* 57: 47-54.
- Davson H und Welch K (1971) The permeation of several materials into the fluids of the rabbit's brain. *J Physiol* 218: 337-351.
- Dawood MY, Lumley LA, Robinson CL et al. (2004) Accelerated Barnes Maze test in mice for assessment of stress effects on memory. *Ann NY Acad Sci* 1032: 304-307.
- Dean M, Hammon Y and Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42: 1007-1017.
- Decker MA und Zimmermann CL (1995) Simultaneous determination of etretinate, acitretin and their metabolites in perfusate, perfusate plasma, bile or hepatic tissue with reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 667: 105-113.
- De Leon J, Susce MT, Pan RM et al. (2007) A study of genetic (CYP2D6 and ABCB1) and environmental (drug inhibitors and inducers) variables that may influence plasma risperidone levels. *Pharmacopsychiatry* 40: 93-102.

Demel MA, Krämer O, Ettmayer P et al. (2009) Predicting ligand interactions with ABC transporters in ADME. *Chemistry and Biodiversity* 6: 1960-1969.

De Vries NA, Zhao J, Kroon E et al. (2007) P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein: Two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan. *Clin Cancer Res* 13: 6440-6449.

Di Luca M, Pastorino L, Bianchetti A et al. (1998) Differential level of platelet amyloid β precursor protein isoforms- An early marker for Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 55: 1195-1200.

Doan KMM, Humphreys JE, Webster LO et al. (2002) Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 1029-1037.

Doran A, Obach RS, Smith BJ et al. (2005) The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: Evaluation using the *mdr1a/1b* knockout mouse model. *Drug Metab Dispos* 33: 165-174.

Dresser GK, Spece JD und Bailey DG (2000) Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 38: 41-57.

Eichelbaum M, Fromm MF und Schwab M (2004) Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism. *Ther Drug Monit* 26: 180-185.

Eisenhardt EU und Bickel MH (1994) Kinetics of tissue distribution and elimination of retinoid drugs in the rat. I. Acitretin. *Drug Metab Dispos* 22: 26-30.

Endres CJ, Hsiao P, Chung FS et al. (2006) The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci.* 27: 501-517.

Errijgers V, van Dam D, Gantois I et al. (2007) FVB.129P2-Pde6b1 Tyrc-ch/Ant, a sighted variant of the FVB/N mouse strain suitable for behavioral analysis. *Genes, Brain and Behavior* 6: 552-557.

Fachinformation Neotigason 10 mg/ 25 mg; Actavis Deutschland GmbH (Langenfeld); Stand 03/2008.

Fahrenholz F und Postina R (2006) α -Secretase activation- An approach to Alzheimer's disease therapy. *Neurodegenerative Dis* 3: 255-261.

Fahrenholz F (2010) The close link between retinoid signalling and the alpha-secretase ADAM10 and its potential for treating Alzheimer's disease (Commentary on Javis et al.). *Eur J Neurosci* 32: 1245.

Fahrenholz F, Tippmann F, Endres K (2010) Retinoids as a perspective in treatment of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 7: 190-192.

Fang J, Bourin M und Baker GB (1999) Metabolism of risperidone to 9-hydroxyrisperidone by human cytochromes P450 2D6 and 3A4. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 359: 147-151.

Frankfort SV, Doodeman VD, Bakker R et al. (2006) ABCB1 genotypes and haplotypes in patients with dementia and age-matched non-demented control patients. *Mol Neurodegen* 1: 13.

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 (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 25: 423-429.

Galderisi S, Davidson M, Kahn RS et al. (2009) Correlates of cognitive impairment in first episode schizophrenia: the EUFEST study. *Schizophr Res* 115: 104-114.

Galetin A, Burt H, Gibbons L et al. (2005) Prediction of time dependent CYP3A4 drug-drug interactions: Impact of enzyme degradation, parallel elimination pathways, and intestinal inhibition. *Drug Metab Dispos* 34: 166-175.

Goldmann EE (1909) Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. *Beitr Klin Chirurg* 64: 192-265.

Goldmann EE (1913) Vitalfärbung am Zentralnervensystem. *Abh. K. Preuss. Akad Wiss Phys Med* 1: 1-60.

Gottesman MM, Fojo T und Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2: 48-58.

Green B (2004) Focus on aripiprazole. *Curr Med Res Opin* 20: 207-213.

Green KN, Billings LM, Roozendaal B et al. (2006) Glucocorticoids increase amyloid- β and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 26: 9047-9056.

Green MF (1996) What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia? *Am J Psychiatry* 153: 321-330.

Green RC, Schneider LS, Amato DA et al. (2009) Effect of tarenflurbil in cognitive decline and activities of daily living in patients with Alzheimer Disease. *JAMA* 302: 2557-2564.

Gunes A, Spina E, Dahl ML et al. (2008) ABCB1 polymorphisms influence steady-state plasma levels of 9-hydroxyrisperidone and risperidone active moiety. *Ther Drug Monit* 30: 628-633.

Guzelian J, Barwick JL, Hunter L et al. (2006) Identification of genes controlled by the Pregnane X Receptor by microarray analysis of mRNAs from pregnenolone16 α -carbonitrile-treated rats. *Toxicol Sci* 94: 379-387.

Hagenbuch B, Gao B und Meier PJ (2002) Transport of xenobiotics across the blood-brain barrier. *News Physiol Sci* 17: 231-234.

Hardy J, Duff K, Hardy KG et al (1998) Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nature Neurosci* 1: 355-358.

Hartmann D, de Strooper B, Serneels L et al. (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11: 2615-2624.

Härtter S und Hiemke C (2002) Pharmakokinetik, Interaktionspotential und TDM. *Pharmazie in unserer Zeit* 31: 546-557.

Härtter S und Hiemke C (2003) Therapeutisches Drug-Monitoring von neuen Antidepressiva und Antipsychotika. *MMP* 26: 160-164.

Hartz AM, Miller DS und Bauer B (2010) Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 77: 715-723.

Hawkins BT und Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57: 173-185.

Heo HJ und Lee CY (2004) Protective effects of quercetin and vitamin c against oxidative stress-induced neurodegeneration. *J Agric Food Chem* 52: 7514-7517.

Hoffmann K und Löscher 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.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O et al. (1999) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multi sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 97: 3473-3478.

- Honey GD, Bullmore ET, Soni W et al. (1999) Differences in frontal cortical activation by a working memory task after substitution of risperidone for typical antipsychotic drugs in patients with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13432–13437.
- Jaquenoud Sirot E, Knezevic B, Morena GP et al. (2009) ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms- Clinical pharmacogenetics of clozapine. *J Clin Psychopharmacol* 29: 319-326.
- Johansson BB (1990) The physiology of the blood-brain barrier. *Adv Exp Med Biol* 274: 25-39.
- Jones BJ und Roberts DJ (1968) A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naïve mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 259: 211.
- Jones PM und George AM (2000) Symmetry and structure of P-glycoprotein and ABC transporters. *Eur J Biochem* 267: 5298-5305.
- Juliano RL und Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 455: 152-162.
- Kageyama M, Fukushima K, Togawa T et al. (2005) Relationship between excretion clearance of Rhodamine 123 and P-glycoprotein (P-gp) expression induced by representative P-gp Inducers. *Biol Pharm Bull* 29: 779- 784.
- Kalkstein S, Hurford I und Gur RC (2010) Neurocognition in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci*. 4: 373-390.
- Kane J, Honigfeld G, Singer J (1988) Clozapine for the treatment resistant schizophrenia. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 58: 789-796.
- Karlsson L, Schmitt U, Josefsson M et al. (2010) Blood-brain barrier penetration of the enantiomers of venlafaxine and its metabolites in mice lacking P-glycoprotein. *Eur Neuropsychopharmacol* 20: 632-640.
- Keefe RS, Silva SG, Perkins DO et al. (1999) The effects of atypical antipsychotic drugs on neurocognitive impairment in schizophrenia: a review and meta-analysis. *Schizophrenia Bull* 25: 201-222.
- Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ et al. (1998) Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene, dosage, genetic background and developmental adaptations. *J Neurosci* 18: 3470-3479.

- Kikuchi T, Tottori K, Uwahodo Y et al. (1995) 7-(4-[4-(2,3-Dichlorophenyl)-1-piperazinyl]butyloxy)-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone (OPC-14597), a new putative antipsychotic drug with both presynaptic dopamine autoreceptor agonistic activity and postsynaptic D₂ receptor antagonistic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 274: 329–336.
- Kim KA, Park PW, Liu KH et al. (2008) Effect of rifampicin, an inducer of CYP3A4 and P-glycoprotein, on the pharmacokinetics of risperidone. *Clin Pharmacol* 48: 66-72.
- Kirn RB, Wandel C, Leake B et al. (1999) Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A4 and P-glycoprotein. *Pharm Res* 16: 408-414.
- Kirschbaum KM, Henken S, Hiemke C et al. (2008) Pharmacodynamic consequences of P-glycoprotein dependent pharmacokinetics of risperidone and haloperidol in mice. *Behav Brain Res* 188: 298-303.
- Kirschbaum KM, Hiemke C und Schmitt U (2009) Rotarod impairment: catalepsy-like screening test for antipsychotic side effects. *Int J Neurosci* 119: 1509-1522.
- Kirschbaum KM, Uhr M, Holthoewer D et al. (2010) Pharmacokinetics of acute and sub-chronic aripiprazole in P-glycoprotein deficient mice. *Neuropharmacol* 59: 474-479.
- Kivistö KT, Niemi M und Fromm MF (2004) Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein. *Fundamental Clin Pharmacol* 18: 621-626.
- Kizaki M, Ueno H, Yamazoe Y (1996) Mechanisms of retinoid resistance in leukemic cells: Possible role of cytochrome P450 and P-glycoprotein. *Blood* 87: 725-733.
- Kliwer SA, Moore JT, Wade L et al. (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92: 73-82.
- Kliwer SA, Goodwin B und Willson TM (2002) The nuclear Pregnane X Receptor: A key regulator in xenobiotic metabolism. *Endocrine Rev* 23: 687-702.
- Kluth D, Banning A, Paur I et al. (2007) Modulation of Pregnane X Receptor and electrophile response element-mediated gene expression by dietary polyphenolic compounds. *Free Radical Biology & Medicine* 42: 315-325.
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S et al. (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the α -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5815-5820.

Köhle C und Bock KW (2009) Coordinate regulation of human drug-metabolizing enzymes, and conjugate transporters by the Ah receptor, pregnane x receptor and constitutive androstane receptor. *Biochem Pharmacol* 77: 689-699.

Köhler C, Ogren SO, Haglund L et al. (1979) Regional displacement by sulpiride of [3H]spiperone binding in vivo biochemical and behavioural evidence for a preferential action of limbic and nigral dopamine receptors. *Neurosci Letters* 13: 51–56.

Kuhn PH, Wang H, Dislich B et al. (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29: 3020-3032.

Kuhnke D, Jedlitschky G, Grube M et al. (2007) MDR1-P-glycoprotein (ABCB1) mediates transport of Alzheimer's amyloid- β peptides- Implications for the mechanisms of A β clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol* 17: 347-353.

Kootstra-Ros JE, Van Weelden MJM, Hinrichs JWW et al. (2006) Therapeutic Drug Monitoring of antidepressants and cytochrome P450 genotyping in general practice. *J Clin Pharmacol* 46: 1320-1327.

Kralic JE, O'Buckley TK, Khisti RT et al. (2002) GABA α receptor alpha-1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological, and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. *Neuropharmacol* 43: 685–694.

Kwan P, Sills GJ, Butler E et al. (2003) Differential expression of multidrug resistance genes in naive rat brain. *Neurosci Letters* 339: 33-36.

Lagas JS, Vlaming MLH und Schinkel AH (2009) Pharmacokinetic assessment of multiple ATP-binding cassette transporters: The power of combination knockout mice. *Mol Interventions* 9: 136-145.

Lam FC, Liu R, Lu P et al. (2001) β -Amyloid efflux mediated by P-glycoprotein. *J Neurochem* 76: 1121-1128.

Lammich S, Kojro E, Postina R et al. (1999) Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3922-3927.

Lee G, Dallas S, Hong M et al. (2001) Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev* 53: 569-596.

Lee G und Bendayan R (2004) Functional Expression and localization of P-glycoprotein in the central nervous system: Relevance to the pathogenesis and treatment of neurological disorders. *Pharm Res* 21: 1313-1330.

Lehnert M (1994) Multidrug resistance in human cancer. *J Neurooncol* 22: 239-243.

Leucht S, Pitschel-Walz G, Abraham D et al. (1998) Efficacy and extrapyramidal side-effects of the new antipsychotics olanzapine, quetiapine, risperidone, and sertindole compared to conventional antipsychotics and placebo. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Schizophrenia Res* 35: 51-68.

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

Lewandowsky M (1900) Zur Lehre von der Cerebrospinal Flüssigkeit. *Zentralblatt Klinische Medizin* 40: 480-494.

Liebermann JA, Stroup S, McEvoy JP et al. (2005) Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353: 1209-1223.

Liu X, Lin HS, Chan SY et al. (2003) Biopharmaceutics of β -cyclodextrin derivative-based formulations of acitretin in Sprague-Dawley rats. *J Pharm Sci* 93: 805-815.

Löscher W und Potschka H (2005a) Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 6: 591-602.

Löscher W und Potschka H (2005b) Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-Binding Cassette gene family. *NeuroRx* 2: 86-98.

Marder SR, McQuade RD, Stock E et al. (2003) Aripiprazole in the treatment of schizophrenia: safety and tolerability in short-term, placebo-controlled trials. *Schizophrenia Res* 61: 123-136.

Martignoni M, Groothuis GMM und de Kanter R (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2: 875-894.

Martin-Facklam M und Haefeli WE (2000) Unerwünschte, klinisch relevante Arzneimittelinteraktionen. *Therapeutische Umschau* 57: 579-583.

- Martin P, Riley R, Thompson P et al. (2010) Effect of prototypical inducers on ligand activated nuclear receptor regulated drug disposition genes in rodent hepatic and intestinal cells. *Acta Pharmacol Sin* 31: 51-65.
- Marwaha J und Aghajanian GK (1982) Typical and atypical neuroleptics are potent antagonists at alpha 1-adrenoceptors of the dorsal lateral geniculate nucleus. An electrophysiological study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 321: 32-37.
- Matheny CJ, Ali RY, Yang X et al. (2004) Effect of prototypical inducing agents on P-glycoprotein and CYP3A4 expression in mouse tissues. *Drug Metab Dispos* 32: 1008-1014.
- McGurk SR, Lee MA, Jayathilake K et al. (2004) Cognitive deficits of olanzapine treatment in schizophrenia. *Med Gen Med* 6: 27.
- Miller DS (2010) Regulation of P-gp and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier. *Trends Pharmacol Sci* 31: 246-254.
- Mitsunaga Y, Takanaga H, Matsuo A et al. (2000) Effect of bioflavonoids on vincristine transport across blood–brain barrier. *Eur J Pharmacol* 395: 193-201.
- Morris R (1984) Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60.
- Murakami H, Takanaga H, Matsuo H et al. (2000) Comparison of blood-brain barrier permeability in mice and rats using in situ brain perfusion technique. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: 1022-1028.
- Mutlu O, Ulak G, Celikyurt IK et al. (2011) Effects of olanzapine, sertindole and clozapine on learning and memory in the Morris water maze test in naïve and MK-801-treated mice. *Pharmacol Biochem Behav* 98: 398-404.
- Narang VS, Fraga C, Kuimar N et al. (2008) Dexamethasone increases expression and activity of multidrug resistance transporters at the rat blood-brain barrier. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: 440-450.
- Obregon DF, Rezai-Zadeh K, Bai Y et al. (2006) ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced α -secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 281: 16419-16427.
- Ogu CC und Maxa JL (2000) Drug interactions due to cytochrome P450. *BUMC Proc* 13: 421-423.

Ohno M, Yamamoto T und Ueki S (1989) Effect of isofloxythepin, a novel neuroleptic, on hippocampal stimulation- induced wet-dog shaking in the rat. *Jpn J Pharmacol* 49: 21-26.

Oldendorf WH (1974) Blood-brain Barrier permeability to drugs. *Annu Rev Pharmacol* 14: 239-248.

Ono K, Yoshiike Y, Takashima A et al. (2003) Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 87: 172-181.

Overall JE und Gorham DR (1962) The Brief Psychiatric Rating Scale. *Psychol Rep* 10: 799-812.

Pal D und Mitra AK (2006) MDR- and CYP3A4-mediated drug-drug interactions. *J Neuroimmune Pharmacol* 1: 323-339.

Pardridge WM (1997) Drug delivery to the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 713-731.

Perez-Raya MD, Risco S, Navarro C et al. (1989) Changes in chlorpromazine induced CNS effects when associated with other neuroleptics and anxiolytics. *Pharm Acta Helv* 64: 146-150.

Postina R, Schroeder A, Dewachter I et al. (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Inv* 113: 1456-1464.

Produktinformation Barnes Maze for Mouse ENV-562-M; Med Associates Inc.; St.Albans (UK)
<http://www.med-associates.com/mazes/barnes.htm>

Produktinformation RotaRod Advanced; TSE Systems; Bad Homburg (Deutschland)
<http://tse-systems.com/products/behavior/motor-function/rotarod.htm>

Qian F, Wei D, Liu J et al. (2006) Molecular model and ATPase activity of carboxyl-terminal nucleotide binding domain from human P-glycoprotein. *Biochem (Moscow)* 71 (Suppl. 1): 18-24.

Rajji TK, Ismail Z und Mulsant BH (2009) Age at onset and cognition in schizophrenia: meta-analysis. *Br J Psychiatry* 195: 286-293.

Reese TS und Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34: 207-217.

Richtlinie 86/609/EEC der EU zum Tierschutz bei experimentellen und anderen wissenschaftlichen Arbeiten (1986) http://ec.europa.eu/food/fs/aw/aw_legislation/scientific/86-609-eec_en.pdf

Riederer P, Laux G und Pödingner W (1992) Neuro-Psychopharmaka. Band 1: Allgemeine Grundlagen der Pharmakopsychiatrie. 2. Auflage, Springer Verlag (Wien).

Rinaldi A, Mandillo S, Oliverio A et al. (2007) D₁ and D₂ antagonist injections in the prefrontal cortex selectively impair spatial learning. *Neuropsychopharmacol* 32: 309-319.

Rubin LL und Staddon JM (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22: 11-28.

Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR et al. (1997) Mice lacking dopamine D₄ receptors are supersensitive to ethanol, cocaine and metamphetamine. *Cell* 90: 991-1001.

Rücker G, Neugebauer M und Willems GG (2001) Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (Stuttgart).

Robey RW, Lazarowski A und Bates SE (2008) P-glycoprotein- a clinical target in drug-refractory epilepsy? *Mol Pharmacol* 73: 1343-1346.

Schäfer I, Lambert M und Naber D (2004) Atypische Antipsychotika bei therapieresistenter Schizophrenie. *Nervenarzt* 75: 79-91.

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

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

Schinkel AH (1999) P-glycoprotein, a gate keeper in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Deliv Rev* 36: 179-194.

Schlangenhauf F, Dinges M, Beck A et al. (2010) Switching schizophrenia patients from typical neuroleptics to aripiprazole: Effects on working memory dependent functional activation. *Schizophrenia Res* 118: 189-200.

Schmitt U, Hiemke C, Fahrenholz F et al. (2006) Over-expression of two different forms of the α -secretase ADAM10 affects learning and memory in mice. *Behav Brain Res* 175: 278-284.

Schröder A, Fahrenholz F und Schmitt U (2009) Effect of dominant-negative form of ADAM10 in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16: 309-314.

Seeger MA und van Veen HW (2009) Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794: 725-737.

Selva-Vera G, Balancá-Martínez V, Salazar-Fraile J et al. (2010) The switch from conventional to atypical antipsychotic treatment should not be based exclusively on the presence of cognitive deficits. *BMC Psychiatry* 10: 47.

Shudo K, Fukasawa H, Nakagomi M et al. (2009) Towards retinoid therapy for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 6: 302-311.

Silverberg GD, Messier AA, Miller MC et al. (2010) Amyloid efflux transporter expression at the blood-brain barrier declines in normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 1034-1043.

Singh BN (2005) A quantitative approach to probe the dependence and correlation of food-effect with aqueous solubility, dose/solubility ratio, and partition coefficient (Log P) for orally active drugs administered as immediate-release formulations. *Drug Dev Res* 65: 55-75.

Small DS und McNamara (1994) Hepatic enzyme induction potential of acitretin in male and female Sprague-Dawley rats. *J Pharm Sci* 83: 662-667.

Sonoda J, Rosenfeld JM, Xu L et al. (2003) A nuclear receptor-mediated xenobiotic response and its implication in drug metabolism and host protection. *Curr Drug Metab* 4: 59-72.

Spina E und de Leon J (2007) Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: A comparative review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 100: 4-22.

Stanley JL, Lincoln RJ, Brown TA et al. (2005) The mouse beam-walking assay offers improved sensitivity over the mouse rotarod in determining motor coordination deficits induced by benzodiazepines. *J Psychopharmacol* 19: 221-227.

Stern L und Gaultier R (1921) Recherches sur le liquid céphalo-rachidien. I. Les Rapports entre le liquide céphalo-rachidien et la circulation sanguine. *Archs Int Physiol* 17: 138-192.

Stern L und Gaultier R (1922) Recherches sur le liquid céphalo-rachidien. II. Les rapports entre le liquide céphalorachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal. *Arch Int Physiol* 17: 391-448.

Summerfield SG, Read K, Begley DG et al. (2007) Central nervous system drug deposition: The relationship between in situ brain permeability and brain free fraction. *J Pharmacol Exp Ther* 322: 205-213.

Sunyer B, Patil S, Hoyer H et al. (2007) Barnes Maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Nature Protocols* doi:10.1038/nprot.2007.390.

Tateishi T, Watanabe M, Kumai T et al. (2000) CYP3A is responsible for N-dealkylation of haloperidol and bromperidol and oxidation of their reduced forms by human liver microsomes. *Life Sci* 67: 2913-2920.

Teng S, Jekerle V, Piquette-Miller M (2003) Induction of ABCC3 (MRP3) by Pregnane X Receptor activators. *Drug Metab Dispos* 31: 1296-1299.

Terry AV, Hill WD, Waller JL et al. (2003) Differential effects of haloperidol, risperidone and clozapine exposure on cholinergic markers and spatial learning performance in rats. *Neuropsychopharmacol* 28: 300-309.

Thiel-Demby VE, Humphreys JE, St. John Williams LA et al. (2008) Biopharmaceutics Classification System: Validation and Learnings of an in vitro permeability assay. *Mol Pharmaceutics* 6: 11-18.

Tippmann F, Hundt J, Schneider A et al. (2009) Upregulation of the α -secretase ADAM10 by retinoid acid receptors and acitretin. *FASEB J* 23: 1643-1654.

Tollefson GD und Sanger TM (1997) Negative symptoms: a path analytic approach to a double-blind, placebo- and haloperidol-controlled clinical trial with olanzapine. *Am J Psychiatry* 154: 466-474.

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

Tuulio-Henricksson A, Partonen T, Suvisaari J et al. (2004) Age at onset and cognitive functioning in schizophrenia. *Br J Psychiatry* 185: 215-219.

Uchida H, Kapur S, Mulsant BH et al. (2009) Sensitivity of older patients to antipsychotic motor side effects: A PET study examining potential mechanisms. *Am J Geriatr Psychiatry* 17: 255-263.

Uhr M, Steckler T, Yassouridis A et al. (2000) Penetration of amitriptyline, but not of fluoxetine, into brain is enhanced in mice with blood-brain barrier deficiency due to mdr1a P-glycoprotein gene disruption. *Neuropsychopharmacol* 22: 380-387.

Uhr M und Grauer MT (2003) Abcb1 ab is involved in the uptake of citalopram and trimipramine into the brain of mice. *J Psychiatr Res* 37: 179-185.

Uhr M, Grauer MT und Holsboer F (2003) Differential enhancement of antidepressant penetration into the brain in mice with abcb1 ab (mdr1 ab) P-glycoprotein gene disruption. *Biol Psychiatry* 54: 840-846.

Uhr M, Tontsch A, Namendorf C et al. (2008) Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron* 57: 203-209.

Urquhart BL, Rommel GT und Kim RB (2007) Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: Implications for interindividual variability in response to drugs. *J Clin Pharmacol* 47: 566-578.

Urquhart BL und Kim RB (2009) Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 65: 1063-1070.

van Veelen NM, Grootens KP, Peuskens J et al. (2010) Short term neurocognitive effects of treatment with ziprasidone and olanzapine in recent onset schizophrenia. *Schizophr Res* 120: 191-198.

van Waterschoot RAB, Lagas JS, Wagenaar E et al. (2009) Absence of both cytochrome P450 3A and P-glycoprotein dramatically increases docetaxel oral bioavailability and risk of intestinal toxicity. *Cancer Res* 69: 8996-9002.

Vogelgesang S, Warzok RW, Cascorbi I et al. (2004) The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 1: 121-125.

Volm M und Efferth T (1994) Resistenzüberwindung bei Tumoren. *Dtsch med Wschr* 119: 475-479.

Walter FK (1929) Die allgemeinen Grundlagen des Stoffaustausches zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. *Arch Psychiatr Nervenkr* 101: 195–230.

Wang JS, Ruan Y, Taylor RM et al. (2004) The brain entry of risperidone and 9-hydroxyrisperidone is greatly limited by P-glycoprotein. *Int J Neuropsychopharmacol* 7: 415-419.

Wang JS, Zhu HJ, Markowitz JS et al. (2006) Evaluation of antipsychotic drugs as inhibitors of multidrug resistance transporter P-glycoprotein. *Psychopharmacol* 187: 415-423.

Wang K, Chen S, Xie W et al. (2008) Retinoids induce cytochrome P450 3A4 through RXR/VDR-mediated pathway. *Biochem Pharmacol* 75: 2204-2213.

Weber CC, Kressmann S, Fricker G et al. (2004) Modulation of P-glycoprotein function by St. John's Wort extract and its major constituents. *Pharmacopsychiatry* 37: 292-298.

Weiss EM, Bilder RM, Fleischhacker WW (2002) The effects of second generation antipsychotics on cognitive functioning and psychosocial outcome in schizophrenia. *Psychopharmacol (Berl.)* 162: 11–17.

Woodward ND, Purdon SE, Meltzer HY et al. (2005) A meta-analysis of neuropsychological change to clozapine, olanzapine, quetiapine, and risperidone in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 8: 457–472.

Xu C, Li Y und Kong A (2005) Induction of phase I, II and III drug metabolism/ transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28: 249-268.

Yamada T, Mori Y, Hayashi R et al. (2003) Suppression of intestinal polyposis in MDR1-deficient *Apc^{Min/+}* mice. *Cancer Res* 63: 895-901.

Yao YY, Liu DM, Xu DF et al. (2007) Memory and learning impairment induced by dexamethasone in senescent but not young mice. *Eur J Pharmacol* 574: 20-28.

Zettel UK, Mix E und Lehnitz R (2005) *Klinische Liquordiagnostik*. 2. Auflage, de Gruyter Verlag (Berlin).

Zhou SF (2008) Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 38: 802-832.

II Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Ampere
ABC	ATP-Binding-Cassette
ADAM10	A Disintegrin And Metalloproteinase 10
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung, Elimination
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
ANOVA	Analysis of variance; Varianzanalyse
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein
APPsα	secreted Amyloid Precursor Protein α
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
atRA	all-trans Retinsäure
BCRP	Breast-Cancer-Resistance-Protein
BPRS	Brief Psychiatric Rating Scale
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Celsius
CAR	Constitutive-Androstane-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation (Identifikation von Zelloberflächen)
CF	Cystische Fibrose
CRABP	Zelluläres Retinsäure Bindungsprotein
CYP	Cytochrom P450
d	Tag (day)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EPMS	Extrapyramidal-motorische Störungen

FAM	Fertigarzneimittel
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glukokortikoid-Rezeptor
h	Stunde
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
i.p.	intra-peritoneal
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
KO	Knockout
m	Masse/ Massenteil
mM	millimol
MDCK	Maddin-Darby canine kidney Zellen
MDR	Multi-Drug-Resistance
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MRP	Multi-Drug-Resistance-Associated-Protein
NC	Nitrocellulose
ng	Nanogramm
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCN	5-Pregnen-3β-ol-20-on-16α-Carbonitril
P-gp	P-Glykoprotein
PLP	Platelet-rich-Plasma
PMSF	Phenylmethylsufonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PXR	Pregnan-X-Rezeptor

RAR	Retinsäure-Rezeptor
RP-HPLC	Reversed-Phase-High-Performance-Liquid-Chromatography
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
TBS	TRIS Buffered Saline
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
U	Umdrehung
UV	Ultra-Violett
V	Volt
V	Volumen
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VT	Volumenteil
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem