

**Baclofen und Strukturverwandte:
Interaktionen mit kinetisch relevanten absorptiven und
sekretorischen Membrantransportern in vitro,
in situ und in vivo**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

**Christiane Leisen
geboren am 29. August 1973 in Trier**

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Hildegard Spahn-Langguth**
- 2. Prof. Dr. Peter Nuhn**
- 3. Prof. Dr. Bernd Epe**

Halle/Saale, 20.12.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004494

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004494>]

Danksagung

Die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen:

Professor Dr. Hildegard Spahn-Langguth für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit unter ihrer Betreuung selbständig anzufertigen. Durch ihr unerschöpfliches Interesse an der Themenstellung, die vielen anregenden Diskussionen, durch ihre hilfreichen Ratschläge und die beständige Unterstützung erhielt ich immer wieder wertvolle Ideen und Einsichten, die zum Gelingen der Arbeit entscheidend beitrugen.

Professor Dr. Peter Nuhn für seine Unterstützung, seine Förderung und seine guten Ratschläge.

Professor Dr. Peter Langguth und Bernd Herber für die Durchführung eines Teils der In-vivo-Studien zu den Baclofenestern an der ETH Zürich.

Dr. Abeer Hanafy, vor allem für das Einarbeiten in die In-situ-Perfusionstechnik, aber auch für ihre Hilfe und die Bereitschaft ihre tierexperimentellen Erfahrungen mit mir zu teilen.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bioanalytik, vor allem Dr. Cornelia Dressler, für ihre Mithilfe bei den RBA-Studien, aber auch für die hilfreichen Ratschläge, die konstruktive Kritik und die gegenseitige Unterstützung, die das wissenschaftliche Arbeiten in einem angenehmen menschlichen Umfeld ermöglichte.

Meinen Eltern für ihre Unterstützung und Zuversicht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungen	IX

1. Einleitung **1**

1.1. γ-Aminobuttersäure (GABA) – Funktionen, Rezeptoren, synthetische Analoga	1
1.1.1. Synthese, Freisetzung und Abbau der γ -Aminobuttersäure.....	1
1.1.2. GABA-Rezeptoren.....	1
1.1.3. Synthetische Analoga.....	2
1.1.3.1. Baclofen.....	2
1.1.3.1.1. Pharmakodynamik.....	3
1.1.3.1.2. Pharmakokinetik	4
1.1.3.1.3. Alternativen zur Therapie der Spastik mit Baclofen	4
1.1.3.1.4. Resorption von Baclofen: Einfluss aktiver Transportprozesse	5
1.1.3.2. Gabapentin	6
1.1.3.2.1. Therapeutische Bedeutung.....	6
1.1.3.2.2. Pharmakokinetik von Gabapentin	7
1.1.3.2.3. Resorption von Gabapentin: Einfluss aktiver Transportprozesse	8
1.2. Schrankeneffekte des Körpers	8
1.2.1. Äußere Schranken des Körpers	9
1.2.1.1. Intestinum	9
1.2.1.2. Mund- und Nasenschleimhaut	10
1.2.1.3. Respirationstrakt.....	10
1.2.1.4. Haut	10
1.2.2. Blut-Gewebe-Schranken	10
1.2.2.1. Blut-Hirn-Schranke.....	11
1.2.2.2. Blut-Plazenta-Schranke	13
1.2.2.3. Blut-Retina-Schranke.....	14
1.3. Membrantransport und Absorptionsmechanismen.....	14
1.3.1. Diffusion	14
1.3.2. Endozytose – Vesikulärer transzellulärer Transport.....	15
1.3.3. Transport.....	15
1.3.3.1. Carrier-vermittelter Transport.....	15
1.3.3.2. Aktiver Transport.....	15
1.4. Transporter	15
1.4.1. Aminosäuretransporter.....	16
1.4.1.1. Neutrale (zwitterionische) Aminosäuren	17
1.4.1.2. Kationische Aminosäuren	18
1.4.1.3. Anionische Aminosäuren	19

1.4.1.4. Superfamilie der Natrium- und Chlorid-abhängigen Neurotransmitter-transporter	20
1.4.2. Oligopeptidtransporter	21
1.4.3. P-Glykoprotein	22
1.5. Arzneistoff-Arzneistoff-, Arzneistoff-Nahrungsmittel-, und Arzneistoff-Chemikalien-Interaktionen	24
1.5.1. Beeinflussung von Makromolekülen als Ursache von Interaktionen	25
1.5.1.1. Pharmakokinetische Interaktionen basierend auf Biotransformationsprozessen	25
1.5.1.2. Interaktionen basierend auf Wechselwirkungen beim aktiven Transport.....	25
1.5.2. Veränderungen der Plasmaproteinbindung als Ursache für Interaktionen.....	26
1.6. Prodrugs.....	27
2. Problemstellung	28
3. Ergebnisse	30
3.1. Studien zur Affinität verschiedener Testsubstanzen zum exsorbitiven Transporter P-Glykoprotein	30
3.1.1. In-vitro-Untersuchungen – Radioligandenbindungsassay.....	30
3.1.1.1. Bestimmung der IC ₅₀ -Werte.....	30
3.1.1.2. Korrelation der IC ₅₀ -Werte mit dem Distributionskoeffizienten log D	31
3.1.1.3. Korrelation des Distributionskoeffizienten (log D) gegen die Anzahl der C-Atome in der Seitenkette der Baclofenesterderivate	32
3.1.2. In-vivo-Untersuchungen.....	33
3.1.2.1. Intravenöse Applikation: Individuelle Konzentrations-Zeit-Profile verschiedener Baclofenester sowie der Muttersubstanz Baclofen.....	33
3.1.2.2. Intraperitoneale Applikation: Verteilung einer homologen Reihe von Baclofenestern im Blut und Gehirn	34
3.1.2.3. Intranasale Applikation: Verteilung einer homologen Reihe von Baclofenestern im Blut und Gehirn	35
3.1.2.4. In-vivo-Verteilungsstudie	36
3.1.2.4.1. Einfluss des P-GP-Substrates Talinolol auf die In-vivo-Verteilung von Baclofenbutylester	37
3.1.2.4.2. Einfluss des Baclofenbutylesters auf die In-vivo-Verteilung von Talinolol	40
3.2. Studien zur Affinität verschiedener Testsubstanzen zu absorptiven Aminosäuretransportern.....	44
3.2.1. In-situ-Untersuchungen.....	44
3.2.1.1. Untersuchungen mit Baclofen.....	44
3.2.1.1.1. Konzentrationsabhängigkeit der intestinalen Baclofenpermeabilität im in-situ perfundierten Rattendarm	44
3.2.1.1.2. Einfluss von Taurin, als physiologischer Ligand des intestinalen Taurintransporters, auf die Baclofenpermeabilität	45
3.2.1.1.3. Einfluss von Coffein auf die Baclofenpermeabilität.....	45
3.2.1.1.4. Einfluss einer Mischung von Taurin und Coffein auf die Baclofenpermeabilität	45

3.2.1.1.5.	Einfluss eines Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks auf die Baclofenpermeabilität	46
3.2.1.1.6.	Abhängigkeit der intestinalen Baclofenpermeabilität von der Taurinkonzentration im Perfusat	47
3.2.1.1.7.	Intestinale Permeabilitäten der Enantiomeren des Baclofens im Vergleich zum Razemat und Einfluss von Taurin	47
3.2.1.1.8.	Einfluss von Creatin auf die Baclofenpermeabilität.....	49
3.2.1.2.	Untersuchungen mit CGP 11.130, dem Fluoranalogon des Baclofens.....	50
3.2.1.2.1.	Bestimmung der intestinalen CGP 11.130-Permeabilität im in-situ perfundierten Rattendarm	50
3.2.1.2.2.	Einfluss von Taurin, als Modellsubstrat des intestinalen Taurintransporters, auf die CGP 11.130-Permeabilität	50
3.2.1.3.	Untersuchungen mit Gabapentin	51
3.2.1.3.1.	Konzentrationsabhängigkeit der intestinalen Gabapentinpermeabilität	51
3.2.1.3.2.	Einfluss von Taurin auf die Gabapentinpermeabilität.....	52
3.2.1.3.3.	Einfluss von Coffein auf die Gabapentinpermeabilität	52
3.2.1.3.4.	Einfluss einer Mischung von Taurin/Coffein auf die Gabapentinpermeabilität	52
3.2.1.3.5.	Einfluss eines Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks auf die Gabapentinpermeabilität.....	53
3.2.1.3.6.	Abhängigkeit der Gabapentinpermeabilität von der Taurinkonzentration im Perfusat	54
3.2.1.3.7.	Einfluss von Creatin auf die Gabapentinbasispermeabilität	55
3.2.2.	In-vivo-Untersuchungen	56
3.2.2.1.	Konzentrations-Zeit-Profile für Baclofen nach peroraler Applikation: Einfluss der gleichzeitigen Gabe von Taurin, Coffein und Zucker bzw. eines Energy Drinks.....	56
3.2.2.2.	Gabapentin: Konzentrations-Zeit-Profile nach peroraler Applikation bei der Ratte sowie Einfluss des Energy Drinks	57

4. Diskussion

58

4.1. Studien zur Affinität verschiedener Testsubstanzen zum exsorbitiven Transporter P-Glykoprotein.....	59
4.1.1. Radioligandenbindungsassay – Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	59
4.1.2. In-vivo-Untersuchungen	59
4.1.2.1. Konzentrations-Zeit-Profile der Baclofenester nach intravenöser Applikation im Vergleich zum Baclofen	60
4.1.2.2. Studien zur Verteilung einer homologen Reihe von Baclofenestern im Blut und Gehirn nach intranasaler bzw. intraperitonealer Applikation.....	60
4.1.2.3. In-vivo-Verteilungsstudie – Gegenseitiger Einfluss von Baclofenbutylester und Talinolol auf die In-vivo-Verteilung.....	61
4.2. Studien zur Affinität verschiedener Testsubstanzen zu absorptiven Aminosäuretransportern: Potential für Arzneistoff-Nahrungsmittel-Interaktionen?	62
4.2.1. In-situ-Untersuchungen – Intestinale Rattendarm-Perfusionsstudien	62
4.2.1.1. Bestimmung der intestinalen Permeabilitäten von Baclofen und seinen Strukturverwandten.....	62
4.2.1.2. Interaktionsstudien.....	64
4.2.1.2.1. Interaktion mit Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks.....	64

4.2.1.2.2. Interaktion mit Creatin	65
4.2.2. In-vivo-Untersuchungen: Interaktionen mit Energy Drinks sowie deren Inhaltsstoffen	66
4.3. Ausblick.....	67
5. Materialien und Methoden	68
5.1. In-vitro-Untersuchungen – Radioligandenbindungsassay	68
5.1.1. Chemikalien und Geräte	68
5.1.1.1. Chemikalien.....	68
5.1.1.2. Geräte.....	69
5.1.2. Caco-2-Zellkultur.....	69
5.1.3. Radioligandenbindungsassay	70
5.1.4. Kalkulation der IC ₅₀ -Werte	70
5.2. In-situ-Untersuchungen – Rattendarm-Perfusionsstudien	71
5.2.1. Chemikalien und Geräte	71
5.2.1.1. Chemikalien.....	71
5.2.1.2. Geräte.....	72
5.2.2. Rechtliche Voraussetzungen für die Durchführung der Tierstudien	72
5.2.3. Vorgehensweise bei den In-situ-Untersuchungen.....	72
5.2.3.1. Chirurgisches Vorgehen	72
5.2.3.2. Perfusionsbedingungen	72
5.2.3.3. Stufenweise Perfusion	73
5.2.3.4. Studiendesign.....	73
5.2.3.4.1. Baclofen	73
5.2.3.4.2. CGP 11.130.....	74
5.2.3.4.3. Gabapentin.....	74
5.2.3.5. Berechnungen	75
5.2.3.5.1. Berechnung des Wassertransportes	75
5.2.3.5.2. Berechnung der intestinalen Permeabilität	75
5.3. In-vivo-Untersuchungen	75
5.3.1. Chemikalien und Geräte	75
5.3.1.1. Chemikalien.....	75
5.3.1.2. Geräte.....	76
5.3.2. Rechtliche Voraussetzungen für die Durchführung der Tierstudien.....	76
5.3.3. Studie zu individuellen Konzentrations-Zeit-Profilen verschiedener Baclofenester sowie der Muttersubstanz Baclofen nach intravenöser Applikation	77
5.3.4. In-vivo-Rattenstudien zur Verteilung der Baclofenester in Hirngewebe und Blut nach intranasaler und intraperitonealer Applikation	77
5.3.5. In-vivo-Verteilungsstudie mit Baclofenbutylester und Talinolol	77
5.3.6. In-vivo-Konzentrations-Zeit-Profile nach Applikation von Baclofen bzw. Gabapentin und Einfluss potentieller Inhibitoren (Taurin, Coffein, Zucker, Energy Drink).....	78
5.3.7. Datenanalyse.....	78
5.4. Statistische Auswertung	79
5.5. HPLC-Analytik.....	80
5.5.1. Chemikalien und Geräte	80
5.5.1.1. Chemikalien.....	80
5.5.1.2. Geräte (inkl. stationäre Phasen).....	81

5.5.2.	Pufferlösungen und Derivatisierungsreagenzien	82
5.5.3.	Bioanalytische Bestimmung von Baclofen.....	82
5.5.3.1.	Probenvorbereitung	82
5.5.3.1.1.	Probenvorbereitung für die Bestimmung von Baclofen aus Tyrodepuffer	82
5.5.3.1.2.	Probenvorbereitung für die Bestimmung von Baclofen aus Blut.....	83
5.5.3.2.	Chromatographische Bedingungen.....	83
5.5.4.	Bioanalytische Bestimmung von CGP 11.130.....	84
5.5.4.1.	Probenvorbereitung für die Bestimmung von CGP 11.130 aus Tyrodepuffer.....	84
5.5.4.2.	Chromatographische Bedingungen.....	84
5.5.5.	Bioanalytische Bestimmung von Gabapentin	85
5.5.5.1.	Probenvorbereitung für die Bestimmung von Gabapentin aus Tyrodepuffer und Blut	85
5.5.5.2.	Chromatographische Bedingungen.....	85
5.5.6.	Bioanalytische Bestimmung der Baclofenester	86
5.5.6.1.	Bestimmung von Baclofenestern in Blut und Gewebe (außer Gehirn).....	87
5.5.6.2.	Bestimmung von Baclofenestern in Gehirnhomogenat	88
5.5.6.3.	Chromatographische Bedingungen.....	88
5.5.7.	Bioanalytische Methode für Talinolol.....	90
5.5.7.1.	Bestimmung von Talinolol in Blut und Gewebe (außer Gehirn).....	90
5.5.7.2.	Bestimmung von Talinolol in Gehirnhomogenat.....	91
5.5.7.3.	Chromatographische Bedingungen.....	91
5.5.8.	Validierung	92
5.5.8.1.	Selektivität.....	92
5.5.8.2.	Linearität	92
5.5.8.3.	Präzision und Richtigkeit.....	93
5.5.8.4.	Bestimmungsgrenze – Limit of Quantitation	93

6. Zusammenfassung 94

7. Literaturverzeichnis 97

Anhang XIII

A.	In-vitro-Untersuchungen – Radioligandenbindungsassay	XIII
B.	In-situ-Untersuchungen – Rattendarm-Perfusionsstudien	XIX
B.1.	In-situ-Perfusionen mit Baclofen	XIX
B.2.	In-situ-Perfusionen mit CGP 11.130, dem Fluoranalogen des Baclofens	XL
B.3.	In-situ-Perfusionen mit Gabapentin.....	XLII
C.	In-vivo-Untersuchungen.. ..	LVII
C.1.	In-vivo-Untersuchungen mit Baclofenestern.....	LVII
C.2.	In-vivo-Untersuchungen mit Baclofen	LXVII
C.3.	In-vivo-Untersuchungen mit Gabapentin	LXIX
D.	Validierungsparameter der verwendeten bioanalytischen Methoden	LXXI
D.1.	Linearität	LXXI
D.2.	Präzision und Richtigkeit.....	LXXIII
D.3.	Bestimmungsgrenze – Limit of Quantitation.....	LXXVI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformel von Baclofen.....	3
Abbildung 2:	Strukturformel von Gabapentin	6
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Enterozyten des intestinalen Epithels: Passive Diffusion und aktive – absorptive sowie exsorptive – Transportprozesse bestimmen die Resorptionsrate einer Substanz	9
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Kapillarendothelzellen, als anatomische Grundlage der Blut-Hirn-Schranke sowie einige ihrer passiven und aktiven Transportmechanismen	13
Abbildung 5:	Schematische Darstellung des GABA-Transporters GAT-1 (SLC6A1).....	20
Abbildung 6:	Schematische Darstellung des P-Glykoproteins	23
Abbildung 7:	Konzentrationsabhängige Verdrängung des Radioliganden [³ H]-Talinolol zur Bestimmung der IC ₅₀ -Werte am Beispiel des Baclofenbutylesters	31
Abbildung 8:	Korrelation von P-GP-Affinität (IC ₅₀) und Lipophilie (log D) von Baclofen und seinen Esterderivaten	32
Abbildung 9:	Korrelation der Lipophilie (log D) und der Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette der Baclofenesterderivate	32
Abbildung 10:	Konzentrations-Zeit-Verläufe von Baclofen und seinen Estern nach intravenöser Applikation in der Ratte	33
Abbildung 11:	Konzentrationen von Baclofen und seinen Esterderivaten im Blut und Gehirn nach intraperitonealer Applikation an Ratten sowie hieraus berechnete Gehirn/Blut-Quotienten	35
Abbildung 12:	Konzentrationen von Baclofen und seinen Esterderivaten im Blut und Gehirn nach intranasaler Applikation an Ratten sowie hieraus berechnete Gehirn/Blut-Quotienten	36
Abbildung 13:	Einfluss des P-GP-Substrates Talinolol auf die In-vivo-Verteilung des Baclofenbutylesters: Konzentrations-Zeit-Profile nach i.v.-Gabe mit und ohne Coadministration von Talinolol.....	37/38
Abbildung 14:	Mittlere AUD-Werte des Baclofenbutylesters nach intravenöser Applikation mit bzw. ohne i.v.-Coadministration von Talinolol	38
Abbildung 15:	Gewebe/Blut-Quotienten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden nach Applikation des Baclofenbutylesters mit bzw. ohne intravenöse Coadministration von Talinolol	39
Abbildung 16:	Einfluss des Baclofenbutylesters auf die Kinetik bzw. In-vivo-Verteilung des P-GP-Substrates Talinolol: Konzentrations-Zeit-Profile mit und ohne Coadministration von Baclofenbutylester.....	41
Abbildung 17:	Mittlere AUD-Werte der Enantiomeren des Talinolols nach intravenöser Applikation mit bzw. ohne Coadministration des Baclofenbutylesters	42
Abbildung 18:	Gewebe/Blut-Quotienten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden nach Applikation von Talinolol mit bzw. ohne gleichzeitige i.v.-Gabe von Baclofenbutylester	42
Abbildung 19:	Konzentrationsabhängigkeit der Baclofenpermeabilität	44
Abbildung 20:	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum und Colon während der 5minütigen Sammelintervalle	45
Abbildung 21:	Prozentuale Inhibition der intestinalen Baclofenpermeabilität durch verschiedene Inhibitoren im Jejunum, Ileum und Colon im Vergleich zur Kontrolle: Inhibition durch Taurin und Coffein sowie durch einen Energy Drink bei pH 7,0 und pH 3,1.....	47
Abbildung 22:	Abhängigkeit der intestinalen Baclofenpermeabilität von der zugesetzten Taurinkonzentration	47

Abbildung 23:	Effektive Permeabilitäten der Baclofenenantiomeren und Einfluss von Taurin im Vergleich zum Razemat	48
Abbildung 24:	Intestinale Baclofenpermeabilität in Abhängigkeit von der zugesetzten Creatinmenge im Jejunum, Ileum und Colon sowie resultierende prozentuale Inhibitionen.....	49
Abbildung 25:	Effektive intestinale Permeabilitäten der fluoranalogen Verbindung des Baclofens, CGP 11.130, im Jejunum und Colon während der 5minütigen Sammelintervalle im Vergleich zum Baclofen	51
Abbildung 26:	Konzentrationsabhängigkeit der Gabapentinpermeabilität.....	52
Abbildung 27:	Prozentuale Inhibition der intestinalen Gabapentinpermeabilität durch verschiedene Inhibitoren im Jejunum, Ileum und Colon im Vergleich zur Kontrolle: Inhibition durch Taurin und Coffein sowie durch einen Energy Drink bei pH 7,0 und pH 3,1	54
Abbildung 28:	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Gabapentinpermeabilitäten (P_{eff}) im Jejunum und Colon während der 5minütigen Sammelintervalle.....	54
Abbildung 29:	Abhängigkeit der effektiven intestinalen Gabapentinpermeabilität von der Taurinkonzentration	55
Abbildung 30:	Intestinale Gabapentinpermeabilität in Abhängigkeit vom Creatinzusatz sowie daraus resultierende prozentuale Inhibitionen	56
Abbildung 31:	Konzentrations-Zeit-Profile und AUD's nach peroraler Applikation von 1,0 mg/kg KG Baclofen: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Konzentrations-Zeit-Profile und die Fläche unter den Datenpunkten.....	57
Abbildung 32:	Konzentrations-Zeit-Profile und AUD's nach peroraler Applikation von 1,0 mg/kg KG Gabapentin: Einfluss eines Energy Drinks auf die Konzentrations-Zeit-Profile und die Fläche unter den Datenpunkten.....	57
Abbildung 33:	Schematische Darstellung der In-situ-Rattendarmperfusion	73
Abbildung 34:	Umsetzung mit N-Acetyl-L-Cystein und o-Phthaldialdehyd: Bildung fluoreszierender Isoindolderivate am Beispiel von Baclofen	83
Abbildung 35:	Baclofen in Perfusionspuffer und Blut: HPLC-Chromatogramme nach Derivatisierung mit NAC und OPA und Detektion des entstehenden Isoindolderivates	84
Abbildung 36:	CGP 11.130 in Perfusionspuffer: HPLC-Chromatogramm nach Derivatisierung mit NAC und OPA und Detektion des entstehenden Isoindolderivates	85
Abbildung 37:	Gabapentin in Perfusionspuffer und Blut: HPLC-Chromatogramme nach Derivatisierung mit NAC und OPA	86
Abbildung 38:	Reaktion der Baclofenester mit NEIC unter Wasserausschluss: Bildung fluoreszierender N,N-disubstituierter Harnstoffderivate.....	88
Abbildung 39:	Baclofenbutylester in verschiedenen biologischen Matrices: HPLC-Chromatogramme der entstehenden N,N-disubstituierten Harnstoffderivate.....	89
Abbildung 40:	Repräsentatives HPLC-Chromatogramm zur chromatographischen Trennung der untersuchten Baclofenester im Blut nach Derivatisierung mit NEIC.....	90
Abbildung 41:	Chemische Struktur des Chiraspher NT-Säulenmaterials	91
Abbildung 42:	Talinolol in Blut und Leberhomogenat: HPLC-Chromatogramme der enantiospezifischen Quantifizierung von Talinolol nach Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Blut und Leberhomogenat	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über verschiedene in der Blut-Hirn-Schranke lokalisierte – absorptive und sekretorische – Transporter sowie beispielhafte Substrate	12
Tabelle 2:	Übersicht über verschiedene Transportproteine für neutrale (zwitterionische) Aminosäuren.....	18
Tabelle 3:	Übersicht über verschiedene Transportproteine für kationische (basische) Aminosäuren.....	19
Tabelle 4:	Übersicht über verschiedene Transportproteine für anionische (saure) Aminosäuren.....	20
Tabelle 5:	Übersicht der IC ₅₀ -Werte von Baclofen und verschiedenen seiner Esterderivate, sowie der Octanol/Wasser-Distributionskoeffizienten, der log D-Werte und der Anzahl der C-Atome in der Seitenkette der Estergruppierung.	31
Tabelle 6:	Berechnete pharmakokinetische Parameter nach i.v.-Applikation von Baclofen und seinen Esterderivaten	34
Tabelle 7:	Mittlere AUD-Werte von Baclofenbutylester nach intravenöser Applikation des Butylesters mit bzw. ohne Coadministration von Talinolol	38
Tabelle 8:	Relative Veränderungen der Gewebe/Blut-Quotienten des Baclofenbutylesters durch Coadministration von Talinolol in Abhängigkeit von der Zeit.....	40
Tabelle 9:	Mittlere AUD-Werte der Enantiomeren des Talinolols nach intravenöser Applikation mit bzw. ohne Coadministration von Baclofenbutylester	41
Tabelle 10:	Gewebe/Blut-Quotienten der Enantiomeren des Talinolols mit bzw. ohne Coadministration von Baclofenbutylester sowie relative Veränderungen der Quotienten durch die Coadministration des Butylesters	43
Tabelle 11:	Baclofenbasispermeabilitäten in verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Taurin, Coffein und nach Perfusion in einem Energy Drink bei unterschiedlichen pH-Werten	46
Tabelle 12:	Baclofen: Basispermeabilitäten der Enantiomeren und des Razemates, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Taurin.....	48
Tabelle 13:	Permeabilitäten von Baclofen in drei verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Creatin	49
Tabelle 14:	Basispermeabilitäten von CGP 11.130 in drei verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Taurin	50
Tabelle 15:	Basispermeabilitäten von Gabapentin in drei verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Taurin, Coffein und nach Perfusion in einem Energy Drink bei unterschiedlichen pH-Werten.....	53
Tabelle 16:	Basispermeabilitäten von Gabapentin in drei verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Creatin	55
Tabelle 17:	Chromatographische Bedingungen für die Trennung der Baclofenester auf einer Kieselgelsäule nach Derivatisierung mit NEIC	87
Tabelle 18:	Interne Standards, Fließmittelzusammensetzungen und mittlere Retentionszeiten für die Bestimmung der Baclofenester	90

Abkürzungen

ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve)
AUD	Fläche unter den Datenpunkten (area under the data)
AZT	Azidothymidin
BAC	Baclofen
BAC1P	Baclofen-1-propylester
BAC2P	Baclofen-2-propylester
BACBU	Baclofen-n-butylester
BACET	Baclofenethylester
BACME	Baclofenmethylester
BBB	Blut-Hirn-Schranke (blood-brain barrier)
BBMV	Brush-Border-Membran-Vesikel
BeWo	humane Chorionkarzinomzelllinie
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BNPI	Gehirn-spezifischer Na ⁺ /P _i Cotransporter (brain-specific Na ⁺ /P _i cotransporter)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
Caco-2	humane Colonkarzinomzelllinie
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDO	Cysteindioxygenase
CGP 11.130	Fluoranalogen des Baclofens
CHO	Chinese Hamster Ovary
CL	Clearance
CL _{ren}	renale Clearance
cm	Centimeter
C _{max}	maximale gemessene Konzentration im Blut
COFF	Coffein
CR	Creatin
CRT	Creatintransporter
CSAD	Cysteinsulfonatdecarboxylase
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit, Liquor cerebrospinalis
CYP	Cytochrom-P-450
D	Octanol/Wasser-Distributionskoeffizient
Da	Dalton
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPM	Zerfälle pro Minute (disintegration per minute)
EA	Ethanolamin
ED	Energy Drink
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule

EtOH	Ethanol
FBAC	CGP 11.130; Fluoranalogen des Baclofens
FBS	Fötales bovines Serum (fetal bovine serum)
5FU	5-Fluorouracil
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GBP	Gabapentin
ggf.	gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLUT-1	Glucosetransporter
h	Stunde (hora)
^3H	Tritium
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HIV	humanes Immunodefizienz-Virus (human immunodeficiency virus)
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
ID	innerer Durchmesser (inner diameter)
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IS	Interner Standard
ISF	Interstitialflüssigkeit
i.v.	intravenös
k_{el}	Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
l	Liter
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantitation)
M	Molarität
MCT	Monocarbonsäuretransporter
MDR	Multidrug-Resistenz (multidrug resistance)
MeAIB	α -Methylaminoisobuttersäure
MeOH	Methanol
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
m/m	Gewicht pro Gewicht
μCi	Mikrocurie
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
MRP	multidrug resistance-associated protein
MRT	Mittlere Verweilzeit (mean residence time)
MW	Mittelwert
n	Stichprobengröße

N	Normalität
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NEA	nichtessentielle Aminosäuren (non-essential amino acids)
NEIC	R-(-)-1-(1-Naphthyl)ethylisocyanat
NFA	National Food Administration
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OAT	Organischer Anionentransporter (organic anion transporter)
OATP	Organische Anionen transportierendes Polypeptid (organic anion transporting polypeptide)
OCT	organischer Kationentransporter (organic cation transporter)
ODS	Octadecylsilan
OPA	o-Phthaldialdehyd
O/W-DC	Octanol/Wasser-Distributionskoeffizient (octanol/water-distribution coefficient)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor (platelet activating factor)
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
P_{eff}	effektive Permeabilität
PEPT1	intestinaler Protonen/Oligopeptid-Symporter
P-GP	P-Glykoprotein
pH	potentia hydrogenii
p.o.	peroral
r	Korrelationskoeffizient
rac-	razemisch
RBA	Radioligandenbindungsassay
RE%	Richtigkeit (relative error)
RL	Radioligand
RPE	retinales Pigmentepithel
RSD%	relative Standardabweichung (relative standard deviation)
RT	Raumtemperatur
R-TAL	R-Enantiomer des Talinolols
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SLC	solute carrier family
S-TAL	S-Enantiomer des Talinolols
SXR	Steroid- und Xenobiotikarezeptor
$t_{1/2}$	terminale Eliminationshalbwertszeit
TAL	Talinolol
TAU	Taurin
TAUT	Taurintransporter
TDM	Therapeutisches Drug Monitoring
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
t_{max}	Zeitpunkt, zu dem die maximale Konzentration erreicht ist
U	Einheit (unit)
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute

V_D	Verteilungsvolumen
v/v	Volumen pro Volumen
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil
ZU	Zucker

1. Einleitung

Sowohl tierische als auch menschliche Organismen benötigen zur Erfüllung ihrer vielfältigen Funktionen leistungsfähige Informations-, Koordinations- sowie Steuersysteme. Das Nervensystem spielt hierbei eine zentrale Rolle zur Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von Reizen. Nach morphologischen Merkmalen wird das Nervensystem in das zentrale Nervensystem (ZNS), zu dem das Gehirn und das Rückenmark gehören, sowie in das periphere Nervensystem, die Hirn- und Spinalnerven, eingeteilt. Funktionell erfolgt die Einteilung in das somatische und das vegetative Nervensystem, bestehend aus sympathischem und parasympathischem Nervensystem.

Die synaptische Erregungsübertragung erfolgt durch chemische Botenstoffe, die sogenannten Neurotransmitter. Neben Acetylcholin und verschiedenen Monoaminen (Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin, Serotonin und Histamin) stehen Aminosäuren für die synaptische Erregungsleitung zur Verfügung. Glutamat und Aspartat stellen exzitatorische Aminosäuren, also erregende Neurotransmitter dar. Glutamat als wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter findet sich praktisch in allen Gehirnabschnitten und an den nozizeptiven Bahnen im Hinterhorn. Glutamat wird in Vesikeln gespeichert, in den synaptischen Spalt abgegeben und durch rasche Wiederaufnahme in die Gliazellen inaktiviert. In den Gliazellen erfolgt die Umwandlung in Glutamin, von dort wird es über ein spezifisches Protein (BNPI) in die Nervenzellen gepumpt, wo es erneut zu Glutamat konvertiert werden kann. Glutamin stellt andererseits aber auch das Ausgangsprodukt für die Synthese von γ -Aminobuttersäure (GABA) dar. GABA und Glycin sind die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter.

1.1. γ -Aminobuttersäure (GABA) – Funktionen, Rezeptoren, synthetische Analoga

1.1.1. Synthese, Freisetzung und Abbau der γ -Aminobuttersäure

Der bedeutendste inhibitorische Neurotransmitter, γ -Aminobuttersäure (GABA), stellt einen der am weitesten verbreiteten Transmitter im Säugetiergehirn dar. GABA ist sowohl für die Regulation der synaptischen Transmission, als auch für die Inhibition der neuronalen Aktivität zuständig.

Die endogene GABA-Synthese erfolgt durch Decarboxylierung der L-Glutaminsäure über den γ -Aminobutyratweg, einen Nebenweg des Citratzyklus. Das aus dem Citratzyklus stammende α -Ketoglutarat bildet über Glutamat nach Decarboxylierung die γ -Aminobuttersäure.

Nach der Freisetzung aus den Vesikeln kommt es zu einem raschen Reuptake von GABA in die Neurone und Gliazellen. Der Abbau erfolgt intrazellulär durch GABA-Transaminasen, ein enzymatischer Abbau im synaptischen Spalt findet dagegen nicht statt. Das beim Abbau entstehende Succinat wird wiederum in den Citratzyklus eingeschleust.

1.1.2. GABA-Rezeptoren

Die Wirkungen des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure werden durch drei verschiedene Rezeptoren, GABA_A, GABA_B und GABA_C, vermittelt.

Bei den GABA_A-Rezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Chloridionenkanäle, die aus verschiedenen Untereinheiten bestehen und durch GABA geöffnet werden. GABA_A-Rezeptoren bestehen aus 5 Untereinheiten, die zu verschiedenen Familien gehören können, aber alle aus jeweils 4 transmembranären Domänen bestehen. Benzodiazepine bewirken durch allosterischen Angriff an spezifischen Bindungsstellen ("Benzodiazepin-Rezeptoren") eine Erhöhung der Affinität von GABA zu seiner Bindungsstelle und damit die Öffnung der Chloridkanäle. Durch den vermehrten

Einstrom von Chloridionen kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zellen und damit zu einer verringerten Erregbarkeit. Für Barbiturate und Neurosteroiden existieren weitere Bindungsstellen. Die bekanntesten GABA_A-Antagonisten sind Bicucullin und Picrotoxinin. Bicucullin blockiert kompetitiv die inhibitorische Wirkung von GABA, so dass eine überschießende Erregungsübertragung ausgelöst wird, die zu Krampfanfällen mit Todesfolge führen kann.

Der GABA_C-Rezeptor [Bormann, 2000] stellt wie der GABA_A-Rezeptor einen ionotropen, ligandengesteuerten Chloridkanal dar. Aus diesem Grund wurde er früher als Subtyp des GABA_A-Rezeptors angesehen und als GABA_{A0r} bezeichnet. Es existieren jedoch eine Reihe von Unterschieden zwischen dem GABA_A- und dem GABA_C-Rezeptor. Während der GABA_A-Rezeptor ein Heterooligomer aus α -, β -, und γ -Untereinheiten darstellt, bildet der GABA_C-Rezeptor ein Homooligomer aus ρ -Untereinheiten. Im Gegensatz zum Bicucullin-sensitiven GABA_A-Rezeptor ist der GABA_C-Rezeptor jedoch Bicucullin-insensitiv. Besonders reich an GABA_C-Rezeptoren ist die Retina von Wirbeltieren [Bormann, 2000].

Im Gegensatz zu den beiden bisher genannten GABA-Rezeptoren ist der GABA_B-Rezeptor ein metabotroper G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Baclofen, als zentral wirkendes Muskelrelaxans stellt einen klassischen Agonisten an GABA_B-Rezeptoren dar. Die Aktivierung dieser Bicucullin-insensitiven GABA_B-Rezeptoren reduziert die Transmission exzitatorischer und inhibitorischer Synapsen. Präsynaptisch führt die Erregung von GABA_B-Rezeptoren zu einem Schließen von Calciumkanälen und damit zu einer reduzierten Freisetzung an Neurotransmittern. Postsynaptisch ist die Rezeptoraktivierung mit einem KaliumEinstrom in den synaptischen Spalt verbunden. Die resultierende Hyperpolarisation inhibiert die neuronale Erregbarkeit. Die Vermutung, dass es sich bei den prä- und postsynaptischen Rezeptoren um verschiedene Subtypen des GABA_B-Rezeptors handelt, liegt nahe, ein Beweis konnte aber bisher nicht erbracht werden. Die Klonierung des GABA_B-Rezeptors identifizierte zwei verschiedene Gene gb1 und gb2 [Kaupmann et al., 1998; Kuner et al., 1999; Jones et al., 1998; White et al., 1998]. Das humane gb1-Rezeptorgen kodiert für drei Varianten, die durch unterschiedliches Spleissen ein und derselben mRNA entstehen und als gb1a, gb1b sowie gb1c bezeichnet werden. Die gb1-Varianten unterscheiden sich nur in der N-terminalen Sequenz. Sie besitzen dagegen dieselbe GABA-Bindungsdomäne, die auf einer extrazellulären Kette gelegen ist [Bowery und Enna, 2000]. Das gb2-Gen kodiert im Gegensatz zum gb1 nur für ein Rezeptorprotein. Als Monomere sind die gb1-Varianten inaktiv und erfordern die Coexpression mit gb2 zur Bildung der funktionsfähigen Heterodimere. Gb1 und gb2 können somit als Untereinheiten angesehen werden, die am C-Terminus der Proteinketten in Form einer α -Helix ineinander verwunden sind. Beide Proteine bestehen, wie für G-Protein gekoppelte Rezeptoren typisch, aus jeweils 7 transmembranären Domänen [White et al., 1998]. Der N-Terminus der Peptidkette ist extrazellulär gelegen, der C-Terminus ist auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert. GABA_B-Rezeptoren sind vorwiegend im Thalamus, cerebralen Cortex und im Cerebellum lokalisiert. Benke et al. [1999] sowie Yamada et al. [1999] berichten, dass die Isoformen teilweise unterschiedlich lokalisiert sind, gb1a vorwiegend präsynaptisch, gb1b dagegen überwiegend postsynaptisch.

1.1.3. Synthetische Analoga

1.1.3.1. Baclofen

Baclofen, (R/S)-4-Amino-3-(4-Chlorphenyl)buttersäure, stellt als Strukturanalogon des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) eines der bedeutendsten Pharmaka zur Therapie spastischer Zustände dar. Es wurde 1972 als erstes einigermaßen spezifisch wirkendes und oral zu applizierendes Medikament [Noth, 2000] unter der Bezeichnung Lioresal[®] zur Therapie der Spastik zugelassen. Im Gegensatz zur achiralen γ -Aminobuttersäure weist Baclofen aufgrund der zusätzlichen Chlorphenylgruppierung am β -C-Atom ein Stereozentrum auf. Dementsprechend liegt Baclofen als Gemisch der beiden Enantiomeren R(-)- und S(+)-Baclofen vor. R(-)-Baclofen stellt das aktive Enantiomer dar [Hill und Bowery, 1981], es ist etwa 100fach stärker wirksam als S(+)-Baclofen. R-Baclofen ist dabei nicht nur pharmakologisch aktiver, sondern auch toxischer als das S-Enantiomer [Olpe et al., 1978]. Interessanterweise hängt der Drehsinn des

Baclofens von der Protonierung der Aminofunktion ab. Somit stellen R-(-)-Baclofen und R-(+)-Baclofen-Hydrochlorid ein und dasselbe Eutomer dar.

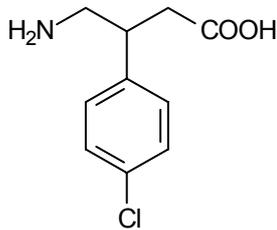


Abbildung 1:
Strukturformel von Baclofen

Vergleich zum Baclofen ist jedoch beim Fluoranalogen die Muskelrelaxation schwächer, die Hemmung des dopaminergen sowie serotonergen Systems dagegen stärker ausgeprägt. Die antispastische Wirkung des CGP 11.130 ist im Vergleich zum Baclofen um den Faktor 5 geringer.

Baclofen wurde von der Ciba-Geigy AG mit dem Ziel synthetisiert, die Lipophilie des natürlichen Neurotransmitters GABA durch Molekülvariationen zu erhöhen und damit eine ausreichende Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu erreichen. Im Verlauf der Entwicklung wurden verschiedene arylsubstituierte GABA-Derivate synthetisiert. Dabei stellte sich ein in para-Position substituierter Phenylring am β -C-Atom als für die Wirkung essentielles Strukturelement heraus. Baclofen erwies sich als die Substanz mit den günstigsten pharmakologischen Eigenschaften. Andere Substanzen wie das Fluoranalogen des Baclofens, CGP 11.130, binden wie Baclofen spezifisch an GABA_B-Rezeptoren. Das Wirkprofil der beiden Substanzen ist ähnlich, beide dämpfen die Motorik und besitzen inhibitorische Effekte auf die Freisetzung klassischer Neurotransmitter, wie Dopamin und Serotonin. Im

1.1.3.1.1. Pharmakodynamik

Die Pathophysiologie der Muskelspastik ist noch nicht ausreichend geklärt und die Zahl der diskutierten Mechanismen dementsprechend groß. Eine pathologische Erhöhung des Skelettmuskeltonus ist entweder durch den Ausfall hemmender Neurone oder durch die ständige Aktivierung von α -Motoneuronen bedingt. Antispastische Substanzen bewirken entweder eine Suppression des exzitatorischen, also vorwiegend glutamatergen Systems oder eine Förderung inhibitorischer Mechanismen [Vogt und Urban, 2000; Gracies et al., 1997] mit supraspinalem oder spinalem Angriffspunkt bzw. einer direkten muskelrelaxierenden Wirkung. Baclofen und andere zentral wirksame Muskelrelaxantien verringern den Muskeltonus durch Angriff an zentralen Synapsen, v.a. durch Hemmung polysynaptischer aber auch monosynaptischer Reflexe [Kita und Goodkin, 2000]. Sie haben dagegen keinen Einfluss auf die Erregungsübertragung an der motorischen Endplatte. Läsionen, die zu spastischen Störungen führen, können cerebralen oder spinalen Ursprungs sein. Als cerebrale Ursachen spastischer Zustände kommen Tumore, Schädel-Hirn-Traumen sowie Morbus Little in Frage, als spinale Ursachen Multiple Sklerose sowie Querschnittslähmungen. Weitere Indikationen für eine Therapie mit Baclofen sind schmerzhafte Verspannungen der Skelettmuskulatur sowie Bandscheibenschäden. Baclofen ist v.a. bei Spastiken spinalen Ursprungs indiziert, während es sich bei cerebraler Spastik als weniger wirksam herausgestellt hat. Des Weiteren hat es sich bei neurogenen Schmerzen, insbesondere bei Trigeminusneuralgie, bewährt und wird bei dieser Indikation nach Carbamazepin als Mittel der 2. Wahl angesehen.

Neben seiner Wirkung als Antispastikum ist Baclofen auch in der Therapie von migräneinduziertem Kopfschmerz erfolgreich. Der Einsatz als Antinozizeptivum wird allerdings durch schnell auftretende Toleranzerscheinungen reduziert. Der analgetische Effekt beruht vermutlich auf der reduzierten Freisetzung sensorischer Transmitter (Substanz P, Glutamat) und der damit abgeschwächten Übertragung schmerzhafter Impulse. Darüber hinaus wurde berichtet, dass Baclofen auch das Verlangen nach Cocain reduzieren kann [Roberts und Andrews, 1997]. In Ratten reduzierte Baclofen die Selbstadministration von Cocain, ohne jedoch einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme zu besitzen.

Besonders gut untersucht ist die spinale Wirkung des Baclofens: Als selektiver Agonist an GABA_B-Rezeptoren, die im Rückenmark vor allem präsynaptisch lokalisiert sind, verhindert es durch Aktivierung der GABA_B-Rezeptoren den spannungsabhängigen Calciumeinstrom in das betroffene Neuron und damit die Freisetzung des erregenden Neurotransmitters Glutamat. Die postsynaptischen Glutamatrezeptoren auf den Motoneuronen des Vorderhorns werden dadurch weniger erregt [Davidoff, 1985]. Zusätzlich führt die postsynaptische Bindung an den afferenten

Endigungen zu einem Ansteigen des Kalium-Auswärtstransport, somit ebenfalls zu einer Hyperpolarisation und damit indirekt zu einer Erhöhung der präsynaptischen Inhibition.

Neben der muskelrelaxierenden Wirkung auf spinaler Ebene, wird durch Baclofen auch eine Verminderung des motorischen Tonus von supraspinalen Zentren ausgelöst.

Therapie- und dosislimitierend wirken sich die vorwiegend zentralen Nebenwirkungen des Baclofens aus: Verwirrtheit, depressive Verstimmungen, Schwindel, Sedierung, Kopfschmerzen und Hypotonie. Daneben treten gastrointestinale Beschwerden auf. Nach Intoxikationen durch Baclofen können neben den muskelrelaxierenden Wirkungen auch Atemdepression und Reflexlosigkeit, optische und akustische Halluzinationen, Bewusstseinsstörungen, Angstzustände sowie epileptische Anfälle auftreten.

1.1.3.1.2. Pharmakokinetik

Die Dosierung des Baclofens sollte einschleichend erfolgen. Initial werden zwei- bis dreimal täglich 5 mg Baclofen peroral appliziert, eine Steigerung der Dosis bis auf 4x täglich 20 mg ist möglich. In Ausnahmefällen können Dosen von 100-150 mg pro Tag sinnvoll sein. Nach peroraler Gabe erfolgt die Resorption rasch und nahezu vollständig. Die Bioverfügbarkeit wird mit mehr als 85% angegeben [Peterson et al., 1985]. Nach einmaliger oraler Applikation von 20 mg Baclofen an gesunden Probanden wurden nach 2 Stunden maximale Blutspiegel von 340 ng/ml bestimmt [Peterson et al., 1985].

Die intrathekale Dauerapplikation von Baclofen erfolgt anfänglich mit einer Bolusdosis von 200-1500 µg und wird anschließend mit einer kontinuierlichen Rate von 500-2000 µg/Tag fortgesetzt [Müller et al., 1987; Saissy et al., 1992]. Die Dosis muss dabei individuell auf den Patienten eingestellt werden, um eine optimale nebenwirkungsarme Therapie (Bradykardie, Hypotonie) zu gewährleisten. Die Wahl der Position des Katheters kann ebenfalls zur Verbesserung der Therapie beitragen: Bei Spastiken der unteren Extremitäten wird der Katheter eher im Bereich des unteren Thorax implantiert, bei Spastiken der oberen Extremitäten werden craniale Positionen des Katheters bevorzugt.

Die Elimination des Baclofens erfolgt über den Urin, mehr als 85% werden unverändert ausgeschieden. Etwa 15% einer applizierten Baclofendosis wird in der Leber v.a. durch Deaminierung metabolisiert [Wuis et al., 1989a]. (R/S)-4-Hydroxy-3-(4-Chlorphenyl)buttersäure stellt den Hauptmetaboliten des Baclofens dar. Aufgrund von Berichten über erhöhte Leberenzym Spiegel sollte die Leberfunktion in regelmäßigen Abständen überprüft werden [Kita und Goodkin, 2000].

Bei Patienten mit intakter Nierenfunktion beträgt die Eliminationshalbwertszeit 4-7 Stunden. Die Plasmaeiweißbindung ist mit $30 \pm 11\%$ gering, das Verteilungsvolumen beträgt beim Menschen durchschnittlich 34 l, die systemische Clearance 180 ml/min. Die renale Clearance entspricht mit 103 ml/min [Honc et al., 1985] in etwa der Creatininclearance und damit der glomerulären Filtrationsrate der Niere. Bei Patienten mit einer Nierenfunktionsstörung sollte entsprechend der Creatininclearance eine Dosisreduktion vorgenommen werden.

Shellenberger et al. [1999] führten eine pharmakokinetische Studie mit Baclofen im Steady-state durch, in deren Verlauf an sieben aufeinanderfolgenden Tagen dreimal täglich 10 mg Baclofen gesunden männlichen Probanden appliziert wurde. Die Arzneistoffapplikation erfolgte im Abstand von 8 Stunden. Folgende pharmakokinetische Parameter wurden für Baclofen im Steady-state-Bereich ermittelt: C_{max} 211 ng/ml, t_{max} 1,2 h, k_{el} $0,11 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2}$ 6,6 h, CL_{ren} 151 ml/min. Unverändert wurden in dieser Studie 80,9% der Dosis ausgeschieden.

1.1.3.1.3. Alternativen zur Therapie der Spastik mit Baclofen

Die Einführung des Baclofens als Antispastikum stellte vor 30 Jahren ein Meilenstein in der Pharmakotherapie der Bewegungsstörungen dar. Dennoch gibt es eine Reihe von Therapieversagern, also Patienten, bei denen trotz Erhöhung der Baclofendosis ein therapeutischer Erfolg in Form eines verringerten Muskeltonus ausbleibt. Trotz der Probleme einer medikamentösen Therapie mit Baclofen führt die Therapie der Spastik ein Schattendasein [Noth, 2000]. Nur eine

weitere Substanz, das Tizanidin, ein α_2 -adrenerger Agonist, wurde Anfang der 80iger Jahre zur Behandlung der Spastik zugelassen. Memantin und Dantrolen haben nur eine geringe Bedeutung in der Praxis erlangt, so dass heute neben Baclofen und Tizanidin [Shellenberger et al., 1999] nur einige Benzodiazepine, v.a. Diazepam, eine Rolle in der Pharmakotherapie der Spastik spielen. Die fehlende Entwicklung neuartiger Antispastika liegt z.T. sicher in dem noch immer nicht vollständig geklärten pathophysiologischen Mechanismus der Spastik sowie im Fehlen eines geeigneten Tiermodells begründet. Hinweise auf einen antispastischen Effekt des Levodopas [Eriksson et al., 1996] fanden bisher kaum Beachtung, obwohl diese Beobachtung bei einem Patienten mit Tetraspastik bestätigt wurde [Brunstrom et al., 2000]. Das als Antiepileptikum zugelassene Gabapentin könnte sich ebenfalls in der Therapie der Spastik als vorteilhaft erweisen [Priebe et al., 1997; Dunevsky und Perel, 1998].

Fortschritte in der Therapie der Spastik wurden dagegen in den letzten Jahren durch die Behandlung mit Botulinumtoxin erzielt. Im terminalen Axon des Motoneurons verhindert Botulinumtoxin über eine Blockade bestimmter Proteine die Vesikelexozytose und somit die Freisetzung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt.

Die Verwendung von Baclofenpumpen führte bei einigen therapierefraktären Patienten zum Einsetzen der therapeutischen Wirkung. Somit stellt die intrathekale Dauerapplikation von Baclofen nicht selten die einzig wirksame Therapieform dar [Vogt und Urban, 2000]. Die Kombination einer intrathekalen Applikation von Baclofen und einer intramuskulären Applikation von Botulinumtoxin führte zu einer weiteren Optimierung der Pharmakotherapie.

1.1.3.1.4. Resorption von Baclofen: Einfluss aktiver Transportprozesse

Die rasche und nahezu vollständige Resorption des Baclofens und die Aminosäurestruktur deuten darauf hin, dass bei der Passage durch die Enterozyten des Darmes bzw. durch die Blut-Hirn-Schranke aktive Transportprozesse eine Rolle spielen könnten. Merino et al. [1989] perfundierten simultan drei verschiedene Darmabschnitte der Ratte. Der intestinale Transport ließ sich durch Natriumazid, einen Enzyminhibitor, signifikant reduzieren. Dies deutet auf aktive Transportprozesse hin. Bezüglich der intestinalen Absorption von Baclofen wurden Interaktionen mit verschiedenen α -, β - und γ -Aminosäuren beschrieben. Cercos-Fortea und Mitarbeiter [1995] beobachteten eine nicht vollständige Inhibition der Baclofenpermeabilität durch Zusatz von Leucin, einem Substrat des Carriers für langkettige neutrale Aminosäuren (L-Typ). Cejudo-Ferragud et al. [1996] untersuchten in ihren Studien den Einfluss von Phenylalanin (ebenfalls einem Substrat des Systems L) auf die Permeabilität des Baclofens. Verschiedene Konzentrationen von Phenylalanin (0-100 mM) wurden zur kompetitiven Hemmung eingesetzt, eine vollständige Hemmung wurde jedoch nicht erzielt. Obwohl die Transporter des L-Systems auch an der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert sind [van Asperen et al., 1997], erreicht nur ein sehr geringer Anteil einer applizierten Baclofendosis das zentrale Nervensystem.

Der Transport über α -Aminosäurecarrier (L-Typ) ist erstaunlich, da es sich beim Baclofen um eine γ -Aminosäure handelt. Dies weist auf die breite Substratspezifität dieses Carriers hin.

Moll-Navarro et al. [1996] untersuchten den Einfluss von Taurin – einer β -Aminosulfonsäure – auf die intestinale Permeabilität des Baclofens im in-situ perfundierten Jejunum der Ratte. Der Transport des Taurins erfolgt im Intestinum vorwiegend durch einen β -Aminosäure-spezifischen Carrier (TAUT), der auch im ZNS lokalisiert ist. Die Studie zeigte eine sättigbare Inhibition der Baclofenpermeation unter dem Einfluss verschiedener Taurinkonzentrationen. Da auch in diesem Fall die Inhibition nicht vollständig war, wurde ein zusätzliches Transportsystem vermutet.

Weitere Studien, die mögliche Interaktionen von Baclofen mit Aminosäuren an Transportern aufdecken sollten, zeigten eine signifikante Reduktion der Baclofenpermeabilität durch Coperfusion mit β -Alanin [Polache et al., 1991] und γ -Aminobuttersäure [Nacher et al., 1994].

Ein stereoselektiver Transport durch die intestinale Membran konnte bisher nicht direkt nachgewiesen werden [Wuis et al., 1989b], allerdings zeigte sich in Studien von van Bree et al. [1991] ein stereoselektiver Transport der beiden Enantiomeren durch die Blut-Hirn-Schranke. Das Transportprofil der Enantiomeren und des Razemates durch die Blut-Hirn-Schranke unterschied sich sowohl in der Geschwindigkeit als auch im Ausmaß des Transportes: Die Daten ließen vermuten, dass das inaktive S-Enantiomer eine höhere Affinität zum Carrier besitzt, das R-Enantiomer aber

effizienter transportiert wird. Das S-Enantiomer beeinflusst somit negativ den Transport des Eutomers [Spahn-Langguth et al., 2002].

Deguchi et al. [1995] lieferten eine mögliche Erklärung für die geringen Konzentrationen von Baclofen im Gehirn im Vergleich zum Blut bzw. Plasma. Nach gleichzeitiger intravenöser Applikation von Probenecid (20 mg/kg KG), einem Substrat des Anionentransporters (OAT), waren die Baclofenkonzentrationen in der ISF gegenüber der Kontrolle um den Faktor 3 erhöht, während die Plasmakonzentrationen nahezu unverändert blieben. Die Autoren folgerten somit, dass die eingeschränkte Distribution von Baclofen in die Interstitialflüssigkeit zumindest teilweise durch ein effizientes Probenecid-sensitives Effluxsystem bedingt ist.

1.1.3.2. Gabapentin

Gabapentin (1-(Aminomethyl)cyclohexanecarbonsäure) wurde ursprünglich als GABA_A-Agonist (GABA-Strukturanalogon) synthetisiert, mit dem Ziel die Lipophilie der γ -Aminobuttersäure (GABA) und somit die passive Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen. Gabapentin besitzt zwei pK_a-Werte von 3,68 und 10,70 bei 25°C und liegt somit unter physiologischen Bedingungen als

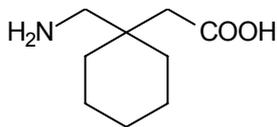


Abbildung 2:

Strukturformel von Gabapentin

zwitterionische Verbindung vor. Gabapentin (Neurontin[®]) besitzt neuroprotektive sowie antiepileptische Eigenschaften. Die Molekülstruktur des Gabapentins lässt eine Aminosäurestruktur erkennen. Gabapentin weist jedoch kein Chiralitätszentrum auf und die Aminogruppe ist nicht α -ständig lokalisiert. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu GABA besitzt Gabapentin nur beschränkte Affinität zum GABAergen System. Es wirkt weder inhibitorisch auf den GABA-Uptake noch auf den GABA-Abbau. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch nicht bekannt. Es wurde allerdings nachgewiesen, dass Gabapentin den GABA-Gehalt einiger Gehirnregionen erhöht [Chadwick, 1994]. Gabapentin bindet an eine spezifische Bindungsstelle, die nur im

ZNS lokalisiert ist. Dabei handelt es sich vermutlich um ein Protein, das vorwiegend auf den Neuronen lokalisiert ist und das außer Gabapentin kein weiteres bekanntes Antiepileptikum bindet. Die Proteindichte ist im Neocortex der Ratte sowie in den Gebieten, die reich an glutaminergen Synapsen sind, am höchsten [Hill et al., 1993, McLean, 1994]. Die Bedeutung der Bindungsstelle für den antiepileptischen Effekt des Gabapentins ist bisher jedoch unbekannt.

1.1.3.2.1. Therapeutische Bedeutung

Unter Epilepsie versteht man den Oberbegriff für chronische Anfallsleiden verschiedener Ursachen, z.B. infolge hirngestörter Erkrankungen (symptomatische Epilepsie), Stoffwechselstörungen (metabolische Epilepsie), familiärer Belastung (hereditäre Epilepsie) oder ohne nachweisbare Ursache (genuine Epilepsie). Die Epilepsie ist gekennzeichnet durch anfallsartig auftretende, zeitlich begrenzte, unkontrollierte Erregungen [Lüllmann et al., 1996] und durch das Auftreten cerebraler Anfälle, die mit generalisierten oder aber mit begrenzten Krämpfen einhergehen. Teilweise geht dem Anfall eine Aura voraus.

Die Einteilung der Epilepsie erfolgt in:

- generalisierte und fokale Anfälle
- Anfälle mit und ohne Bewusstseinsverlust
- Anfälle mit und ohne bekanntem Auslöser

Antiepileptika dienen der Prophylaxe epileptischer Anfälle, da eine akute Behandlung aufgrund der kurzen Dauer des Anfalls nicht möglich ist. Auslöser für epileptische Anfälle sind sogenannte "Schrittmacherzellen", die im Gegensatz zu anderen Nervenzellen ein instabiles Ruhemembranpotential aufweisen, d.h. dass nach Beendigung eines Aktionspotentials ein depolarisierender Strom fortbesteht. Antiepileptische Pharmaka sollen das Ruhemembranpotential stabilisieren und damit die Erregbarkeit der Nervenzellen reduzieren. Zunächst wird mit Hilfe einer

Monotherapie versucht, beim Patienten eine Anfallsfreiheit zu erreichen. Ist dies nicht möglich so wird die Kombination mit einem "Add-on"-Therapeutikum empfohlen. Gabapentin wird sowohl bei partiellen als auch bei generalisierten Anfällen als "Add-on"-Therapeutikum eingesetzt, wofür es aufgrund seiner fehlenden Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen mit Mitteln der ersten Wahl (Valproat bei generalisierten und Carbamazepin bei fokalen Anfällen) besonders geeignet ist. Der genaue Wirkungsmechanismus ist bei vielen Antiepileptika bisher nicht geklärt, prinzipiell kann die Erregbarkeit durch die Hemmung exzitatorischer oder durch die Aktivierung inhibitorischer Nervenzellen reduziert werden. Glutamat als wichtigster exzitatorischer, sowie GABA als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter stellen daher die Angriffsorte vieler Antiepileptika dar. Gabapentin soll die Bereitstellung von Glutaminsäure, der Ausgangssubstanz der GABA-Synthese erhöhen. Darüber hinaus soll Gabapentin die Glutamatdecarboxylase im ZNS stimulieren und damit zu einer erhöhten Bildung von γ -Aminobuttersäure aus Glutaminsäure führen.

Studien von Ng et al. [2001] zeigten, dass Gabapentin einen selektiven Agonisten an postsynaptischen GABA_B-gb1a-gb2 Rezeptoren darstellt, die mit Kaliumkanälen gekoppelt sind.

Gabapentin ist bei erwachsenen Patienten mit refraktären partiellen Anfällen (mit oder ohne sekundär generalisierte tonisch-klonische Krämpfe) indiziert [Chadwick, 1994]. Die Dosierung erfolgt einschleichend und wird innerhalb der ersten Woche bis auf 1200 mg pro Tag, aufgeteilt in drei gleichen Dosen, eingestellt. Anschließend kann in Abhängigkeit vom therapeutischen Effekt eine Erhöhung der Dosis bis auf 1800 bis 2400 mg täglich in Betracht gezogen werden. Aufgrund der günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften des Gabapentins, vor allem aufgrund seiner großen therapeutischen Breite und dem geringen Interaktionspotential, kann auf ein therapeutisches Drug Monitoring (TDM) verzichtet werden.

1.1.3.2.2. Pharmakokinetik von Gabapentin

Pharmakokinetische Parameter sind in der Beurteilung neuer Arzneistoffe von großer Bedeutung. Gabapentin verfügt im Vergleich zu traditionellen Antiepileptika, die häufig eine geringe therapeutische Breite und ein hohes Interaktionspotential aufweisen, über günstige pharmakokinetische Eigenschaften. Gerade im Hinblick darauf, dass Monotherapien häufig nicht ausreichen, um ein Ausbleiben epileptischer Anfälle sicherzustellen, sind Wechselwirkungen unter Antiepileptika häufig.

Nach oraler Gabe wird Gabapentin gut resorbiert. Pharmakokinetische Studien geben die Bioverfügbarkeit nach einer einzelnen Dosis von 300 mg Gabapentin mit $57 \pm 10\%$ an. Maximale Blutspiegel werden 1-3 Stunden nach peroraler Gabe erzielt. Nach dreimal täglicher Applikation von 300 mg liegen die Peak-Plasmakonzentrationen im Steady-State-Bereich bei 4 $\mu\text{g/ml}$ [Richens, 1993]. Trotz der Sättigbarkeit der aktiven Transportprozesse [Stewart et al., 1993] steigen die Gabapentinspiegel nach Gabe therapeutischer Dosen nahezu linear an. Dies deutet darauf hin, dass bis zu einer täglichen Dosis von 1800 mg keine Sättigung des aktiven Transportes einsetzt [US Gabapentin Study, 1993]. Bei Dosen über 1800 mg täglich setzt dann allerdings eine Sättigung ein, die bei etwa 3600 mg täglich ein Plateau erreicht. Nach einer Dosis von 4800 mg pro Tag wird die Bioverfügbarkeit auf nur noch 35% geschätzt [Richens, 1993].

Vollmer et al. [1986] führten pharmakokinetische Untersuchungen unter Verwendung von [¹⁴C]-markiertem Gabapentin nach intravenöser sowie nach intragastraler Applikation an Ratten bzw. Hunden sowie nach peroraler Gabe am Menschen durch. Gabapentin wird sowohl bei Ratten und Hunden als auch beim Menschen gut resorbiert. Nach intravenöser Applikation in der Ratte stellten sich nach einer kurzen Distributionsphase annähernd gleiche Konzentrationen im Blut und Gehirn ein. Maximale Konzentrationen wurden im Pankreas und der Niere, minimale im Fettgewebe gefunden. Im Menschen wird das Verteilungsvolumen mit 58 l angegeben. Aufgrund der fehlenden Bindung an Plasmaproteine (Humanplasmaproteine, Humanserumalbumin) deutet dies auf eine ausgeprägte Verteilung in die Organe hin. Darüber hinaus wirkt Gabapentin nicht induzierend auf die Leberenzyme, so dass kinetische Interaktionen auf metabolischer Ebene unwahrscheinlich sind, ebenso wie Interaktionen basierend auf einer Verdrängung aus der Proteinbindung.

Gabapentin wird ähnlich wie Baclofen kaum metabolisiert: Beim Menschen [Stewart et al., 1993] wird keine, bei der Ratte nur eine geringfügige Biotransformation beobachtet. Hunde dagegen bilden das Biotransformationsprodukt N-Methyl-Gabapentin in deutlichem Maße.

Die Elimination des Gabapentins erfolgt vorwiegend renal. Bei Ratten werden 99,8% und beim Menschen 80% unverändert über den Urin ausgeschieden. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt bei der Ratte 2-3 Stunden, bei Hunden 3-4 Stunden und beim Menschen 5-6 Stunden [McLean 1994; Vollmer et al., 1986]. Die Clearance entspricht in etwa der Creatininclearance [Leach und Brodie, 1995] und somit der glomerulären Filtrationsrate der Niere. Die Dosierung sollte sich an der Nierenfunktion orientieren und bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen angepasst werden, da es sonst zu einer Erhöhung der Eliminationshalbwertszeit kommen kann. Bei einer Creatininclearance von 41 ml/min steigt die Eliminationshalbwertszeit auf 16 Stunden. Beträgt die Creatininclearance nur noch 13 ml/min, so steigt die Eliminationshalbwertszeit sogar auf 42 Stunden [McLean, 1994].

Sivenius et al. [1994] berichteten, dass ein therapeutischer Effekt erst ab einer Plasmakonzentration von 2 µg/ml einsetzt. Trotz der vermuteten Korrelation von Plasmakonzentration und antiepileptischem Effekt sollte sich die Dosis eher an dem klinischen Effekt als an dem Erreichen einer spezifischen Plasmakonzentration orientieren.

1.1.3.2.3. Resorption von Gabapentin: Einfluss aktiver Transportprozesse

Das Ausmaß der Gabapentinresorption im Menschen sinkt mit ansteigender Dosis [Stewart et al., 1993; Dichter und Brodie, 1996]. Da Gabapentin nicht metabolisiert wird und andererseits gut wasserlöslich ist, ist die Sättigung eines aktiven Transportprozesses eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen.

Luer et al. [1999] berichteten, dass der Transport von Gabapentin durch die Blut-Hirn-Schranke durch den Carrier für langkettige, neutrale Aminosäuren (L-Typ) vermittelt wird. Der aktive Transport ins ZNS erfolgt durch das L-System, obwohl Gabapentin, wie Baclofen, keine α -Aminosäure darstellt. In Übereinstimmung mit einem Carrier-vermittelten Transportprozess ist die Gabapentinresorption sättigbar und durch verschiedene große neutrale Aminosäuren hemmbar [Stewart et al., 1993]. Sowohl L-Leucin als auch L-Phenylalanin inhibieren den aktiven Transport von Gabapentin. Gidal et al. [1996] untersuchten den Einfluss einer proteinreichen Mahlzeit auf die Pharmakokinetik des Gabapentins. Interessanterweise wurden sogar höhere maximale Blutkonzentrationen erzielt, ebenso war die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Konzentration verkürzt. Die Autoren erklären diesen Befund mit einer möglichen raschen Hochregulation der Aminosäuretransporter durch die hohe luminal vorliegende Aminosäurekonzentration im Intestinum. Der Gabapentintransport durch intestinale Brush-Border-Membran-Vesikel (BBMV) der Ratte und des Kaninchens ist Natrium-unabhängig [Piyapolrunroj et al., 2001]. Darüber hinaus ist die Gabapentinabsorption nicht in allen Darmabschnitten identisch: Im Vergleich zum Jejunum erwies sich der Transport im Duodenum und Ileum als signifikant höher. Vermutlich wird der Gabapentintransport auch durch das System $b^{0,+}$ vermittelt. Dies ist möglich, da Gabapentin bei physiologischem pH im Gastrointestinaltrakt in zwitterionischer Form vorliegt. Obwohl Gabapentin eine neutrale Aminosäure ist, zeigten Studien an Caco-2-Zellen auch eine Inhibition des Gabapentintransportes durch die saure Aminosäure Arginin [Stewart et al., 1994]. Su et al. [1995] bestätigten den Transport durch den Carrier des L-Systems in Astrozyten und CHO-Zellen, dagegen konnten sie keine Interaktionen mit den Aminosäuren GABA, Glutamat und Arginin feststellen.

1.2. Schrankeneffekte des Körpers

Vor der Aufnahme in den Blutkreislauf bzw. vor der Verteilung in andere Organe müssen applizierte Substanzen zunächst verschiedene Barrieren passieren, die den Körper gegen äußere Einflüsse abgrenzen und schützen sollen. Neben der Haut dienen dabei verschiedene Schleimhäute dem Organismus als "äußere" Schranke, ebenso wie Blut-Gewebe-Schranken zusätzlich als "innere" Schranken fungieren. Die Zellmembranen weisen trotz unterschiedlicher Strukturmerkmale gemeinsame Charakteristika auf: Eine Lipiddoppelschicht (8-12 nm) aus Phospholipiden, Cholesterol und Glykolipiden, die über hydrophobe Wechselwirkungen lamellare Strukturen ausbilden. Die hydrophilen Köpfe der Phospholipide sind dabei nach außen gerichtet. In die

Membran sind Proteine eingelagert, die als Enzyme (z.B. Saccharase, Amino-peptidase der Darmschleimhaut) oder als Transportproteine fungieren.

Epithelien sind geschlossene Zellverbände, die interzelluläre Verbindungen aufweisen und durch eine Basalmembran gegen das daruntergelegene Bindegewebe abgegrenzt sind. Hierbei unterscheidet man äußere und innere Epithelien, je nachdem ob es sich um eine äußere Schranke oder um eine Gewebe-Schranke handelt.

1.2.1. Äußere Schranken des Körpers

1.2.1.1. Intestinum

Erfolgt die Applikation z.B. eines Arzneistoffes peroral, so gelangt die Substanz nach Passage der Mundhöhle und des Magens in das Intestinum. Die Wand des Gastrointestinaltraktes besitzt neben ihrer Bedeutung in der Homöostase und der Absorption von Nahrungsbestandteilen auch wichtige Funktionen im Metabolismus und im Schutz vor Xenobiotika.

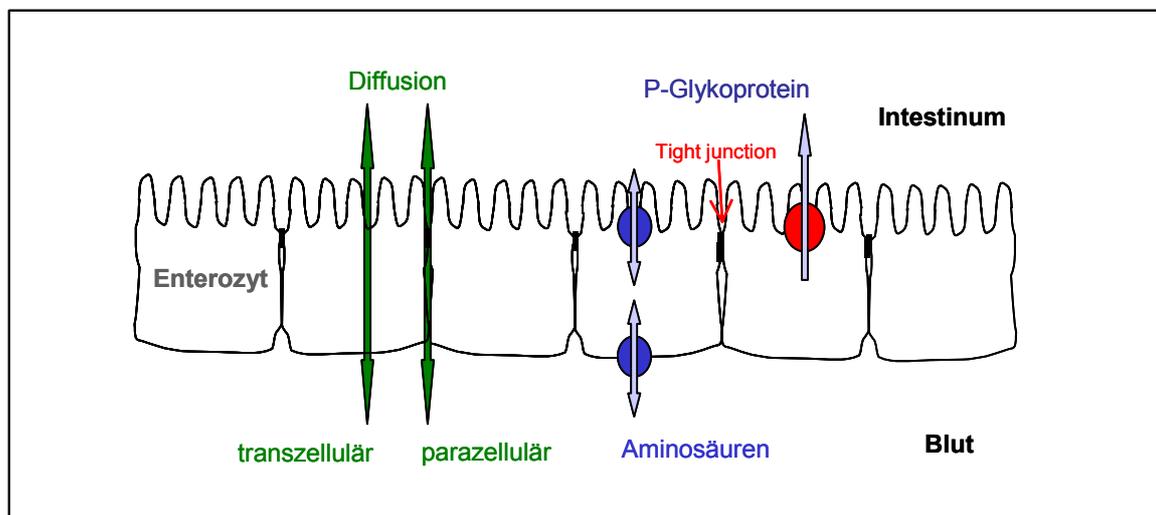


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Enterozyten des intestinalen Epithels: Passive Diffusion und aktive – absorptive sowie exsorptive – Transportprozesse bestimmen die Resorptionsrate einer Substanz

Aufgrund der im Vergleich zum Magen großen Oberfläche des Darmes dient v.a. das Darmepithel als Absorptionsbarriere. Die große Oberfläche des Darmes liegt in der anatomischen Besonderheit begründet mit Kerckringschen Falten, Zotten (Villi) sowie den sogenannten Enterozyten, die die typische Bürstensaummembran (Microvilli) auf der apikalen Seite der Membran tragen. Zur apikalen Seite der Membran sind die Enterozyten durch Tight junctions (Zonula occludens) verbunden. Diese stellen einen "Verschmelzungsbereich" zweier benachbarter Zellen dar, in dem sich die Phospholipidmembranen der Zellen sehr nahe annähern und über Proteine, die in der Membran integriert sind, verbunden sind. Im Bereich des Intestinums sind die Zonulae occludentes als Barriere nur einreihig, in anderen Organen, wie z.B. dem Gehirn sind die Endothelzellen dagegen durch mehrere Reihen an Tight junctions noch effektiver gegen den parazellulären Transport von Substanzen geschützt. Im Intestinum existieren in den Wänden der Kapillaren sogenannte Fenster, also Poren, durch die vor allem niedermolekulare Substanzen ungehindert passieren können. Die Beobachtung, dass Nährstoffe, wie Glucose, Aminosäuren, Peptide und Vitamine trotz ungünstiger physikochemischer Parameter sehr effektiv und mit großer Geschwindigkeit resorbiert werden, weist darauf hin, dass nicht nur rein passive Prozesse am Absorptionsgeschehen beteiligt sein können.

Spezifische Transportsysteme, die sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Membran der Enterozyten lokalisiert sein können, tragen zur Resorption solcher Substanzen bei. Es existieren jedoch auch bioverfügbarkeitslimitierende Prozesse in den Enterozyten, darunter sekretorische Transporter und metabolische Prozesse, die vor allem durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen, Sulfotransferasen und Glucuronyltransferasen bedingt sind.

1.2.1.2. Mund- und Nasenschleimhaut

Die guten Resorptionseigenschaften der Mund- und Nasenschleimhaut werden bei der sublingualen, buccalen bzw. intranasalen Applikation von Arzneistoffen ausgenutzt. Die Membranen der Zellen bestehen aus einem mehrschichtigen, aber unverhornten Plattenepithel, deren Zellen im Gegensatz zum Intestinum und Resorptionstrakt nicht durch Tight junctions, sondern durch Desmosomen, die nur punktuelle Kontakte ausbilden, miteinander verbunden sind und den Interzellularraum somit nicht abdichten. Statt der Tight junctions besitzen die Zellen der Mundschleimhaut allerdings die Besonderheit, phospholipidhaltige Membranfragmente abzusondern, die sich extrazellulär zu Schichten anordnen und somit ebenfalls eine kontinuierliche Barriere bilden. Nach sublingualer bzw. intranasaler Applikation werden Substanzen – unter Umgehung des First-Pass-Effektes der Leber – über die obere Hohlvene in den Blutkreislauf transportiert. Somit wird ein rascher Wirkungseintritt gewährleistet. Nachteilig ist die kleine Oberfläche der Mund- und Nasenschleimhaut. Die Umgehung des Magens ist besonders interessant für Arzneistoffe, die nach oraler Applikation im Magen-Darm-Trakt zersetzt würden [Langguth, 2000]. Ein weiterer Nachteil der intranasalen Applikation stellt die geringe Zeit dar, die aufgrund der Ziliaraktivität des respiratorischen Epithels für die Resorption des Arzneistoffes zur Verfügung steht. Darüber hinaus besitzt die Nasenschleimhaut, die zahlreiche Peptidasen und Proteasen enthält, eine hohe metabolische Kapazität. In der Therapie etablierte Arzneistoffe zur nasalen Applikation sind z.B. Desmopressin, zur Therapie des Diabetes insipidus, sowie Gonadoliberein-Analoga zur Behandlung von Prostata-Karzinomen. Bei beiden Substanzen handelt es sich um säurelabile Oligopeptide, die im sauren Mageninhalt zersetzt würden. Sakane et al. [1999] erzielten durch intranasale Applikation des hydrophilen 5-Fluorouracil (5FU) signifikant höhere Konzentrationen in der CSF als nach intravenöser Applikation.

1.2.1.3. Respirationstrakt

Die Flimmerepithelzellen des Respirationstraktes sind ebenfalls durch Tight junctions an der apikalen Seite der Membran verbunden, die somit eine kontinuierliche Barriere zum Interstitialraum darstellen.

1.2.1.4. Haut

Die Haut bildet ebenso wie die Mundschleimhaut ein mehrschichtiges Plattenepithel, das aber im Gegensatz zur Schleimhaut stark verhornt ist. Die vorhandene kontinuierliche Phospholipidbarriere ermöglicht nur lipophilen Substanzen den Transport durch die Haut.

1.2.2. Blut-Gewebe-Schranken

Nach Absorption der Wirkstoffe in das Blut werden die Substanzen verschiedenen Verteilungsvorgängen unterworfen. Dabei müssen die Arznei- oder Nahrungsstoffe weitere Barrieren überwinden. Die eigentlichen Blut-Gewebe-Schranken bilden dabei die Wände der Kapillaren, da diese aufgrund ihrer Verzweigung eine sehr große Oberfläche bei einer geringen Strömungsgeschwindigkeit des Blutes aufweisen. Die Kapillarwand, die neben der Endothelzellschicht aus der sie umhüllenden Basalmembran besteht, weist Tight junctions auf, so dass der Stofftransport durch

das Interstitium behindert ist. In Abhängigkeit vom Organ ist die Durchlässigkeit der Kapillarwände sehr unterschiedlich.

1.2.2.1. Blut-Hirn-Schranke

Das Konzept einer Schranke zwischen Blut und Gehirn kam erstmals im Jahre 1885 durch den Bakteriologen Paul Ehrlich auf, der feststellte, dass in das Blut injizierte Farbstoffe, z.B. eine Reihe von Anilinderivaten, sich schnell in alle Organe mit Ausnahme des Gehirns verteilten. Diesen Befund interpretierte Ehrlich mit einer geringeren Affinität der Farbstoffe zum Gehirn. In nachfolgenden Untersuchungen injizierte Edwin Goldmann, ein Student Ehrlichs, Trypanblau direkt in die Cerebrospinalflüssigkeit von Kaninchen und Hunden. Dabei verteilte sich der Farbstoff rasch im gesamten Gehirn, trat aber nicht in das Blut und andere periphere Organe über. Dieses Experiment machte deutlich, dass das zentrale Nervensystem durch eine Art Barriere vom Blut abgetrennt sein muss. Ende der 60iger Jahre konnte die Hypothese, dass die Hirnkapillaren die anatomische Basis der Blut-Hirn-Schranke darstellen, mittels Elektronenmikroskopie bestätigt werden.

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zwischen dem Kapillarendothel und dem Extrazellularraum des ZNS wird durch die Endothelzellen der Hirnkapillaren, die umgebenden Perizyten und die umgebende kontinuierliche Basalmembran gebildet. Die Endothelzellen des Gehirns sind durch Tight junctions fest miteinander verknüpft [Drewes, 1999]. Im Gegensatz zu den Tight junctions der Körperperipherie sind die Verschmelzungen der Hirnendothelien mehrreihig und weisen einen hohen elektrischen ($1500-2000 \Omega\text{cm}^2$) [Butt et al., 1990] sowie hydraulischen Widerstand auf. Die Kapillarendothelien zeichnen sich darüber hinaus durch die fehlende Fenestrierung [Tamai und Tsuji, 2000] und eine geringe transzytotische Aktivität aus. Obwohl 99% der Kapillaroberfläche von Ausläufern der Astrozyten besetzt sind, tragen diese aufgrund der immer noch verbleibenden erheblichen Abstände zwischen den Zellen nicht zur Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke bei.

Substanzen, die in das Gehirn aufgenommen werden sollen, müssen die Endothelzellen passieren. Ein parazellulärer Transport findet aufgrund der dichten Tight junctions kaum statt, lediglich sehr kleine hydrophile Moleküle (Sauerstoff, Kohlendioxid) können das Gehirn durch parazelluläre Diffusion erreichen. Alle anderen Substanzen müssen die Endothelzellen transzellulär passieren [Goldstein und Betz, 1986; Pardridge, 1988]. Lipophile Substanzen mit Molekulargewichten <700 Da (z.B. Alkohol, Narkotika, Antikonvulsiva, Coffein, Nicotin) diffundieren dabei gut durch die Blut-Hirn-Schranke, ebenso wie undissoziierte und nicht proteingebundene Substanzen. Die Beschränkung auf Moleküle mit einem Molekulargewicht <700 Da wurde früher mit einer sterischen Hinderung grosser Moleküle erklärt, heute weiss man, dass höhermolekulare Substanzen häufig Substrate des exsorptiven Transporters P-Glykoprotein darstellen.

Trotz der zu erwartenden geringen Permeabilität hydrophiler Substanzen durch die BHS zeichnen sich viele polare Substanzen durch eine sehr hohe Transportrate durch die Blut-Hirn-Schranke aus, die in der Existenz spezifischer aktiver Transporter begründet ist. Viele Carrier, die im Intestinum lokalisiert sind, finden sich auch in der Blut-Hirn-Schranke, dazu gehören sowohl absorptiv gerichtete Transporter z.B. für Glucose (GLUT-1, [Pardridge, 1993]) und Aminosäuren, als auch exsorptive Transporter wie das P-Glykoprotein [Tsuji et al., 1992; Tatsuta et al., 1992], das MRP als Transporter für organische Anionen [Kusuhara et al., 1998] sowie Transporter für anionische und kationische zyklische Peptide [Tamai und Tsuji, 2000].

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene in der Blut-Hirn-Schranke lokalisierte – absorptive und sekretorische – Transporter sowie beispielhafte Substrate [Tamai und Tsuji, 2000]

absorptiv		sekretorisch	
Transportsystem	Substrat	Transportsystem	Substrat
Hexosen	D-Glucose	P-Glykoprotein	Vinca-Alkaloide
Monocarbonsäuren	Lactat	Monocarbonsäuren (MCT1)	Valproinsäure
Neutrale Aminosäuren	Phenylalanin	MRP	Organische Anionen
Saure Aminosäuren	Glutamat		
Basische Aminosäuren	Arginin		
Amine	Cholin		
Peptide			
Nucleoside	Adenosin		
Purinbasen	Adenin		

Die Funktion der Blut-Hirn-Schranke liegt im Schutz des Hirngewebes vor potentiell toxischen Substanzen, dem Schutz vor Hormonen und Neurotransmittern der Körperperipherie sowie in der Konstanthaltung der Homöostase des Gehirns. Für die Hirnfunktion essentielle Substanzen werden aktiv resorbiert, während exsorptive Transporter die Ausschleusung von Xenobiotika, sowie von Stoffwechselendprodukten ermöglichen. Substanzen, die passiv diffundieren, gelangen in den Interzellularraum der Endothelzellen der Hirnkapillaren, die eine größere Anzahl an Mitochondrien als die übrigen Zellen des Organismus aufweisen. Auch eine große Zahl spezifischer Enzyme [Minn et al., 1991; Brownlees und Williams, 1993; Brownson et al., 1994], wie γ -Glutamyl-Transpeptidase, alkalische Phosphatase, Butyrylcholinesterase, aromatische L-Aminosäuredecarboxylase, Monoaminoxidase A und B, Catechol-O-Methyltransferase, GABA-Transaminase, Adenylatcyclase und Guanylatcyclase ist hier vorhanden. Diese Enzyme katalysieren den metabolischen Abbau aufgenommener Substanzen [Begley, 1996] und sind im Metabolismus der Neurotransmitter involviert [Jolliet-Riant und Tillement, 1999]. Diese zusätzlich zur physikalischen Barriere der Tight junctions existierende Schranke wird als metabolische Barriere bezeichnet.

Pathologische Prozesse können die Funktion der Blut-Hirn-Schranke beeinträchtigen, die Durchlässigkeit erhöhen und somit v.a. zu einem Anstieg der passiven Permeabilität führen. Einige Ursachen für eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke sind:

- Substanzen, die die Funktion der Blut-Hirn-Schranke herabsetzen: Arachidonsäure und Metabolite, Eicosanoide, freie Sauerstoffradikale, Histamin, Bradykinin, Serotonin, Cytokine, PAF, Complementfaktoren
- Hirnödem
- Multiple Sklerose
- Hypertensive Krise
- Hirntumore
- Die Infusion einer hypertonen Mannitol-Lösung führt zu einer vorübergehenden Öffnung der BHS und wird bei Applikation von Zytostatika, die im Gehirn wirken sollen, angewendet.

Aufgrund ihrer physiologischen Schutzfunktion stellt die Überwindung einer intakten Blut-Hirn-Schranke häufig ein Problem bei der Therapie von Erkrankungen des ZNS dar, da viele Arzneistoffe diese aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften nicht überwinden können bzw. transportierter Arzneistoff effektiv wieder durch Effluxtransporter in das Blut sezerniert wird. So erreicht beispielsweise das HIV-Virus das Gehirn über einwandernde, infizierte Makrophagen, die meisten bisher erhältlichen Therapeutika können jedoch die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden, so dass das Virus zwar in den meisten Organen der Körperperipherie gut kontrollierbar und therapierbar ist, das ZNS aber somit einerseits eine Quelle neuerlicher Ausbreitung darstellt und andererseits mit der HIV-bedingten Demenz in Verbindung gebracht wird. AZT, eines der wenigen BHS-gängigen Antiinfektiva nutzt wohl seine strukturelle Ähnlichkeit zum Thymidin aus, um die Blut-Hirn-Schranke aktiv zu passieren.

Führen lipophile Modifikationen der Molekülstruktur oder die Bildung von Prodrugs (L-DOPA) nicht zu einer Permeabilitätssteigerung, so kann unter Umständen über die Art der Applikation (z.B. intrathekal wie im Falle des Baclofens) ein Effekt erzielt werden.

Bei Arzneistoffen, deren Zielstrukturen dagegen periphere Gewebe darstellen, ist eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke unerwünscht, da dies – wie bei den älteren Antihistaminika – zu zentralen Nebenwirkungen führen kann. Die erste Generation H₁-Antihistaminika wird mit verschiedenen zentralen Nebenwirkungen in Verbindung gebracht (Sedierung), während die zweite Generation der H₁-Antagonisten in der Regel nicht sedierend wirkt. Die mangelnde Penetration ins Gehirn kann mit den bisher angenommenen Modellen zur Lipophilie und passiven Diffusion nicht in Einklang gebracht werden und wird daher mit einer Affinität zum Effluxtransporter P-Glykoprotein erklärt. Studien von Chishty et al. [2001] zeigten in einem Uptake-Assay mit [³H]-Colchicin die Akkumulation von Colchicin unter dem Einfluss moderner, nicht-sedierender H₁-Antihistaminika, die in einer ähnlichen Größenordnung lag wie die Akkumulation von Colchicin unter dem Einfluss des P-GP-Modulators Verapamil.

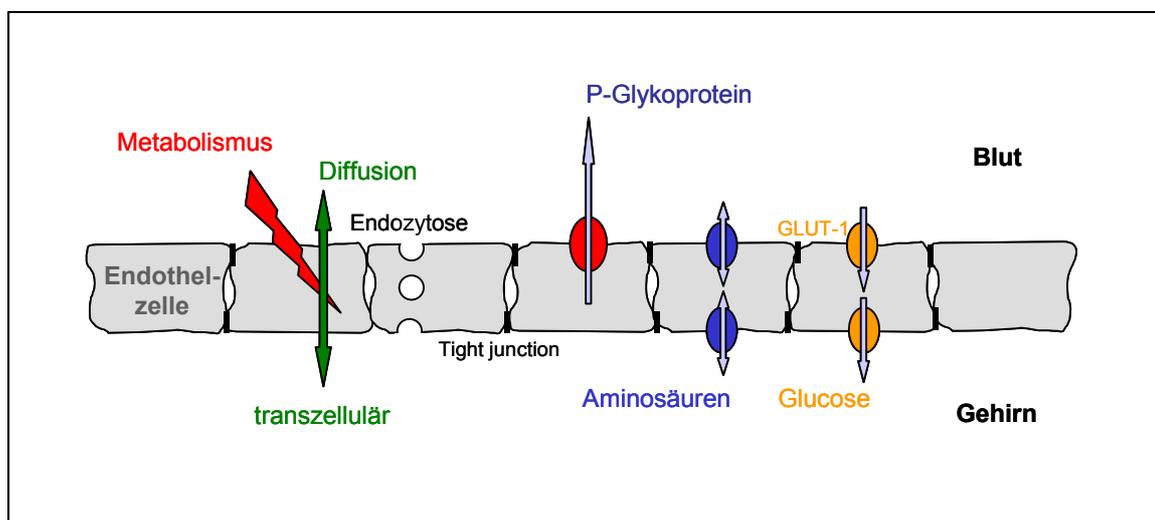


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kapillarendothelzellen als anatomische Grundlage der Blut-Hirn-Schranke sowie einige ihrer passiven und aktiven Transportmechanismen

1.2.2.2. Blut-Plazenta-Schranke

Die Plazenta, als "Schnittstelle" zwischen Mutter und Kind, dient vor allem dem Austausch zwischen mütterlichem und fetalem Blut und dient somit einerseits der Versorgung des Kindes mit Sauerstoff und Nährstoffen, sowie andererseits dem Abtransport von Endprodukten des Stoffwechsels. Ein direkter Kontakt zwischen mütterlichen und fetalen Blutgefäßen besteht allerdings nicht, vielmehr müssen alle Substanzen die Epithelzellen der kindlichen Blutgefäße passieren. Diese Barriere, die sogenannte Plazentaschranke, besteht aus der Kapillarwand sowie aus einer einzelnen Schicht vielkerniger Zellen, den Syncytiotrophoblasten, die den Stoffaustausch zwischen Mutter und Kind einschränkt. In Analogie zu anderen Barrieren ist die Passage abhängig von der Lipophilie, der Ladung und Größe der Substanz sowie der Proteinbindung. Lipophile Arzneistoffe darunter auch einige Drogen (Nicotin, Cocain) können die Plazentaschranke passieren. Andererseits existieren auch in der Plazenta aktive Transportsysteme. Sato et al. [2002] konnten in den Syncytiotrophoblasten der Plazenta den Glucosetransporter GLUT-1 nachweisen. Des Weiteren wurden in der Plazenta bisher 15 verschiedene Aminosäuretransporter identifiziert [Jansson, 2001], darunter Transporter für neutrale sowie für basische und saure Aminosäuren. Ebenfalls existent in der Plazenta ist der humane Taurintransporter (TAUT), der in der Plazenta 100-200fach höhere Taurinkonzentrationen als im mütterlichen Blut aufrechterhält [Philipps et al., 1978; Ramamoorthy et al., 1994]. Neben diesen absorptiven Transportern sind auch in der Plazenta exsorptive Transporter

wie das P-Glykoprotein lokalisiert [Pavek et al., 2001]. Studien von Ushigome [2000] an BeWo-Zellen (einer humanen Chorionkarzinomzelllinie) zeigten, dass sich das P-GP nur in der Brush-Border-Membran der Trophoblasten, also auf der mütterlichen Seite, befindet und dem Schutz des Fötus vor toxischen Substanzen dient.

1.2.2.3. Blut-Retina-Schranke

Die Photorezeptoren der Netzhaut besitzen keinen direkten Kontakt zu Blutgefäßen, statt dessen sind sie auf dem retinalen Pigmentepithel (RPE) lokalisiert, das die Substanzen passieren müssen, um die Sinneszellen zu erreichen. Die Zellen des RPE resorbieren wichtige Nährstoffe (wie Vitamin A zu den Rezeptorzellen) und transportieren Stoffwechselprodukte zurück zu den Kapillaren der Aderhaut. Die retinalen Endothelzellen sind durch besonders dichte Tight junctions gekennzeichnet.

1.3. Membrantransport und Absorptionsmechanismen

Lange Zeit wurde angenommen, dass Substanzen die Epithelzellen verschiedener Organe nur durch verschiedene passive Prozesse überwinden können. Mittlerweile sind jedoch eine Reihe aktiver Transportprozesse bekannt, die auch bei den weniger gut membrangängigen Substanzen mit ausgeprägter Hydrophilie zu einer ausreichenden Bioverfügbarkeit führen.

1.3.1. Diffusion

Die Geschwindigkeit der Diffusion hängt vom Konzentrationsgradienten, also dem Konzentrationsunterschied zwischen apikaler und basolateraler Membran (Ficksches Gesetz) sowie vom Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten ab. Je größer der Konzentrationsgradient und je größer die Lipophilie der Substanz um so größer ist auch die Diffusionsgeschwindigkeit. Des Weiteren wird die Diffusion durch die Perfusion der Organe limitiert und die zu resorbierenden Substanzen müssen gewisse physikochemische Eigenschaften aufweisen. Neben dem Ionisationsgrad, der Molekülgröße, der Protein- und Gewebefixierung sowie der Wasserstoffbrückenbindung einer Substanz spielt die Lipophilie eine große Rolle. Nur lipophile Substanzen können in die Phospholipiddoppelschicht der Zellen eindringen, ins Zellinnere gelangen und von dort die Zelle auch wieder durch die Zellmembran verlassen. Neben dieser transzellulären Diffusion, die quantitativ den größten Beitrag zur passiven Diffusion leistet, ist in bedingtem Ausmaß auch eine parazelluläre Diffusion möglich. In diesem Fall diffundieren die Substanzen nicht durch die Lipidmembranen der Endothelzellen, sondern durch den Interzellularraum, so dass die parazelluläre Diffusion auch für hydrophile Substanzen möglich ist. Allerdings ist die parazelluläre Diffusion stark abhängig vom Aufbau des Endothels des entsprechenden Organs, da die Endothelzellen über unterschiedlich starke "Verschmelzungen" verbunden sind.

Man unterscheidet drei verschiedene Typen von Verbindungen: Gap junctions sind Haftstellen zwischen zwei benachbarten Zellen, über die der Transport von Ionen und kleinen Molekülen (<1500 Da) möglich ist. Tight junctions sind Verschmelzungen der Plasmamembran, die den Stofftransport stark einschränken und die Zelle "gürtelartig" an den interzellulären Spalten umschließen. Während die interzellulären Spalten eine Größe von ungefähr 200 Å besitzen, verengen die Tight junctions diesen Abstand bzw. verschließen die interzellulären Spalten wie an der Blut-Hirn-Schranke komplett. Im Gehirn liegen sogar mehrere Reihen solcher Verschmelzungen vor. Erkennbar wird dies auch an dem hohen elektrischen Widerstand der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Punktförmige Verbindungen stellen die sogenannten Desmosomen dar, die z.B. in der Plazenta, dem Herzen und in der Haut existieren.

1.3.2. Endozytose – Vesikulärer transzellulärer Transport

Absorption via Diffusion ist nur für kleine, niedermolekulare Moleküle möglich. Höhermolekulare Stoffe, wie z.B. Enzyme können Rezeptor-vermittelt durch Einstülpung der Zellmembran und unter Abschnürung von Vesikeln der Zellmembran und Einschluss der aufzunehmenden Substanz absorbiert werden. Je nach Aggregatzustand der Substanz unterscheidet man zwischen der Pinozytose, also der Aufnahme von Flüssigkeitströpfchen, und der Phagozytose von partikulären Substanzen. Kommt es zu einer Verschmelzung der Vesikel mit Lysosomen, zu den sogenannten Phagolysosomen, kann der darin eingeschlossene Arzneistoff abgebaut werden.

1.3.3. Transport

Einige polare Moleküle, darunter viele Nahrungsbestandteile (Aminosäuren, Monosaccharide) sowie Elektrolyte passieren die Endothelzellen mit hoher Geschwindigkeit, trotz ihrer für diffusive Prozesse ungünstigen physikochemischen Eigenschaften. Der Resorption liegen hier häufig Interaktionen mit Transportproteinen zugrunde. Voraussetzung für den Transport ist allein die Affinität zum entsprechenden Carrier. Transportvorgänge sind mehr oder weniger selektiv, sie akzeptieren also teilweise nur ganz spezifische Substanzen als Substrat, andere transportieren eine Reihe strukturell verwandter Substanzen (Aminosäuretransporter) oder aber sie transportieren strukturell stark unterschiedliche Substrate (P-Glykoprotein). Im Allgemeinen arbeiten absorptiv gerichtete Transporter substratspezifischer als sekretorische Transporter. Während die Diffusion als passiver Prozess nicht hemmbar ist, kann der aktive Transport durch Substanzen, die Affinität zur selben Bindungsstelle am Transporter aufweisen, kompetitiv gehemmt werden.

1.3.3.1. Carrier-vermittelter Transport

Die erleichterte Diffusion via passive Carrier erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten, so dass der Transport ohne Verbrauch von Energie ablaufen kann. Im Gegensatz zur rein passiven Diffusion ist dieser Prozess jedoch bei hohen Substratkonzentrationen sättigbar sowie kompetitiv hemmbar.

Die treibende Kraft aktiver Carrier (sekundär aktiver Transport) stellt ein elektrochemischer Gradient dar, der durch die ungleiche Verteilung positiv oder negativ geladener Ionen (Na^+ , H^+ , HCO_3^- , Cl^-) durch die Membranen generiert wird, der durch elektrogene Pumpen erzeugt wird.

1.3.3.2. Aktiver Transport

Neben der Substratspezifität, der kompetitiven Hemmung durch andere Substrate des Transporters sowie der Sättigbarkeit ist der Verbrauch von Energie, häufig unter Spaltung von ATP ein weiteres Charakteristikum aktiver Transportprozesse.

1.4. Transporter

Nach dem humanen Genom-Projekt (human genome project) wird die Zahl menschlicher proteincodierender Transkripte auf 30000 geschätzt [Venter et al., 2001], darunter sollen 533 für Transporter organischer und anorganischer Substanzen kodieren.

Die meisten der bisher bekannten Transporter werden in einer der beiden Superfamilien, der "solute carrier"-Familie (SLC) oder der Familie der ABC-Transporter zusammengefasst.

Die SLC-Superfamilie ist in 32 Subfamilien gegliedert. Nur drei dieser Familien stellen intrazelluläre Transporter dar, während die Mehrzahl der Carrier an der Plasmamembran der Zellen lokalisiert ist.

Von diesen scheint nur ein Teil eine Bedeutung für den Transport von Arzneistoffen zu besitzen. Dazu gehören die Transporter der Familie 22, die organischen Kationentransporter (OCT1, OCT2, OCT3, OCTN1, OCTN2) ebenso wie die Anionentransporter (OAT1, OAT2 und OAT3). Von großer Bedeutung sind des Weiteren einige Carrier, die für den Transport von Aminosäuren verantwortlich sind:

- *SLC1-Familie*: Glutamat, sowie Glutamat/Aspartat-Transporter (s. Tabelle 4)
- *SLC2-Familie*: Transport von Cystin und basischen sowie neutralen Aminosäuren (s. Tabelle 2)
- *SLC6-Familie*: Neurotransmittertransporter: GABA, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin, Glycin, Taurin, L-Prolin, Creatin, Betain (s. Tabelle 2)
- *SLC7-Familie*: Kationische Aminosäuretransporter (γ^+ , s. Tabelle 3)
- *SLC15-Familie*: Oligopeptidtransporter
- *SLC32-Familie*: vesikuläre GABA-Transporter

Die zweite Superfamilie, die ABC-Transporter, umfasst 48 Transportergene und wird in 7 Subfamilien zusammengefasst. Der Terminus ABC (ATP-binding cassette) leitet sich von der Tatsache ab, dass alle Mitglieder der ABC-Superfamilie primär aktive Transporter darstellen, die die Energie für den Transport des Substrates durch ATP-Hydrolyse gewinnen.

Transporter-vermittelte absorptive sowie exsorptive Prozesse sind sättigbar und inhibierbar. Jeder Carrier kann durch K_m und V_{max} , also durch die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Transportgeschwindigkeit beobachtet wird, und die maximale Transportrate, charakterisiert werden.

1.4.1. Aminosäuretransporter

Aminosäuren, die "Bausteine" der Proteine, sind Aminofunktion tragende aliphatische oder aromatische Carbonsäuren. Im Allgemeinen ist die Aminogruppe der natürlichen Aminosäuren α -ständig, seltener dagegen befindet sie sich an weiter entfernten Positionen (Taurin, β -Alanin, γ -Aminobuttersäure). Darüber hinaus sind die meisten Aminosäuren (Ausnahme bei den proteinogenen Aminosäuren: Glycin) chiral. Die natürlichen Aminosäuren sind L-konfiguriert.

Im menschlichen Körper sind 20 verschiedene proteinogene Aminosäuren bekannt. Acht davon, darunter Lysin und Phenylalanin, sind essentielle Aminosäuren. Diese müssen daher in ausreichender Menge aus der Nahrung zunächst in den Blutkreislauf aufgenommen werden. Proteine der Nahrung werden im Magen-Darm-Trakt in die Einzelbausteine zerlegt, anschließend resorbiert, und im Körper dann zum Aufbau körpereigener Proteine unterschiedlicher Funktion verwendet.

Die Aminosäuretransporter der Blut-Hirn-Schranke gewährleisten den Transport von Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan, 5-Hydroxy-Tryptophan, DOPA), die für die Synthese von Neurotransmittern notwendig sind.

Aminosäuren besitzen im Organismus eine Vielzahl weiterer physiologischer Funktionen: Spezifische Aminosäuren fungieren als Neurotransmitter und synaptische Modulatoren, andere – wie das nichtproteinogene Taurin – tragen wichtige Funktionen in der Konjugation von Gallensäuren [Burtis und Ashwood 1996], der Osmoregulation des Zellvolumens [Schaffer et al., 2000] oder als Antioxidans [Waterfield et al., 1993, Huxtable 1992]. Der intestinale Transport von diätetischem Taurin stellt einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Taurinhomeostase dar [O'Flaherty et al., 1997]. Taurin bietet drei Besonderheiten: Eine Sulfonsäuregruppe ersetzt die fehlende Carboxylstruktur. Taurin als Aminosäure zu bezeichnen ist daher nicht korrekt, vielmehr stellt Taurin eine Aminosulfonsäure dar. Weitere Besonderheiten sind die β -Position der Aminogruppe und die Tatsache, dass Taurin nicht chiral ist. Aufgrund der fehlenden Carboxylgruppe kann Taurin nicht in Proteine inkorporiert werden und stellt somit die "Aminosäure" dar, die – in freier Form – in höchster Konzentration im Körper vorliegt. Die unter Umständen nicht ausreichende endogene Synthese aus Methionin und Cystein, katalysiert durch die Cysteinsulfonatdecarboxylase (CSAD) einerseits und die vielfältigen biologischen Funktionen andererseits zeigen die Bedeutung eines effektiven Transportsystems für Taurin auf. Sowohl für Taurin, als auch für β -Aminosäuren

wurden spezifische Transportsysteme charakterisiert, die sich durch einen Cotransport von Natrium- und Chloridionen auszeichnen. Der Transport von Taurin wird mit 3 verschiedenen Transportsystemen in Verbindung gebracht, die je nach Spezies eine unterschiedliche Bedeutung haben, dem β -Aminosäure-Carrier, dem Taurintransporter und dem Iminosäurecarrier [O'Flaherty et al., 1997].

Der Transfer der Aminosäuren durch die hydrophobe Zellmembran erfolgt durch Transportproteine, die die Aminosäuren erkennen, binden und aus der extrazellulären Matrix ins Zellinnere transportieren. Seit 1990 wurde die cDNA von mehr als 20 verschiedenen Aminosäuretransportern isoliert. Die Carrier unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität, Gewebeverteilung, Transportcharakteristik und in der physiologischen Bedeutung der Transporter [Palacin et al., 1998]. Viele Aminosäuretransporter besitzen eine breite Substratspezifität, arbeiten aber stereospezifisch, d.h. der Transport des L-Isomers erfolgt mit deutlich höherer Geschwindigkeit als der des D-Isomers. Aminosäuretransporter sind in der Regel absorptiv gerichtet, es existieren jedoch auch sekretorische Carrier.

Aufgrund der hohen Anzahl verschiedener Carrier wurde eine Klassifizierung dringend erforderlich [Tsuji und Tamai, 1996]. Allgemein üblich ist heute die Einteilung in Transporter für neutrale, anionische und kationische Aminosäuren bzw. in Bezug auf die thermodynamischen Eigenschaften des Transports (aktiver Transport, erleichterte Diffusion). Die Affinitäten zu den einzelnen Transportern sind teilweise überlappend, d.h. ein Transporter erkennt mehrere Substanzen als Substrat bzw. ein Substrat kann von mehreren Carriern transportiert werden.

Die verschiedenen Klassen der Aminosäuretransporter sind teilweise ubiquitär vorhanden (System A, ASC, L, γ^+ , X⁻), andere dagegen sind gewebespezifisch (System B^{0,+}, N^m, b^{0,+}). Dies ermöglicht einen zellspezifischen Aminosäurefluss, angepasst an die Bedürfnisse der unterschiedlichen Zellen.

Viele der Aminosäuretransporter sind in der apikalen Membran der Zelle lokalisiert, andere in der basolateralen Membran. Letztere weisen eine breite Substratspezifität auf.

1.4.1.1. Neutrale (zwitterionische) Aminosäuren

Für neutrale Aminosäuren existieren eine Reihe unterschiedlicher Carrier, die sich in ihrer Lokalisation und ihren Substraten unterscheiden, teilweise aber auch überlappen. Die in Tabelle 2 angegebenen Transporter sind bis auf den Transporter für voluminöse, hydrophobe Aminosäuren (L-Typ) Na⁺-abhängige Transporter. Der Transport langer neutraler Aminosäuren ins Gehirn erfolgt in Analogie zur Peripherie durch einen Carrier, der Leucin als Substrat bevorzugt und als LAT-Typ bezeichnet wird. Im Vergleich zum peripheren Transporter besitzt das L-System der Blut-Hirn-Schranke eine wesentlich höhere Affinität. Kanai et al. [1998] klonierten den LAT-1-Transporter, der mit der schweren Kette des 4F2hc-Antigens, einem Zelloberflächenglykoprotein, coexprimiert wird und so ein Heterodimer bildet. Dieser Transporter wird selektiv nur an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert, in peripheren Organen (Leber, Niere und Lunge) fehlt er [Boado et al., 1999].

Die Aktivität des Systems A wird durch eine Reihe von Prozessen stark reguliert, so kommt es während des Zellzyklus sowie unter hormonaler Kontrolle (Insulin, Glucagon, Catecholamine, Glucocorticoide) zu einer erhöhten Expression des Transporters [Palacin et al., 1998]. α -Methylaminoisobuttersäure (MeAIB) stellt einen spezifischen Inhibitor des Systems A dar [Barker et al., 1999].

Neben den häufig ubiquitär vorhandenen Transportern existiert in der Leber ein Na⁺-abhängiger Transporter, der den Transport von L-Glutamin, L-Histidin und L-Asparagin katalysiert (System N). Ein System mit ähnlichen Eigenschaften wurde in der Skelettmuskulatur entdeckt (N^m).

Tabelle 2: Übersicht über verschiedene Transportproteine für neutrale (zwitterionische) Aminosäuren [Munck und Munck, 1995; Palacin et al., 1998]

Transporter	Subtyp	Lokalisation	Substrate
A		Ubiquitär an basolateraler Membran (sekretorisch)	Kleine dipolare α -Aminosäuren und Iminosäuren (Alanin, Serin, Glutamin, Prolin, Glycin, Methionin), auch N-methylierte Aminosäuren
ASC	ASCT-1 ASCT-2	Ubiquitär an basolateraler Membran	Kleine dipolare α -Aminosäuren (Alanin, Serin, Cystein, Threonin, Valin, Glutamat), <u>keine</u> N-methylierten Aminosäuren
asc		Intestinale basolaterale Membran	Dipolare Aminosäuren
β	GAT-1	ZNS	GABA, Betain, β -Alanin
	GAT-2	ZNS, Retina, periphere Gewebe	GABA, β -Alanin, Taurin
	GAT-3	ZNS	GABA, β -Alanin, Taurin
	BGT-1	ZNS, periphere Gewebe	GABA, Betain, L-Prolin
	TAUT	ZNS, periphere Gewebe	Taurin, β -Alanin
B^0		Brush-Border-Membranen	Breite Substratspezifität für neutrale Aminosäuren
GLYT	GLYT-1	ZNS, periphere Gewebe	Glycin, Sarcosin
	GLYT-2	ZNS	
IMINO		Niere, intestinale Brush-Border-Membran	Prolin, Hydroxyprolin, N-Methylglycin
	PROT	Gehirn (spezifisch)	Prolin
L	4F2hc/LAT-1 LAT-2	Intestinum, Blut-Hirn-Schranke, weit verbreitet	Voluminöse, hydrophobe, dipolare Aminosäuren (verzweigt-kettig, aromatisch) Phenylalanin, Leucin Baclofen, Gabapentin, L-Dopa
	L1 L2	Hepatozyt in Abhängigkeit vom Alter (L1: Affinität im μ M-Bereich; L2: Affinität im mM-Bereich)	
N		Hepatozyt	Glutamin, Asparagin, Histidin
N^m		Muskel	Glutamin, Asparagin, Histidin
PHE		Ubiquitär in Brush-Border-Membran	Phenylalanin, Methionin

1.4.1.2. Kationische Aminosäuren

Bisher sind fünf verschiedene Transportsysteme für kationische Aminosäuren bekannt. y^+ ist als einziges dieser Systeme ubiquitär verbreitet, während die anderen 4 Systeme spezifischen Organen zugeordnet werden. Sie unterscheiden sich in ihrer Affinität zu kationischen Aminosäuren, der Abhängigkeit von Natrium sowie der Kapazität für zwitterionische Aminosäuren. $B^{0,+}$ ist der einzige kationische Aminosäuretransporter, der eine Natriumabhängigkeit aufweist.

Einige Aminosäuretransporter wie der LAT-1, LAT-2, der y^+ LAT-1 und der y^+ LAT-2-Carrier [Verrey et al., 1999; Verrey et al., 2000] sind mit Glykoproteinen assoziiert und stellen somit Heterodimere dar (s. Kapitel 1.4.1.1.). Die 12 transmembranären Domänen des Carrierproteins liegen mit der einzelnen transmembranären Domäne des 4F2hc-Proteins assoziiert vor. Andere Aminosäuretransporter wie der $b^{0,+}$ sind mit einem dem 4F2hc-verwandten Protein, dem rBAT, assoziiert. Sie sind für die Sekretion von Aminosäuren verantwortlich und sind vermutlich an der

basolateralen Membran und nicht an der Brush-Border-Membran der Epithelzellen lokalisiert [Rossier et al., 1999].

Tabelle 3: Übersicht über verschiedene Transportproteine für kationische (basische) Aminosäuren

Transporter	Subtyp	Lokalisation	Substrate
B ^{0,+}		Brush-Border-Membranen, Blastozyten Na ⁺ -abhängig	Breite Substratspezifität für zwitterionische und basische Aminosäuren
b ^{0,+}		Blastozyten	Breite Substratspezifität für zwitterionische und basische Aminosäuren, Gabapentin
b ⁺		Brush-Border-Membranen	Kationische Aminosäuren
y ⁺	CAT-1	Weit verbreitet in der Brush- Border-Membran (nicht in der Leber)	Zwitterionische und basische Aminosäuren
	CAT-2	T-Zellen, Makrophagen, Lunge, Testis, Blut-Hirn-Schranke	
	CAT-2a	Leber, Muskel, Haut	
	CAT-3	Gehirn (spezifisch)	
	CAT-3	ubiquitär	
	CAT-4	Pankreas, Skelettmuskel, Herz, Plazenta	
y ⁺ LAT		Erythrozyten, Plazenta, Fibroblasten	Zwitterionische und basische Aminosäuren

1.4.1.3. Anionische Aminosäuren

Die Affinität von Glutamat und Aspartat zum Na⁺- und K⁺-abhängigen Transporter X_{AG}⁻ bedingt deren hohe Akkumulation in vielen Zellen (neuronale und gliale Zellen, Hepatozyten, Enterozyten) [Palacin et al., 1998]. Interessanterweise zeigt dieses System für die beiden Enantiomeren des Aspartats gleiche Affinitäten, eine Tatsache, die für Aminosäuretransporter nur sehr selten beobachtet wird. Man vermutet, dass die 5 bekannten Glutamattransporter (EAAT) ebenfalls zum System X_{AG}⁻ gehören.

Tabelle 4: Übersicht über verschiedene Transportproteine für anionische (saure) Aminosäuren

Transporter	Subtyp	Lokalisation	Substrate
X_{AG}^- (Na^+ -abhängig)		neuronale und gliale Zellen, Hepatozyten, Enterozyten	Saure (anionische) Aminosäuren: Glutamat, Aspartat (D- und L-Form)
	EAAT-1	Gehirn (andere Gewebe?)	Glutamat
	EAAT-2	Gehirn	
	EAAT-3	Epithelium, Gehirn, andere Gewebe	
	EAAT-4	Gehirn, andere Gewebe	
EAAT-5	Retina		
X_c^- (Na^+ -unabhängig)		Hepatozyt, Fibroblast, embryonale Zellen	Glutamat, Cystein

1.4.1.4. Superfamilie der Natrium- und Chlorid-abhängigen Neurotransmittertransporter

Die GABA-Transporter GAT-1, GAT-2, GAT-3, BGT-1 sowie der Taurintransporter TAUT, der Prolintransporter PROT und der Glycintransporter GLYT-1 werden als Superfamilie der Natrium- und Chlorid-abhängigen Neurotransmittertransporter zusammengefasst. Diese Superfamilie besitzt eine gemeinsame Membrantopologie, die aus 12 transmembranären Domänen besteht und als weitere Gemeinsamkeit eine Na^+ - und Cl^- -Abhängigkeit aufweist. Sowohl der NH_2 - als auch der $COOH$ -Terminus liegt intrazellulär. Dort sind auch die meisten mutmaßlichen Phosphorylierungsstellen lokalisiert. Die Transporter weisen eine recht hohe Homologie (30-65%) auf [Palacin et al., 1998]. Auf der Basis der Substratspezifität und der Aminosäurehomologie wird die Superfamilie in 2 Subfamilien aufgeteilt:

1. Subfamilie der Neurotransmittertransporter
 - a. (biogene) Monoamintransporter (Dopamin, Norepinephrin und Serotonintransporter)
 - b. GABA- und Taurintransporter (einschließlich Creatintransporter)
 - c. Glycin- und Prolintransporter
2. "Orphan transporters", deren strukturelle Charakteristiken stark von denen der ersten Subfamilie abweicht.

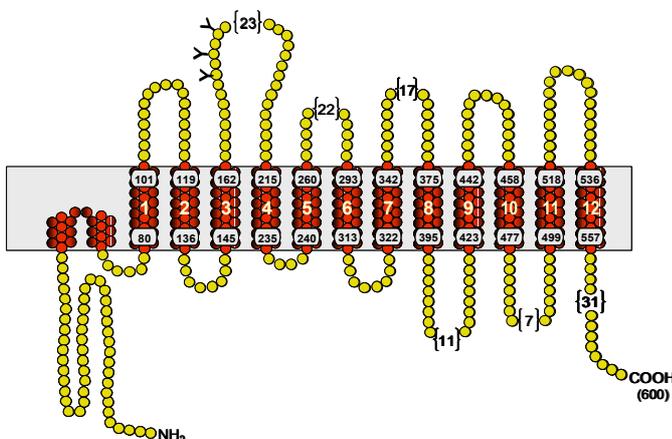


Abbildung 5: Schematische Darstellung des GABA-Transporters GAT-1 (SLC6A1)

Das Ausmaß und die Dauer einer GABA-synaptischen Erregungsübertragung wird durch verschiedene Membranproteine, die GABA-Transporter (GAT-1, GAT-2, GAT-3, BGT-1), die Na^+/Cl^- -abhängige, hochaffine Transporter darstellen, bestimmt. Sie sind für die Aufnahme von GABA in die präsynaptischen Membranen der Neurone sowie der Glia verantwortlich. GAT-2 ist jedoch auch teilweise für die Calcium-unabhängige Freisetzung von GABA verantwortlich [Minelli et al., 2000].

Alle genannten Transporter werden im ZNS exprimiert, manche zusätzlich auch in peripheren Geweben [Clark et al., 1992; Guastella et al., 1990]. Die GABA-Transporter GAT-1 und GAT-3 scheinen

ZNS-spezifisch zu sein. GAT-1, -2 und -3 werden ausser im Gehirn auch in der Retina exprimiert [Borden et al., 1992; Brecha und Weigmann, 1994]. Die Expression des GAT-1 erfolgt gleichmäßig mit der Verteilung der γ -Aminobuttersäure in allen Regionen des Gehirns. Die Verteilung des GAT-1 im Hippocampus, der Retina und im Cerebellum der Ratte lässt eine Bedeutung in den GABAergen Synapsen vermuten, wo er für die Wiederaufnahme aus dem extrazellulären Spalt verantwortlich sein könnte und so zusätzlich eine Rolle in der Regulation der extrazellulären Konzentration der γ -Aminobuttersäure spielen könnte. Darüber hinaus existiert eine gute Korrelation zwischen der Expression des GAT-1 und der Glutamatdecarboxylase, einem Enzym der GABA-Synthese. Diese Befunde stützen somit die Vermutung, dass GAT-1 eine präsynaptische Rolle in den Synapsen spielt und zusätzlich eine postsynaptische Rolle in der Regulation der GABA-Konzentration innehat. Aufgrund seiner Lokalisation auf den Endigungen der Axone (und den Astrozyten) stellt GAT-1 vorwiegend einen *neuronalen präsynaptischen Transporter* dar. Eine Besonderheit des GAT-1 stellt die absolute Substratspezifität für GABA dar, Taurin und β -Alanin werden nicht transportiert.

GAT-3 weist eine komplementäre Verteilung zum GAT-1 im ZNS auf. Dieser wird v.a. im Rückenmark, im Hirnstamm, im Thalamus und Hypothalamus exprimiert, kaum dagegen im Cerebellum, Hippocampus und Striatum, den vorwiegenden Expressionsorten des GAT-1. Die Lokalisation des GAT-3 stimmt teilweise sehr gut mit der Zahl der GABAergen Neurone sowie der Aktivität der Glutamatdehydrogenase überein. Anfänglich wurde GAT-3 vor allem als Transporter der Neurone beschrieben, heute weiß man jedoch, dass er auch in der Astroglia und im cerebralen Cortex lokalisiert ist. Zur Zeit wird GAT-3 vorwiegend als *glialer Transporter* angesehen.

Unter den hochaffinen GABA-Transportern stellt der GAT-2 den einzigen Carrier dar, der zusätzlich zum Gehirn und der Retina auch in peripheren Geweben (Niere, Leber) exprimiert wird. Interessanterweise ist der GAT-2 mRNA-Spiegel abhängig vom Entwicklungsstadium, so ist er im Gehirn neugeborener Mäuse signifikant höher als im erwachsenen oder fötalen Gehirn. Die Verteilung des GAT-2 ist stark unterschiedlich zur Distribution des GAT-1 und GAT-3, so dass ihm eine Bedeutung in nicht-neuronalen Prozessen zugeordnet wird. Aufgrund seiner Eigenschaften wird der GAT-2 ebenfalls als *glialer Transporter* angesehen.

BGT-1 stellt vermutlich einen *glialen Transporter* dar, da er in Astrozytenzellkulturen, jedoch nicht in neuronalen Zellen nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich zum ZNS wird der GABA-Transporter BGT-1 auch in peripheren Geweben, wie der Leber, der Niere, der Plazenta und dem Skelettmuskel exprimiert.

Der Taurintransporter TAUT (SLC6A6) wird in verschiedenen peripheren und zentralen Geweben exprimiert. Die Expression ist dabei u.a. auch von der Art der Spezies abhängig. U.a. wurde die mRNA des Taurintransporters in der Niere, dem Intestinum, dem Gehirn, der Lunge, der Retina, sowie im Skelettmuskel, Herz, Plazenta, Gallenblase und Pankreas nachgewiesen [Ramamoorthy et al., 1994; Palacin et al., 1998]. Der Taurintransport ist sowohl durch β -Alanin als auch durch GABA hemmbar.

Die physiologische Bedeutung der Natrium-abhängigen Transporter in der präsynaptischen und glialen Membran besteht in der Entfernung der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt. Biochemische und pharmakologische Studien, sowie Studien zur Immunlokalisation zeigten, dass der GAT-1 dem neuronalen Subtyp des GABA_A-Rezeptors entspricht. Der GAT-1 stellt vermutlich den Angriffsort des Antiepileptikums Tiagabin dar. Die Funktion des Taurintransporters ist bisher nicht vollständig geklärt, Taurin fungiert jedoch vermutlich als Osmoregulator [Palacin et al., 1998].

1.4.2. Oligopeptidtransporter

Die Peptidtransporter (PEPT1 und PEPT2) der Epithelien spielen eine große Rolle in der Absorption kleiner Peptide und peptidähnlicher Verbindungen. Sie besitzen die Eigenschaft Di- und Tripeptide der Nahrung durch die Brush-Border-Membran des Gastrointestinaltraktes zu resorbieren [Tsuji und Tamai, 1996; Leibach und Ganapathy, 1996]. Aufgrund ihrer breiten Substratspezifität besitzen PEPT1 und PEPT2 aber auch die Eigenschaft, Substanzen mit struktureller Ähnlichkeit zu Peptiden als Substrat zu erkennen, darunter β -Lactamantibiotika [Ganapathy et al., 1995; Terada et al., 1997] und den L-Valylester des Aciclovirs [Han et al., 1998]. Die Bioverfügbarkeit von Aciclovir nach oraler Therapie mit dem vom Oligopeptidtransporter transportierten Valaciclovir ist signifikant größer als nach oraler Applikation von Aciclovir. Durch die Bildung eines L-Phenylalanin-L-Dopa-Dipeptides

konnte für L-Dopa ebenfalls eine verbesserte Bioverfügbarkeit erreicht werden, obwohl dieses selbst aktiv über ein Aminosäuretransportsystem resorbiert wird. Durch die Bildung des Peptides geht die Affinität zum Aminosäuretransporter verloren, dafür weist dieses Affinität zum PEPT1 auf [Tamai et al., 1998].

Der aus 710 Aminosäuren bestehende Peptidtransporter PEPT1 ist in der Brush-Border-Membran des Intestinums lokalisiert und besitzt 12 transmembranäre Domänen. Der aktive Transport, als Symport mit H^+ , wird durch ein negatives Membranpotential angetrieben. Stimulierend auf den Oligopeptidtransport wirkt Insulin, dagegen wirkt das Choleratoxin inhibierend [Adibi, 1997].

Der PEPT2-Transporter wird vor allem in der Niere, nicht aber im Intestinum exprimiert [Liu et al., 1995].

1.4.3. P-Glykoprotein

Die Entwicklung einer Multidrug-Resistenz stellt ein großes Hindernis in der Therapie verschiedener Karzinome mit Chemotherapeutika dar. Resistente Tumore weisen nach Therapie mit einem einzelnen Zytostatikum eine Kreuzresistenz gegenüber einem breiten Spektrum anderer Chemotherapeutika auf, darunter Vinca-Alkaloide, Anthracycline, Epipodophyllotoxine und Taxane. Zytostatika wie Vinblastin oder Colchicin diffundieren aufgrund ihrer Lipophilie schnell in die Lipidbilayer der Zellen, wo sie an ihre Zielstrukturen, die Mikrotubuli binden und dort den Zelltod induzieren. Die Resistenz der Krebszellen kann über verschiedene Mechanismen erfolgen, u.a. auch durch die Überexpression des membranständigen Transportproteins P-Glykoprotein. P-GP transportiert diese Substanzen aktiv wieder aus der Zelle heraus und die Zellen überleben. Die Expression von P-GP trägt somit zur Verschlechterung der Prognose eines Krebspatienten bei. MDR-Modulatoren führen zu einer Reduktion des Effluxes von P-GP-Substraten und damit zu einer höheren intrazellulären Konzentration und demzufolge besserer Wirksamkeit des Zytostatikums. In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, um durch eine kombinierte Therapie eines Chemotherapeutikums mit einem MDR-Modulator die Resistenz der Krebszellen zu überwinden.

P-Glykoprotein wird jedoch nicht nur in Karzinomzellen, sondern auch physiologisch an der apikalen Membran [Fojo et al., 1987; Schinkel et al., 1996; Gottesman et al., 2002] der Epithelzellen verschiedener exkretorischer Organe, wie der Leberzellmembran, den kleinen Gallengängen in der Leber, dem proximalen Tubulus der Niere, den Enterozyten des Darmes, der Gallenblase, der Lunge sowie an den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimiert [Cordon-Cardo et al., 1990; Jolliet-Riant und Tillement, 1999]. Die mRNA-Spiegel des P-GP steigen entlang des Gastrointestinaltraktes an, die niedrigsten P-GP-Spiegel liegen somit im Magen, die höchsten im Colon vor. P-Glykoprotein katalysiert den Transport in das intestinale Lumen, in die Galle und in den Urin und fördert damit auf verschiedene Arten die Exkretion von Xenobiotika [Gottesman und Pastan, 1993]. Aufgrund seiner verbreiteten Lokalisation und der Bedeutung in verschiedenen Phasen der Pharmakokinetik (Absorption, Distribution, Elimination) hat P-Glykoprotein einen großen Einfluss auf das pharmakokinetische Verhalten vieler Arzneistoffe [Leveque und Jehl, 1995]: Trotz günstiger physikochemischer Eigenschaften limitiert P-Glykoprotein die Bioverfügbarkeit von Substraten, an der Blut-Hirn-Schranke schränkt es die Distribution in das Gehirn ein. Sowohl die renale als auch die biliäre Exkretion wird durch P-GP gesteigert.

Die physiologische Bedeutung des P-Glykoproteins liegt vermutlich im Schutz des Organismus vor potentiell toxischen Substanzen. Nach oraler Applikation führt intestinales P-GP zu einer reduzierten Resorptionsrate. Da lipophile Substanzen auch die Blut-Hirn-Schranke passieren können, hat das in der Blut-Hirn-Schranke lokalisierte P-GP für das Gehirn ebenfalls eine Schutzfunktion. Das Phänomen, dass einige höhermolekulare Substanzen eine nur geringe Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke aufweisen, konnte lange Zeit nur durch sterische Hinderung erklärt werden. Heute wird dagegen angenommen, dass die fehlende Passage durch die Blut-Hirn-Schranke mit zunehmender Lipophilie und zunehmender Molekülgröße auch durch die Anwesenheit von P-Glykoprotein u.ä. bedingt ist. So zeigten *mdr1a(-/-)*-Knockout-Mäuse, also Tiere, denen das P-Glykoprotein der Blut-Hirn-Schranke fehlt, wesentlich höhere Permeationen von P-GP-Substraten (Ivermectin, Vinblastin, Digoxin, Ciclosporin) [Dagenais et al., 2001; Schinkel et al., 1996]. Die Inhibition des P-Glykoproteins durch Modulatoren bewirkte einen Anstieg der Permeabilität des

Vinblastin in Caco-2-Monolayern [Hunter et al., 1993]. Vinblastin zeigte dabei eine nichtlineare Abhängigkeit der Permeabilität von der eingesetzten Konzentration. Durch zunehmende luminare Konzentrationen des Inhibitors Verapamil stieg nach Sättigung des P-Glykoproteins die Permeation stark an. Das Phänomen einer nichtlinearen Kinetik wurde auch für das P-GP-Modellsubstrat Talinolol [Wetterich et al., 1996] sowie für Celiprolol [Chiou, 1996] beschrieben.

Das 170kDa P-Glykoprotein ist Mitglied der mehr als 200 Proteine zählenden Familie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette) und besteht aus 1280 Aminosäuren. Der Transport durch

P-GP ist sättigbar und erfolgt gegen einen Konzentrationsgradienten. Typische ABC-Transportproteine bestehen aus vier Einheiten: Sie besitzen zwei membranständige homologe Hälften, die über eine flexible "Linker-Region" verbunden sind [Higgins et al., 1997], jede mit 6 transmembranären Domänen, sowie zwei Nukleotidbindungsstellen, die ATP binden und hydrolysieren. Die beiden Hälften besitzen eine 43%ige Homologie der Aminosäuresequenz. Interaktionen, bedingt durch P-GP erfolgen entweder kompetitiv oder nicht-kompetitiv und damit an verschiedenen Bindungsstellen. Martin et al. [2000] vermuten mindestens 4 Substratbindungsstellen, an denen entweder der Transport der Substanzen durch die Membran oder die Regulation der P-GP-Funktion an regulatorischen Bindungsstellen erfolgt.

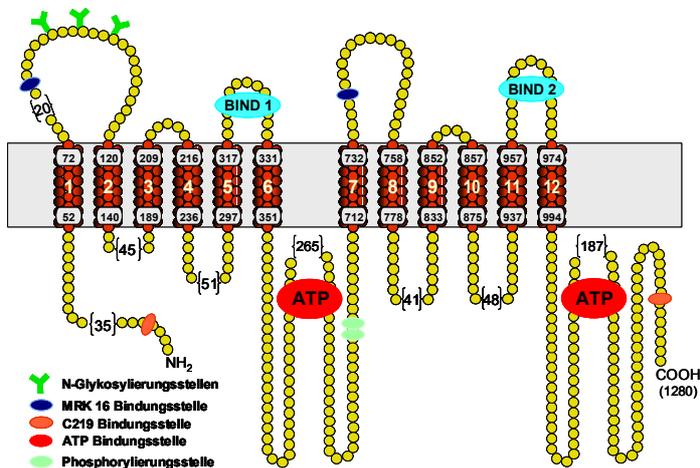


Abbildung 6:
Schematische Darstellung des P-Glykoproteins

Substanzen, die Affinität zum P-Glykoprotein besitzen, werden eingeteilt in:

- *Substrate*, die durch das P-Glykoprotein transportiert werden
- *Modulatoren*, die die P-GP-Funktion verändern, aber nicht transportiert werden [Martin et al., 2000]

Der NH₂- und COOH-Terminus des Polypeptids, sowie die beiden ATP-Bindungsstellen sind intrazellulär lokalisiert. Die integralen Membrandomänen des P-Glykoproteins haben 2 zentrale Funktionen im Transportprozess: Sie formen den Weg, durch den die Translokation der Substanzen erfolgt und sie formen die Substratbindungsstelle. Die Arbeitsweise des P-Glykoproteins wird wie folgt zusammengefasst: Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der meisten P-GP-Substrate diffundieren diese leicht in die Lipidbilayer, ebenfalls durch Diffusion gelangen sie zum P-Glykoprotein. Dort erfolgt die Bindung an die Substratbindungsstelle, die einer lipophilen Tasche entspricht. Die Bindung und Hydrolyse von ATP an die Nukleotidbindungsstelle führt zu einer Konformationsänderung des P-Glykoproteins und zu einer Veränderung der Affinität des Substrates zur Bindungsstelle, die den Transport aus der Zelle zur Folge hat.

Die für das P-Glykoprotein kodierenden Gene wurden im Hamster, der Maus sowie im Menschen kloniert und sequenziert. In Nagetieren (Maus, Hamster) werden alle drei Isoformen exprimiert: *mdr1a* (*mdr3*), *mdr1b* (*mdr1*), *mdr2* [Gros et al., 1988]. In Primaten sind dagegen nur 2 P-GP-Gene bekannt: MDR1 und MDR3 [Roninson et al., 1986]. In Transfektionsstudien wurde nachgewiesen, dass nur die Isoformen 1 und 2 zur Multidrug-Resistenz beitragen, während MDR3 eine Phosphatidyltranslokase darstellt, also für den Transport von Phospholipiden in die Galle verantwortlich ist. Klasse 3 P-GP ist an der kanalikulären Membran der Hepatozyten lokalisiert.

Die Substratspezifität des *mdr1a* und *mdr1b* P-Glykoproteins ist stark überlappend, obwohl es für beide bevorzugte Substrate gibt. Die Organverteilung des *mdr1a* und *mdr1b* P-Glykoproteins der Maus ist teilweise ähnlich, teilweise unterschiedlich, jedoch entspricht die Organverteilung der beiden Mausgene zusammen in etwa der Verteilung des einen humanen MDR-Genes [Schinkel, 1999].

Die meisten bekannten Carrier besitzen eine mehr oder weniger ausgeprägte Substratspezifität. In dieser Hinsicht stellt P-GP ein ungewöhnliches Transportprotein dar, da es eine Reihe strukturell sehr unterschiedlicher Substanzen als Substrat erkennt [Endicott und Ling, 1989]. Neben den

bereits erwähnten Zytostatika ist die Zahl der P-GP-Substrate sehr groß und schließt u.a. Immunsuppressiva (Ciclosporin) [Saeki et al., 1993], Digoxin [Tanigawara et al., 1992], Glucocorticoide, Morphin, HIV-Proteaseinhibitoren, Terfenadin sowie verschiedene Antibiotika ein. Der Mechanismus der Substraterkennung ist noch nicht näher bekannt. Es existieren jedoch einige gemeinsame Merkmale von P-GP-Substraten [Seelig, 1998]. Typische Substrate besitzen ein relativ großes Molekulargewicht ($M_r > 400$), ein planares Ringsystem und sie sind amphipatisch. Die Substrate unterscheiden sich stark in der Molekülgröße sowie in der Ladung. P-GP-Substrate sind jedoch in der Regel bei physiologischem pH-Wert neutral bis positiv geladen, im Gegensatz zu Substraten des MRP1 (multidrug resistance-associated protein), einem weiteren exsorptiven Transporter, der anionische Substanzen bevorzugt. Viele Substrate des P-Glykoproteins, wie Cortisol, Chinidin und Erythromycin stellen ebenfalls Substrate des CYP 3A4 dar, so dass der einzelne Beitrag der beiden bioverfügbarkeitslimitierenden Faktoren – Exkretion und Metabolismus – in vivo nur schwer einzuschätzen ist [Spahn-Langguth et al., 1997; Langguth et al., 1997; Baron et al., 2001]. Darüber hinaus ist sowohl CYP 3A4, als eines der Hauptenzyme der Phase-I-Reaktion, als auch der Effluxtransporter P-Glykoprotein in den Enterozyten des Dünndarmes lokalisiert, so dass sie in additiver Weise die Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation stark einschränken [Benet et al., 1999]. Die Induktion und Inhibition der beiden Proteine erfolgt darüber hinaus teilweise durch die gleichen Substrate.

1.5. **Arzneistoff-Arzneistoff-, Arzneistoff-Nahrungsmittel-, und Arzneistoff-Chemikalien-Interaktionen**

Eine Arzneistoffinteraktion bedingt durch die gleichzeitige Applikation mehrerer Arzneistoffe bzw. durch gleichzeitige Einnahme von Nahrungsmitteln oder Chemikalien (Alkohol, Tabak) eine Veränderung der erwarteten Arzneistoffwirkung eines Individuums auf den Arzneistoff. Interaktionen, die sich in dem verstärkten Auftreten von Nebenwirkungen äußern, sind unerwünscht, andere werden dagegen gezielt genutzt, um eine Verbesserung der therapeutischen Eigenschaften eines Arzneistoffes zu erzielen [Marroum et al., 2002; Moyle und Back, 2001]. Die klinische Relevanz einer Interaktion darf bei deren Beurteilung jedoch nicht außer Acht gelassen werden.

Pharmakokinetische Interaktionen werden üblicherweise nach dem ADME-System klassifiziert, also in Interaktionen, die *die Absorption, die Distribution, den Metabolismus oder die Exkretion* eines Arzneistoffes betreffen.

Bezüglich der Absorptionsphase ist eine Einteilung in 4 Kategorien möglich: Absorptionsverminderung, -erhöhung, -verzögerung und -konstanz. *Physiologische Faktoren* (veränderte Magenentleerungszeiten, pH-Wert-Veränderungen im Magen, Veränderungen der intestinalen Permeabilität oder der Galleproduktion) können ebenso wie *physikochemische Wechselwirkungen* (Interaktion von Tetrazyklinen mit zweiwertigen Kationen; Komplexbildung zwischen bzw. Adsorption an Wirkstoffe (Kohle, Cholestyramin)) eine Veränderung der Absorptionsrate einer Substanz bewirken.

Neben Wechselwirkungen, die auf *physikochemischen Interaktionen* beruhen, existieren Interaktionen, die auf *pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Mechanismen* basieren und Interaktionen, denen *Wechselwirkungen mit einem oder mehreren Makromolekülen* zu Grunde liegen.

1.5.1. Beeinflussung von Makromolekülen als Ursache von Interaktionen

Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen durch Beeinflussung von Makromolekülen basieren entweder

- auf der Blockade der Bindungsstellen einer Substanz durch eine konkurrierende Substanz
- einer Veränderung des Bindungsverhaltens des Arzneistoffes zum Makromolekül in Gegenwart einer interagierenden Substanz oder
- einer Veränderung der Anzahl vorhandener Makromoleküle.

Makromoleküle, die bei kinetischen Interaktionen mit Arzneistoffen eine Rolle spielen, haben verschiedene physiologische Funktionen [Marroum et al., 2002]:

- Als *metabolische Enzyme* katalysieren sie Phase-I- oder Phase-II-Reaktionen. Die Inhibition und Induktion dieser Enzyme wirkt sich auf die Kinetik von Arzneistoffen aus.
- Ebenfalls von sehr großer Bedeutung sind *Interaktionen mit Transportproteinen*, die in der Absorption von Substanzen durch biologische Membranen ebenso eine Rolle spielen können wie in sekretorischen Prozessen.
- Die *Bindung an Plasmaproteine oder Gewebeproteine* kann durch gleichzeitige Applikation mehrerer Arzneistoffe verändert sein.

1.5.1.1. Pharmakokinetische Interaktionen basierend auf Biotransformationsprozessen

Arzneistoffe wie Chinidin, Cyclosporin A oder Metoprolol, die über verschiedene Cytochrom-P-450-abhängige mikrosomale Enzyme oxidativ abgebaut werden, bewirken eine Reihe pharmakokinetischer aber auch pharmakodynamischer Interaktionen. Die gleichzeitige Applikation mehrerer Substanzen, die über das gleiche Isoenzym abgebaut werden, kann dann entweder zur Biotransformationshemmung der Substanz und damit zu erhöhten Plasmaspiegeln der Muttersubstanz führen oder über eine Enzyminduktion durch Arzneistoffe (z.B. Rifampicin, Phenobarbital) oder andere Substanzen, wie die im Zigarettenrauch, zu erniedrigten Wirkstoffspiegeln und einer erhöhten Konzentration der Metabolite führen. Handelt es sich bei der applizierten Substanz um die Wirksubstanz und ist der Metabolit pharmakologisch inaktiv, so kann unter Umständen der therapeutische Effekt ausbleiben.

Die gleichzeitige Applikation des Virustatikums Sorivudin und des Zytostatikums 5-Fluorouracil führt durch die irreversible Inhibition der Dihydropyrimidindehydrogenase, dem limitierenden Enzym der Biotransformation des 5-Fluorouracils, zu schweren Intoxikationen [Kanamitsu et al., 2000].

Interaktionen auf Biotransformationsebene können präsystemisch z.B. auf intestinaler oder hepatischer Ebene durch gastrointestinalen oder hepatischen First-Pass-Effekt auftreten und so neben der Bioverfügbarkeit auch die Clearance einer Substanz beeinflussen. Besondere Beachtung sollte daher auf Substanzen gelegt werden, die sich neben einer geringen therapeutischen Breite durch einen hohen First-Pass-Metabolismus auszeichnen.

Grapefruitsaft erhöht die Bioverfügbarkeit vieler CYP 3A-Substrate durch Inhibition des Phase-I-Metabolismus [Lown et al., 1997]. Nach intravenöser Applikation bleibt die Pharmakokinetik dagegen unbeeinflusst, so dass ein hepatischer Effekt ausgeschlossen werden kann.

1.5.1.2. Interaktionen basierend auf Wechselwirkungen beim aktiven Transport

Zusätzlich zur Clearance über Phase-I- oder Phase-II-Biotransformationen kann die Elimination der Ausgangssubstanz oder ihrer Metabolite aus der systemischen Zirkulation auf der Affinität zu aktiven sekretorischen Transportern beruhen.

Der Anteil, den der entsprechende Transporter an der gesamten Absorption einer Substanz hat, bestimmt die Bedeutung des sättigbaren Prozesses. Hohe passive Permeabilitäten werden die Relevanz Transporter-vermittelter Prozesse signifikant reduzieren, obwohl die Affinitäten zum entsprechenden Transporter sehr hoch sein können.

In Analogie zum Arzneistoffmetabolismus sind zwei verschiedene Arten der Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktion, die Liganden desselben Carriers sind, möglich:

- Reduktion oder Steigerung des Arzneistofftransportes durch kompetitive/nicht-kompetitive Inhibition der Bindung oder des Transportes
- Veränderung der Transporterexpression, d.h. Veränderung der Anzahl vorhandener Proteinmoleküle (induzierte oder inhibierte Expression)

Für die Coadministration von Substraten des Effluxtransporters P-Glykoprotein wurden zahlreiche Interaktionen beschrieben, wie z.B. die Wechselwirkung von Talinolol mit Verapamil [Spahn-Langguth et al., 1998; Gramatte und Oertel, 1999] sowie Erythromycin [Schwarz et al., 2000]. Durch die gleichzeitige Applikation von P-GP-Substraten wird die intestinale sättigbare Sekretion des Talinolols inhibiert und somit resultiert eine verbesserte Bioverfügbarkeit. Interaktionen wurden für verschiedene P-GP-Substrate und -Inhibitoren beschrieben darunter Talinolol [Westphal et al., 2000], Verapamil [Ito et al., 1993] und Ketoconazol [Salphati und Benet, 1998]. Digoxin wird vorwiegend unverändert ausgeschieden. Beobachtete Interaktionen basieren daher vorwiegend auf Wechselwirkungen mit Transportproteinen. Für Digoxin wurden auch Interaktionen mit Drogenextrakten wie Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) beschrieben [Johne et al., 1999]. Interaktionen mit Johanniskraut wurden auch für andere Arzneistoffe (Cyclosporin A [Barone et al., 2000], Indinavir [Ioannides, 2002]) beschrieben, allerdings muss hier zusätzlich der Cytochrom-P450-abhängige Metabolismus in Betracht gezogen werden [Durr et al., 2000].

Neben P-Glykoprotein wurden auch Interaktionen mit anderen sekretorischen, ebenso wie absorptiven Transportern beschrieben. So inhibiert Indometacin die renale Clearance des Schleifendiuretikums Furosemid. Die Interaktionen des Indometacins werden verschiedenen Transportern zugeordnet, darunter dem Organischen Anionentransporter (physiologisches Substrat p-Aminohippursäure) sowie dem MRP [Ito, 1999].

Neben Arzneistoffen können auch Nahrungsmittel oder Nahrungsbestandteile mit Carriern interagieren [Wagner et al., 2001]. Bekanntes Beispiel ist die Interaktion einiger Arzneistoffe mit Grapefruitsaft. Inhaltsstoffe des Grapefruitsaftes können den präsystemischen intestinalen Metabolismus einiger Arzneistoffe (Felodipin, Cyclosporin A) hemmen, die v.a. durch CYP 3A4 intestinal und hepatisch biotransformiert werden. Soldner et al. [1999] sowie Spahn-Langguth und Langguth [2001] zeigten am Beispiel des Digoxins, Fexofenadins und Talinolols, dass Grapefruitsaft-vermittelte Interaktionen auch durch Konkurrenz spezifischer Inhaltsstoffe am P-Glykoprotein bedingt sein können. Andere Studien ergaben Interaktionen einer Gruppe von Flavonoiden mit P-Glykoprotein [Conseil et al., 1998; Shapiro und Ling, 1997]. Des Weiteren wurden Interaktionen mit Rotwein [Tsunoda et al., 2001] und grünem Tee [Jodoin et al., 2002] beschrieben.

Viele Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen entstehen durch gleichzeitige Applikation von Substanzen, die sowohl Substrate und/oder Induktoren des CYP 3A4 als auch des MDR1 sind. Eine Langzeittherapie mit solchen Arzneistoffen wird durch Induktion des CYP 3A4 und des P-Glykoproteins zu einer gesteigerten systemischen Clearance, wie sie bei der Therapie mit verschiedenen Zytostatika auftritt, führen und so die Überlebenschance des Patienten reduzieren. Aktuelle Studien zeigen, dass der Steroid- und Xenobiotikarezeptor (SXR), der sowohl in der Leber als auch im Gastrointestinaltrakt exprimiert wird, eine zentrale Rolle in der Regulation des CYP 3A4, CYP 2C8 sowie der Expression des P-Glykoproteins spielt [Schuetz und Strom, 2001; Synold et al., 2001].

1.5.2. Veränderungen der Plasmaproteinbindung als Ursache für Interaktionen

Verdrängungen der Plasmaproteinbindung gelten als wahrscheinlich, wenn zwei Arzneistoffe in hohem Maße an Plasmaproteine gebunden werden. Resultat dieser Verdrängung ist eine Erhöhung der ungebundenen Arzneistofffraktion. Die an Proteine gebundenen Arzneistoffe stellen ein Arzneistoffreservoir dar, dagegen steht nur der freie, also nicht-proteingebundene Anteil eines Arzneistoffes für die Wirkung zur Verfügung. Höhere freie Arzneistoffkonzentrationen können zu veränderten pharmakodynamischen Wirkungen führen. Häufig erfolgt allerdings eine rasche Weiterverteilung in andere Organe.

1.6. Prodrugs

Prodrugs (Propharmaka) stellen weitgehend inaktive Vorstufen von Wirkstoffen dar, die in der Regel nach Resorption entweder spontan (pH-abhängig) oder durch Biotransformation in die aktive Wirkform überführt werden. Die Entwicklung von Prodrugs ist immer dann sinnvoll, wenn pharmakokinetische, -dynamische oder toxikologische Eigenschaften eines Wirkstoffes verbessert werden sollen.

Sinnvoll können Prodrugs sein bei Wirkstoffen:

- zur Verbesserung eines schlechten Geschmacks	Bsp.: Chloramphenicolpalmitat
- zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit	Methylprednisolonhemisuccinat
- zur Steigerung der Resorptionsquote	Pivampicillin, Enalapril, Clofibrat
- bei hohem First-Pass-Effekt	
- zur Wirkungsverlängerung	Fluphenazindecanoat
- zur Verbesserung der Penetration in das Zielorgan	Levodopa
- zur Erhöhung der Wirkungsselektivität	Omeprazol
- zur Erniedrigung der Toxizität	Azathioprin

Die chemische Modifikation von Arzneistoffen kann auf unterschiedliche Weise zur Verbesserung des Wirkprofils beitragen. Durch lipophile Modifikationen der chemischen Struktur (z.B. Veresterung von Hydroxyl- oder Carboxylgruppen) wird die passive Diffusion durch die intestinale Membran ebenso gesteigert werden wie die Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke. Bekanntes Beispiel stellt die Diacetylierung von Morphin zum lipophileren Heroin dar, das sich durch seine im Vergleich zum Morphin wesentlich schnellere Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke auszeichnet.

Modifikationen der chemischen Struktur einer Substanz, die zu hydrophileren Prodrugs im Vergleich zur Wirksubstanz führen, verfolgen dagegen die Möglichkeit aktive Transportprozesse auszunutzen. Die Applikation des Prodrugs Levodopa zur Behandlung der Parkinsonschen Krankheit führt nach oraler Gabe zur Bildung des zu substituierenden Neurotransmitters Dopamin. Dopamin selber ist dagegen nach oraler Applikation wirkungslos, da es zu hydrophil ist, um die lipophilen Membranen zu passieren. L-Dopa wird dagegen aufgrund seiner Aminosäurestruktur vom Aminosäurecarrier des L-Typs als Substrat erkannt und aktiv sowohl durch die intestinale Membran als auch durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert. In den Zellen des Gehirns erfolgt dann die Decarboxylierung zum Dopamin. Die periphere Decarboxylierung des L-Dopa wird durch Kombination mit den Decarboxylaseinhibitoren Carbidopa oder Benserazid verhindert, die im Gegensatz zu L-Dopa die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können.

Die Bildung des Valinesters von Aciclovir [Eksborg et al., 2002] und Ganciclovir [Curran und Noble, 2001] führt ebenfalls zu einer deutlich besseren Bioverfügbarkeit hier unter Ausnutzung des aktiven Transportes via Oligopeptidtransporter. Nach der intestinalen Resorption wird der Ester rasch durch hepatische Esterasen gespalten. Sawada et al. [1999] untersuchten die Affinität von L-Aminosäureestern zu den Peptidtransportern PEPT1 und PEPT2 der Ratte und stellten fest, dass sowohl der L-Valin- als auch der L-Methylester des Aciclovirs von den beiden Peptidtransportern der Ratte erkannt und transportiert werden.

2. Problemstellung

Die intestinale Absorption einer Substanz in das Blut, also in die systemische Zirkulation, ist Grundvoraussetzung für den nachfolgenden Transport in das Zielorgan und einen ausreichenden therapeutischen Effekt.

Ziel der Entwicklung neuer Arzneistoffe ist eine möglichst spezifische Wirkung im Erfolgsorgan, um unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Als problematisch kann sich dabei das Targeting erweisen, wenn es sich bei der Zielstruktur um das zentrale Nervensystem (ZNS) handelt. Aufgrund des besonderen Aufbaus der Endothelzellen der Blutkapillaren, u.a. durch die Tight junctions, die fehlende Fenestrierung und die hohe metabolische Aktivität, wird die Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke (z.B. für hydrophile Arzneistoffe) nur sehr gering sein, falls für die Substanzen nicht einwärts gerichtete Carrier vorhanden sind. Viele der im Intestinum vorhandenen Transporter sind jedoch auch in der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert [Tsuji, 1998; Tsuji und Tamai, 1999].

Bei peroraler oder intravenöser Applikation lassen sich auch durch Erhöhung der Dosis nicht immer therapeutische Blutspiegel im ZNS erzielen. Allerdings ist in diesem Fall mit verstärkten peripheren Nebenwirkungen zu rechnen, die die maximal zu applizierende Dosis limitieren.

Im Falle von γ -Aminobuttersäure (GABA) und einigen seiner Derivate findet eine z.T. nur sehr geringe Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke statt, obwohl die intestinale Absorption nahezu vollständig verläuft. Insbesondere bei Baclofen, einem bei schweren spastischen Zuständen indizierten GABA_B-Agonisten, verläuft die Absorption aus dem Intestinum rasch und nahezu vollständig. Aufgrund der Aminosäurestruktur wurden Interaktionen mit verschiedenen Transportern für α -, β -, und γ -Aminosäuren vermutet [Moll-Navarro et al., 1996], die auch in der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert sind und Substrate in das ZNS transportieren. Dennoch werden nur sehr geringe Konzentrationen von Baclofen im Zielorgan ZNS erreicht. Die Rate an Therapieversagern ist dementsprechend hoch. In diesem Fall können ausreichende Wirkspiegel im ZNS nur durch eine intrathekale Applikation des Baclofens erreicht werden.

Basierend auf der Vermutung, dass Esterprodrugs des Baclofens im Gewebe gespalten werden, wurden von Herber [2002] C₁- bis C₄-Ester des Baclofens mit dem Ziel synthetisiert und charakterisiert, aufgrund der höheren Lipophilie eine bessere ZNS-Gängigkeit zu erreichen und somit höhere Konzentrationen im Gehirn zu erzielen. Hierbei könnte allerdings aufgrund der Strukturmodifikation eine Affinität zu anderen Transportern von Bedeutung sein.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit mit Baclofen, seinen Esterderivaten und anderen Strukturverwandten (dem Fluoranalogen des Baclofens CGP 11.130 sowie Gabapentin) waren

- ⇒ die Entwicklung und Validierung von Methoden zur bioanalytischen Bestimmung der Verbindungen.
 - ⇒ in In-vitro-Studien die Affinität von Baclofen und seinen Estern zum exsorbitiven Transporter P-Glykoprotein zu untersuchen und in vivo den Einfluss des P-GP-Modellsubstrates Talinolol auf den Baclofenbutylester zu bestimmen.
 - ⇒ in In-vivo-Untersuchungen die Derivate des Baclofens hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Passage der Blut-Hirn-Schranke zu charakterisieren und mit der Muttersubstanz Baclofen zu vergleichen.
 - ⇒ in In-vivo-Studien den Einfluss der Applikationsart (intravenös, intranasal, intraperitoneal) auf die Distribution von Baclofen und seinen Estern in das Targetorgan Gehirn zu prüfen.
-

-
- ⇒ den intestinalen Transport in In-vivo- und In-situ-Untersuchungen zu charakterisieren, sowie den inhibitorischen Effekt verschiedener Lebensmittelbestandteile und Inhaltsstoffe sogenannter Energy Drinks (Taurin, Coffein) sowie von leistungssteigernden Muskelaufbaupräparaten (Creatin) zu testen, um auf potentielle Arzneistoff-Interaktionen zu schließen.
-

3. Ergebnisse

3.1. Studien zur Affinität verschiedener Testsubstanzen zum exsorptiven Transporter P-Glykoprotein

3.1.1. In-vitro-Untersuchungen – Radioligandenbindungsassay

Untersuchungen von Dressler [2002] zeigten, dass die Bindung des Radioliganden [³H]-Talinolol durch Lösungsmittelzusätze (Methanol, Ethanol, DMSO, Acetonitril) und pH-Wertveränderungen verändert sein kann. Baclofen sowie seine lipophileren Ester (Methyl-, Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl- und Butyl-) waren in den verwendeten Konzentrationen sehr gut in Wasser löslich, so dass alle In-vitro-Untersuchungen ohne Zusatz von Cosolventien bei pH 7,0 im Inkubationspuffer durchgeführt werden konnten.

3.1.1.1. Bestimmung der IC₅₀-Werte

Zur Bestimmung der P-GP-Affinität mit Hilfe des Radioligandenbindungsassays wurden die Testsubstanzen in 12 unterschiedlichen Konzentrationen im Inkubationspuffer bei einer konstanten Konzentration des Radioliganden [³H]-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% [³H]-Talinolol) bei pH 7,0 gelöst. In den Bindungsstudien wurde eine fast vollständige Verdrängung des Radioliganden [³H]-Talinolol bei hohen Konzentrationen der Testsubstanz beobachtet. Die untersuchten Substanzen wiesen Unterschiede in der Verdrängung des Radioliganden auf. Zur Abschätzung der P-GP-Affinität wurden Talinolol und Verapamil, Modellsubstrate des P-Glykoproteins, als Referenzsubstanzen in die Bestimmung der IC₅₀-Werte miteinbezogen. Die Variabilität der erhaltenen Daten war gering für Baclofen und seine Ester, ebenso wie für Verapamil, eine der Referenzsubstanzen. Die konzentrationsabhängige Verdrängung des Radioliganden erlaubte die Bestimmung der IC₅₀-Werte für Baclofen und seine Esterderivate, für die typische Inhibitionskurven ermittelt wurden (Abbildung 7). Die In-vitro-Studien ergaben für Baclofen eine sehr geringe Affinität zum P-Glykoprotein (IC₅₀: 4492 µM). Für die lipophileren Baclofenderivate wurde eine Verdrängung des [³H]-Talinolol bei geringeren Konzentrationen nachgewiesen, was auf höhere Affinitäten zur makromolekularen Bindungsstelle des P-Glykoproteins hinweist. Der Baclofenmethylester zeigte mit einem IC₅₀-Wert von 1278 µM bereits eine Verdrängung des Radioliganden [³H]-Talinolol bei deutlich geringeren Konzentrationen. Die höchste P-GP-Affinität unter den untersuchten Baclofenderivaten wurde für den Isopropylester mit einem IC₅₀-Wert von 292 µM ermittelt. Die IC₅₀-Werte des 1-Propyl- und Butylesters waren dem IC₅₀-Wert des 2-Propylesters sehr ähnlich. Die höchste P-GP-Affinität aller untersuchten Substanzen wurde für die Referenzsubstanz Verapamil (IC₅₀-Wert: 76 µM) ermittelt, gefolgt von den lipophilsten der Baclofenester. Der IC₅₀-Wert des Talinolols, der zweiten Referenzsubstanz, lag zwischen dem IC₅₀-Wert des Butylesters und dem des Ethylesters (IC₅₀-Wert: 703 µM). Die Reihung der getesteten Substanzen ergab in Bezug auf die mit Hilfe des Radioligandenbindungsassays ermittelte P-GP-Affinität zusammengefasst Folgendes:

Verapamil > 2-Propylester / 1-Propylester / Butylester > Talinolol > Ethylester > Methylester > Baclofen

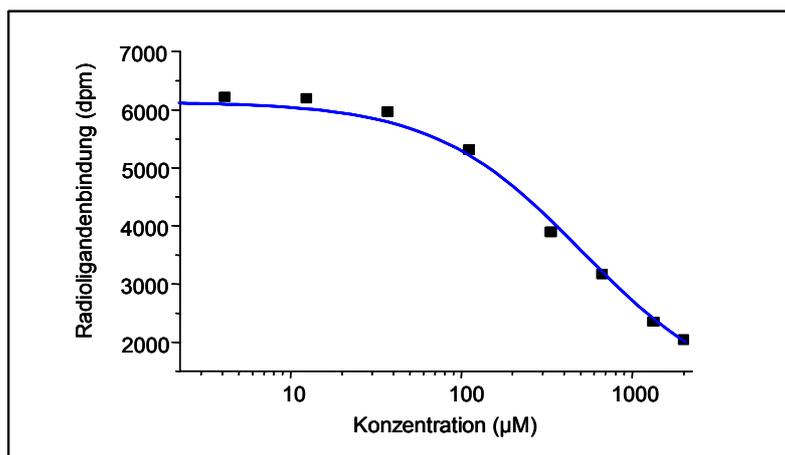


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Verdrängung des Radioliganden $[^3\text{H}]$ -Talinolol zur Bestimmung der IC_{50} -Werte am Beispiel des Baclofenbutylesters

3.1.1.2. Korrelation der IC_{50} -Werte mit dem Distributionskoeffizienten $\log D$

Die Reihung der Testsubstanzen in Kapitel 3.1.1.1. weist auf eine Beziehung zwischen Lipophilie und IC_{50} -Wert der Derivate des Baclofens hin. Die Korrelation zwischen dem IC_{50} - und dem $\log D$ -Wert ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten nach linearer Regressionsanalyse (r^2) betragen im Mittel 0,9321, wenn Baclofen mit in die Regressionsanalyse einbezogen wurde, und $r^2=0,9682$ ohne Einbeziehung von Baclofen, das nur eine geringe Affinität zum P-Glykoprotein aufwies. Eine statistische Signifikanz der Korrelation zwischen dem IC_{50} - und dem $\log D$ -Wert wurde in Übereinstimmung mit dem Rang-Korrelationskoeffizienten von Spearman [Sachs, 1992] auf der Basis von $p < 0,05$ gefunden. Die Veresterung des bei physiologischem pH zwitterionisch vorliegenden Baclofens entfernt eine ionisierbare Gruppe aus der Molekülstruktur. Beim Vergleich einer homologen Serie von Derivaten ist es generell sinnvoll, nur Strukturen gegenüberzustellen, die den gleichen Protonierungszustand aufweisen. Die hier untersuchten Baclofenderivate können aufgrund der veresterten Carboxylgruppe nicht mehr in zwitterionischer Form vorliegen. Daher ist es nicht überraschend, dass ohne Einbeziehung von Baclofen ein wesentlich besserer Korrelationskoeffizient bei der Regressionsanalyse erzielt wurde.

Tabelle 5: Übersicht der IC_{50} -Werte (μM) von Baclofen und verschiedenen seiner Esterderivate, sowie der Octanol/Wasser-Distributionskoeffizienten (O/W-DC), der $\log D$ -Werte [Herber, 2002] und der Anzahl der C-Atome in der Seitenkette der Estergruppierung

	Baclofen	Methylester	Ethylester	1-Propylester	2-Propylester	Butylester
C-Atome	0	1	2	3	3	4
O/W-DC	0,11	$3,0 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,2$	$20,2 \pm 1,6$	$18,6 \pm 0,8$	$26,4 \pm 1,1$
$\log D$	-0,96	0,48	0,77	1,31	1,27	1,42
IC_{50} (μM)	4492	1278	1055	315	292	430

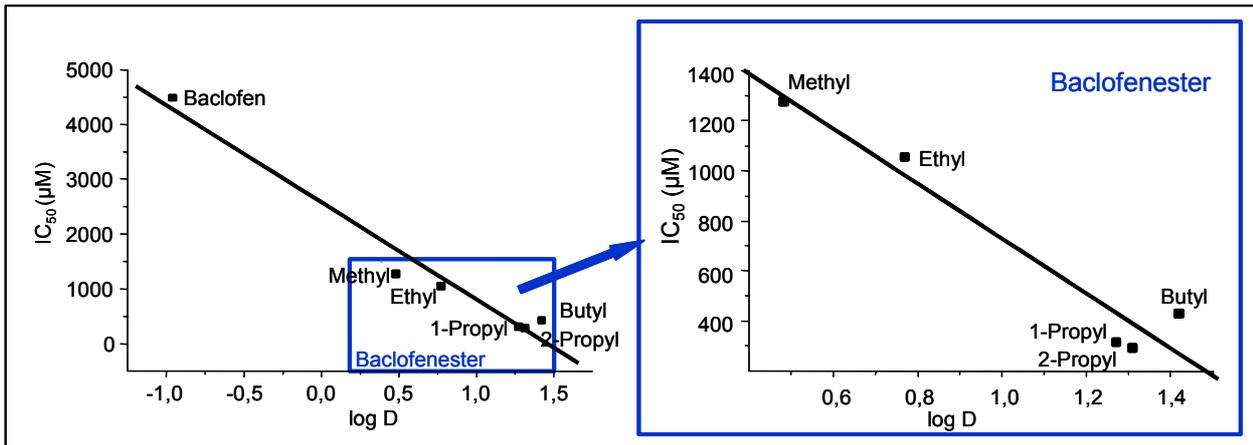


Abbildung 8: Korrelation von P-GP-Affinität (IC_{50}) und Lipophilie ($\log D$) von Baclofen und seinen Esterderivaten

3.1.1.3. Korrelation des Distributionskoeffizienten ($\log D$) gegen die Anzahl der C-Atome in der Seitenkette der Baclofenesterderivate

Mit wachsender Kettenlänge der Estergruppierung der Baclofenderivate (ansteigende Anzahl C-Atome in der Seitenkette) steigen erwartungsgemäß auch die Octanol/Wasser-Distributionskoeffizienten (O/W-DC) und die daraus abgeleiteten $\log D$ -Werte, als Maß für die Lipophilie (Tabelle 5). Das Verhältnis zwischen Lipophilieparameter und der Anzahl C-Atome in der Seitenkette der Estergruppierung wurde mittels linearer Regressionsanalyse analysiert. Dabei ergab sich eine eindeutige Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2=0,9390$, wenn nur die Baclofenesterderivate in die lineare Regression miteinbezogen wurden und $r^2=0,8664$ wenn zusätzlich Baclofen in die Regressionsanalyse aufgenommen wurde. In Abbildung 9 ist die Korrelation des $\log D$ mit der Anzahl C-Atome in der Seitenkette von Baclofen und seinen Esterderivaten dargestellt. Statistische Signifikanz wurde in Übereinstimmung mit dem Rang-Korrelationskoeffizienten von Spearman [Sachs, 1992] auf der Basis von $p<0,05$ gefunden.

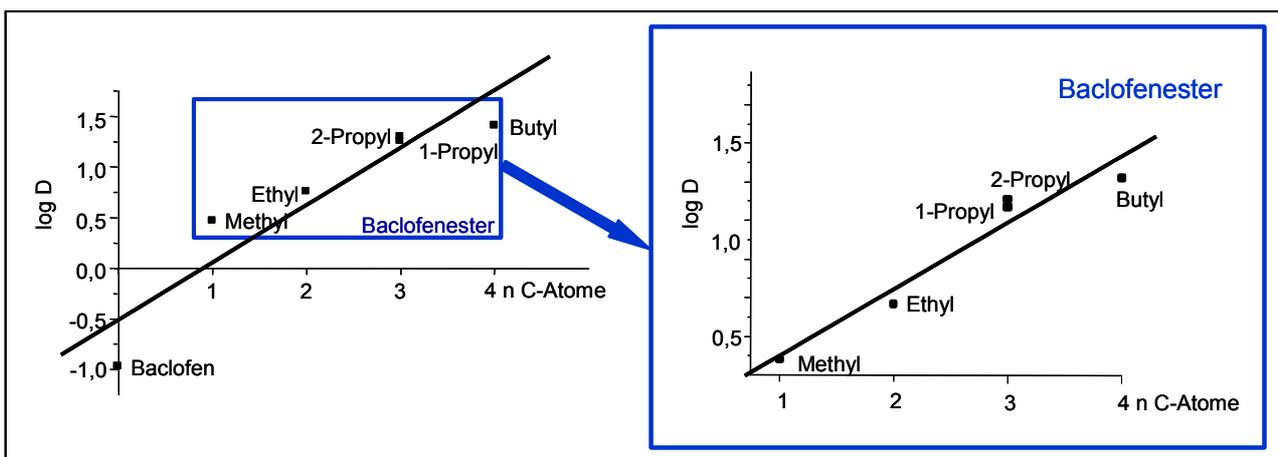


Abbildung 9: Korrelation der Lipophilie ($\log D$) und der Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette der Baclofenesterderivate

3.1.2. In-vivo-Untersuchungen

Die mit Hilfe des Radioligandenbindungsassays durchgeführten In-vitro-Untersuchungen ergaben steigende Affinitäten zum exsorbitiven Transporter P-Glykoprotein mit zunehmender Lipophilie der Baclofenderivate, d.h. je lipophiler der Alkohol, der zur Veresterung des Baclofens eingesetzt wurde, desto geringer der IC_{50} -Wert, der als Maß für die P-GP-Affinität diente. In In-vivo-Untersuchungen sollte nun überprüft werden, ob sich die in vitro ermittelten P-GP-Affinitäten auf die zu erwartenden Blut- und Organkonzentrationen in In-vivo-Studien übertragen lassen.

3.1.2.1. Intravenöse Applikation: Individuelle Konzentrations-Zeit-Profile verschiedener Baclofenester sowie der Muttersubstanz Baclofen

Ziel dieser Untersuchungen war es, die individuellen Konzentrations-Zeit-Profile von Baclofen sowie seinen Esterderivaten (Methyl-, Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, Butyl-) nach intravenöser Applikation einer Dosis von 1,0 mg Baclofen zu ermitteln. Die Dosen der Baclofenester wurden so gewählt, dass sie 1,0 mg/kg KG unverestertem Baclofen entsprachen (s. Kapitel 5.3.3.). Die erhaltenen Konzentrations-Zeit-Profile sind in Abbildung 10 dargestellt. Die höchsten Konzentrationen im Blut wurden erwartungsgemäß für die Muttersubstanz Baclofen erhalten [Herber, 2002]. Über den gesamten Zeitraum (210 min) konnte Baclofen im Blut nachgewiesen werden. Für den Methylester des Baclofens wurden ebenfalls hohe Konzentrationen im Blut nachgewiesen [siehe auch Döppenschmitt et al., 1998], allerdings war die interindividuelle Variabilität sehr hoch. Bei den höherwertigen Estern (Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, Butyl-) konnten bereits 3 Minuten nach Applikation nur noch sehr geringe Konzentrationen im Blut nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine rasche hydrolytische Spaltung der Ester zur Ausgangssubstanz Baclofen bzw. auf eine schnelle Distribution der Ester vom Blut in andere Organe hin. Neunzig Minuten nach Applikation lag die Konzentration der Baclofenester im Blut unter der Nachweisgrenze von 10 ng/ml. Die interindividuelle Variabilität war für diese Ester wesentlich geringer als für den Baclofenmethylester. Die Ester untereinander, mit Ausnahme des Baclofenmethylesters, zeigten relativ geringe Unterschiede bei den gemessenen Blutkonzentrationen. Nach der letzten Blutentnahme (210 Minuten nach der Applikation) wurden die Tiere getötet und anschließend das Hirngewebe entnommen. Im Gegensatz zum Blut konnten hier für alle Ester Konzentrationen zwischen 146 und 395 ng/g Gehirn nachgewiesen werden (Daten s. Anhang). Die höchsten Konzentrationen im Gehirn wurden für den Isopropylester des Baclofens bestimmt (285,6 ng/g), die geringsten für den Butylester (181,8 ng/g). Die Konzentrationen für den Ethylester (256,9 ng/g) und den 1-Propylester (245,2 ng/g) lagen in einem vergleichbaren Bereich. Da selbst 210 Minuten nach Applikation noch hohe Konzentrationen der Ester im Gehirn nachgewiesen werden konnten, ist eine rasche hydrolytische Spaltung als Ursache für die niedrigen Konzentrationen im Blut weniger wahrscheinlich als die schnelle Verteilung der Baclofenester in andere periphere und zentrale Organe bzw. Gewebe.

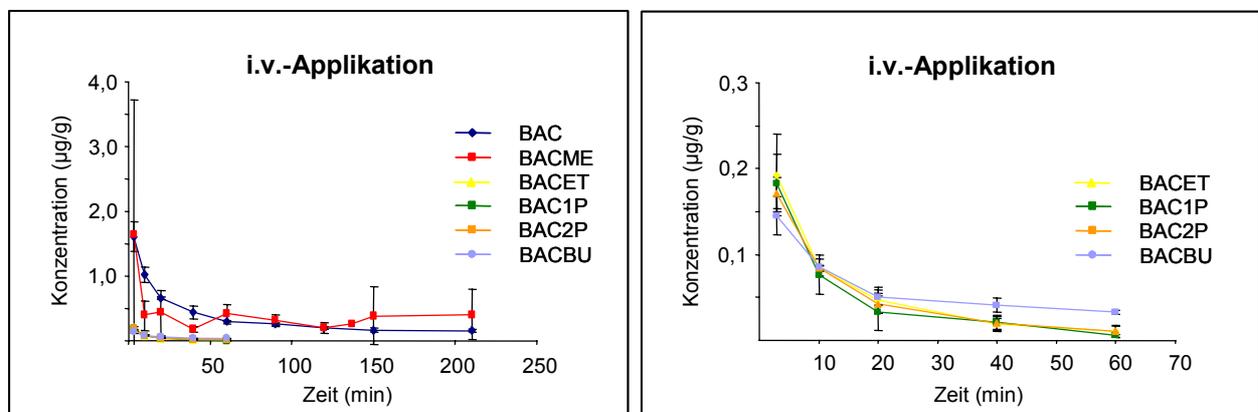


Abbildung 10: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Baclofen und seinen Estern nach intravenöser Applikation in der Ratte (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere)

Aus den individuellen Konzentrations-Zeit-Profilen (Abbildung 10) wurden die in Tabelle 6 zusammengefassten pharmakokinetischen Parameter berechnet.

Tabelle 6: Berechnete pharmakokinetische Parameter nach i.v.-Applikation von Baclofen und seinen Esterderivaten

	Baclofen	Methylester	Ethylester	1-Propyl- ester	2-Propyl- ester	Butylester
k_{el} (min ⁻¹)	0,012	0,016	0,048	0,056	0,050	0,024
$T_{1/2}$ (min)	61,8	38,0	14,7	12,6	14,6	28,6
AUD (µg*min/g)	95,9	60,4	2,2	2,3	2,4	2,9
MRT (min)	59,0	78,1	18,5	15,9	18,3	39,9
CL (ml/min)	13,0	12,7	372,3	414,8	365,2	276,8
V_D (l)	1,1	1,5	7,8	7,6	7,6	11,4

3.1.2.2. Intraperitoneale Applikation: Verteilung einer homologen Reihe von Baclofenestern im Blut und Gehirn

Die Konzentrations-Zeit-Profile, die nach intraperitonealer Applikation von Baclofen bzw. seinen Estern im Blut und Gehirn beobachtet wurden, zeigten ähnliche Ergebnisse, wie sie nach intravenöser Applikation erhalten wurden. Nach intraperitonealer Applikation wurden die höchsten Konzentrationen im Blut ebenfalls für das unveresterte Baclofen bestimmt. Für den Methylester des Baclofens, den Ester mit der geringsten Lipophilie in der Gruppe der untersuchten Baclofenderivate, wurden signifikant höhere Konzentrationen im Blut als für die übrigen Baclofenester (Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, Butyl-) gefunden. Die Konzentrationen, die für den 1-Propylester ermittelt wurden, waren im Vergleich zu den anderen untersuchten Esterderivaten besonders niedrig und lagen nur wenig über der Nachweisgrenze der verwendeten analytischen Methode. Lässt man den 1-Propylester ausser Acht, so zeichnet sich die Tendenz ab, dass mit zunehmender Lipophilie der Substanzen die Konzentration im Blut abnimmt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten des Bindungsassays überein, in dem für die Propylester und den Butylester die höchsten Affinitäten zum P-Glykoprotein nachgewiesen werden konnten. Im Gehirn war die Tendenz ähnlich. Die lipophileren Baclofenester wiesen eine deutlich bessere Penetration ins Gehirn auf. Die Konzentrationen der Ester im Gehirn waren signifikant höher als die Konzentrationen, die bei der Muttersubstanz Baclofen erzielt wurden. Vom Baclofenethylester zum Butylester stiegen mit zunehmender Lipophilie der Substanzen auch die Gehirnkonzentrationen an. Interessanterweise wies jedoch der Baclofenmethylester entgegen der Tendenz die höchsten Konzentrationen im Gehirn auf, die von allen untersuchten Estern ermittelt wurden. Des Weiteren war der Methylester neben der Muttersubstanz Baclofen auch die einzige Verbindung, deren maximale Gehirnkonzentration erst nach 20 Minuten erzielt wurde. Bei den übrigen Estern wurde diese bereits 5 Minuten nach Applikation erreicht. Zusammenfassend ergibt sich somit für die Ester eine höhere Gewebeselektivität, die sich in höheren Gehirn/Blut-Quotienten für die Ester im Vergleich zum Baclofen widerspiegelt (Abbildung 11). Allgemein ließ sich auch hier erkennen, dass mit zunehmender Lipophilie der Ester die Gehirn/Blut-Quotienten ansteigen. Eine Ausnahme bildete auch hier der 1-Propylester, der nach 5 und 60 Minuten die höchste Gewebeselektivität aufwies. Dies beruhte v.a. auf den sehr niedrigen Konzentrationen im Blut, während die Konzentration im Gehirn sowohl mit den Konzentrationen des Ethyl- als auch des 2-Propylesters vergleichbar waren.

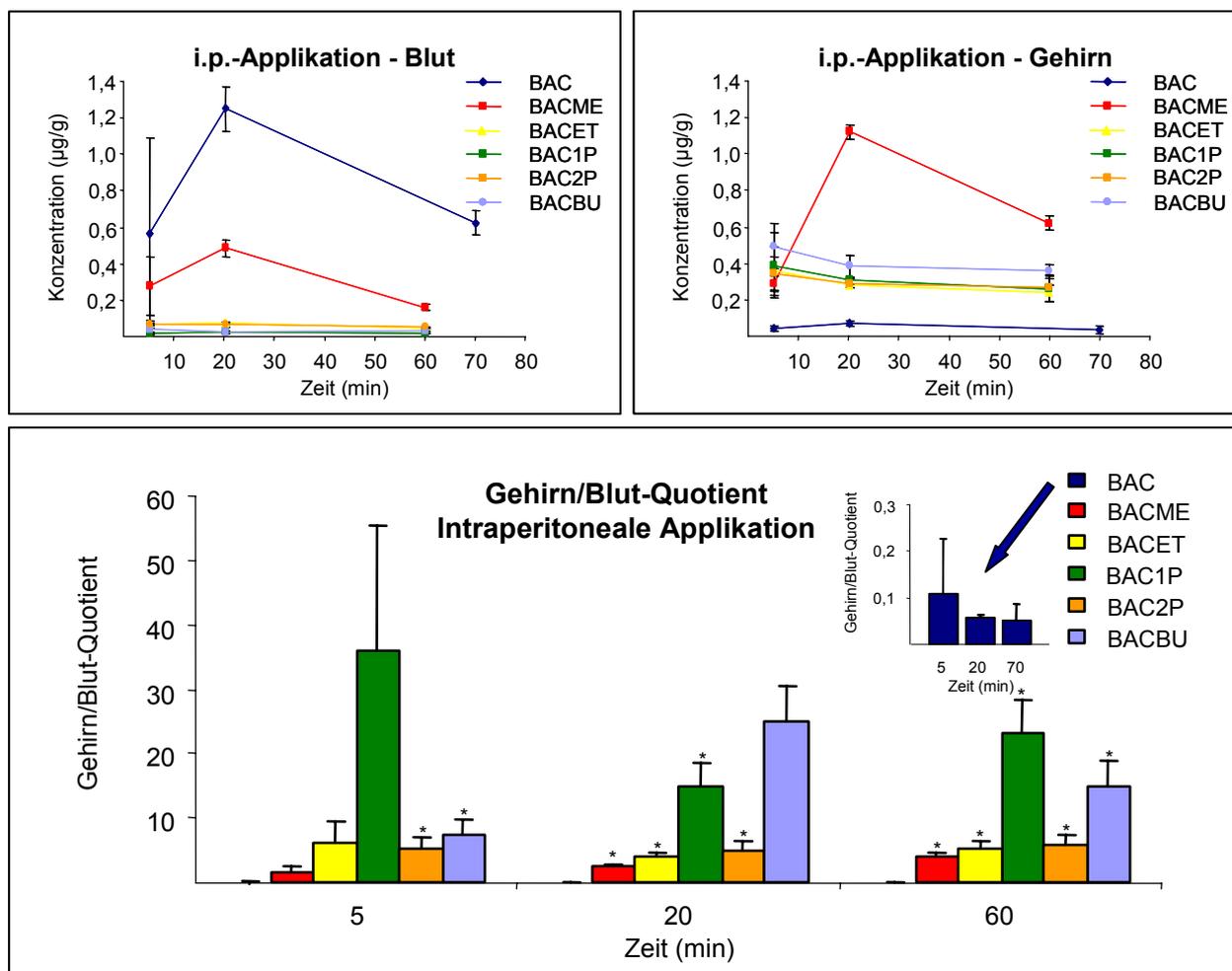


Abbildung 11: Konzentrationen von Baclofen und seinen Esterderivaten im Blut und Gehirn nach intraperitonealer Applikation an Ratten (Mittelwert \pm SD, $n=3$ Tiere) sowie hieraus berechnete Gehirn/Blut-Quotienten (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)

3.1.2.3. Intranasale Applikation: Verteilung einer homologen Reihe von Baclofenestern im Blut und Gehirn

Nach intranasaler Applikation von Baclofen bzw. seinen Estern in der Ratte wurden in den untersuchten Matrices (Blut und Gehirn) ähnliche Ergebnisse erzielt, wie sie auch nach intravenöser und intraperitonealer Applikation erhalten wurden. In Analogie zu diesen Ergebnissen, wurden auch nach intranasaler Applikation die höchsten Konzentrationen im Blut für die Muttersubstanz Baclofen bestimmt. Für den Methylester wurden vergleichsweise hohe Konzentrationen gefunden, die signifikant höher waren, als die der übrigen Baclofenester (Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, Butyl-). Die Ergebnisse der intranasalen Applikation bestätigten also die Tendenz zu abnehmenden Blutkonzentrationen bei zunehmender Lipophilie der Substanzen. Vom C₂- bis zum C₄-Ester des Baclofens blieben dabei jedoch die Konzentrationen im Blut nahezu gleich.

Analog zur intraperitonealen sowie zur intravenösen Applikation waren die Konzentrationen, die nach Applikation von Baclofen im Gehirn erzielt wurden, sehr gering [Herber, 2002]. Die lipophileren Baclofenester wiesen dagegen eine bessere Penetration ins Gehirn auf. Besonders hohe Konzentrationen traten nach Applikation des Baclofenbutylesters auf. Vom Baclofenethylester zum Butylester stiegen mit zunehmender Lipophilie der Substanzen auch die Gehirnkonzentrationen. Entgegen der Tendenz waren jedoch wie auch nach intraperitonealer Applikation die Konzentrationen an Baclofenmethylester vergleichsweise hoch (s. Abbildung 12). Bei allen untersuchten Estern wurde die maximale Konzentration im Gehirn bereits nach 5 Minuten erreicht.

Beim Methylester blieb die Konzentration über den beobachteten Zeitraum nahezu konstant, während für die übrigen Ester schon nach 20 Minuten ein deutlicher Abfall in der Gehirnkonzentration zu erkennen war. Die Muttersubstanz Baclofen war die einzige Verbindung, deren maximale Gehirnkonzentration nicht bereits 5 Minuten nach Applikation erzielt wurde. Insgesamt ergibt sich somit auch für die intranasale Applikation eine höhere Gewebeselektivität für die Baclofenester im Vergleich zum Baclofen, erkennbar an höheren Gehirn/Blut-Quotienten für die Ester (Abbildung 12). Die Gehirn/Blut-Quotienten nach intranasaler Applikation waren für die meisten Baclofenester höher als die entsprechenden Quotienten nach i.p.-Applikation. Für den Butylester ergaben sich intranasaler Applikation Gewebe/Blut-Quotienten, die statistisch signifikant ($p < 0,05$) höher waren als nach intraperitonealer Applikation. Nur der 1-Propylester wies nach intranasaler Applikation niedrigere Gehirn/Blut-Quotienten auf als nach i.p.-Applikation. Diese Ergebnisse zeigen, dass die intranasale Applikation der Baclofenester geeignet ist, eine höhere Selektivität für das Gehirn zu erreichen.

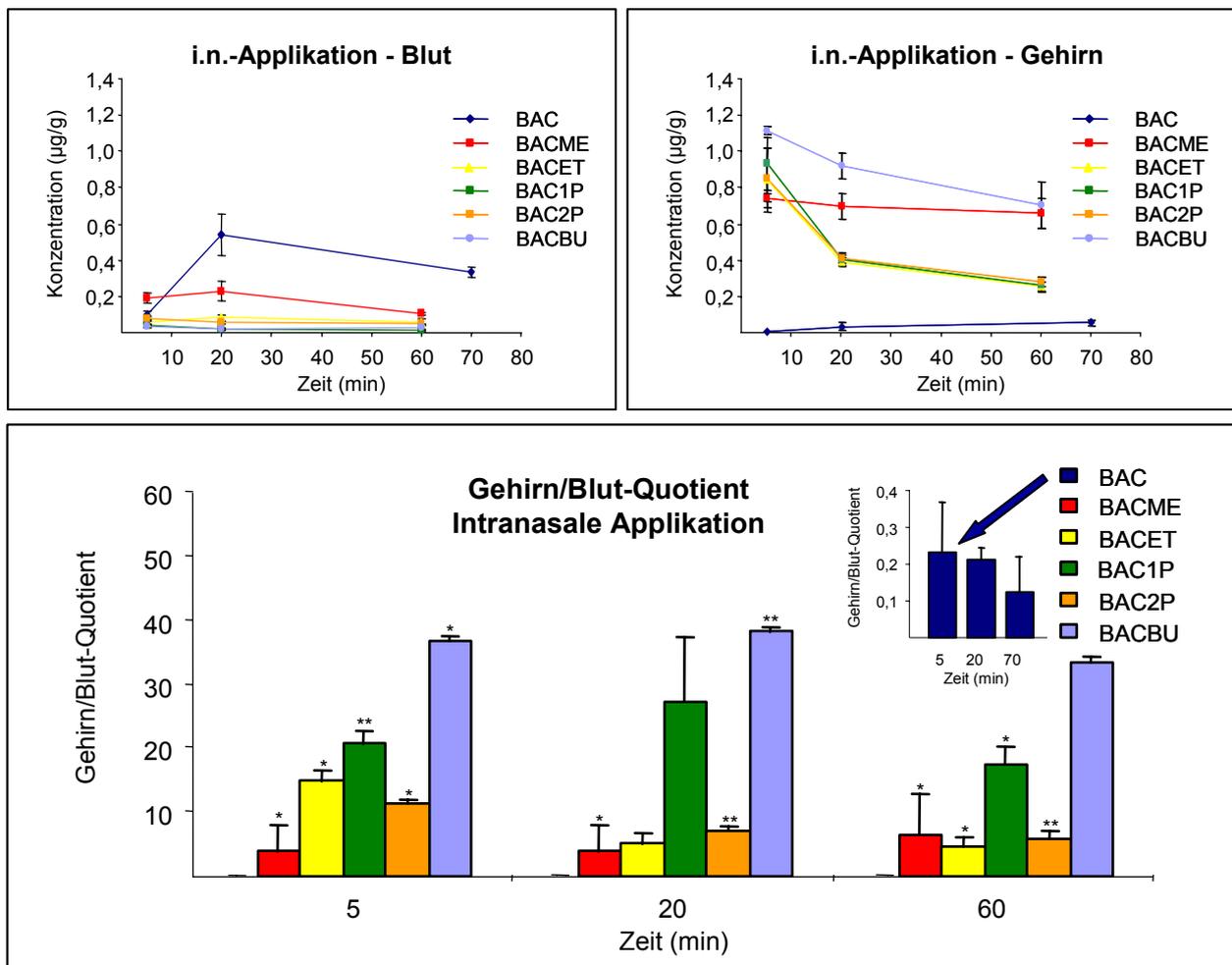


Abbildung 12: Konzentrationen von Baclofen und seinen Esterderivaten im Blut und Gehirn nach intranasaler Applikation an Ratten (Mittelwert \pm SD, $n=3$ Tiere) sowie hieraus berechnete Gehirn/Blut-Quotienten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

3.1.2.4. In-vivo-Verteilungsstudie

Zur Bestimmung des Verteilungsverhaltens und zur Bestätigung der P-GP-Affinität der Baclofenester wurde am Beispiel des Baclofenbutylesters, der sich in den In-vitro- und den vorausgegangenen In-vivo-Studien (Kapitel 3.1.2.1.-3.) als einer der Ester mit hoher P-GP-Affinität herausgestellt hatte, In-vivo-Verteilungsstudien durchgeführt. Die Verteilungsstudien wurden an männlichen White-Wistar-Ratten nach intravenöser Applikation von Baclofenbutylester und Talinolol durchgeführt. Den

Ratten wurde dabei entweder der Baclofenbutylester (10 mg/kg KG) oder Talinolol (4 mg/kg KG) separat appliziert, bzw. eine dritte Gruppe von Tieren erhielt eine Kombination der beiden Substanzen. Dies ermöglichte die Bestimmung des gegenseitigen Einflusses der beiden Substanzen aufeinander, also die Beantwortung der Frage: Welchen Einfluss hat das P-GP-Modellsubstrat Talinolol auf die In-vivo-Verteilung des Baclofenbutylesters und wie wird andererseits das Verteilungsverhalten von Talinolol durch den Butylester des Baclofens beeinflusst?

3.1.2.4.1. Einfluss des P-GP-Substrates Talinolol auf die In-vivo-Verteilung von Baclofenbutylester

Die Konzentrations-Zeit-Profile des Baclofenbutylesters (Abbildung 13) wurden nach intravenöser Applikation von 10 mg/kg KG Butylester mit bzw. ohne i.v.-Coadministration von Talinolol (4 mg/kg KG) zu vier verschiedenen Zeitpunkten im Blut und verschiedenen relevanten Organen (Gehirn, Leber, Niere, Jejunum, Ileum) bestimmt. Unabhängig von der Behandlung wurden in allen Organen maximale Konzentrationen bereits nach 0,5 Stunden ermittelt. Die geringsten Konzentrationen an Baclofenbutylester waren im zentralen Kompartiment Blut sowie im Ileum zu finden. Die höchsten Konzentrationen wurden dagegen im Gehirn erzielt. Hohe Konzentrationen wurden des Weiteren in der Niere, sowie in der Leber bestimmt. Die Konzentration in der Leber war allerdings nur initial und nur bei gleichzeitiger Applikation von Talinolol sehr hoch. Innerhalb der ersten Stunde nahm die Konzentration in der Leber sehr schnell ab.

Unter dem Einfluss des P-GP-Modulators Talinolol sank die Konzentration an Baclofenbutylester im Blut. In den übrigen Organen bewirkte die Coadministration von Talinolol einen Anstieg in der Konzentration des Butylesters. Besonders deutlich wurden diese Unterschiede im Gehirn und in der Leber (Abbildung 13). Der Einfluss von Talinolol auf die Konzentrations-Zeit-Profile war besonders stark ausgeprägt zum Zeitpunkt der ersten Probennahme. Nachfolgend glichen sich die Konzentrations-Zeit-Profile zunehmend an und nach 4 Stunden war, abgesehen vom Ileum kein Unterschied mehr zwischen den beiden Behandlungen feststellbar.

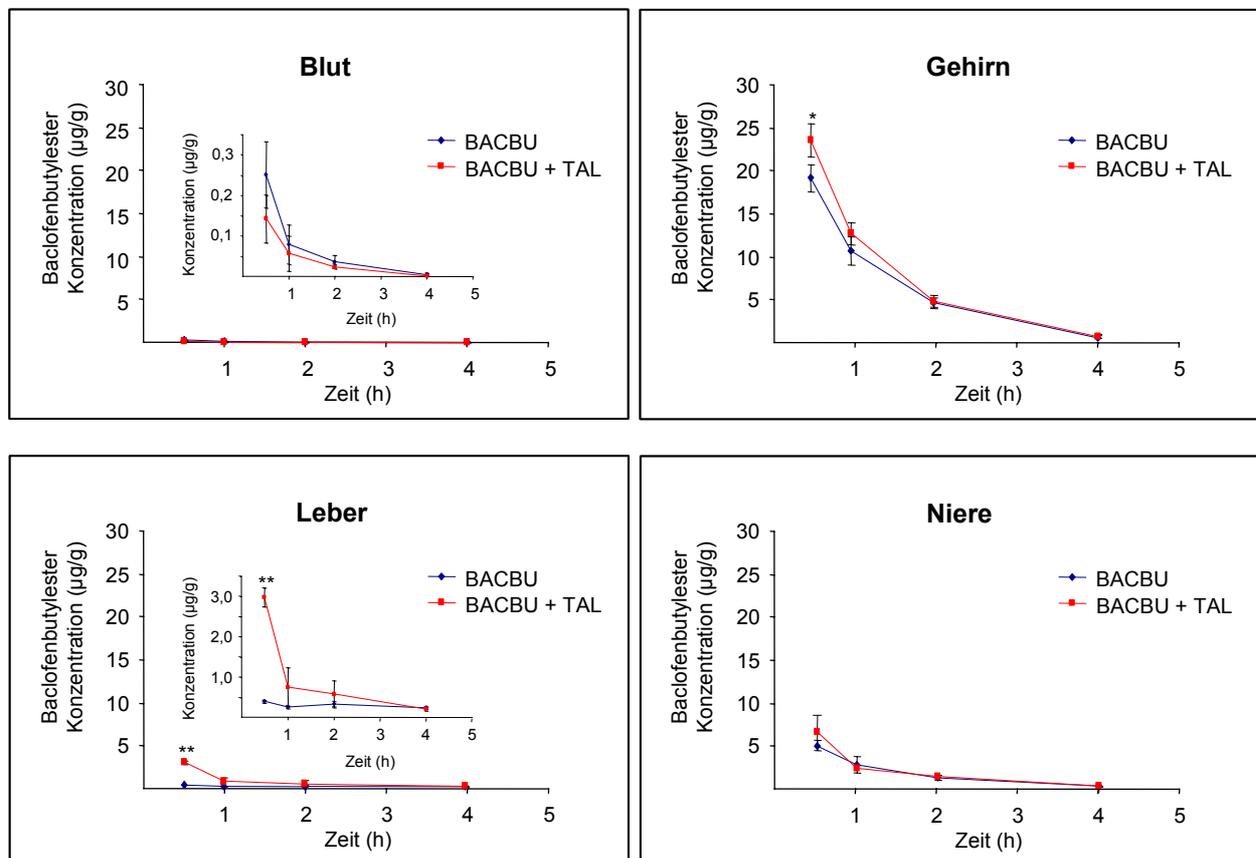


Abbildung 13 Teil 1

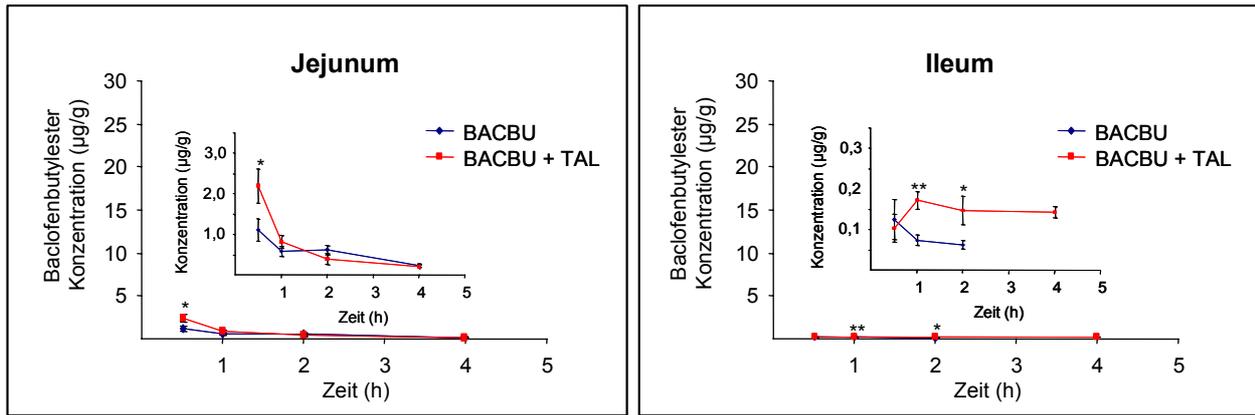


Abbildung 13 (Fortsetzung): Einfluss des P-GP-Substrates Talinol auf die In-vivo-Verteilung des Baclofenbutylesters: Konzentrations-Zeit-Profile nach i.v.-Gabe mit und ohne Coadministration von Talinol (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

Tabelle 7: Mittlere AUD-Werte von Baclofenbutylester nach intravenöser Applikation des Butylesters mit bzw. ohne Coadministration von Talinol (*p<0,05, **p<0,01)

Applikation	AUD ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{g}$)					
	Blut	Gehirn	Leber	Niere	Jejunum	Ileum
BACBU	10,90	1272,04	49,32	319,26	98,13	8,01
BACBU+TAL	7,00	1457,20	142,24**	341,81	106,44	30,99**

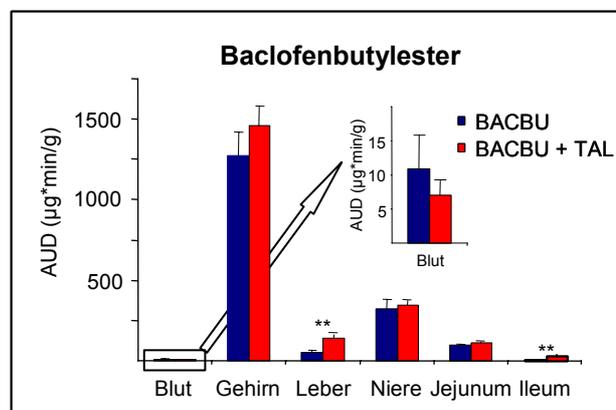


Abbildung 14: Mittlere AUD-Werte des Baclofenbutylesters nach intravenöser Applikation mit bzw. ohne i.v.-Coadministration von Talinol (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

Die Bestimmung der Blut-Konzentrations-Zeitverläufe und die Berechnung der AUD-Werte zeigte, dass der applizierte Baclofenbutylester sehr schnell Verteilungsvorgängen unterliegt, was sich in den nur sehr geringen Konzentrationen und dementsprechend niedrigen AUD-Werten im Blut und den rasch ansteigenden Konzentrationen in anderen Organen widerspiegelte. Die höchsten Konzentrationen wurden sowohl nach alleiniger Applikation von Baclofenbutylester als auch nach Co-medikation von Talinol im Gehirn erzielt. Die Fläche unter den Datenpunkten war für das Gehirn um den Faktor 117 höher als für das Blut, wenn der Ester alleine appliziert wurde, bei Coadministration von Talinol sogar um den Faktor 208 höher. Die Konzentration in der Niere war

bei beiden Applikationen ebenfalls signifikant höher als im Blut (Butylester: Faktor 29; Butylester + Talinolol: Faktor 49). Die Konzentration an Baclofenbutylester war in der Leber sehr hoch, jedoch nahm die Konzentration innerhalb der ersten Stunde stark ab. Interessanterweise war der Einfluss von Talinolol auf die Konzentration und die AUD in der Leber besonders groß. Die Fläche unter den Datenpunkten war durch die zusätzliche Applikation von Talinolol im Vergleich zur alleinigen Gabe des Butylesters um den Faktor 2,9 erhöht. Im Darmgewebe wurden für die alleinige Applikation des Baclofenbutylesters signifikant höhere AUD's für das Jejunum im Vergleich zum Ileum bestimmt. Die gleichzeitige intravenöse Gabe von Talinolol führte sowohl im Jejunum als auch im Ileum zu einer Erhöhung der AUD. Neben der Leber war der Einfluss von Talinolol auf die AUD besonders hoch im Ileum. Talinolol bewirkte hier nahezu ein Vervierfachung der Fläche unter den Datenpunkten.

Zur Abschätzung der Veränderungen in der Verteilung des Baclofenbutylesters in Abhängigkeit von der Zeit wurden Gewebe/Blut-Quotienten (Tissue-to-blood ratios) für die 4 Zeitpunkte berechnet und miteinander verglichen (Abbildung 15). Hierbei wurde deutlich (Tabelle 8), dass die Coadministration von Talinolol zu einem deutlichen Anstieg der Gewebe/Blut-Quotienten in allen untersuchten Organen führte. In der Niere, Leber und in den Darmsegmenten waren die Quotienten über den Zeitraum von 0,5-2 Stunden annähernd konstant. Nach 4 Stunden wurden maximale Gewebe/Blut-Quotienten ermittelt. Eine Stunde nach der Applikation wurde im Gehirn zusätzlich ein zweites Maximum in dem Gewebe/Blut-Quotienten erreicht.

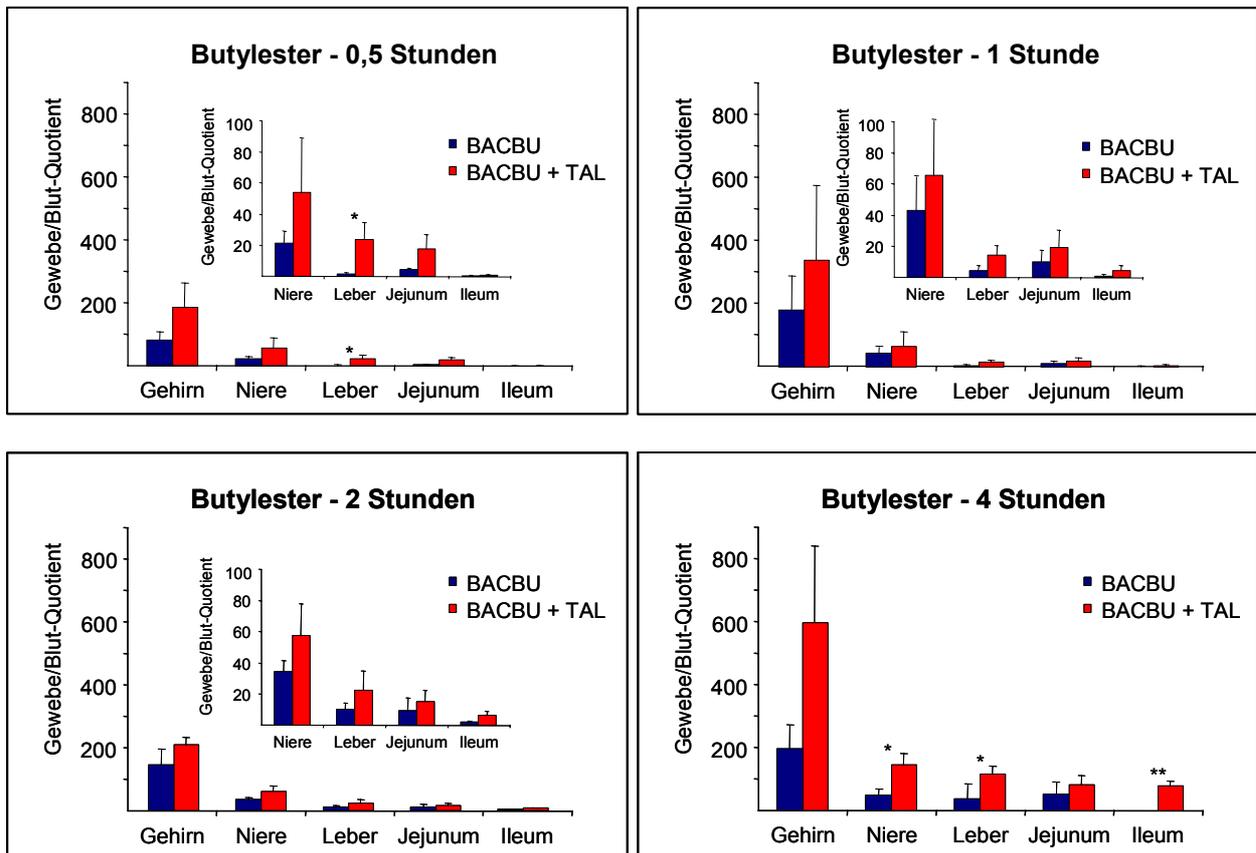


Abbildung 15: Gewebe/Blut-Quotienten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden nach Applikation des Baclofenbutylesters mit bzw. ohne Coadministration von Talinolol (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere; $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Tabelle 8: Relative Veränderungen der Gewebe/Blut-Quotienten des Baclofenbutylesters durch Coadministration von Talinolol (in Prozent) in Abhängigkeit von der Zeit. Bei gleichzeitiger Applikation von Talinolol wurde in allen Organen ein Anstieg der Gewebe/Blut-Quotienten beobachtet (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Gewebe	0,5 Stunden			1 Stunde		
	BACBU	BACBU+TAL	%-Veränd.	BACBU	BACBU+TAL	%-Veränd.
Gehirn	82,7 \pm 24,9	186,4 \pm 75,3	+ 125,4	183,6 \pm 114,1	346,8 \pm 245,9	+ 88,9
Leber	1,7 \pm 0,7	23,7 \pm 10,4	+ 1294,1*	4,6 \pm 3,3	14,3 \pm 6,4	+ 210,9
Niere	21,4 \pm 7,3	53,8 \pm 34,4	+ 151,4	43,4 \pm 21,1	66,0 \pm 49,0	+ 52,1
Jejunum	4,4 \pm 1,1	17,7 \pm 9,6	+ 302,3	9,9 \pm 7,9	19,3 \pm 11,3	+ 94,9
Ileum	0,5 \pm 0,1	0,8 \pm 0,6	+ 68,0	1,0 \pm 1,1	4,6 \pm 3,1	+ 360,0
Gewebe	2 Stunden			4 Stunden		
	BACBU	BACBU+TAL	%-Veränd.	BACBU	BACBU+TAL	%-Veränd.
Gehirn	145,8 \pm 46,0	209,2 \pm 19,8	+ 43,5	196,0 \pm 74,8	594,8 \pm 244,6	+ 203,5
Leber	10,3 \pm 4,0	22,5 \pm 12,6	+ 118,4	37,7 \pm 42,0	114,5 \pm 26,8	+ 203,7*
Niere	34,6 \pm 7,0	57,5 \pm 20,8	+ 66,2	48,9 \pm 16,0	146,0 \pm 37,2	+ 198,6*
Jejunum	9,3 \pm 8,3	15,1 \pm 7,8	+ 62,4	50,5 \pm 38,0	80,2 \pm 32,7	+ 58,8
Ileum	2,0 \pm 1,0	6,4 \pm 2,9	+ 220,0	-	79,5 \pm 12,1	-**

3.1.2.4.2. Einfluss des Baclofenbutylesters auf die In-vivo-Verteilung von Talinolol

Im zweiten Teil der Verteilungsstudie wurde der Einfluss des Baclofenbutylesters auf die In-vivo-Verteilung von Talinolol überprüft. Dazu wurden die Konzentrations-Zeit-Profile des Talinolols nach intravenöser Applikation von 4 mg/kg KG Talinolol mit den Konzentrations-Zeit-Profilen des Talinolols verglichen, die durch gleichzeitige Gabe des Baclofenbutylesters (10 mg/kg KG) zu vier verschiedenen Zeitpunkten im Blut und verschiedenen relevanten Organen (Gehirn, Leber, Niere, Jejunum, Ileum) erhalten wurden (Abbildung 16). Die höchsten Konzentrationen an Talinolol wurden unabhängig von der Behandlung in der Leber, gefolgt vom Ileum gefunden. Maximale Konzentrationen wurden in den meisten Organen eine halbe Stunde nach Applikation ermittelt, in der Leber jedoch erst eine Stunde nach Applikation. Im Ileum stieg die Talinololkonzentration ebenfalls von 0,5 auf 1 Stunde an, blieb dann bis zum Zweistundenwert konstant und nahm erst dann wieder ab. Dagegen nahm die Konzentration im Jejunum, dem proximalen Segment des Dünndarmes über den untersuchten Zeitraum nahezu linear ab. Unter dem Einfluss des Baclofenbutylesters veränderten sich die Konzentrationen des Talinolols in den meisten Organen nur wenig (Blut, Jejunum, Ileum). In der Leber führte der Zusatz an Butylester zu einer deutlichen Reduktion der Konzentrationen zu allen untersuchten Zeitpunkten. In der Niere bewirkte der Zusatz an Baclofenbutylester zur Applikationslösung ebenfalls eine Reduktion der Konzentration des Talinolols, allerdings wurde der Effekt nur initial deutlich, d.h. nach 0,5 sowie 1 Stunde. Zu späteren Zeitpunkten glichen sich die Konzentrationen an. Im Gehirn konnte bei keiner Behandlung Talinolol nachgewiesen werden.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Enantiomeren des Talinolols konnte nicht festgestellt werden, daher wurde auf eine separate Darstellung des R-Talinolols (s. Anhang) verzichtet und nur das S-Enantiomer in den folgenden Abbildungen dargestellt.

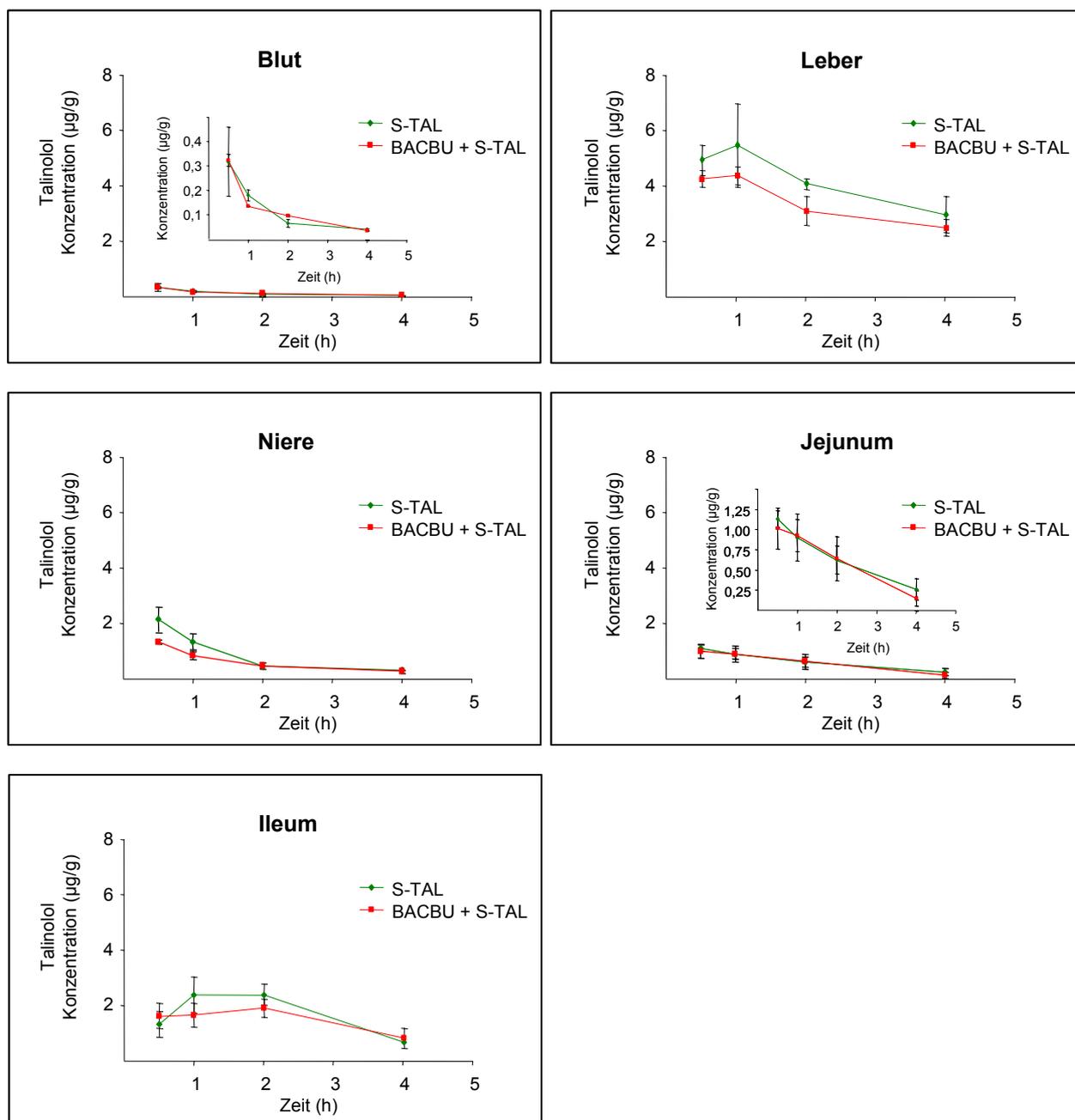


Abbildung 16: Einfluss des Baclofenbutylesters auf die Kinetik bzw. In-vivo-Verteilung des P-GP-Substrates Talinolol: Konzentrations-Zeit-Profile von S-Talinolol mit und ohne Coadministration von Baclofenbutylester (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Tabelle 9: Mittlere AUD-Werte der Enantiomeren des Talinolols nach intravenöser Applikation mit bzw. ohne Coadministration von Baclofenbutylester (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Applikation	AUD ($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{g}$)					
	Blut	Gehirn	Leber	Niere	Jejunum	Ileum
S-TAL	21,82	-	851,36	158,30	129,10	380,22
S-TAL+BACBU	21,38	-	675,43	120,76	123,75	315,79
R-TAL	24,38	-	907,19	167,49	140,62	391,27
R-TAL+BACBU	26,55	-	728,36	141,33	133,67	307,88

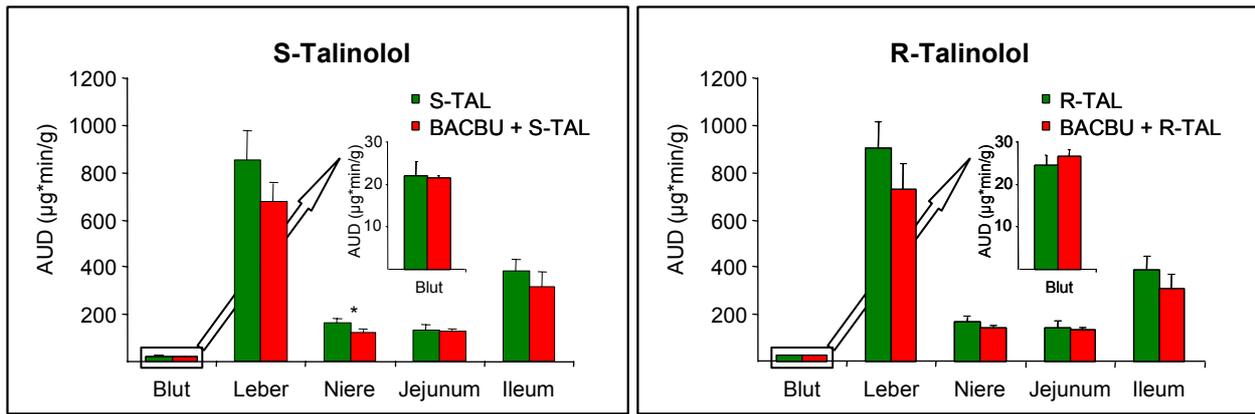


Abbildung 17: Mittlere AUD-Werte der Enantiomere des Talinolols nach intravenöser Applikation mit bzw. ohne Coadministration des Baclofenbutylesters (BACBU) (Mittelwert \pm SD, $n=3$ Tiere; * $p<0,05$, ** $p<0,01$)

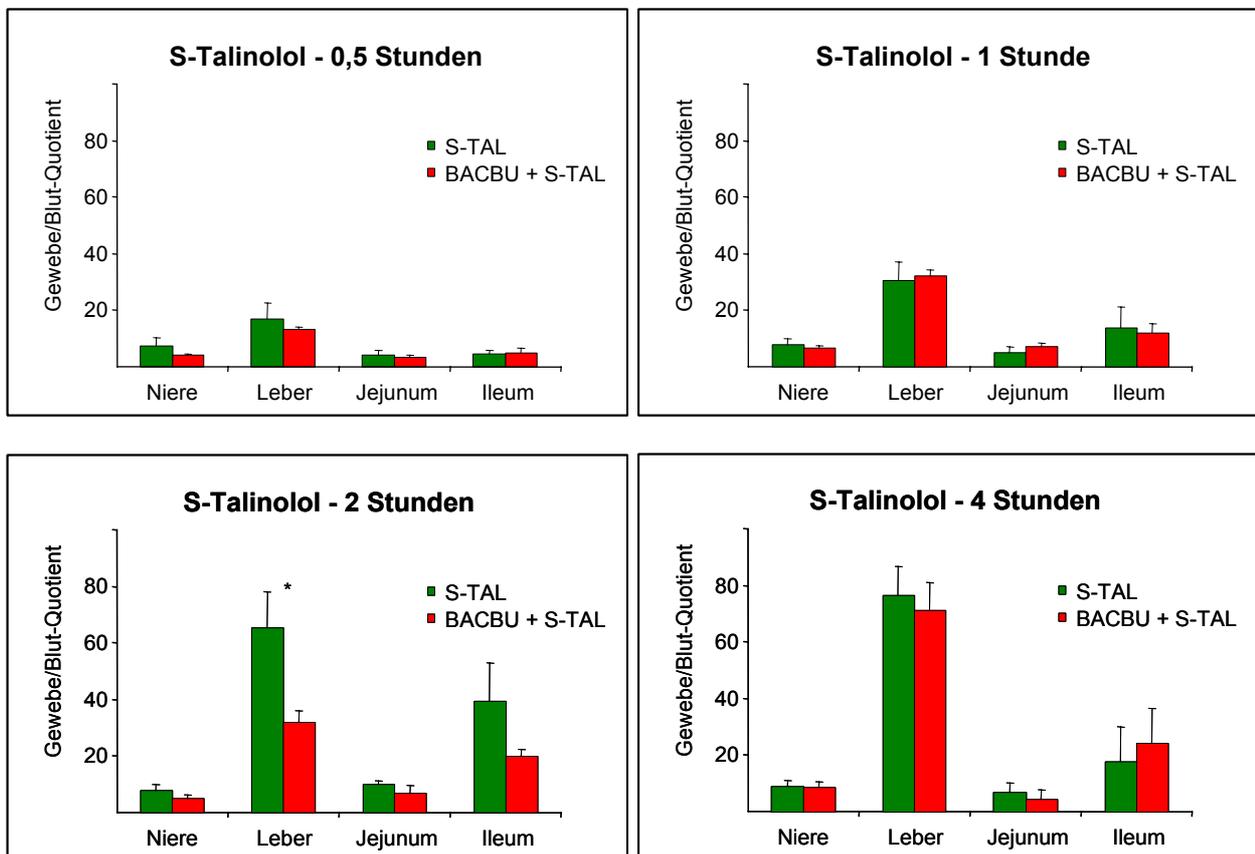


Abbildung 18: Gewebe/Blut-Quotienten 0,5, 1, 2 und 4 Stunden nach Applikation von Talinolol mit bzw. ohne gleichzeitige i.v.-Gabe von Baclofenbutylester (MW \pm SD, $n=3$ Tiere; * $p<0,05$, ** $p<0,01$)

Die Bestimmung der Blut-Konzentrations-Zeitverläufe und die Berechnung der AUD-Werte machte deutlich, dass das applizierte Talinolol ebenso wie der Baclofenbutylester sehr schnell verlaufenden Distributionsvorgängen unterliegt. Allerdings unterscheiden sich die beiden Substanzen in den Organen, in denen die höchsten Konzentrationen erzielt werden. Im Gehirn, dem Organ, in dem die höchste AUD für den Butylester gefunden wurde, konnte kein Talinolol detektiert werden. Dagegen wurden sehr hohe AUD's in der Leber bestimmt, ebenso wie im Ileum. Der Unterschied zwischen

der AUD des Jejunums und des Ileums war signifikant, mit einer signifikant geringeren AUD im Jejunum.

Zur Abschätzung der Veränderung in der Verteilung durch den Zusatz an Baclofenbutylester wurden auch für Talinolol Gewebe/Blut-Quotienten (Tissue-to-blood ratios) in Abhängigkeit von der Zeit berechnet und miteinander verglichen (Abbildung 18). Es zeigte sich (Tabelle 10), dass die Coadministration von Baclofenbutylester nicht zu einer einheitlichen Tendenz in den Gewebe/Blut-Quotienten führte. Im Gegensatz zum Einfluss von Talinolol auf die Verteilung des Butylesters führte hier der Zusatz des Butylesters zum Talinolol meist sogar zu einer Reduktion der Gewebe/Blut-Quotienten. Die Unterschiede zwischen den Gewebe/Blut-Quotienten war jedoch in der Regel nicht signifikant. Die Quotienten blieben während des untersuchten Zeitraumes relativ konstant, nur in der Leber stiegen sie mit der Zeit an.

Tabelle 10: Gewebe/Blut-Quotienten der Enantiomeren des Talinolols mit bzw. ohne Coadministration von Baclofenbutylester sowie relative Veränderungen der Quotienten durch die gleichzeitige Gabe des Butylesters (in Prozent) (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

Gewebe	0,5 Stunden			1 Stunde		
	S-TAL	S-TAL +BACBU	%-Veränd.	S-TAL	S-TAL +BACBU	%-Veränd.
Leber	16,9 \pm 5,8	13,0 \pm 0,8	- 23,1	30,3 \pm 6,9	32,0 \pm 2,0	+ 5,6
Niere	7,6 \pm 2,8	4,2 \pm 0,2	- 44,7	7,7 \pm 2,3	6,5 \pm 1,1	- 15,6
Jejunum	4,0 \pm 1,6	3,2 \pm 1,0	- 20,0	5,1 \pm 1,9	6,9 \pm 1,5	+ 35,3
Ileum	4,5 \pm 1,4	5,0 \pm 1,4	+ 11,1	13,8 \pm 7,4	12,1 \pm 3,1	- 12,3

Gewebe	2 Stunden			4 Stunden		
	S-TAL	S-TAL +BACBU	%-Veränd.	S-TAL	S-TAL +BACBU	%-Veränd.
Leber	64,8 \pm 13,1	31,7 \pm 4,3	- 51,1*	76,7 \pm 15,3	71,2 \pm 10,0	- 7,2
Niere	8,0 \pm 1,7	5,1 \pm 0,9	- 36,3	9,0 \pm 1,8	8,6 \pm 2,0	- 4,4
Jejunum	9,7 \pm 1,5	6,7 \pm 2,7	- 30,9	7,1 \pm 3,9	4,6 \pm 3,3	- 35,2
Ileum	39,0 \pm 13,8	19,7 \pm 2,8	- 49,5	17,6 \pm 3,5	24,2 \pm 12,5	+ 37,5

Gewebe	0,5 Stunden			1 Stunde		
	R-TAL	R-TAL +BACBU	%-Veränd.	R-TAL	R-TAL +BACBU	%-Veränd.
Leber	16,1 \pm 4,7	13,4 \pm 0,7	- 16,8	26,2 \pm 5,1	26,2 \pm 5,7	0
Niere	6,4 \pm 2,3	4,4 \pm 1,0	- 31,3	6,1 \pm 1,8	5,8 \pm 1,7	- 4,9
Jejunum	3,6 \pm 1,2	3,2 \pm 0,6	- 11,1	4,3 \pm 1,5	5,2 \pm 1,7	+ 20,9
Ileum	5,1 \pm 0,9	4,6 \pm 0,7	- 9,8	11,6 \pm 3,3	9,4 \pm 2,4	- 19,0

Gewebe	2 Stunden			4 Stunden		
	R-TAL	R-TAL +BACBU	%-Veränd.	R-TAL	R-TAL +BACBU	%-Veränd.
Leber	58,2 \pm 11,7	27,9 \pm 4,8	- 52,1*	66,8 \pm 15,5	55,9 \pm 9,2	- 16,3
Niere	8,0 \pm 2,2	4,9 \pm 0,6	- 38,8	8,9 \pm 2,0	7,8 \pm 1,1	- 12,4
Jejunum	9,3 \pm 1,9	6,0 \pm 1,5	- 35,5	6,5 \pm 3,3	4,4 \pm 1,9	- 32,3
Ileum	32,2 \pm 10,1	15,0 \pm 2,4	- 53,4	14,8 \pm 2,8	17,8 \pm 7,1	+ 20,3

3.2. Studien zur Affinität verschiedener Testsubstanzen zu absorptiven Aminosäuretransportern

3.2.1. In-situ-Untersuchungen

Die In-situ-Untersuchungen wurden als Zwei- oder Dreistufenperfusion in jeweils drei intestinalen Segmenten (Jejunum, Ileum und Colon) simultan durchgeführt und die P_{eff} -Werte in Abständen von 5 Minuten für die 30minütige Steady-state-Periode berechnet. Während der Steady-state-Periode traten für keine der getesteten Substanzen bei der Bestimmung der Basispermeabilität zeitabhängige Veränderungen der P_{eff} -Werte auf, die auf eine Instabilität des Systems hindeuteten (Trend-Test [Sachs, 1992]). Die Perfusionsbedingungen waren stabil bis zum Ende der Perfusion (max. 135 min). Dies wurde auch durch den Wassertransport bestätigt, der für die gesamte Zeit und unabhängig von der jeweiligen Behandlung maximal 10% betrug und keinen Trend aufwies.

3.2.1.1. Untersuchungen mit Baclofen

3.2.1.1.1. Konzentrationsabhängigkeit der intestinalen Baclofenpermeabilität im in-situ perfundierten Rattendarm

In einer Dreistufenperfusion (n=2 Tiere) wurde im Jejunum, Ileum und Colon simultan die Konzentrationsabhängigkeit der Baclofenpermeabilität untersucht. Dabei wurden die intestinalen Segmente mit ansteigenden Konzentrationen an Baclofen (0,05, 0,1 und 0,5 mM) perfundiert. Die Berechnung der intestinalen Permeabilitäten (P_{eff} -Werte) zeigte eine hohe Transportrate für Baclofen in allen drei untersuchten intestinalen Segmenten. Es stellte sich heraus, dass das Absorptionsverhalten von Baclofen in den beiden untersuchten Dünndarmsegmenten sehr ähnlich ist. Die Unterschiede zwischen den beiden Dünndarmabschnitten, Jejunum und Ileum, waren nicht signifikant. Die Permeabilität des Baclofens im Colon war allerdings signifikant höher als in den beiden Segmenten des Dünndarmes.

Die intestinalen Segmente verhielten sich ähnlich auf ansteigende Baclofenkonzentrationen im Perfusat. Während die Verdopplung der Baclofenkonzentration von 0,05 mM auf 0,1 mM einen deutlichen Anstieg in der Permeabilität verursachte (s. Abbildung 19), der sich nahezu in einer Verdopplung der Baclofenpermeabilität äußerte, führte die Erhöhung der Baclofenkonzentration im Perfusat auf 0,5 mM nur noch zu einer geringen Steigerung der effektiven Permeabilität (Jejunum 16,3%, Ileum 23,8%, Colon 9,0%). Für die weiteren Studien wurde daher als Baclofenkonzentration 0,1 mM ausgewählt.

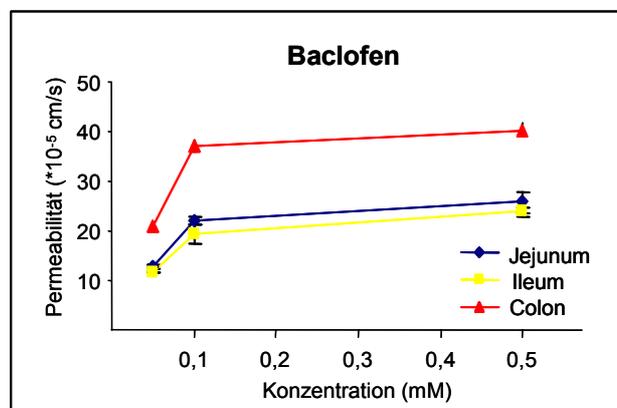


Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit der Baclofenpermeabilität (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere)

3.2.1.1.2. Einfluss von Taurin, als physiologischer Ligand des intestinalen Taurintransporters, auf die Baclofenpermeabilität

In drei intestinalen Segmenten (Jejunum, Ileum und Colon) wurde der Einfluss von Taurin, einer endogenen β -Aminosulfonsäure, auf die Baclofenpermeabilität untersucht. Die Konzentration von Taurin wurde so gewählt, dass sie der Taurinkonzentration in kommerziell erhältlichen Energy Drinks entsprach (400 mg/dl; 32,0 mM). In allen drei untersuchten Segmenten führte der Zusatz von Taurin zu einer signifikanten Reduktion der effektiven Baclofenpermeabilitäten. Die P_{eff} -Werte sanken unter dem Einfluss von Taurin auf 19,5% im Jejunum, 19,8% im Ileum und 14,0% im Colon. Die Baclofenpermeabilität stellte sich in allen drei Segmenten auf nahezu denselben Wert ein, dementsprechend war die Inhibition durch Taurin im Colon am stärksten ausgeprägt. Auf der Basis des t-Testes nach Student ($p < 0,05$, zweiseitig, gepaart) war der Unterschied in der Permeabilität zwischen den Darmsegmenten in der hier untersuchten Gruppe an Tieren ($n=4$) nicht mehr signifikant.

3.2.1.1.3. Einfluss von Coffein auf die Baclofenpermeabilität

Im Jejunum, Ileum und Colon wurde der Einfluss von Coffein auf die Baclofenpermeabilitäten untersucht. Die Konzentration an Coffein wurde ebenfalls so gewählt, dass sie der üblichen Coffeinkonzentration in kommerziell erhältlichen Energy Drinks entsprach (30 mg/dl; 0,6 mM). In allen 3 untersuchten Segmenten führte der Zusatz an Coffein zur Tyrode zu einer signifikanten Reduktion der effektiven Baclofenpermeabilitäten. Durch den Zusatz an Coffein sanken die effektiven Permeabilitäten von Baclofen auf 45,3% im Jejunum und 46,6% im Ileum. Die Inhibition war somit in den beiden Segmenten des Dünndarms ähnlich stark ausgeprägt. Der Effekt von Coffein auf die intestinale Baclofenpermeabilität im Colon war dagegen weniger stark (Reduktion der Baclofenpermeabilität auf 65,0%).

3.2.1.1.4. Einfluss einer Mischung von Taurin und Coffein auf die Baclofenpermeabilität

In Übereinstimmung mit den Resultaten, die mit den einzelnen Komponenten der Energy Drinks erzielt wurden, führte eine Mischung aus Coffein (30 mg/dl) und Taurin (400 mg/dl) ebenfalls zu einer ausgeprägten Abnahme der intestinalen P_{eff} -Werte, die den reduzierenden Effekt der einzelnen Komponenten überstieg. Im Jejunum und Ileum ergab sich eine Inhibition der Baclofenpermeabilität von 89,4%, im Colon von 92,9%.

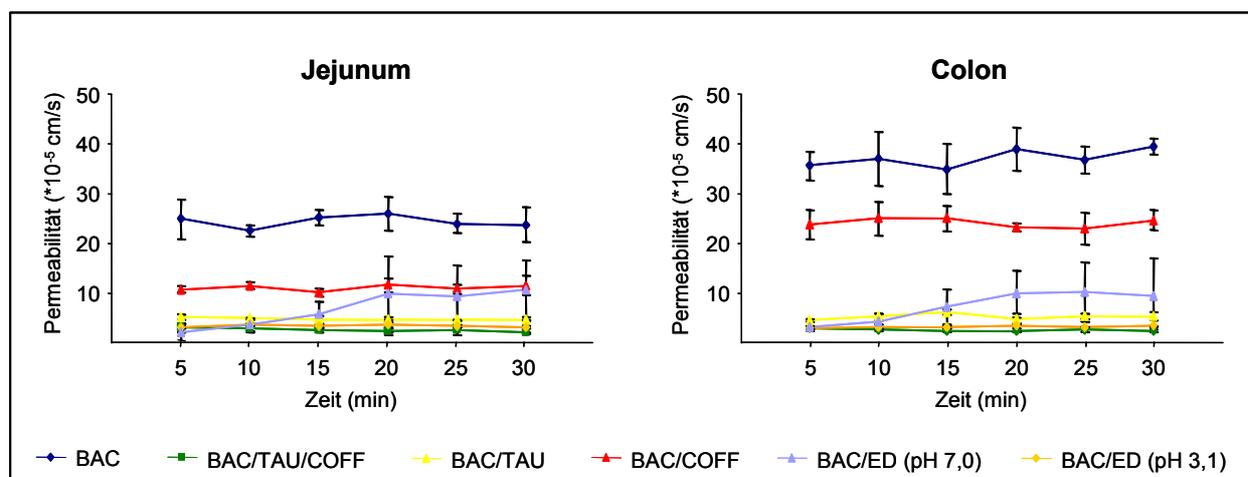


Abbildung 20: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum und Colon (Ileum s. Anhang) während der 5minütigen Sammelintervalle (Mittelwert \pm SD, $n=4$ Tiere)

3.2.1.1.5. Einfluss eines Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks auf die Baclofen-permeabilität

Ziel dieser Studie war es, die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von Taurin und Coffein, die in dem üblicherweise verwendeten Tyrodepuffer erhalten wurden, mit den Resultaten zu vergleichen, die durch direkte Perfusion der intestinalen Segmente mit einem Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drink (Red Bull®) erzielt werden, um den Einfluss anderer im Energy Drink, aber nicht im Tyrodepuffer enthaltener Substanzen (s. Kap. 5.2.1.1.) auszuschließen. Der Energy Drink wurde dabei entweder neutralisiert (pH 7,0) oder nicht neutralisiert (pH 3,1) verwendet. Bei pH 7,0 zeigten sich ähnliche Ergebnisse, wie sie im Tyrodepuffer erzielt wurden, d.h. eine ausgeprägte, statistisch signifikante Reduktion der Baclofenpermeabilität. Die Permeabilität des Baclofens unter dem Einfluss des neutralisierten Energy Drinks war geringfügig höher als im Tyrodepuffer.

Die Studie, die im nicht neutralisierten Energy Drink (pH 3,1) durchgeführt wurde, zeigte eine stetig ansteigende Baclofenpermeabilität in zwei der vier untersuchten Tiere, was auf Irritationen der intestinalen Mucosa zurückzuführen ist. Dieser Effekt wurde nur bei dem sauren pH festgestellt, bei keiner der in neutraler Lösung durchgeführten Untersuchungen trat dieser Effekt auf. Der Trend-Test von Cox und Stuart ($p < 0,01$) wurde angewendet, um den Anstieg der Baclofenpermeabilität unter dem Einfluss des sauren Energy Drinks (pH 3,1) statistisch abzusichern [Sachs, 1992].

Tabelle 11: Baclofenbasispermeabilitäten [P_{eff} ($\cdot 10^{-5}$ cm/s), MW \pm SD] in verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Taurin, Coffein und nach Perfusion in einem Energy Drink bei unterschiedlichen pH-Werten. Die prozentuale Inhibition bezieht sich auf die Inhibition der Basispermeabilität des Baclofens durch den jeweiligen Zusatz zum Perfusat (Mittelwert \pm SD, n=4 Tiere; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Behandlung	Darmsegment					
	Jejunum		Ileum		Colon	
	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition
BAC	24,5 \pm 0,7	0	24,7 \pm 2,5	0	37,1 \pm 1,7	0
+ TAU	4,8 \pm 0,2	80,3 \pm 2,3**	4,9 \pm 0,2	80,0 \pm 2,3**	5,2 \pm 0,4	85,9 \pm 1,3**
+ COFF	11,1 \pm 0,5	54,3 \pm 4,4**	11,5 \pm 0,2	53,0 \pm 4,4**	24,1 \pm 0,5	34,8 \pm 3,2**
+ TAU/COFF	2,5 \pm 0,2	89,4 \pm 3,0**	2,6 \pm 0,4	89,4 \pm 0,7**	2,7 \pm 0,2	92,9 \pm 0,4**
+ ED (pH 7,0)	3,4 \pm 0,1	86,1 \pm 0,6**	3,4 \pm 0,3	86,1 \pm 2,2**	3,2 \pm 0,2	91,3 \pm 0,7**
+ ED (pH 3,1)	7,0 \pm 3,1	70,8 \pm 17,2**	6,1 \pm 3,0	75,8 \pm 9,7**	7,3 \pm 3,8	80,6 \pm 9,9**

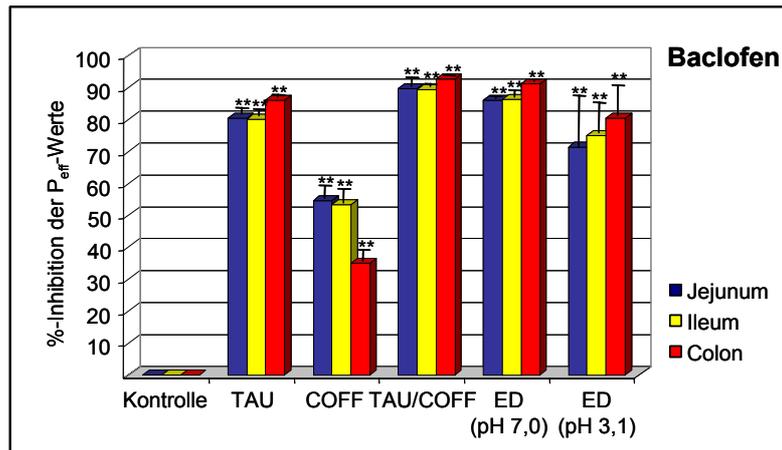


Abbildung 21: Prozentuale Inhibition der intestinalen Baclofenpermeabilität durch verschiedene Inhibitoren im Jejunum, Ileum und Colon im Vergleich zur Kontrolle (Baclofen): Inhibition durch Taurin (TAU) und Coffein (COFF) sowie durch einen Energy Drink (ED) bei pH 7,0 und pH 3,1 (Mittelwert \pm SD, n=4 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

3.2.1.1.6. Abhängigkeit der intestinalen Baclofenpermeabilität von der Taurinkonzentration im Perfusat

Die Studie zur Konzentrationsabhängigkeit der Baclofenpermeabilität von der zugesetzten Menge Taurin im Perfusat zeigte eine klare Abhängigkeit der Baclofen P_{eff} -Werte vom Taurinzusatz. Eine Taurinkonzentration von 65,8 mg/dl im Jejunum und 63,2 mg/dl im Ileum führte zu einer halbmaximalen Inhibition des Transportes (IC_{50}). Der respektive IC_{50} -Wert für das Colon betrug 66,0 mg/dl.

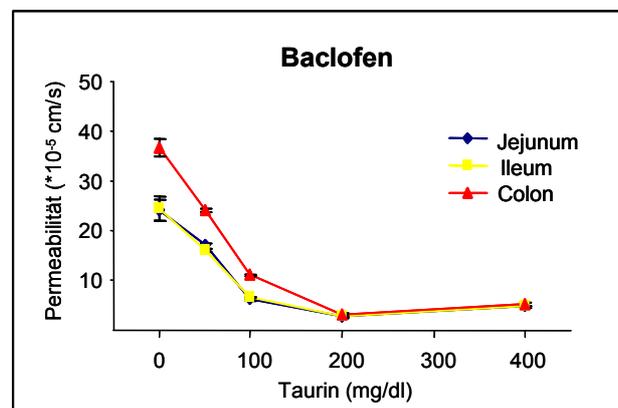


Abbildung 22: Abhängigkeit der intestinalen Baclofenpermeabilität von der zugesetzten Taurinkonzentration (Mittelwert \pm SD, n=2 Tiere)

3.2.1.1.7. Intestinale Permeabilitäten der Enantiomeren des Baclofens im Vergleich zum Razemat und Einfluss von Taurin

Baclofen stellt eine chirale Verbindung dar, deren Enantiomeren sich in ihrer biologischen Aktivität unterscheiden. In den bisherigen Studien wurde jeweils das Razemat des Baclofens als 0,1 mM Lösung eingesetzt. Aufgrund des vermuteten, zumindest teilweise aktiven intestinalen Transportes

des Baclofens via Aminosäurecarrier, die in der Regel nur die L-Form natürlicher Aminosäuren transportieren, stellten wir die Hypothese auf, dass sich die beiden Enantiomere des Baclofens in ihrer intestinalen Permeabilität unterscheiden bzw. gegenseitig beeinflussen könnten. Dazu wurden Perfusionen (n=2 Tiere) an männlichen White-Wistar-Ratten als Zweistufenperfusion durchgeführt, in denen in der ersten Stufe die Basispermeabilität des jeweiligen Enantiomers bzw. zur Kontrolle die Permeabilität des Razemates ermittelt wurde. Als Konzentration wurde hier eine 0,05 mM Lösung eingesetzt, da dies der Konzentration der jeweiligen Enantiomere in den bisherigen Studien entsprach. Zur Kontrolle wurde auch die Permeabilität des Razemates in 0,05 mM Lösung bestimmt. In der zweiten Stufe wurde der Einfluss von 400 mg/dl Taurin auf die jeweilige Basispermeabilität ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass sich weder die Basispermeabilitäten der beiden Enantiomere untereinander noch die Permeabilität des Razemates voneinander unterscheiden. In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen konnte auch kein Unterschied in der Reduktion der Permeabilitäten durch Zusatz von Taurin erreicht werden. Der inhibitorische Effekt von Taurin war bei den Enantiomeren sowie beim Razemat in allen drei untersuchten Darmsegmenten gleich stark ausgeprägt.

Tabelle 12: Baclofen: Basispermeabilitäten [P_{eff} ($\cdot 10^{-5}$ cm/s), Mittelwert \pm SD, n=2 Tiere] der Enantiomeren und des Razemates (0,05 mM), sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Taurin (400 mg/dl, 32,0 mM). Die prozentuale Inhibition bezieht sich auf die Inhibition der jeweiligen Basispermeabilität durch den Taurinzusatz (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Behandlung	Darmsegment					
	Jejunum		Ileum		Colon	
	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition
(+)-BAC	11,4 \pm 0,8	72,8 \pm 1,8**	11,3 \pm 0,7	72,6 \pm 2,5**	20,1 \pm 1,9	79,0 \pm 2,1**
(+)-BAC+TAU	3,1 \pm 0,3		3,1 \pm 0,3		4,2 \pm 0,6	
(-)-BAC	10,4 \pm 1,0	70,6 \pm 3,6**	10,5 \pm 0,7	69,3 \pm 2,2**	19,6 \pm 2,1	77,4 \pm 2,4**
(-)-BAC+TAU	3,0 \pm 0,4		3,2 \pm 0,6		4,4 \pm 0,3	
rac-BAC	11,8 \pm 0,9	73,4 \pm 2,5**	11,0 \pm 0,8	69,2 \pm 3,2**	20,3 \pm 2,1	79,4 \pm 2,4**
rac-BAC+TAU	3,1 \pm 0,2		13,7 \pm 0,4		4,2 \pm 0,3	

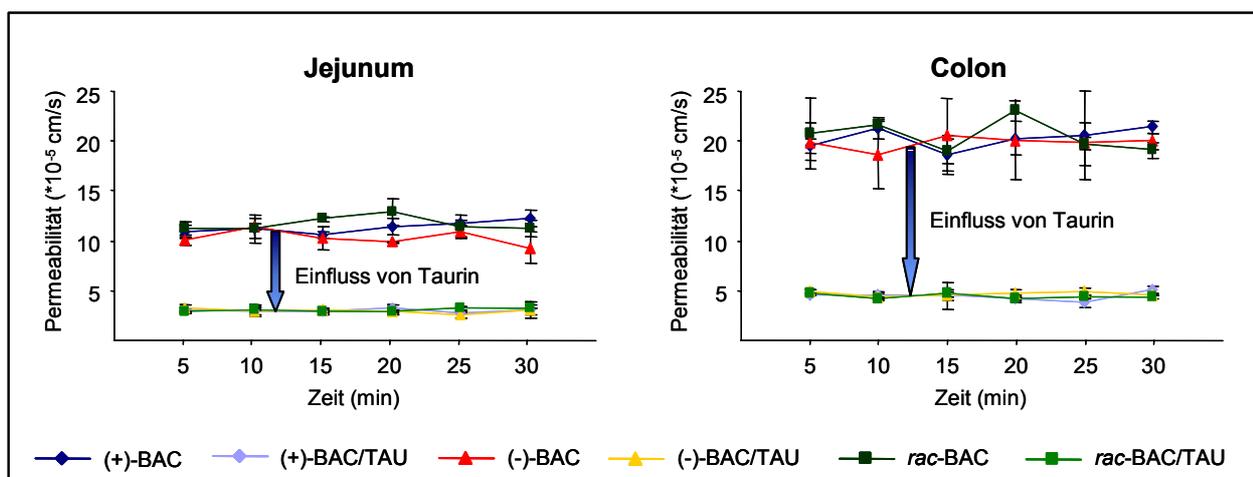


Abbildung 23: Effektive Permeabilitäten der Baclofenenantiomeren und Einfluss von Taurin im Vergleich zum Razemat (Mittelwert \pm SD, n=2 Tiere)

3.2.1.1.8. Einfluss von Creatin auf die Baclofenpermeabilität

Ziel dieser Studie war es den Einfluss von Creatin auf die Baclofenpermeabilität in einer Dreistufenperfusion zu untersuchen. In der ersten Stufe der Perfusion wurde die Basispermeabilität des Baclofens bestimmt. In der zweiten und dritten Stufe der Perfusion wurde dem Tyrodepuffer Creatin zugesetzt, in der zweiten Stufe als 7,6 mM (100 mg/dl) und in der dritten Stufe als 76,3 mM Lösung (1000 mg/dl). Der Zusatz von 100 mg/dl Creatin zur Lösung führte bereits zu einer signifikanten Reduktion der Baclofenbasispermeabilität. Die Erhöhung der Creatinkonzentration auf 1000 mg/dl führte dagegen zu keinem weiterem Abfall der Baclofenpermeabilität. Die Inhibition lag für das Jejunum und das Ileum mit 70% im gleichen Bereich, im Colon war sie dagegen mit 60% deutlich geringer.

Tabelle 13: Permeabilitäten [P_{eff} ($\cdot 10^{-5}$ cm/s)] von Baclofen in drei verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Creatin resultierend in einer 0,1%igen (7,6 mM) bzw. 1%igen Lösung (76,3 mM). Die prozentuale Inhibition bezieht sich auf die Inhibition der Basispermeabilität des Baclofens durch den jeweiligen Creatinzusatz zum Perfusat (Mittelwert \pm SD, n=2 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

Behandlung	Darmsegment					
	Jejunum		Ileum		Colon	
	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition
BAC	21,3 \pm 1,7	0	21,4 \pm 2,4	0	31,8 \pm 1,8	0
+ 0,1% CR	6,4 \pm 1,1	69,6 \pm 5,7**	6,1 \pm 0,7	71,0 \pm 5,9**	12,5 \pm 1,0	60,7 \pm 3,8**
+ 1% CR	5,6 \pm 0,6	73,5 \pm 3,5**	5,7 \pm 0,6	72,9 \pm 4,0**	12,8 \pm 1,2	59,7 \pm 4,3**

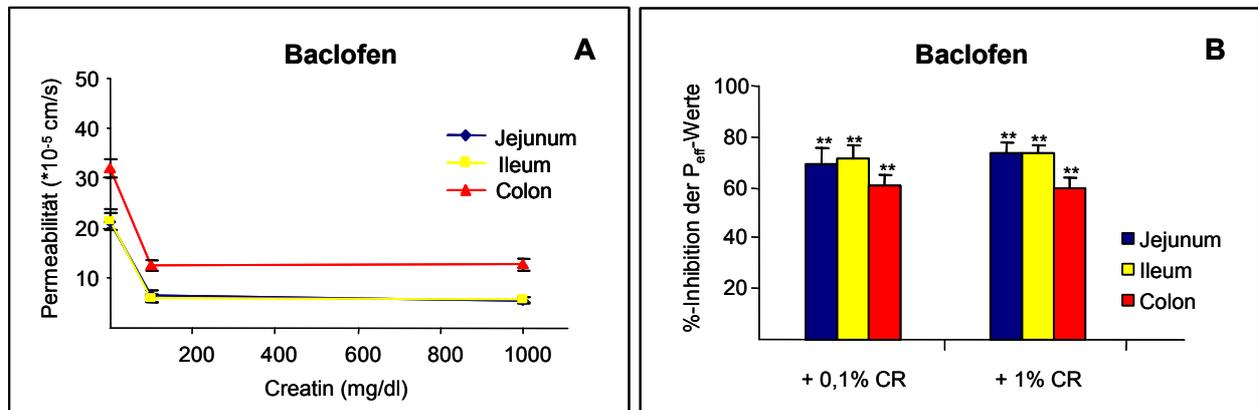


Abbildung 24: Intestinale Baclofenpermeabilität (A) in Abhängigkeit von der zugesetzten Creatinmenge (0,1%, 1% Creatin) im Jejunum, Ileum und Colon sowie resultierende prozentuale Inhibitionen (B) (Mittelwert \pm SD, n=2 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

3.2.1.2. Untersuchungen mit CGP 11.130, dem Fluoranalogen des Baclofens

3.2.1.2.1. Bestimmung der intestinalen CGP 11.130-Permeabilität im in-situ perfundierten Rattendarm

Die Berechnung der intestinalen Permeabilitäten für die fluoranaloge Verbindung des Baclofens ergab in allen drei intestinalen Segmenten niedrigere P_{eff} -Werte ($\cdot 10^{-5}$ cm/s) als für Baclofen. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus den Baclofenperfusionenstudien war allerdings auch beim CGP 11.130 die Permeabilität im Colon am höchsten (39,6% höher als im Jejunum; 40,6% höher als im Ileum), die P_{eff} -Werte im Jejunum und im Ileum waren dagegen sehr ähnlich.

3.2.1.2.2. Einfluss von Taurin, als Modellsubstrat des intestinalen Taurintransporters, auf die CGP 11.130-Permeabilität

Der Zusatz von Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) zur Perfusionslösung führte – in Analogie zum Baclofen – ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Permeabilität in allen drei untersuchten Segmenten. Die prozentuale Inhibition betrug im Jejunum 75,4%, im Ileum 75,6% und 78,7% im Colon. Damit war die Reduktion der P_{eff} -Werte geringfügig niedriger als für Baclofen, in Übereinstimmung mit den Daten zu Baclofen war sie aber auch bei der fluoranalogen Verbindung im Colon am höchsten.

Tabelle 14: Basispermeabilitäten [P_{eff} ($\cdot 10^{-5}$ cm/s), Mittelwert \pm SD, n=2 Tiere] von CGP 11.130 (FBAC) in drei verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Taurin. Die prozentuale Inhibition (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) bezieht sich auf die Inhibition der Basispermeabilität durch Taurin im entsprechenden intestinalen Segment. Als Vergleich sind die entsprechenden Daten der Muttersubstanz Baclofen angegeben.

Behandlung	Darmsegment					
	Jejunum		Ileum		Colon	
	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition
FBAC	13,9 \pm 3,8	75,4 \pm 1,4**	13,8 \pm 0,4	76,6 \pm 3,0**	19,4 \pm 0,8	78,7 \pm 1,0**
FBAC+TAU	3,4 \pm 0,3		3,2 \pm 0,4		4,1 \pm 0,2	
BAC	24,5 \pm 0,7	80,3 \pm 2,3**	24,7 \pm 2,5	80,0 \pm 2,3**	37,1 \pm 1,7	85,9 \pm 1,3**
BAC+TAU	4,8 \pm 0,2		4,9 \pm 0,2		5,2 \pm 0,4	

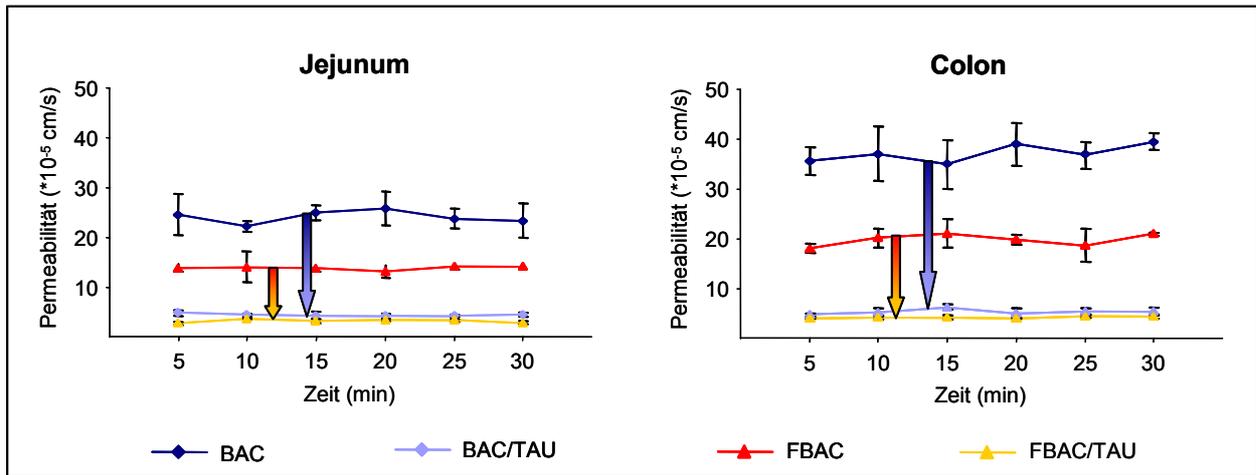


Abbildung 25: Effektive intestinale Permeabilitäten (P_{eff}) der fluoranalogen Verbindung des Baclofens, CGP 11.130, im Jejunum und Colon (Ileum s. Anhang) und Einfluss von Taurin während der 5minütigen Sammelintervalle im Vergleich zum Baclofen (Mittelwert \pm SD, $n=2-4$ Tiere)

3.2.1.3. Untersuchungen mit Gabapentin

3.2.1.3.1. Konzentrationsabhängigkeit der intestinalen Gabapentinpermeabilität

Simultan an drei intestinalen Segmenten (Jejunum, Ileum und Colon) wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Gabapentinpermeabilität in einer Dreistufenperfusion an $n=2$ Tieren untersucht. Die intestinalen Segmente wurden dabei mit ansteigenden Konzentrationen an Gabapentin (0,05, 0,1 und 0,5 mM) perfundiert. Die Berechnung der intestinalen Permeabilitäten (P_{eff} -Werte) zeigte für Gabapentin im Vergleich zum Baclofen eine niedrigere Transportrate in den drei untersuchten Darmsegmenten. Die Permeabilität von Gabapentin in den beiden untersuchten Dünndarmsegmenten war (wie beim Baclofen) sehr ähnlich. Dagegen war die Permeabilität im Colon signifikant höher als in den beiden Segmenten des Dünndarmes, Jejunum und Ileum. Die P_{eff} -Werte im Colon überstiegen die Permeabilität im Jejunum um 50,1%, im Ileum um 47,4%.

Ähnlich verhielten sich dagegen die intestinalen Segmente auf ansteigende Gabapentinkonzentrationen im Perfusat. Die Verdopplung der Gabapentinkonzentration von 0,05 mM auf 0,1 mM bewirkte nahezu eine Verdopplung der Permeabilität (s. Abbildung 26). Dagegen stiegen die effektiven Gabapentinpermeabilitäten durch die Erhöhung der Konzentration auf 0,5 mM nur noch geringfügig an (Jejunum 20,9%, Ileum 18,4%, Colon 16,6%). In den weiteren Studien wurden daher 0,1 mM Gabapentinlösungen verwendet.

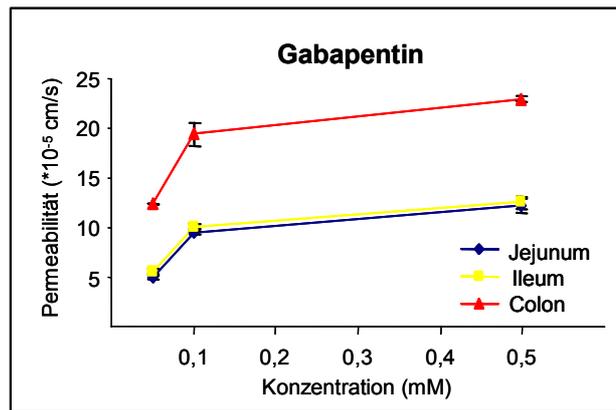


Abbildung 26: Konzentrationsabhängigkeit der Gabapentinpermeabilität (P_{eff}) (Mittelwert \pm SD, n=2 Tiere)

3.2.1.3.2. Einfluss von Taurin auf die Gabapentinpermeabilität

Der Einfluss von Taurin auf die Gabapentinpermeabilität wurde in den intestinalen Segmenten Jejunum, Ileum und Colon untersucht. Die Konzentration von Taurin entsprach wiederum der Taurinkonzentration in kommerziell erhältlichen Energy Drinks (400 mg/dl; 32,0 mM). In allen drei untersuchten Segmenten führte der Zusatz an Taurin zu einer signifikanten Reduktion der effektiven intestinalen Permeabilitäten. Unter dem Einfluss von Taurin sanken die P_{eff} -Werte von Gabapentin auf 31,6% im Jejunum, 36,1% im Ileum und 23,5% im Colon. Die Gabapentinpermeabilität stellte sich in den beiden Segmenten des Dünndarmes auf nahezu den gleichen Wert ein, wobei die Inhibition im Jejunum etwas stärker war als im Ileum. Die Inhibition durch Taurin war im Colon zwar prozentual am stärksten ausgeprägt, dennoch war die verbleibende Permeabilität im Colon höher als in den beiden Dünndarmsegmenten.

3.2.1.3.3. Einfluss von Coffein auf die Gabapentinpermeabilität

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von Coffein auf die intestinale Gabapentinpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon untersucht. Die Konzentration an Coffein entsprach der Coffeinkonzentration in kommerziell erhältlichen Energy Drinks (30 mg/dl; 0,6 mM). In den untersuchten Segmenten führte der Zusatz an Coffein zum Arzneistoff-haltigen Tyrodepuffer zu einer signifikanten Reduktion der effektiven Permeabilitäten. Im Vergleich zum Baclofen war der Effekt durch Coffein beim Gabapentin deutlich geringer. Durch den Zusatz sanken die effektiven Permeabilitäten von Gabapentin auf nur 85,2% des Ausgangswertes im Jejunum und 80,7% im Ileum. Der Effekt von Coffein auf die intestinale Permeabilität war dagegen im Colon wesentlich stärker ausgeprägt als in den beiden Segmenten des Dünndarmes (Reduktion der Gabapentinpermeabilität auf 66,9%).

3.2.1.3.4. Einfluss von Taurin/Coffein auf die Gabapentinpermeabilität

Eine Mischung aus Coffein (30 mg/dl; 0,6 mM) und Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) als Zusatz zum Tyrodepuffer führte auch beim Gabapentin zu einer ausgeprägten Abnahme der intestinalen P_{eff} -Werte. Die Inhibition überstieg den reduzierenden Effekt, der mit den einzelnen Komponenten des Energy Drinks erzielt wurde. Im Jejunum ergab sich eine Inhibition der Gabapentinpermeabilität von 77,3%, im Ileum von 77,9% und im Colon von 83,0%. Die prozentuale Inhibition war somit wiederum im Colon am stärksten ausgeprägt.

3.2.1.3.5. Einfluss eines Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks auf die Gabapentin-permeabilität

Taurin und Coffein stellen die pharmakologisch aktiven Komponenten der sogenannten Energy Drinks dar. Diese wurden in den vorangegangenen Studien auf ihren Einfluss auf die intestinale Gabapentinpermeabilität getestet. Dennoch war es möglich, dass auch andere Substanzen, die im Energy Drink aber nicht im Tyrodepuffer enthalten sind, einen Einfluss auf die Permeabilität von Gabapentin haben. Daher wurde abschließend eine Studie durchgeführt deren Ziel es war die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von Taurin und Coffein in dem üblicherweise verwendeten Tyrodepuffer mit den Resultaten zu vergleichen, die durch direkte Perfusion der intestinalen Segmente mit einem Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drink (Red Bull®) erzielt werden. Der Energy Drink wurde dabei wie beim Baclofen entweder neutralisiert (pH 7,0) oder nicht neutralisiert (pH 3,1) verwendet. Bei pH 7,0 zeigten sich in allen drei Darmsegmenten ähnliche Ergebnisse, wie sie im Tyrodepuffer erzielt wurden, d.h. einen ausgeprägten und statistisch signifikanten Abfall der Gabapentinpermeabilität im Vergleich zur intestinalen Permeabilität der Kontrolle. Zusätzlich wurden auch für Gabapentin Untersuchungen durchgeführt, bei denen der Energy Drink nicht neutralisiert wurde. Bei pH 3,1 ergaben sich hier die gleichen Ergebnisse, wie sie sowohl im Tyrodepuffer als auch im neutralisierten Energy Drink erhalten wurden. Eine stetig ansteigende Permeabilität, wie sie beim Baclofen in saurem Milieu beobachtet wurde, trat beim Gabapentin nicht auf.

Tabelle 15: Basispermeabilitäten [P_{eff} ($\cdot 10^{-5}$ cm/s), Mittelwert \pm SD, n=4 Tiere] von Gabapentin in drei verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Taurin, Coffein und nach Perfusion in einem Energy Drink bei unterschiedlichen pH-Werten. Die prozentuale Inhibition bezieht sich auf die jeweilige Inhibition der Basispermeabilität des Gabapentins durch den jeweiligen Zusatz zum Perfusat (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Behandlung	Darmsegment					
	Jejunum		Ileum		Colon	
	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition
GBP	9,7 \pm 0,2	0	10,2 \pm 0,3	0	19,5 \pm 1,2	0
+ TAU	3,1 \pm 0,1	68,3 \pm 1,4**	3,7 \pm 0,8	63,8 \pm 9,5**	4,6 \pm 0,1	76,4 \pm 1,7**
+ COFF	8,3 \pm 0,3	14,8 \pm 3,1**	8,2 \pm 0,4	19,3 \pm 4,0**	13,0 \pm 0,4	33,1 \pm 3,8**
+ TAU/COFF	2,2 \pm 0,2	77,3 \pm 2,0**	2,2 \pm 0,1	77,9 \pm 1,8**	3,3 \pm 0,2	83,0 \pm 1,9**
+ ED (pH 7,0)	2,0 \pm 0,1	79,4 \pm 0,8**	2,0 \pm 0,1	80,3 \pm 0,6**	3,6 \pm 0,1	81,5 \pm 1,5**
+ ED (pH 3,1)	2,0 \pm 0,1	79,8 \pm 0,6**	2,0 \pm 0,1	80,0 \pm 1,0**	3,5 \pm 0,5	81,9 \pm 0,9**

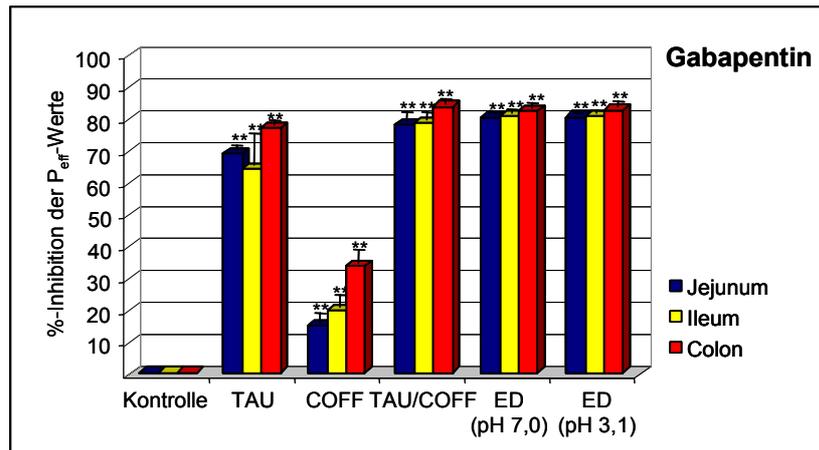


Abbildung 27: Prozentuale Inhibition der intestinalen Gabapentinpermeabilität durch verschiedene Inhibitoren im Jejunum, Ileum und Colon im Vergleich zur Kontrolle (Gabapentin): Inhibition durch Taurin (TAU) und Coffein (COFF) sowie durch einen Energy Drink (ED) bei pH 7,0 und pH 3,1 (Mittelwert \pm SD, n=4 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

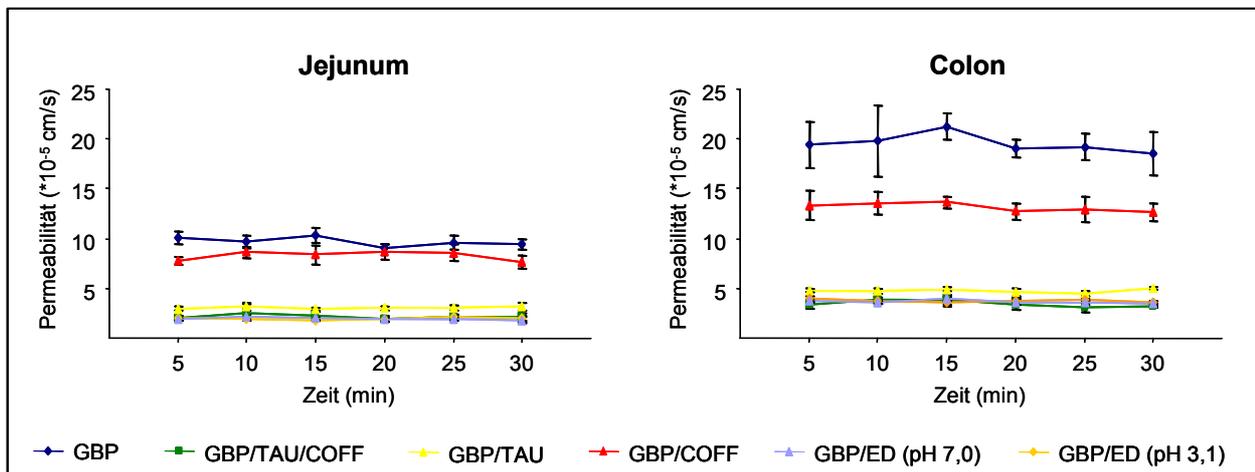


Abbildung 28: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Gabapentinpermeabilitäten (P_{eff}) im Jejunum und Colon (Ileum s. Anhang) während der 5minütigen Sammelintervalle (Mittelwert \pm SD, n=4 Tiere)

3.2.1.3.6. Abhängigkeit der Gabapentinpermeabilität von der Taurinkonzentration im Perfusat

Die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Gabapentinpermeabilität von der zugesetzten Taurinmenge zeigte eine deutliche Abhängigkeit der P_{eff} -Werte vom Zusatz an Taurin. Eine halbmaximale Inhibition des Transportes (IC_{50}) wurde durch Zusatz von 33,7 mg/dl Taurin im Jejunum und 33,4 mg/dl im Ileum erreicht. Der entsprechende IC_{50} -Wert für das Colon betrug 40,9 mg/dl Taurin.

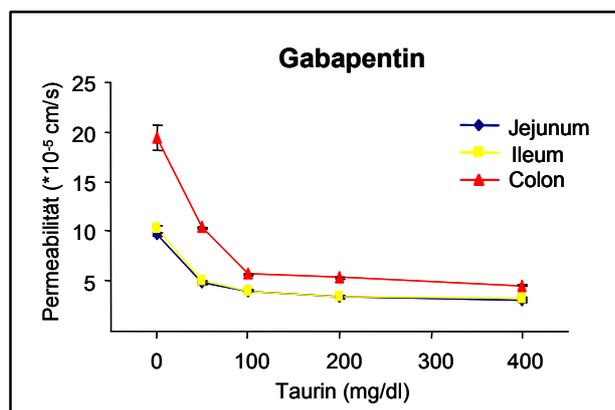


Abbildung 29: Abhängigkeit der effektiven intestinalen Gabapentinpermeabilität (P_{eff}) von der Taurinkonzentration (Mittelwert \pm SD, $n=2$ Tiere)

3.2.1.3.7. Einfluss von Creatin auf die Gabapentinbasispermeabilität

In einer Dreistufenperfusion wurde der Einfluss von Creatin auf die Permeabilität des Gabapentins untersucht. Im Anschluss an die Bestimmung der Basispermeabilität des Gabapentins in der ersten Stufe der Perfusion wurde in den folgenden Stufen Creatin zum Tyrodepuffer (pH 7,0) zugesetzt, in der zweiten Stufe der Perfusion als 7,6 mM und in der dritten Stufe als 76,3 mM Lösung. Der Zusatz von 100 mg/dl Creatin (7,6 mM) zum Arzneistoff-haltigen Tyrodepuffer führte bereits zu einer signifikanten Reduktion der Basispermeabilität. Die Erhöhung der Creatinkonzentration auf 1000 mg/dl führte zwar – im Gegensatz zum Baclofen – zu einer weiteren Reduktion der Gabapentinpermeabilität, dieser war allerdings statistisch nicht signifikant (Vergleich 7,6 / 76 mM). Die Inhibition lag für das Jejunum und das Ileum im gleichen Bereich, im Colon war sie dagegen wesentlich stärker ausgeprägt (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Basispermeabilitäten [P_{eff} ($*10^{-5}$ cm/s)] von Gabapentin (0,1 mM) in drei verschiedenen Darmsegmenten, sowie Permeabilitäten nach Zusatz von Creatin (CR) als 0,1%ige Lösung (7,6 mM) bzw. als 1%ige Lösung (76,3 mM). Die prozentuale Inhibition bezieht sich auf die Inhibition der Basispermeabilität des Gabapentins durch den jeweiligen Creatinzusatz (Mittelwert \pm SD, $n=2$ Tiere; * $p<0,05$, ** $p<0,01$)

Behandlung	Darmsegment					
	Jejunum		Ileum		Colon	
	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition	P_{eff}	%-Inhibition
GBP	10,1 \pm 0,9	0	10,0 \pm 1,1	0	19,4 \pm 1,1	0
+ 0,1% CR	5,3 \pm 0,6	46,5 \pm 7,8**	5,2 \pm 0,4	47,5 \pm 7,2**	8,6 \pm 0,8	55,5 \pm 5,0**
+ 1% CR	4,9 \pm 0,4	50,3 \pm 7,2**	5,3 \pm 0,5	46,0 \pm 6,5**	7,5 \pm 0,4	61,3 \pm 2,8**

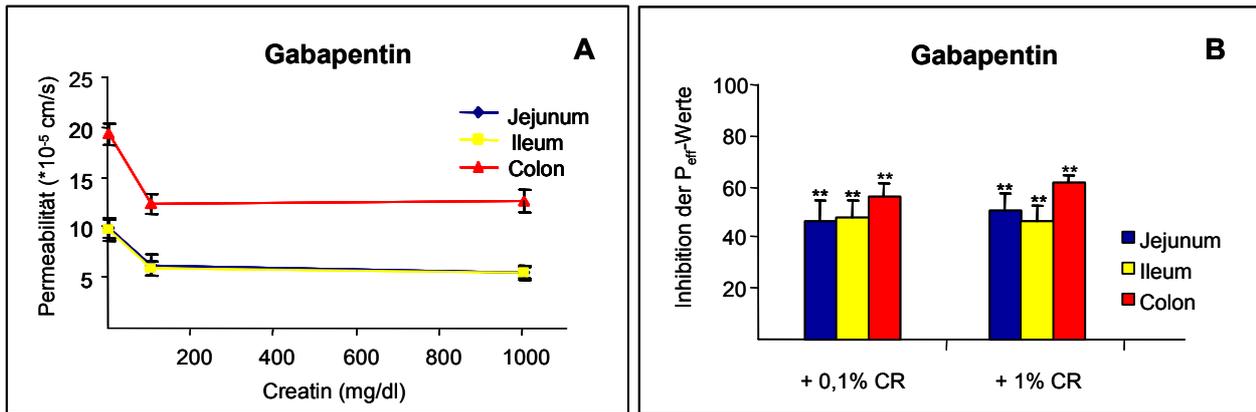


Abbildung 30: Intestinale Gabapentinpermeabilität (A) in Abhängigkeit vom Creatinzusatz (0,1%, 1% Creatin) sowie daraus resultierende prozentuale Inhibitionen (B) (Mittelwert \pm SD, n=2 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

3.2.2. In-vivo-Untersuchungen

3.2.2.1. Konzentrations-Zeit-Profile für Baclofen nach peroraler Applikation: Einfluss der gleichzeitigen Gabe von Taurin, Coffein und Zucker bzw. eines Energy Drinks

Die individuellen Konzentrations-Zeit-Verläufe für Baclofen wurden nach peroraler Applikation von 1,0 mg/kg KG Baclofen allein oder in Kombination mit potentiellen Inhibitoren bzw. Energy Drink-Inhaltsstoffen (Taurin, Coffein, Zucker) an männlichen White-Wistar-Ratten (n=3) erhalten. Des Weiteren wurde Baclofen direkt in einem Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drink (Red Bull®) gelöst und peroral appliziert. Die Konzentrationen an Taurin und Coffein wurden in Analogie zu den Perfusionsstudien so gewählt, dass sie den Konzentrationen in Energy Drinks entsprachen (Taurin: 400 mg/dl, 32,0 mM; Coffein 30 mg/dl, 0,6 mM). Die pharmakokinetischen Parameter nach peroraler Gabe waren mit den Parametern von Baclofen nach intravenöser Gabe (s. Anhang) sehr gut vergleichbar. Die hohen Blutkonzentrationen und die große Fläche unter den Datenpunkten im Vergleich zur intravenösen Applikation stimmen mit der guten Bioverfügbarkeit von Baclofen überein. Peterson et al. [1985] gaben die Bioverfügbarkeit von Baclofen mit >85% an. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den In-situ-Perfusionsstudien führte auch der Zusatz von Taurin (80 mg/kg KG) zur applizierten Lösung zu einer Reduktion von C_{max} um 18,2%. Des Weiteren äußerte sich der Taurinzusatz auch in einem Abfall des AUD-Wertes. Der Effekt war eine halbe Stunde nach Applikation besonders stark ausgeprägt. Zu späteren Zeitpunkten glichen sich die Kurven (mit und ohne Taurin) an. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den In-situ-Untersuchungen führte der Zusatz von Coffein zur applizierten Lösung in der hier durchgeführten In-vivo-Studie nicht zu einer Abnahme der Bioverfügbarkeit von Baclofen, sondern im Gegenteil sogar zu einer Erhöhung der Baclofenkonzentration im Blut. Initial war die Resorption von Baclofen durch die Coadministration von Coffein verzögert (15 min). Insgesamt führte der Coffeinzusatz jedoch sowohl zu einer Erhöhung der maximalen Blutkonzentration (C_{max}) als auch zu einer Erhöhung der AUD um 18,4%. Wurde Baclofen in Kombination mit einem Energy Drink appliziert, so resultierte eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Zeit-Kurve. Bei allen anderen Applikationen (BAC; BAC/TAU; BAC/COFF; BAC/ZUCKER) wurden maximale Blutkonzentrationen bereits nach 0,5 Stunden im Blut erzielt. Die gleichzeitige Gabe des Energy Drinks bewirkte eine Verschiebung von t_{max} um eine halbe Stunde auf eine Stunde nach Applikation. Die Konzentration im Blut war nach einer halben Stunde deutlich geringer als nach alleiniger Gabe von Baclofen (37,2%) bzw. nach Gabe von Baclofen in Kombination mit Coffein (40,3%). Der Zusatz an Zucker führte zu keiner signifikanten Änderung der pharmakokinetischen Parameter: Der Konzentrations-Zeit-Verlauf, C_{max} und t_{max} sowie die AUD, blieben unverändert.

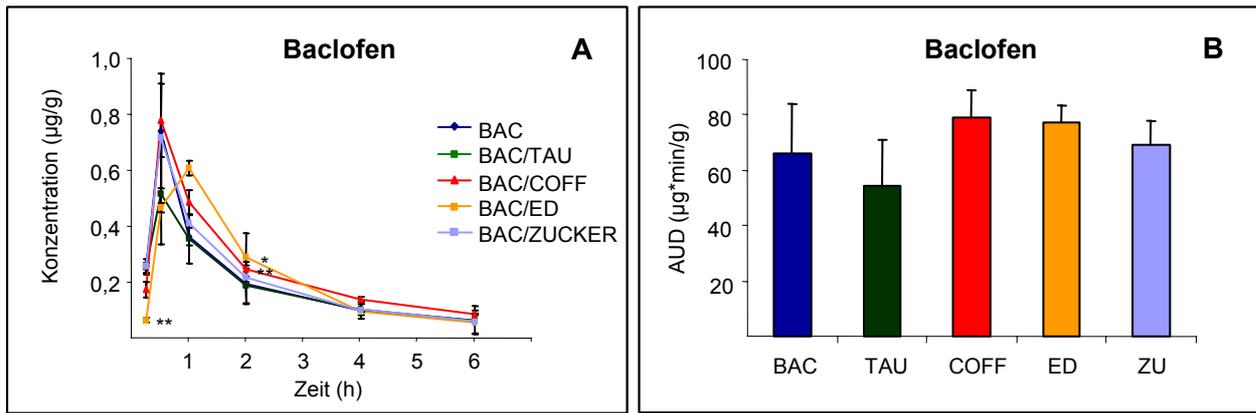


Abbildung 31: Konzentrations-Zeit-Profile (A) und AUD's (B) nach peroraler Applikation von 1,0 mg/kg KG Baclofen: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Konzentrations-Zeit-Profile und die Fläche unter den Datenpunkten (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

3.2.2.2. Gabapentin: Konzentrations-Zeit-Profile nach peroraler Applikation bei der Ratte sowie Einfluss des Energy Drinks

Die individuellen Konzentrations-Zeit-Verläufe für Gabapentin wurden ebenfalls nach peroraler Applikation von 1,0 mg/kg KG Gabapentin allein oder nach Coadministration eines Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks (Red Bull®) an männlichen White-Wistar-Ratten (n=3) untersucht. Nach alleiniger Applikation von Gabapentin wurden Blutspiegel erhalten, die ebenfalls auf eine sehr gute Bioverfügbarkeit des Gabapentins hindeuten. Maximale Blutspiegel wurden allerdings erst eine Stunde nach Applikation erreicht. Die kombinierte Applikation von Gabapentin mit einem Energy Drink führte wie beim Baclofen zu einer Rechtsverschiebung der Kurve, so dass maximale Blutspiegel hier erst zwei Stunden nach Gabe der Gabapentindosis erzielt wurden. Eine Stunde nach Applikation war die Gabapentinkonzentration nach Coadministration mit einem Energy Drink um 46,4% reduziert, verglichen mit der alleinigen Gabapentinapplikation. Zwei Stunden nach Applikation war die Gabapentinkonzentration allerdings um 21,4% gegenüber der alleinigen Gabapentinapplikation erhöht. Erst 6 Stunden nach Applikation hatten sich die Kurven wieder angeglichen. Dies erklärt auch die nur geringe Reduktion der AUD um 8,3% durch den Energy Drink.

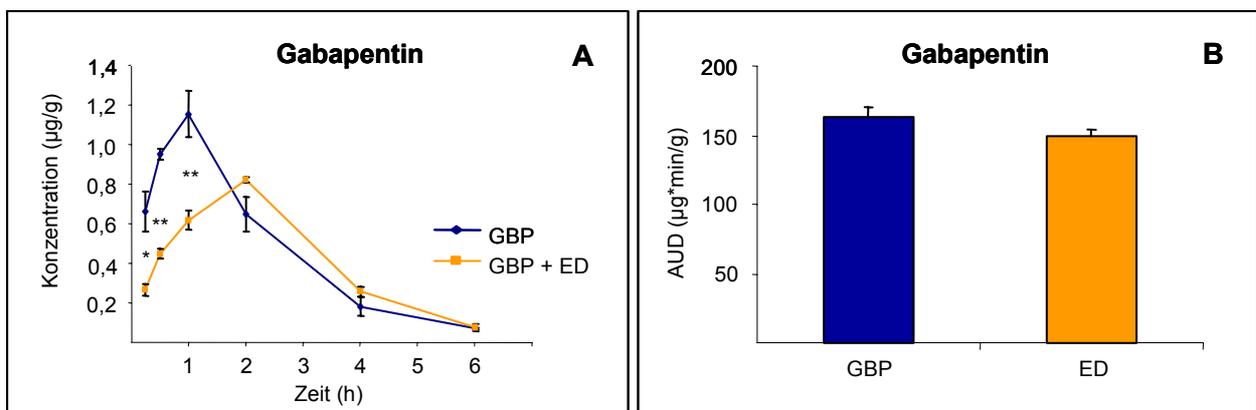


Abbildung 32: Konzentrations-Zeit-Profile (A) und AUD's (B) nach peroraler Applikation von 1,0 mg/kg KG Gabapentin: Einfluss eines Energy Drinks auf die Konzentrations-Zeit-Profile und die Fläche unter den Datenpunkten (Mittelwert \pm SD, n=3 Tiere; *p<0,05, **p<0,01)

4. Diskussion

Voraussetzung für die Wirkung eines Pharmakons ist eine ausreichende Konzentration am Wirkort. Sofern der Arzneistoff nicht intravasal oder direkt am Wirkort appliziert wird, muss er zunächst durch die Mukosa des Magen-Darm-Traktes in die Blutbahn resorbiert und anschließend an den Wirkort transportiert werden. Dabei sind unter Umständen weitere physiologische Schranken zu überwinden. Die resorbierte Menge einer Substanz stellt die Summe passiver und aktiver sowie absorptiver und sekretorischer Prozesse dar.

Hydrophile Substanzen, die trotz ihrer für diffusive Prozesse ungünstigen physikochemischen Eigenschaften dennoch eine sehr gute Bioverfügbarkeit erzielen, erreichen dies unter Ausnutzung aktiver Transportprozesse.

Im Fall von Baclofen wurden bisher mehrere Carrier für die Absorption verantwortlich gemacht, darunter der Aminosäuretransporter für langkettige neutrale Aminosäuren (LAT) sowie ein β -Aminosäure-spezifischer Transporter [Moll-Navarro et al., 1996], durch den auch der Transport von Taurin erfolgt. Die Transporter des Intestinums, darunter auch viele Aminosäurecarrier, sind teilweise auch an der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert. Es wird daher als überraschend angesehen, dass Baclofen scheinbar nicht in ausreichendem Maße die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, obwohl der neutrale Aminosäurecarrier nach neueren Studien auch in der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert ist [Kido et al., 2001]. Deguchi et al. [1995] wiesen einen Einfluss von Probenecid, einem Modellsubstrat des organischen Anionentransporters auf die BHS-Gängigkeit des Baclofens nach. Unter dem Einfluss von Probenecid war eine signifikante Hemmung des exsorbitiven Transportes und damit eine höhere Baclofenkonzentration im Gehirn nachweisbar. Aufgrund der Carboxylgruppe des Baclofens ist eine ähnliche Affinität zu Anionentransportern möglich, wie sie auch für β -Laktamantibiotika und Valproinsäure [Ogawa et al., 1994; Scism et al., 2000] nachgewiesen ist. Hinweise darauf, dass auch andere sekretorische Prozesse, z.B. durch P-Glykoprotein vermittelt, zu der geringen Konzentration von Baclofen in der Targetstruktur beitragen, liegen nicht vor.

Die Besonderheit aktiver Transportprozesse liegt darin, dass sie im Gegensatz zur rein passiven Diffusion einerseits durch hohe Konzentrationen sättigbar und andererseits durch konkurrierende Substrate kompetitiv hemmbar sind. Die Sättigung intestinaler Prozesse führt dazu, dass die Dosissteigerung eines aktiv resorbierten Arzneistoffes (wie im Falle des Gabapentins) nicht mehr mit einem linearen Anstieg der Blutkonzentration einhergeht, sobald der aktive Transport gesättigt ist [Stewart et al., 1993]. Weiter – wenn auch nicht linear – ansteigende Konzentrationen sind in diesem Fall durch zusätzliche passive Prozesse bedingt [Spahn-Langguth et al., 2002]. Die kompetitive Hemmung aktiver Transportprozesse durch Substrate, die ebenfalls Affinität zum Carrier haben, kann sowohl durch endogene Substanzen und durch gleichzeitig applizierte Arzneistoffe als auch durch Nahrungsmittel erfolgen.

Die kompetitive Hemmung absorptiver Transportprozesse im Intestinum resultiert in einer reduzierten Bioverfügbarkeit, die Interaktion mit sekretorischen Carriern erhöht dagegen die absorbierte Menge.

Strukturelle Veränderungen eines etablierten Arzneistoffes können die Affinität zu aktiven Transportern stark verändern, wie es auch bei der Biotransformation beobachtet wurde. Evtl. geht die Affinität zu einem Transportsystem verloren, während die Strukturvariante Affinität zu anderen Carriern aufweist. Diese Tatsache macht man sich bei der Entwicklung von Prodrugs zunutze.

Von Herber [2002] wurden Esterprodrugs des Baclofens mit dem Ziel synthetisiert, die Lipophilie des Baclofens und damit die passive Permeabilität durch Membranen, v.a. durch die Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen. Die Affinität zu Aminosäuretransportern sollte durch diese Strukturmodifikation allerdings verloren gehen.

Im ersten Schritt der Arbeit sollte überprüft werden, ob die geringe Permeationsrate von Baclofen in das Zielorgan ZNS auf der Affinität zum sekretorischen Transporter P-Glykoprotein beruht und wie sich die Veresterung des Baclofens durch eine homologe Reihe einfacher Alkohole (Methanol, Ethanol, Isopropanol, Propanol, Butanol) auf die P-GP-Affinität auswirkt.

4.1. Studien zur Affinität verschiedener Testsubstanzen zum exsorptiven Transporter P-Glykoprotein

4.1.1. Radioligandenbindungsassay – Bestimmung der IC₅₀-Werte

Das von Döppenschmitt [1998] entwickelte und von Dressler [2002] und von Koggel [2002] modifizierte Radioligandenbindungsassay ermöglichte die rasche Bestimmung der Affinität der Testsubstanzen zum exsorptiven Transporter P-Glykoprotein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die IC₅₀-Werte von Baclofen und fünf seiner Ester (Methyl-, Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, Butylester) im Vergleich zu den P-GP-Modells substraten Talinolol und Verapamil bestimmt. In den Bindungsstudien konnte nur eine sehr geringe Affinität des Baclofens zum P-Glykoprotein festgestellt werden. Mit zunehmender Kettenlänge der Estergruppe, nahm jedoch die Affinität zum P-Glykoprotein zu. Die C₃- und der C₄-Ester des Baclofens wiesen eine ähnliche Affinität zum Transporter auf, die in der Größenordnung des IC₅₀-Wertes von Talinolol lag. Die IC₅₀-Werte für Baclofen und seine Esterderivate ergaben eine sehr gute Korrelation der P-GP-Affinität mit dem Octanol/Wasser-Distributionskoeffizienten sowie der Anzahl der C-Atome in der Seitenkette der Estergruppe als Maß für die Lipophilie der untersuchten Substanzen. Auch für andere Gruppen strukturell verwandter Substanzen wurde die Lipophilie als ein Hauptfaktor aufgezeigt, der die Affinität zur Verapamil-Bindungsstelle des P-Glykoproteins bestimmt. Die Auswirkung auf den Transport durch die Blut-Hirn-Schranke war bisher nicht quantitativ definiert. Ähnliche Ergebnisse wie sie für Baclofen und seine Ester nachweisbar waren, wurden auch für eine Serie von β -Adrenozeptorantagonisten und eine Reihe anderer ZNS-aktiver Substanzen erhalten [Koggel et al., 2002]. Auch in der Publikation von Döppenschmitt [1999] wurde die Beziehung zwischen Lipophilie und P-GP-Affinität diskutiert.

Die erhaltenen Daten zum Baclofen korrelieren mit der guten Bioverfügbarkeit nach peroraler Gabe, da Baclofen einerseits effektiv durch verschiedene absorptive Transporter in den Blutkreislauf aufgenommen wird [Cercos-Forte et al., 1995; Moll-Navarro et al. 1996; Cejudo-Ferragud et al., 1996], es aber andererseits durch die fehlende bzw. nur geringe Affinität zum Effluxtransporter P-Glykoprotein nicht wieder zurück in das Darmlumen sezerniert wird. Weiterhin unklar bleibt dagegen die geringe Permeabilität in das zentrale Nervensystem, da sowohl der absorptive Transporter für neutrale Aminosäuren als auch das sekretorische P-Glykoprotein auch in der Blut-Hirn-Schranke präsent sind. Die P-GP-Bindungsstudien könnten weiterhin vermuten lassen, dass auch die Esterprodrugs des Baclofens aufgrund ihrer Affinität zum P-Glykoprotein Probleme haben könnten die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Jedoch ist dabei auch die Erhöhung der passiven Permeabilität durch die Erhöhung der Lipophilie zu beachten, die gegebenenfalls den Auswärtstransport nahezu kompensieren könnte.

4.1.2. In-vivo-Untersuchungen

In In-vivo-Studien sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse des Radioligandenbindungsassays auf In-vivo-Verhältnisse übertragen lassen. Die Baclofenester sollten, aufgrund der höheren Lipophilie im Vergleich zum Baclofen und der damit zu erwartenden ausgeprägteren passiven Diffusion, eine bessere Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke aufweisen. Die In-vivo-Studien sollten nun zeigen, wie sich die durch die ansteigende Lipophilie vermittelte theoretisch ebenfalls zu erwartende ansteigende P-GP-vermittelte Sekretion auf das Verteilungsverhalten der Baclofenester auswirkt. Die Daten wurden mit den von Herber [2002] ermittelten Werten zur Kinetik und Verteilung von Baclofen verglichen.

4.1.2.1. Konzentrations-Zeit-Profile der Baclofenester nach intravenöser Applikation im Vergleich zum Baclofen

Die Bestimmung der individuellen Konzentrations-Zeit-Profile ergab für Baclofen signifikant höhere Konzentrationen im Blut als für die Baclofenester. Besonders deutlich wird der Unterschied in der Fläche unter den Datenpunkten (AUD). Während die AUD für die C₂- bis C₄-Ester des Baclofens nahezu identisch waren (2,2-2,9 µg*min/g), war die AUD des Baclofens mit 95,6 µg*min/g um etwa das 40fache höher. Der Methylester des Baclofens, der Ester der homologen Reihe mit der geringsten Lipophilie, wies nach dem Baclofen die höchsten Konzentrationen im Blut auf. Die AUD war mit 60,4 µg*min/g nur um 37% gegenüber der AUD des Baclofens reduziert. Die Konzentrationen im Blut stimmten somit gut mit den Erwartungen überein, die aus den Ergebnissen des Radioligandenbindungsassays resultierten: Ansteigende Affinitäten zum P-Glykoprotein führen zu abnehmenden Konzentrationen im Blut, bedingt durch die auftretende aktive Sekretion durch P-Glykoprotein. Dementsprechend stimmte die Reihung der Ester in Bezug auf die IC₅₀-Werte gut mit den erhaltenen maximalen Blutkonzentrationen (C_{max}) und Verteilungsvolumina (V_D) überein:

IC₅₀: 2-Propylester / 1-Propylester / Butylester < Ethylester < Methylester < Baclofen
 C_{max}: Butylester < 2-Propylester < 1-Propylester < Ethylester < Methylester < Baclofen
 V_D Butylester > Ethylester > 2-Propylester = 1-Propylester > Methylester > Baclofen

Zusätzlich wurde nach der letzten Blutentnahme und der Tötung des Tieres Gehirnmaterial entnommen und analysiert. Hierbei liessen sich für die Ester signifikant höhere Konzentrationen im Gehirn im Vergleich zum Baclofen nachweisen. In vivo wurde also durch die Veresterung des Baclofens, vermutlich vermittelt durch die ansteigende Lipophilie, eine Akkumulation im Gehirn erzielt.

Die Tatsache, dass die Baclofenester ohne Schwierigkeiten in das Gehirn penetrieren, zeigt wiederum, dass das Gleichgewicht zwischen P-GP-Affinität und passiver Permeabilität – oder allgemein aller Prozesse – die Fraktion des Arzneistoffes bestimmt, die in einem bestimmten Kompartiment verfügbar ist. Die in ein Organ aufgenommene Menge eines Arzneistoffes hängt also nicht allein von der Präsenz von Transportern in der entsprechenden "Schranke" ab. Die höhere Lipophilie scheint im Fall der Baclofenester den nach außen gerichteten Transport in der Blut-Hirn-Schranke zu kompensieren.

Es wurde somit bei den vorliegenden Untersuchungen deutlich, dass die Verteilung eines Arzneistoffes in die Gewebekompartimente nicht unbedingt durch die P-GP-Affinität der Substanz beeinflusst sein muss, wenn die passive Permeabilität, die vor allem von der Lipophilie und der Größe der Substanz (Molekulargewicht) abhängig ist, hoch ist. Auch für andere Gruppen strukturell verwandter Substanzen wurde die Lipophilie als ein Hauptfaktor, der die Affinität zum P-Glykoprotein bestimmt, bestätigt [Seelig, 1998]. Dies scheint auch für die hier untersuchte Gruppe der Baclofenesterderivate zuzutreffen.

4.1.2.2. Studien zur Verteilung einer homologen Reihe von Baclofenestern im Blut und Gehirn nach intranasaler bzw. intraperitonealer Applikation

Die Nasenschleimhaut besitzt ähnlich wie die Mundschleimhaut gute Resorptionseigenschaften. Weit verbreitet ist die topische Anwendung schleimhautabschwellender Nasentropfen und -sprays bei Rhinitis. Hierbei auftretende systemische Nebenwirkungen verdeutlichen, dass der applizierte Arzneistoff nicht nur lokal wirkt, sondern zusätzlich auch in die systemische Zirkulation aufgenommen wird. Des Weiteren erhofft man sich von der intranasalen Applikation ZNS-aktiver Substanzen einen direkten Transport des Arzneistoffes aus der Nasenhöhle – unter Umgehung des First-Pass-Effektes der Leber – in die Cerebrospinalflüssigkeit.

Sowohl nach intranasaler als auch nach intraperitonealer Applikation von Baclofen wurden im Gehirn nur geringe Konzentrationen erzielt, obwohl der Arzneistoff gut in das Blut resorbiert wurde, dabei waren bei intranasaler Applikation die Konzentrationen im Blut höher als nach intraperitonealer Applikation. Für die Ester wurden bei beiden Applikationsarten ähnlich wie nach

intravenöser Applikation nur geringe Konzentrationen im Blut detektiert. Maximale Konzentrationen im Gehirn wurden bei intranasaler Applikation bereits nach 5 Minuten erreicht. Im Vergleich zur intraperitonealen Applikation waren nach intranasaler Applikation z.B. für den 2-Propylester die Gehirnkonzentrationen nach 5 Minuten um den Faktor 2,5 erhöht. Nach 20 Minuten hatten sich dagegen die Konzentrationen im Gehirn bei den beiden Applikationsarten nahezu angeglichen. Dennoch waren für die intranasale Applikation sowohl nach 5 als auch nach 20 Minuten die Gehirn/Blut-Quotienten höher als nach i.p.-Applikation, einzige Ausnahme bildete der 1-Propylester. Die Ergebnisse zeigen, dass die intranasale Applikation der Baclofenester eine effektive Alternative zur intravenösen Applikation der Esterderivate sein könnte.

4.1.2.3. In-vivo-Verteilungsstudie – Gegenseitiger Einfluss von Baclofenbutylester und Talinolol auf die In-vivo-Verteilung

Sowohl die Bestimmung der IC_{50} -Werte in den In-vitro-Studien als auch die Bestimmung der Gehirn/Blut-Quotienten nach intravenöser, intranasaler und intraperitonealer Applikation wiesen auf die Anreicherung der Ester im Gehirn und auf die P-GP-Affinität der Esterderivate hin. In einer In-vivo-Verteilungsstudie sollte nun der Einfluss des P-GP-Modellsubstrates Talinolol auf die Gewebeverteilung des Baclofenbutylesters, als eines der Baclofenderivate mit der höchsten im Bindungsassay ermittelten Affinität zum P-Glykoprotein, sowie im Umkehrschluss der Einfluss des Butylesters auf die Verteilung von Talinolol untersucht werden. Aufgrund der bei der Planung der Studie noch unbekannt oralen Verfügbarkeit der Ester wurden die Substanzen intravenös appliziert. Die gleichzeitige Gabe von P-GP-Substraten sollte in höheren Konzentrationen im Gewebe und einer Veränderung der Gewebeverteilung durch kompetitive Inhibition des Auswärtstransportes resultieren.

Außer im Blut führte die Coadministration von Talinolol in allen untersuchten Organen zu einem Anstieg der Konzentrationen von Baclofenbutylester. Die höchsten Konzentrationen an Butylester wurden im Gehirn bestimmt. Bei gleichzeitiger Gabe von Talinolol stiegen die Gehirn/Blut-Quotienten als Maß für die Gewebeselektivität signifikant an. Durch Coadministration von Talinolol wurde ein Anstieg der AUD von 15% im Gehirn erreicht. Im Blut wurden nur sehr geringe Konzentrationen erzielt, was auf eine schnelle und effektive Verteilung in die Organe hindeutet. Ebenfalls sehr geringe Konzentrationen wurden im Ileum bestimmt, im Jejunum konnte deutlich mehr Butylester nachgewiesen werden.

Das Ausmaß der Verseifung der Baclofenester nach intravenöser Applikation scheint in vivo und v.a. im Blut kleiner zu sein, als es Daten zur ex-vivo/in-vitro-Hydrolyse erwarten liessen. Eine Ursache könnte eine Bindung an Plasmaproteine sein.

Im Rahmen von nicht in die Arbeit miteinbezogenen Vorstudien wurde auch die perorale Applikation von Baclofenbutylester (30 mg/kg KG) mit bzw. ohne gleichzeitiger Gabe von Talinolol (p.o., 20 mg/kg KG) untersucht. Unabhängig von der Art der Behandlung der Tiere konnte nach peroraler Applikation weder im Blut noch in anderen Organen (Gehirn, Leber, Niere, Jejunum, Ileum) der Ester des Baclofens nachgewiesen werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben, z.B. die mangelnde Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt oder die hydrolytische Spaltung des Esters zur Muttersubstanz Baclofen im Magen bzw. Darm. Für den Fall einer im Gastrointestinaltrakt stattfindenden Verseifung der Ester zum Baclofen müssten aufgrund der guten Bioverfügbarkeit des "Spaltproduktes" hohe Baclofenkonzentrationen im Blut nachzuweisen sein. Die entsprechenden Blutproben wurden auf den Baclofengehalt untersucht, jedoch war die Konzentration von Baclofen wesentlich niedriger, als es im Fall einer in größerem Maße auftretenden hydrolytischen Spaltung zu erwarten gewesen wäre. Vermutlich werden die Baclofenesterprodrugs also nur unzureichend aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert.

In diesen Vorstudien wurde auch der Einfluss von PSC 833, einem potenten P-GP-Inhibitor, auf die Blutkonzentration des Baclofenbutylesters nach peroraler Applikation untersucht. Nach gleichzeitiger Gabe von PSC 833 konnte der Butylester des Baclofens auch nach peroraler Applikation nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Relevanz von P-GP bei der Resorption der Baclofenesterderivate nach peroraler Applikation.

Im zweiten Teil der Studie wurde auch der Einfluss des Baclofenbutylesters auf die Verteilung von Talinolol untersucht. Im Blut konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden

Behandlungen festgestellt werden. Signifikant niedrigere Talinololkonzentrationen wurden allerdings in der Leber nach Coadministration des Butylesters erzielt. Dies ist überraschend, da eine kompetitive Interaktion zweier P-GP-Substrate sich in einem Anstieg der Gewebekonzentrationen zeigen sollte. Der gleiche Effekt zeigte sich auch in der Niere. In der Niere war der Einfluss des Butylesters auf Talinolol um so ausgeprägter, je früher der Zeitpunkt der Probennahme war. In den beiden Darmabschnitten, Jejunum und Ileum, war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungen feststellbar. In den von Hanafy [2001] durchgeführten Studien nach peroraler Applikation von 20 mg/kg KG Talinolol konnten im Gehirn nur sehr geringe Konzentrationen an Talinolol (100 ng/g je Enantiomer) bestimmt werden. In der hier durchgeführten Verteilungsstudie wurde Talinolol intravenös in einer Dosis von 4 mg/kg KG appliziert. Bei dieser Studie lag die Talinololkonzentration im Gehirn unterhalb der Nachweisgrenze.

In Analogie zu den Studien von Hanafy [2001] konnte in keinem der untersuchten Gewebe ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Enantiomeren festgestellt werden.

4.2. Studien zur Affinität verschiedener Testsubstanzen zu absorptiven Aminosäuretransportern: Potential für Arzneistoff-Nahrungsmittel-Interaktionen?

4.2.1. In-situ-Untersuchungen – Intestinale Rattendarm-Perfusionsstudien

In In-situ-Untersuchungen sollte der intestinale Transport von Baclofen und seinen Estern näher charakterisiert und mit den Transporteigenschaften des CGP 11.130, einer von der Ciba-Geigy AG entwickelten fluoranalogen Verbindung des Baclofens, sowie mit Gabapentin, einer Substanz, die ebenfalls über eine GABA-Struktur verfügt, verglichen werden. Der Einfluss verschiedener potentieller Inhibitoren sollte untersucht werden. Das hier verwendete In-situ-Perfusionsmodell stellt eine zuverlässige Methode dar, die intestinale Absorption von Arzneistoffen zu bestimmen und Interaktionen mit anderen Arzneistoffen oder Nahrungsbestandteilen abzuschätzen. Die von Doluisio et al. [1969] entwickelte Methode wurde von Hanafy [2001] dahingehend optimiert und validiert, dass auch bei der hier verwendeten geringen Tierzahl (n=2-4) aufgrund der geringen interindividuellen Schwankungen sichere und zuverlässige Ergebnisse erzielt werden konnten.

In-situ-Perfusionen ermöglichen die Bestimmung der Permeabilität unter genauer Kontrolle der Konzentration, des pH-Wertes, der Osmolarität und der Flussrate. Somit spiegeln In-situ-Studien in der Regel sehr gut die In-vivo-Verhältnisse wider, v.a. auch weil der Blutfluss, die Innervation und die Clearanceeigenschaften des lebenden Tieres intakt bleiben [Barthe et al., 1999]. Ein weiterer Vorteil ist die getrennte Bestimmung der regionalen Absorptionsraten in ausgewählten Darmabschnitten.

Die Interpretation der Absorptionscharakteristiken der verwendeten Substanzen kann sich allerdings als schwierig erweisen, da nur ein Gesamteffekt ermittelt wird, ohne dass die Summe der Einzeleffekte getrennt betrachtet werden kann. Sowohl für die untersuchten Substanzen Baclofen und Gabapentin als auch für Taurin, einer der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten potentiellen Inhibitoren, sind mehrere Transporter in die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt involviert [Nacher et al., 1994; Cercos-Forteza et al., 1995; Cejudo-Ferragud et al., 1996; Moll-Navarro et al., 1996; Stewart et al., 1993]. Es bleibt aber unklar, in welchem Ausmaß die Affinitäten zu den diversen Carriern überlappen.

4.2.1.1. Bestimmung der intestinalen Permeabilitäten von Baclofen und seinen Strukturverwandten

Im Rahmen der In-situ-Studien wurden zunächst Perfusionen durchgeführt, in denen die Basispermeabilität der zu testenden Substanzen bestimmt wurde.

In Übereinstimmung mit der guten Bioverfügbarkeit von Baclofen waren die beobachteten intestinalen Permeabilitäten hoch. Interessanterweise war die Permeabilität des Baclofens im Colon

signifikant höher als in den beiden Segmenten des Dünndarms, dem Jejunum und dem Ileum. Erklärbar ist dieser Effekt durch die sehr starke Durchblutung des Colons oder aber durch ein verstärktes Auftreten der Aminosäurecarrier, die in die Absorption von Baclofen involviert sind. Im Jejunum und Ileum waren die Permeabilitäten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Polache et al. [1993] sehr ähnlich, ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Dünndarmsegmenten konnte nicht festgestellt werden. Das Colon wurde von Polache et al. [1993] nicht untersucht.

Das Colon wird in der letzten Zeit intensiv als Absorptionsort für Proteine und Peptide, die im oberen Bereich des Gastrointestinaltraktes durch Verdauungsenzyme gespalten werden, untersucht [Sinha und Kumria, 2001]. Ugawa et al. [2001] gelang in der Maus die Klonierung und funktionelle Charakterisierung eines colonspezifischen Natrium- und Chlorid-abhängigen $B^{0,+}$ -Aminosäuretransporters, der an der apikalen Membran der absorptiven Zellen des Colons stark exprimiert wird und für die Absorption von Aminosäuren aus dem Intestinum verantwortlich ist. In anderen Organen, darunter Gehirn, Herz, Leber, Niere und Dünndarm, wird er dagegen nicht exprimiert. Vor allem neutrale und kationische Aminosäuren, wie Alanin, Leucin und Phenylalanin wurden als Substrate dieses Carriers erkannt.

In Perfusionsstudien wurde ebenfalls die Abhängigkeit der intestinalen Permeabilität von der eingesetzten luminal vorliegenden Baclofenkonzentration untersucht. Die auftretende Sättigung, erkennbar an einer nicht linear ansteigenden Permeabilität stimmt gut mit einem vermuteten aktiven Transportprozess überein. Eine Stereoselektivität des Transportes konnte obwohl viele Aminosäuretransporter nur die L-Form der natürlichen Aminosäuren transportieren, nicht nachgewiesen werden.

Die Baclofenester sollten zur Aufklärung intestinaler Transporteigenschaften und zur Ermittlung der effektiven Permeabilitäten ebenfalls in In-situ-Perfusionsstudien untersucht werden. Im Rahmen von Vorstudien wurde allerdings beobachtet, dass die Ester des Baclofens an die Silikonschläuche der Perfusionsapparatur binden. Der Butylester, der lipophilste der untersuchten Baclofenderivate, zeigte eine nahezu vollständige Bindung an die Schläuche sowohl unter statischen (94,6%) als auch unter dynamischen (89,6%) Bedingungen. Mit abnehmender Lipophilie der Derivate nahm zwar die prozentual gebundene Fraktion der Baclofenester ab, dennoch konnten aufgrund des schwankenden Ausmaßes der Bindung keine Perfusionsstudien für die Ester durchgeführt werden. Untersuchungen zur Bindung an Schlauchmaterial als mögliche Fehlerquelle bei In-situ-Perfusionen wurden auch für alle anderen untersuchten Substanzen – Testsubstanzen und Inhibitoren – durchgeführt. Bei keiner weiteren, im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen trat eine Schlauchbindung auf.

Während des von der Ciba-Geigy durchgeführten Arzneistoff-Screenings waren verschiedene Baclofenderivate mit dem Ziel entwickelt worden, unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Eines dieser Analoga, CGP 11.130, das Fluoranalogen des Baclofens (R/S-4-Amino-3-(4-Fluorphenyl)buttersäure) schien günstige pharmakologische Wirkungen kombiniert mit reduzierten Nebenwirkungen aufzuweisen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Baclofen wurde vermutet, dass die beiden Substanzen – Baclofen und sein Fluoranalogen – Affinitäten zu den gleichen intestinalen Transportern aufweisen und damit ähnliche Absorptionseigenschaften und Interaktionspotentiale zeigen sollten. Die effektiven intestinalen Permeabilitäten des Fluorbaclofens waren niedriger als die der Muttersubstanz Baclofen. Die Verringerung der intestinalen Permeabilitäten kann u.a. durch reduzierte Affinitäten zu einem oder mehreren Aminosäuretransportern bedingt sein. In Analogie zum Baclofen war auch beim CGP 11.130 die Permeabilität im Colon höher als im Jejunum und Ileum.

Gabapentin, ein weiterer Arzneistoff mit γ -Aminobuttersäurestruktur, wird im Intestinum aktiv via Aminosäuretransporter resorbiert [Stewart et al., 1993] und weist eine Sättigung der intestinalen Transporter bei Applikation hoher Dosen auf. Dies konnte in den durchgeführten In-situ-Studien bestätigt werden. Durch die Erhöhung der luminal vorliegenden Konzentration von 0,05 mM auf 0,1 mM wurde ein nahezu linearer Permeabilitätsanstieg erreicht. Eine 0,5 mM Gabapentinlösung wies dagegen als Zeichen einer Sättigung aktiver Prozesse eine nur minimal höhere Permeabilität auf. Im Vergleich zum Baclofen ist beim Gabapentin sowohl die Bioverfügbarkeit als auch die Resorptionsgeschwindigkeit geringer [Vollmer et al., 1986]. Die Permeabilitäten des Gabapentins

waren dementsprechend geringer als die für Baclofen ermittelten Werte, wiederum aber im Colon am höchsten.

4.2.1.2. Interaktionsstudien

4.2.1.2.1. Interaktion mit Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks

Taurin- und Coffein-haltige Getränke, sogenannte Energy Drinks, wurden während des vergangenen Jahrzehntes in mehr als 50 Ländern weltweit, darunter Europa, die Vereinigten Staaten von Amerika und Australien, in immer größerem Ausmaß vermarktet. Diese Getränke sollen speziell in Zeiten großer körperlicher und mentaler Anstrengung zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit und des Erinnerungs- und Reaktionsvermögens beitragen [Seidl et al., 2000; Alford et al., 2001]. Die Steigerung der Leistungsfähigkeit soll aus dem Zusatz von Taurin, Coffein sowie Glucose resultieren. Die stimulierende Wirkung des Coffeins wird dabei durch die Inhibition von Adenosinrezeptoren [Biaggioni et al., 1991] erklärt, die Taurineffekte durch Interaktion mit glycinergen, GABAergen, cholinergen oder adrenergen Neurotransmitterrezeptoren [Seidl et al., 2000]. Auch Substanzen wie Creatin – in hohen Dosen verwendet zum Muskelaufbau – werden derzeit in den USA bereits Energy Drinks zugesetzt.

Die Unbedenklichkeit dieser Getränke wird jedoch, aufgrund des hohen Gehaltes an z.B. Taurin (400 mg/dl) und Coffein (24-32 mg/dl) diskutiert. In einigen Länder, darunter Frankreich und Kanada, ist der Verkauf von Energy Drinks aufgrund des hohen Coffeingehaltes verboten, andere Länder, wie Dänemark und Norwegen, stufen Energy Drinks aufgrund des Coffeingehaltes (>15 mg/dl) als apothekenpflichtige Arzneimittel ein. In Schweden stehen Energy Drinks seit dem Tod dreier Menschen unter Beobachtung der NFA (National Food Administration).

Basierend auf den Ergebnissen von Moll-Navarro et al. [1996], die eine mögliche Interaktion von Baclofen mit der β -Aminosulfonsäure Taurin andeuteten, stellten wir die Hypothese auf, dass Interaktionen von Verbindungen wie Baclofen, CGP 11.130 und Gabapentin mit Taurin als Zusatzstoff von Nahrungsmitteln oder Getränken möglich sein könnten. Ziel der hier durchgeführten Interaktionsstudien am in-situ perfundierten Rattendarm war es, den inhibitorischen Effekt von Taurin als möglichem kompetitivem Inhibitor der aktiven Baclofenabsorption sowie von Coffein als zweiter – und pharmakologisch aktiver – Komponente von Energy Drinks zu bestimmen. Um den Einfluss anderer Inhaltsstoffe dieser Getränke auszuschließen, wurden Perfusionen durchgeführt, in denen der üblicherweise verwendete Tyrodepuffer durch Red Bull® (als typisches Beispiel für einen Energy Drink) ersetzt wurde.

Der intestinale Taurintransport leistet einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Taurinhomöostase. Die endogene Taurinsynthese aus Methionin und Cystein wird durch die beiden Enzyme Cysteindioxygenase (CDO) und Cysteinsulfonatdecarboxylase (CSAD) katalysiert [Bitoun et al., 2001]. Die Taurinsupplementierung mit der Nahrung ist aufgrund der vielfältigen physiologischen Funktionen des Taurins von besonderer Bedeutung. Die bekannteste physiologische Funktion des Taurins liegt in der Konjugation von Gallensäuren. In der Leber erfolgt die Umwandlung eines Teiles des Cholesterins zu den primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure. Nachfolgend werden die primären Gallensäuren mit Glycin oder Taurin konjugiert und damit die Hydrophilie erhöht. Des Weiteren wird durch die Konjugation der Gallensäuren der pK_a erniedrigt, die konjugierten Gallensäuren liegen somit ionisiert im intestinalen Lumen vor [Burtis und Ashwood, 1996].

Taurin stellt diejenige Aminosäure dar, die in freier Form in höchster Konzentration im Organismus vorliegt, eine Inkorporation in Proteine ist aufgrund der fehlenden Carboxylgruppe nicht möglich. Die höchsten Konzentrationen liegen in der Retina [Vinnakota et al., 1997; Militante und Lombardini, 1999], im Gehirn und im Myokard vor. Im Gehirn sowie im Myokard wurden Konzentrationen von bis zu 50 mM bestimmt [Huxtable et al., 1992]. Extrazellulär liegen wesentlich niedrigere Konzentrationen vor (0,01-0,1 mM). Neben der Konjugation von Gallensäuren erfüllt Taurin eine Reihe weiterer biologischer Funktionen [O'Flaherty et al., 1997], darunter in der Osmoregulation des Zellvolumens [Schaffer et al., 2000], der Detoxifizierung von Xenobiotika und der Immunomodulation. Darüber hinaus wirkt Taurin als Calciummodulator und Vasodilatator [Stapleton et al., 1998; Redmond et al., 1998]. In den Augen schützt Taurin als Antioxidans die Linse vor der

Bildung eines Kataraktes [Devomanoharan et al., 1999]. In diesem Kontext könnte auch die altersabhängige Reduktion der Taurinkonzentration – bedingt durch eine reduzierte intestinale Transportkapazität – von Interesse sein [Eppler und Dawson, 2001].

Die vielfältigen physiologischen Funktionen kombiniert mit der nicht ausreichenden endogenen Synthese verdeutlichen die Notwendigkeit, Taurin über die Nahrung aufzunehmen. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Taurin mit der Nahrung wird von Laidlaw et al. [1990] mit weniger als 200 mg pro Tag angegeben. Der durchschnittliche Tauringehalt eines kommerziell erhältlichen Energy Drinks beträgt dagegen 1,0 g. Zur Absorption von Taurin aus der Nahrung stehen dem Organismus intestinale Natrium- und Chlorid-abhängige Transporter zur Verfügung, die neben Taurin und β -Alanin auch Baclofen als γ -Aminobuttersäurederivat transportieren sollen. Dies illustriert eine bisher unbekannte Möglichkeit einer Nahrungsmittel-Arzneistoff-Interaktion, für den Fall, dass Arzneistoff und Getränk in Kombination eingenommen werden.

Nach der Bestimmung der intestinalen Basispermeabilität wurde in der zweiten (und evtl. dritten) Stufe der In-situ-Untersuchungen den Lösungen der untersuchten GABA-Analoga Taurin bzw. Coffein in der Konzentration zugesetzt, wie sie in Energy Drinks üblicherweise vorliegen. Der Zusatz von Taurin führte zu einer Reduktion der Baclofenabsorption in allen drei untersuchten intestinalen Segmenten. Das Ausmaß der Inhibition war mit 80-86% überraschend, konnte aber in Studien mit Gabapentin und CGP 11.130 bestätigt werden. Der Taurinzusatz reduzierte die CGP 11.130-Permeabilität je nach Darmabschnitt um 75-79%, die Gabapentinpermeabilität um 68-74%.

Der starke inhibitorische Effekt von Coffein auf die Permeabilität des Baclofens war unerwartet. Von Cejudo-Ferragud et al. [1996] wurde postuliert, dass Baclofen zumindest teilweise Affinität zu dem L-System der Aminosäuretransporter besitzt. Phenylalanin wird ebenfalls von diesem Transporter als Substrat erkannt und transportiert. Im gleichen Jahr berichtete Kreydiyyeh et al. [1996], dass Coffein-haltiger Tee die mukosale Aufnahme von Phenylalanin inhibiert, während der Transport von der serosalen Seite unbeeinträchtigt bleibt. Die Autoren vermuten, dass der inhibitorische Effekt von Coffein auf die Absorption von Phenylalanin durch einen Anstieg des cAMP-Spiegels bedingt ist. Coffein stellt einen potenten Phosphodiesteraseinhibitor dar, die erhöhten cAMP-Spiegel führen zum Verlust des für die Absorption von Phenylalanin essentiellen Natriumgradienten. Ein vergleichbarer Mechanismus könnte auch für Interaktion von Baclofen und Coffein möglich sein. Alternativ wäre auch ein reduzierter Blutfluss und eine verminderte Blutperfusion des Darmgewebes bedingt durch den vasokonstriktorisches Effekt des Coffeins möglich.

Die Perfusionen, die direkt im Energy Drink durchgeführt wurden, sowie die Perfusionsstudien, die den Einfluss eines Gemisches von Taurin und Coffein in Tyrodepuffer untersuchten, bestätigten die Ergebnisse, die durch die separaten Inhibitoren erzielt wurden. Ein Einfluss anderer zusätzlich im Energy Drink enthaltener Substanzen konnte ausgeschlossen werden.

4.2.1.2.2. Interaktion mit Creatin

Creatin, als nicht-essentielle diätetische Substanz, wird im Körper durch endogene Synthese aus Arginin und Glycin über die Zwischenstufen Ornithin und Guanidinoacetat synthetisiert. Der tägliche Bedarf an Creatin liegt bei 2 g, davon werden etwa 50% mit der Nahrung (v.a. aus Fleisch-, Fisch- und anderen tierischen Produkten) aufgenommen. Die Synthese findet vor allem im Pankreas und in der Leber statt, die höchsten Konzentrationen (etwa 95%) an Creatin befinden sich aber im Skelettmuskel, obwohl Muskelzellen nicht in der Lage sind, Creatin zu synthetisieren [Zorzano et al., 2000].

Im Muskel wird ein Teil des Creatins in einem reversiblen Prozess unter Verbrauch von ATP zum Phosphocreatin phosphoryliert. Zu Zeiten großer körperlicher Anstrengung erfolgt die Rückübertragung der Phosphatgruppe auf ADP unter Bildung von ATP [Persky und Brazeau, 2001]. Phosphocreatin dient dem Muskel somit als "Energiespeicher". Der hohe Bedarf an Creatin verdeutlicht die Bedeutung für ein effektives intestinales Transportsystem. Gensequenzanalysen stufen die Creatintransporter (CRT1, CRT2) aufgrund ihrer hohen Homologie zu den GABA-, Taurin- und Betain-Transportern in die Klasse der Natrium- und Chlorid-abhängigen Neurotransmittertransporter ein. Die beiden Isoformen des Creatintransporters werden durch verschiedene Gene kodiert [Zorzano et al., 2000]. CRT1 wird im Menschen vor allem im Herz- und Skelettmuskel, im Gehirn, in der Niere und der Plazenta [Sora et al., 1998], CRT2 dagegen nur in

den Testes exprimiert. Die Regulation des Creatintransporters kann akut entweder durch Veränderung der Natriumkonzentration oder durch Stimulation bzw. Inhibition des Transportproteins erfolgen. Eine längerfristige Regulation erfolgt über die Expression des Transporters [Snow und Murphy, 2001].

Creatin wird in hohen Dosen (20 g) vor allem von Sportlern zur Erhöhung der körperlichen Leistungsfähigkeit eingesetzt. Die Therapie mit Creatin gilt als relativ sicher, auftretende Nebenwirkungen stellen u.a. durch Wassereinlagerungen bedingte Gewichtszunahme, gastro-intestinale Störungen und renale Dysfunktionen dar.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, ist eine Resorption unter Ausnutzung dieser Carrierproteine ebenso möglich wie die Resorption durch spezialisierte Transporter wie den Taurintransporter [Persky und Brazeau, 2001].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Creatinkonzentrationen auf mögliche Interaktionen mit den γ -Aminobuttersäurederivaten Baclofen und Gabapentin in In-situ-Untersuchungen geprüft. Die Inhibition der intestinalen Permeabilität war bei beiden Substanzen stark ausgeprägt. Der Zusatz von Creatin zum Perfusat resultierte sowohl beim Gabapentin als auch beim Baclofen in einer Reduktion der Permeabilität im Colon von 60%. In den beiden Dünndarmsegmenten reduzierte Creatin die Permeabilität von Baclofen um 70% und war dementsprechend stärker ausgeprägt als im Colon. Für Gabapentin dagegen war die Inhibition im Colon schwächer als im Jejunum und Ileum. Dies kann nur dadurch erklärt werden, dass die beiden GABA-Derivate unterschiedliche Affinitäten zu Aminosäuretransportern und eventuell auch zu verschiedenen Carriern besitzen. Die überlappende Affinität zu mehreren Transportsystemen, sowohl Natrium-abhängigen als auch Natrium-unabhängigen Carriern, könnte ebenfalls eine Erklärungsmöglichkeit liefern.

4.2.2. In-vivo-Untersuchungen: Interaktionen mit Energy Drinks sowie deren Inhaltsstoffen

Die in situ beobachteten Effekte sollten auf ihre In-vivo-Relevanz hin geprüft werden. Dazu wurde Ratten entweder Baclofen bzw. Gabapentin alleine oder in Kombination mit den Inhibitoren der Perfusionsstudien peroral appliziert. Zusätzlich wurde der Einfluss eines Zuckergemisches (Glucose, Saccharose), wie es in Energy Drinks üblich ist, untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Zuckerzusatz keinen Effekt auf die pharmakokinetischen Parameter des Baclofens besitzt. Taurin führte wie in den Perfusionsstudien zu einer Reduktion sowohl der AUD als auch von C_{max} . Das Ausmaß der Inhibition war in vivo allerdings deutlich niedriger als in situ. Coffein, das in den In-situ-Studien ebenfalls einen ausgeprägten inhibitorischen Effekt auf die Baclofenpermeabilität aufwies, bewirkte in vivo sogar einen Anstieg der Fläche unter den Datenpunkten. Es ist allerdings interessant, dass nach 15 Minuten, also zum Zeitpunkt der ersten Probennahme, die Baclofenkonzentration im Blut durch Coffein signifikant (um 33%) reduziert war. Zusammenfassend hatte Coffein also einen verzögernden, aber dennoch bioverfügbarkeitserhöhenden Effekt auf die Resorption von Baclofen. Die "Rechtsverschiebung" der Konzentrations-Zeit-Profile wurde besonders deutlich nach gleichzeitiger Applikation von Baclofen mit einem Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drink. Die Verzögerung der Baclofenresorption zeigte sich hier in einer Verschiebung der t_{max} von 0,5 auf 1 Stunde nach Applikation sowie einer Reduktion von C_{max} . Allerdings war die hier gemessene Baclofenkonzentration nach 1 Stunde höher als nach alleiniger Applikation von Baclofen. Die damit ebenfalls verzögerte Elimination wirkte sich auf die AUD dahingehend aus, dass sie unter dem Einfluss des Energy Drinks sogar minimal erhöht war.

Für Gabapentin wurde nur der Einfluss des Energy Drinks auf die Absorption untersucht, nicht dagegen der getrennte Einfluss der Inhaltsstoffe. Die verzögernde Wirkung des Energy Drinks auf die Resorption konnte für Gabapentin bestätigt werden. Maximale Blutspiegel wurden bei Gabapentin erst eine Stunde nach Applikation erreicht, die Coadministration des Energy Drinks führte beim Gabapentin bis eine Stunde nach Applikation ebenfalls zu einer starken Reduktion der Blutkonzentrationen. T_{max} wurde nach Coadministration des Energy Drinks erst 2 Stunden nach Applikation erzielt. Die AUD war allerdings nur geringfügig reduziert.

4.3. Ausblick

Die Kenntnis der Affinität zu Transportern ist von entscheidender Bedeutung in der Entwicklung neuer Arzneistoffe. Arzneistoffe, die aktiv durch Membranen aufgenommen werden, weisen Besonderheiten bei den pharmakokinetischen Eigenschaften auf. Nach Überschreiten der Transportkapazität werden höhere Dosen von Substraten absorptiver Transporter nur noch ineffektiv absorbiert. Bei Substraten sekretorischer Transporter steigt nach Überschreiten der Transportkapazität die Absorptionsrate überproportional an, da der Auswärtstransport keine so große Rolle mehr spielt. Die Folge beider – absorptiver und sekretorischer – sättigbarer Prozesse sind somit nichtlineare Kinetiken. Das Wissen um die Absorptionseigenschaften einer Substanz trägt somit zur Gewährleistung einer sicheren und effektiven Arzneimitteltherapie bei.

Schnelle und sichere Screening-Methoden, wie das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Radioligandenbindungsassay, sind gut geeignet, um schon während der Entwicklung neuer Arzneistoffe Informationen zur Transporteraffinität zu erhalten. Die im Bindungsassay ermittelte Affinität der untersuchten Baclofenester zum P-Glykoprotein konnte in In-vivo-Untersuchungen bestätigt werden.

Ideal wäre es, wenn die Bestimmung einfach zu ermittelnder physikochemischer Parameter einer Substanz sichere Hinweise auf die Affinität zum P-Glykoprotein zulassen würde. Die Korrelation der Lipophilie der Baclofenester mit der P-GP-Affinität zeigt einen wichtigen Parameter zur Abschätzung dieser Affinität auf. Verapamil, eine Substanz mit ähnlicher Lipophilie wie der Baclofenbutylester, zeigte auch in vivo ähnliche Effekte auf die Bioverfügbarkeit von Talinolol. Dies bestätigt die Theorie eines vergleichbaren Interaktionspotentials bei ähnlicher P-GP-Affinität und bei vergleichbarer Lipophilie.

Dennoch sind In-vivo-Studien zur Beurteilung der klinischen Relevanz von Transporteigenschaften bislang nicht durch In-vitro-Studien zu ersetzen. Die gezielte Betrachtung eines einzelnen Transportproteins gibt die tatsächlichen Auswirkungen auf die Absorption und Distribution im intakten Organismus nicht unbedingt korrekt und in quantitativer Hinsicht prädiktiv wieder. Am Beispiel der Baclofenester konnte gezeigt werden, dass andere, parallel verlaufende – aktive ebenso wie passive – Prozesse den Einfluss eines einzigen Transporters mehr als kompensieren können. In vivo hängt der Einfluss eines Carriers also davon ab, welchen Anteil am Gesamtprozess er inne hat.

Neben In-vivo-Studien sind In-situ-Untersuchungen vor allem für Interaktionsstudien sehr gut geeignet. Sie ermöglichen in dem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Mehrstufenverfahren einen intraindividuellen Vergleich. Die Variabilitäten sind gering und eine statistische Absicherung der Ergebnisse daher selbst bei geringen Tierzahlen möglich.

Somit sind In-vitro- und In-situ-Untersuchungen unerlässlich zur Beurteilung pharmakokinetischer Eigenschaften. Die Kombination von Ergebnissen aus Bindungsstudien, die das Augenmerk gezielt auf einen zuvor definierten Transporter legen, und solchen aus Perfusionsstudien, die den Einfluss auf das intakte Tier widerspiegeln, ergänzen sich somit in idealer Weise zur Vorhersage der In-vivo-Verhältnisse. Lediglich potentielle lokale vaskuläre Effekte können im In-situ-Modell zu Abweichungen zwischen Prädiktion und Observation führen.

5. Materialien und Methoden

5.1. In-vitro-Untersuchungen – Radioligandenbindungsassay

5.1.1. Chemikalien und Geräte

5.1.1.1. Chemikalien

rac-Alprenolol	(R/S)-1-(2-Allylphenoxy)-3-isopropylamino-2-propanol, Sigma, St. Louis, USA
rac-Baclofen	(R/S)-4-Amino-3-(4-Chlorphenyl)buttersäure, Ciba-Geigy GmbH, Wehr/Baden, Deutschland
Baclofenester: Methyl-, Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, Butylester	Synthese und Charakterisierung durch B. Herber [2002]
Dulbecco's modified Eagle medium mit stabilem Glutamin	DMEM, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Fötales bovines Serum	Fetal bovine serum (FBS), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Hank's Salzlösung	Hank's balanced salt solution (HBSS), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
L- α -Lysophosphatidylcholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat	MES, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	NaCl, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren	Non essential amino acids (NEA), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml, 10000 μ g/ml)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Phosphatpuffer ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Phosphate buffered saline (PBS), Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Rotiszint 22	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (1N)	HCl, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
[³ H]-Talinolol	Kix, Volxheim (www.isotopes.de), Deutschland, (55 mCi/mmol)
rac-Talinolol	(R/S)-1-{4-[3-(tert-Butylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl}-3-cyclohexylurea, Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul, Deutschland
Trypsin/EDTA	0,25%/0,02%, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
rac-Verapamil-Hydrochlorid	(R/S)-2-Isopropyl-2,8-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methyl-6-azaocantitril, Sigma, St. Louis, USA
Vinblastin-Sulfat	[3aR-[3a α ,4 β ,5 β , 5a β ,9(3R*,5S*,7R*,9S*),10bR*,13a α]]-Methyl-4-(acetyloxy)-3a-ethyl-9-[5-ethyl-1,4,5,6,7,8,9,10-octahydro-5-hydroxy-9-(methoxy-carbonyl)2H-3,7-methanoazacyclo-undecino[5,4-b]indol-9-yl]-3a,4,5,5a,6,11,12,13a-octahydro-5-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-1H-indolizino[8,1-cd]carbazol-5-carboxylat, Velbe™, Lilly, Bad Homburg, Deutschland

5.1.1.2. Geräte

Counter	Flüssigszintillationszähler, Beckman Coulter, Unterschleissheim, Deutschland
Datenanalyse	Windows 98, Microsoft Excel 97, Microcal Origin™ 6.0 Software, Northampton, USA
Destillation	Destamat, Bi 18 E, Heraeus, Hanau, Deutschland
Filter	GF/C Filter, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Deutschland
Hämocytometer	Thoma-Zählkammer
Harvester	Brandel Harvester M-24R, Biomedical Research & Development Laboratories, Gaithersburg, USA
Inkubator	CO ₂ -Inkubator MCO 17 AI, Sanyo, Vertrieb durch MS-Laborgeräte, Deutschland
pH-Meter	pH 538 Multical, WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Platten	Microwell™ Plate, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Schüttler	IKA™-Schüttler MTS 2, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Zellkulturflaschen	Zellkulturflaschen mit Filterdeckel, 75 cm ² , Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturröhrchen	Sterile Polypropylen-Röhrchen, 15 und 50 ml, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5804R, Hamburg, Deutschland

5.1.2. Caco-2-Zellkultur

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Radioligandenbindungsassay (RBA) basiert auf Caco-2-Zellen, einer humanen Colonkarzinomzelllinie, die die im humanen Intestinum physiologischerweise vorkommenden Transportproteine (z.B. P-GP, OCT, PEPT1) exprimiert. Ausdifferenzierte Caco-2-Zellen besitzen außerdem die für das Intestinum typischen Microvilli.

Die Caco-2-Zellen (Passage 58-61) wurden in DMEM mit stabilem Glutamin kultiviert, das zusätzlich 20% fötales bovines Serum (FBS), 1% nichtessentielle Aminosäuren (NEA), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 nM Vinblastinsulfat (zur Aufrechterhaltung der Überexpression von P-Glykoprotein) enthielt. Die Zellen wurden wöchentlich mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%/0,02%) trypsinisiert und in 75 cm² Zellkulturgefäßen in einer Dichte von 5 Millionen Zellen pro Gefäß ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C in einer Atmosphäre, die 95% Luft und 5% CO₂ bei einer relativen Feuchtigkeit von 100% enthielt. Nach 7 bis 10 Tagen wurden die Zellen im Radioligandenbindungsassay verwendet. Für das Bindungsassay wurde das Medium von den Zellen entfernt und die Zellmonolayer zweimal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (Phosphatpuffer, PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,25%/0,02%) behandelt. Dreißig Minuten später wurde die Trypsinisierung durch Zusatz von 18 ml komplettem Medium gestoppt. Die Zellen wurden individualisiert, mit einem Hämocytometer gezählt und vom Medium durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 23°C, 1200 Upm). Die Zellen wurden dann einmal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen und in einer 0,01%igen Lösung von L- α -Lysophosphatidylcholin in Hank's Salzlösung (HBSS), die 10 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat (MES) enthielt und auf pH 7,0 mit Salzsäure eingestellt war, resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension sofort im Bindungsassay verwendet.

5.1.3. Radioligandenbindungsassay

Das Radioligandenbindungsassay wurde von Döppenschmitt [1999] entwickelt und modifiziert von Dressler [2002] und Koggel [2002]. Es dient der Bestimmung der Affinität zum exsorbitiven Transporter P-Glykoprotein. Das RBA erlaubt eine schnelle, zuverlässige und direkte Bestimmung der Affinität zum exsorbitiven Transporter P-Glykoprotein und basiert auf P-GP überexprimierenden Caco-2-Zellen. Die stabile Überexpression des P-Glykoproteins wurde durch Zusatz des Zytostatikums Vinblastin erzielt. Grundlage des Bindungsassays ist die kompetitive Bindung und Verdrängung von P-GP-Liganden. Durch Zusatz des Radioliganden [³H]-Talinolol, der sich aufgrund seiner geringen nichtspezifischen Bindung als besonders geeignet erwiesen hatte [Dressler, 2002] tritt je nach Affinität der zu untersuchenden Substanz zum Transporter P-Glykoprotein eine mehr oder weniger ausgeprägte Verdrängung des Talinolols durch die zu untersuchende Substanz auf. Der nichtgebundene Anteil des radioaktiv markierten Talinolols wird abgetrennt und das gebundene radioaktive [³H]-Talinolol in einem Counter vermessen. Mit Hilfe der gemessenen Radioaktivität kann die Affinität der untersuchten Substanzen zum P-Glykoprotein bestimmt werden.

Die Lösungen aller verwendeten Substanzen (5 verschiedene Baclofenester, bzw. deren Muttersubstanz Baclofen) wurden in Hank's Salzlösung (HBSS), die 10 mM Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat (MES) (Inkubationspuffer, pH 7,0) enthielt, hergestellt. Das Radioligandenbindungsassay wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Jede Inkubationslösung bestand aus 100 µl Substanzlösung (Baclofenester, Baclofen) in zwölf verschiedenen Konzentrationen (2000; 1333,33; 666,67; 333,33; 111,11; 37,037; 12,346; 4,115; 1,372; 0,457; 0,046; 0 µM). Darüber hinaus enthielt jede Inkubationslösung die Lösung des Radioliganden (25 µl; 1 µM Talinolol mit 20% [³H]-Talinolol) und 125 µl Zellsuspension (s. Kapitel 5.1.2.). Nach Inkubation (30 min, 1200 Upm) bei Raumtemperatur, wurde die Lösung unter Vakuum in einem Brandel-Cell-Harvester durch Glasfaserfilter filtriert und dabei der ungebundene Radioligand von dem an P-GP gebundenen Radioliganden abgetrennt. Zur vollständigen Entfernung des ungebundenen Radioliganden wurden die Filter mit 5 ml eiskalter 0,9%iger Kochsalzlösung in bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Filter in 4 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und die gebundene, also die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität, in einem Flüssigszintillationszähler vermessen.

5.1.4. Kalkulation der IC₅₀-Werte

Für die Bestimmung der P-GP-Affinität nicht gelabelter Substanzen wurde die Verdrängung des Radioliganden [³H]-Talinolol durch ansteigende Konzentrationen der Testsubstanz (12 verschiedene Konzentrationen pro Substanz) bestimmt. Alle Kurvenanpassungen sowie die nichtlineare Regressionsanalyse wurden mit Hilfe von Microcal Origin™ Version 6.0 unter Anwendung folgender Gleichung durchgeführt:

$$y = y_0 + \frac{a * x^b}{c^b + x^b}$$

y_0 und a repräsentieren dabei die Verdrängung bei minimaler (0%) und maximaler Substratkonzentration (100%). b ist der Hill Koeffizient und c der IC₅₀-Wert (µM). Der IC₅₀ ist definiert als die Konzentration einer Substanz, die die Bindung des Radioliganden um 50% inhibiert und stellt somit ein Maß für die Affinität zum Transporter P-Glykoprotein dar. Verapamil und Talinolol wurden als Referenzsubstanzen zusätzlich zur Bestimmung von Baclofen und seinen Analoga in die Bestimmung der IC₅₀-Werte eingeschlossen.

Alprenolol zeigte eine fast vollständige Verdrängung des Radioliganden bei hohen Konzentrationen (30 mM) und wurde daher zur Abschätzung der nichtspezifischen Bindung und zur Bestimmung der spezifischen Bindung verwendet.

$$\text{Spezifische Bindung} = \text{Gesamtbindung} - \text{Nicht-spezifische Bindung}$$

5.2. In-situ-Untersuchungen – Rattendarm-Perfusionsstudien

5.2.1. Chemikalien und Geräte

5.2.1.1. Chemikalien

rac-Baclofen	(R/S)-4-Amino-3-(4-Chlorphenyl)buttersäure, Ciba-Geigy GmbH, Wehr/Baden, Deutschland
R-Baclofen	R-4-Amino-3-(4-Chlorphenyl)buttersäure, Ciba-Geigy GmbH, Wehr/Baden, Deutschland
S-Baclofen	S-4-Amino-3-(4-Chlorphenyl)buttersäure, Ciba-Geigy GmbH, Wehr/Baden, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ *2H ₂ O, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
rac-CGP 11.130	(R/S)-4-Amino-3-(4-Fluorphenyl)buttersäure, Ciba-Geigy GmbH, Basel, Schweiz
Coffein	1,3,7-Trimethylxanthin, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Creatin	N-Amidinosarcosin, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Dikaliumhydrogenphosphat	K ₂ HPO ₄ , Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Diethylether	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gabapentin	1-(Aminomethyl)cyclohexanessigsäure, Parke-Davis GmbH/Gödecke AG, Freiburg, Deutschland
Glucose, wasserfrei	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	KCl, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ , E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	(R/S)-2-(2-Chlorphenyl)-2-(methylamino)cyclohexanon, Ketamin-Ratiopharm [®] 100 O.K., Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂ *6H ₂ O, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	NaCl, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃ , Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄ , Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natronlauge (1N)	NaOH, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Red Bull [®]	Wasser, Saccharose, Glucose, Zitronensäure, Taurin (400 mg/dl), Kohlensäure, Glucuronolacton, Coffein (30 mg/dl), Inosit, Vitamine (Niacin, Pantothensäure, B ₆ und B ₁₂), Red Bull GmbH, Fuschl, Österreich
Salzsäure (1N)	HCl, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Taurin	2-Aminoethansulfonsäure, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Tyrodepuffer	Zusammensetzung: NaCl 8,0 g, KCl 0,2 g, CaCl ₂ *2H ₂ O 0,2 g, MgCl ₂ *6H ₂ O 0,1 g, NaH ₂ PO ₄ 0,04 g, NaHCO ₃ 1,0 g, Glucose 3,0 g ad 1000 ml, eingestellt auf pH 7,0 mit 1N HCl
Xylazin-Hydrochlorid	2-(2,6-Xylidino)-5,6-dihydro-4H-1,3-thiazin, Rompun [™] , 2%ige Injektionslösung, BayerVital, Leverkusen, Deutschland

5.2.1.2. Geräte

Einmalspritze (1 ml)	Omnifix Feindosierungsspritze, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Heizdecke	
Peristaltische Pumpe	Ismatec MC-MS CA8/6 Peristaltische Pumpe, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz
pH-Meter	Jonway 3051, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Silikonschläuche	Silikonschlauchverbindungen, Innendurchmesser 2,0 und 4,0 mm, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Wasserbad	Thermomix 1420, Typ 850022, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland

5.2.2. Rechtliche Voraussetzungen für die Durchführung der Tierstudien

Die durchgeführten In-situ-Perfusionsstudien wurden durch das zuständige Regierungspräsidium Halle (Dezernat 43) genehmigt. Das Versuchsprotokoll legt u.a. die Dauer des Versuches, die Dosierung der Arzneistoffe, die Anästhesie sowie das chirurgische Vorgehen im Detail fest. Die Versuche wurden dahingehend optimiert, mit einer geringen Anzahl an Tieren ein Maximum an Informationen zu erhalten.

5.2.3. Vorgehensweise bei den In-situ-Untersuchungen

5.2.3.1. Chirurgisches Vorgehen

Das chirurgische Vorgehen bei der intestinalen Perfusion entspricht der ursprünglich von Doluisio et al. [1969] publizierten Methode, modifiziert nach Hanafy [2001]. Den Ratten (männliche White-Wistar-Ratten, n=2-4, Körpergewicht 349 ± 32 g) wurde 18 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen, sie hatten jedoch bis unmittelbar vor Beginn des Experimentes uneingeschränkten Zugang zu Wasser. Nach einer kurzen Betäubung der Tiere durch Inhalation von Diethylether, wurde eine Anästhesie durch intraperitoneale Applikation von Ketamin (40 mg/kg KG) und Rompun™ (2 mg) durchgeführt. Eventuell notwendige Nachdosierungen der Anästhesie während des Experimentes erfolgten mit Ketamin (5 mg, i.p.). Die narkotisierten Ratten wurden zur Aufrechterhaltung ihrer Körpertemperatur und zur Vermeidung übermäßiger Mucussekretion auf einem Heizkissen, das auf 37°C temperiert war, plaziert. Anschließend wurde die Bauchhöhle durch einen ca. 4 cm langen Schnitt an der Linea alba eröffnet, die ausgewählten intestinalen Segmente freigelegt und durch kleine Schnitte unter Vermeidung übermäßiger Blutungen eröffnet. Die zu perfundierenden Darmabschnitte wurden dann mit dem auf 37°C temperierten Tyrodepuffer gespült und gereinigt und anschließend die Silikonschläuche an den drei intestinalen Segmenten, die pro Ratte ausgewählt wurden, mit Nähseide befestigt (Jejunum $6,1 \pm 1,3$ cm, Ileum $4,7 \pm 1,2$ cm, Colon $2,2 \pm 0,6$ cm). Dabei wurde darauf geachtet, dass durch das Nahtmaterial keine größeren Blutgefäße abgeklemmt wurden.

5.2.3.2. Perfusionsbedingungen

Die Perfusionslösung, bestehend aus Arzneistoff-haltigem Tyrodepuffer, wurde mittels eines Wasserbades auf 37°C temperiert und mit einer konstanten Flussrate von 0,2 ml/min durch die intestinalen Segmente von cranial nach caudal gepumpt. Die aus den intestinalen Segmenten

austretende Lösung wurde in definierten Intervallen (5 Minuten) quantitativ gesammelt und das entsprechende Volumen durch Wiegen der Eluatfraktionen ermittelt. Die erhaltenen Fraktionen wurden ebenso wie die Arzneistofflösungen bis zur HPLC-analytischen Bestimmung bei $<-20^{\circ}\text{C}$ gelagert.

5.2.3.3. Stufenweise Perfusion

Die Perfusionen wurden entweder als Zwei- bzw. Dreistufenperfusion mit einer Gesamtdauer von 90 bzw. 135 Minuten durchgeführt. In der ersten Stufe der Perfusion wurde die Basispermeabilität des entsprechenden Arzneistoffes ermittelt. In den darauf folgenden Abschnitten wurde der Einfluss spezifischer Inhibitoren durch Zusatz zum Arzneistoff-haltigen Tyrodepuffer betrachtet. Jede dieser Perfusionsabschnitte mit einer Gesamtdauer von 45 Minuten war aufgeteilt in einen 15minütigen Vorlauf, der nicht in die Berechnung der effektiven Permeabilität miteinbezogen wurde und zur Einstellung von Steady-state-Bedingungen diente, sowie einer Periode von 30 Minuten für die Bestimmung der P_{eff} -Werte in Abständen von 5 Minuten. Die Bestimmung erfolgt simultan in drei Darmabschnitten (Jejunum, Ileum und Colon). Vor Beginn der Studien wurde auf eine mögliche analytische Interferenz der Inhibitoren getestet, um eine präzise und korrekte HPLC-Analytik zu gewährleisten.

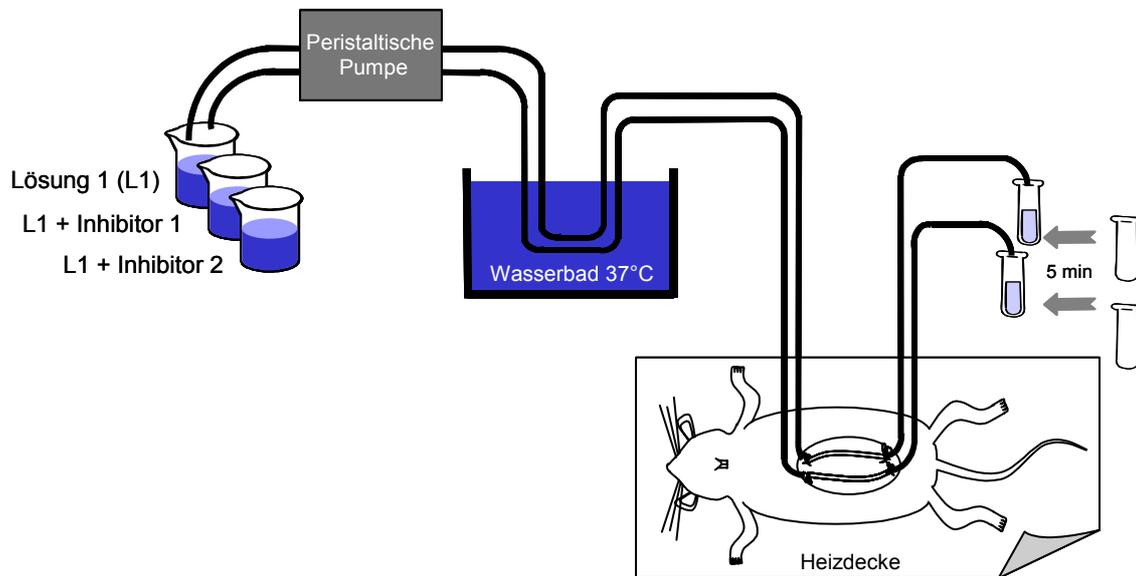


Abbildung 33: Schematische Darstellung der In-situ-Rattendarmperfusion, hier dargestellt als Dreistufenperfusion an zwei intestinalen Segmenten

5.2.3.4. Studiendesign

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Perfusionen mit verschiedenen Arzneistoffen sowie potentiellen Inhibitoren der intestinalen Permeabilität durchgeführt.

5.2.3.4.1. Baclofen

Für Baclofen wurden zunächst Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Baclofenpermeabilität als Dreistufenperfusion (0,05, 0,1, 0,5 mM) durchgeführt. Dabei stellte sich die Konzentration von 0,1 mM aufgrund der noch nicht gesättigten intestinalen Transportsysteme als für die weiteren Studien geeignet heraus. Baclofen besitzt als Derivat der γ -Aminobuttersäure ein

Chiralitätszentrum. Da mit Hilfe der etablierten HPLC-Methode zur bioanalytischen Bestimmung von Baclofen (s. Kapitel 5.5.3.) keine Trennung der Enantiomeren des Baclofens möglich war, wurden Perfusionen separat für die beiden Enantiomere durchgeführt, sowie der Einfluss der achiralen aminosäureanalogen Substanz Taurin auf die Permeabilität der Enantiomeren getestet. Ziel der folgenden Studien war es, Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen sowie Arzneistoff-Nahrungsmittel-Interaktionen zu untersuchen. Als potentieller kompetitiver Inhibitor der aktiven Absorption des Baclofens wurde Taurin zum Tyrodepuffer zugefügt und zwar in derselben Konzentration (32,0 mM, 400 mg/dl) wie dieses den sogenannten Energy Drinks üblicherweise zugesetzt ist. Weiterhin stellten wir die Hypothese auf, dass das in kommerziell erhältlichen Energy Drinks ebenfalls in hoher Konzentration enthaltene Coffein (0,6 mM, 30 mg/dl) die intestinale Permeabilität von Baclofen beeinflussen kann. Neben dem separaten Einfluss der Substanzen Taurin und Coffein wurde die Veränderung der Baclofenpermeabilität durch einen "Cocktail" der beiden Substanzen untersucht. Um einen Einfluss anderer Substanzen, die in Energy Drinks, aber nicht in dem Tyrodepuffer enthalten waren, auf die Baclofenpermeabilität auszuschließen, wurden Perfusionen mit Baclofen durchgeführt, bei denen statt des üblicherweise verwendeten Tyrodepuffers, das Baclofen direkt in einem Energy Drink (Red Bull®) gelöst wurde und die Ratte direkt entweder mit dem neutralisierten bzw. mit dem nicht neutralisierten (pH 3,1) Energy Drink perfundiert wurde. Zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes der Inhibition der Baclofenpermeabilität durch Taurin wurden abschließend Perfusionen durchgeführt, in denen die Abhängigkeit der Baclofenpermeabilität von der Taurinkonzentration im Perfusat untersucht wurde. Dabei kamen folgende Taurinkonzentrationen zum Einsatz: 0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 mM.

Abschließend wurde in einer Dreistufenperfusion zunächst die Baclofenpermeabilität bestimmt und dann der Einfluss von 100 mg/dl (7,6 mM) sowie 1000 mg/dl (76,3 mM) Creatin auf die Basislinienpermeabilität untersucht.

5.2.3.4.2. CGP 11.130

Für CGP 11.130, das Fluoranalogen des Baclofens, wurde aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zur Muttersubstanz ein ähnliches Absorptionsverhalten vermutet. Daher wurden Perfusionen durchgeführt, in denen in der ersten Perfusionsperiode die Basispermeabilität des CGP 11.130 ermittelt wurde und in der zweiten Perfusionsperiode der Einfluss von Taurin (32,0 mM) untersucht wurde.

5.2.3.4.3. Gabapentin

Analog zum Baclofen wurden auch für Gabapentin zunächst Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Permeabilität als Dreistufenperfusion (0,05, 0,1, 0,5 mM) durchgeführt. Als Konzentration für die weiteren Studien wurde ebenfalls 0,1 mM festgelegt. Da es sich bei Gabapentin ebenfalls um eine Substanz mit Aminosäurecharakter handelt, wurden vergleichbare Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen sowie Arzneistoff-Nahrungsmittel-Interaktionen mit Taurin vermutet. Das Versuchsdesign war äquivalent zu dem in Kapitel 5.2.3.4.1. beschriebenen, so dass neben der Basispermeabilität, der Einfluss von Taurin und Coffein, einzeln sowie als Gemisch, untersucht wurde. Die Konzentrationen der beiden Substanzen entsprachen den üblicherweise in Energy Drinks zugesetzten Mengen. Es wurden ebenfalls Perfusionen mit Gabapentin durchgeführt, bei denen statt des üblicherweise verwendeten Tyrodepuffers, das Gabapentin in dem Energy Drink (Red Bull®) gelöst wurde und die Ratte direkt mit dem neutralisierten bzw. mit dem nicht neutralisierten (pH 3,1) Energy Drink perfundiert wurde. Zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes der Inhibition der Gabapentinpermeabilität durch Taurin wurden abschließend Perfusionen durchgeführt, in denen die Abhängigkeit der intestinalen Permeabilität von der Taurinkonzentration im Perfusat (0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 mM) untersucht wurde.

In einer Dreistufenperfusion wurde zunächst die Gabapentinpermeabilität bestimmt und dann der Einfluss von 100 mg/dl (7,6 mM) sowie 1000 mg/dl (76,3 mM) Creatin auf die Basislinienpermeabilität untersucht.

5.2.3.5. Berechnungen

5.2.3.5.1. Berechnung des Wassertransportes

Die Bestimmung des Wassertransportes erfolgte getrennt für jeden einzelnen Darmabschnitt durch Gewichts- und Volumenmessung jeder einzelnen Probe. Der Wassertransport wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\% \text{ - Wassertransport} = \frac{m_{\text{in}} - m_{\text{out}}}{m_{\text{in}}} * 100$$

m_{in} and m_{out} repräsentieren hierbei die Gewichte der Lösungen, die in das jeweilige intestinale Segment eintreten bzw. das Segment verlassen. Die Korrektur der Arzneistoffkonzentrationen erfolgte auf der Basis des Verhältnisses $m_{\text{out}} / m_{\text{in}}$. Üblicherweise betrug der Wassertransport zwischen 5 und 10%.

5.2.3.5.2. Berechnung der intestinalen Permeabilität

Intestinale Permeabilitäten (P_{eff} [cm/s]) wurden auf der Basis des "Mixed-tank-Modelles" unter Zuhilfenahme der nachfolgenden Gleichung berechnet, die erstmals von Sinko et al. [1991] beschrieben worden war:

$$P_{\text{eff}} = \frac{v * \frac{C_{\text{in}} - C_{\text{out}}}{C_{\text{out}}}}{2\pi r l}$$

Hierbei stellt v die Flussrate [ml/min], C_{in} und C_{out} die jeweilige Konzentration [ng/ml] der Arzneistoffhaltigen Perfusionslösung, die in das intestinale Segment eintritt bzw. es verlässt, und r bzw. l den Radius bzw. die Länge [cm] des korrespondierenden intestinalen Segmentes dar (durchschnittlicher Radius der intestinalen Segmente: Jejunum 0,21 cm, Ileum 0,21 cm, Colon 0,23 cm). Die effektiven Permeabilitäten wurden für jede Perfusionsperiode separat in Abständen von 5 Minuten bestimmt.

5.3. In-vivo-Untersuchungen

5.3.1. Chemikalien und Geräte

5.3.1.1. Chemikalien

rac-Baclofen	(R/S)-4-Amino-3-(4-Chlorphenyl)buttersäure, Ciba-Geigy GmbH, Wehr/Baden, Deutschland
Baclofenester: Methyl-, Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, Butylester	Synthese und Charakterisierung durch B. Herber [2002]
Coffein	1,3,7-Trimethylxanthin, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Cordanum®	Talinolol-Injektionslösung, 10 mg/5 ml, Arzneimittelwerk Dresden GmbH, Radebeul, Deutschland
Gabapentin	1-(Aminomethyl)cyclohexanessigsäure, Parke-Davis GmbH/Gödecke AG, Freiburg, Deutschland
γ -Cyclodextrin	W8HP 0.6, Wacker-Chemie, Liestal, Schweiz

Glucose, wasserfrei	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Heparin	Labor Dr. G. Bichsel AG, Interlaken, Schweiz
Natriumchlorid	NaCl, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	NaF, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Oxalsäure	H ₂ C ₂ O ₄ , E. Merck, Darmstadt, Deutschland
physiologische Kochsalzlösung	Braun Medical AG, Emmenbrücke, Schweiz
Red Bull®	Wasser, Saccharose, Glucose, Zitronensäure, Taurin (400 mg/dl), Kohlensäure, Glucuronolacton, Coffein (30 mg/dl), Inosit, Vitamine (Niacin, Pantothersäure, B ₆ und B ₁₂), Red Bull GmbH, Fuschl, Österreich
Saccharose	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Rac-Talinolol	(R/S)-1-{4-[3-(tert-Butylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl}-3-cyclohexylurea, Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul, Deutschland
Taurin	2-Aminoethansulfonsäure, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Urethan	Carbaminsäureethylester, Aldrich, Milwaukee, USA

5.3.1.2. Geräte

Einmalspritze (1 ml)	Primo, Asik, Dänemark
Einmalspritze (2 ml)	Becton Dickinson, Braunschweig, Deutschland
Homogenisator	Ultra-Turrax, Typ: TP 18/10, Nr.: 15918, Janke & Kunkel KG IKA-Werk, Staufen, Deutschland Polytron-Homogenizer, Kinematica AG, Littau, Schweiz
PH-Meter	Jonway 3051, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipetman	Volumenbereich, 0-20 µl, Pipetman Samedic AG, Zürich, Schweiz
Sammelröhrchen	Minigrip-Sammelröhrchen, 1 ml, Milan, Genf, Schweiz
Tips for pipetman	Gilson Medical Electronics, Villiers-le Bel, Frankreich
Treff Lab-Gefäße	1,5 ml, Treff-Lab AG, Degersheim, Schweiz
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 H, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Waage	Sartorius Basic, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

5.3.2. Rechtliche Voraussetzungen für die Durchführung der Tierstudien

Die durchgeführten Tierstudien wurden von den zuständigen Behörden genehmigt. Die Genehmigung der In-vivo-Verteilungsstudie zur P-GP-Affinität mit Baclofenbutylester und Talinolol erfolgte durch das Regierungspräsidium Halle (Dezernat 43). Die entsprechende Anmeldung der tierexperimentellen Untersuchungen zu den Baclofenestern erfolgte beim Veterinäramt des Kantons Zürich. Die Versuchsprotokolle legten u.a. die Dauer des Versuches, die Dosierung der Arzneistoffe sowie das chirurgische Vorgehen im Detail fest. Die Versuche wurden auf der Basis der vorher ermittelten intraindividuellen Variabilitäten dahingehend optimiert, mit einer möglichst geringen Anzahl an Tieren ein Maximum an Informationen zu erhalten.

5.3.3. Studie zu individuellen Konzentrations-Zeit-Profilen verschiedener Baclofenester sowie der Muttersubstanz Baclofen nach intravenöser Applikation

Die In-vivo-Untersuchungen zur kinetischen Charakterisierung der Baclofenester waren von Bernd Herber und Peter Langguth an männlichen White-Wistar-Ratten am Departement Pharmazie der ETH Zürich (Schweiz) durchgeführt worden.

Die Versuchsbedingungen waren wie folgt: Die Ratten wurden zunächst mit Diethylether narkotisiert. Im Anschluss daran erfolgte die intramuskuläre Applikation von Urethan (50%, g/g) in steriler physiologischer Kochsalzlösung in einer Dosis von 1500 mg/kg Körpergewicht. Anschließend erfolgte die stumpfe Präparation der Vena jugularis, deren Abbindung cranial und die Einführung eines Polypropylen-Katheters. Dieser wurde im Anschluss an die Fixierung mit einer Heparin-haltigen physiologischen Kochsalzlösung (1:10, v/v) gespült. Die Applikation der Baclofenesterlösung (max. 400 µl; in physiologischer Kochsalzlösung) erfolgte in die Vena femoralis. Die Dosis der verschiedenen Baclofenester wurde dabei so gewählt, dass sie jeweils einer Dosis von 1,0 mg/kg KG unverestertem Baclofen entsprach (Ethylester 1,149 mg/kg KG, 1-Propylester 1,214 mg/kg KG, 2-Propylester 1,214 mg/kg KG, Butylester 1,280 mg/kg KG). Zu definierten Zeitpunkten (3, 10, 20, 40, 60, 90, 120 und 210 min) wurde aus dem in die Vena jugularis eingebrachten Katheter Blut entnommen. Nach jeder Blutentnahme (max. 300 µl/Zeitpunkt) wurde der Katheter mit einer Heparin-haltigen physiologischen Kochsalzlösung gespült und das entnommene Blutvolumen durch sterile Kochsalzlösung ersetzt. Nach der letzten Blutentnahme wurde das Tier getötet und das Hirngewebe entnommen. Das Hirngewebe wurde sofort nach Entnahme unter Zusatz einer gewichtsäquivalenten Menge physiologischer Kochsalzlösung (m/m) homogenisiert und ebenso wie die Blutproben bis zur HPLC-analytischen Bestimmung bei <-20°C gelagert. Zum Zeitpunkt der tierexperimentellen Untersuchungen war die Stabilität der verwendeten Baclofenester noch nicht abschließend geklärt. Daher wurden die erhaltenen Blut- sowie Gewebeproben unter Zusatz von Natriumfluorid (10 g/l) als Esteraseinhibitor stabilisiert. Die Stabilisierung der Hirnproben erfolgte zusätzlich mit Oxalsäure (2 g/l) [Baselt et al., 1993].

5.3.4. In-vivo-Rattenstudien zur Verteilung der Baclofenester in Hirngewebe und Blut nach intranasaler und intraperitonealer Applikation

Auch die In-vivo-Verteilungsuntersuchungen waren an männlichen White-Wistar-Ratten von Bernd Herber und Peter Langguth am Departement Pharmazie der ETH Zürich (Schweiz) durchgeführt worden.

Versuchsbedingungen: Für die In-vivo-Untersuchungen wurden Tiere mit einem Lebendgewicht von 251 ± 33 g verwendet. Die Tiere (n=3 pro Entnahmezeitpunkt) hatten bis zum Versuch freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte wie in Kapitel 5.3.3. beschrieben. Sechzig Minuten später erfolgte die Applikation der Baclofenester in physiologischer Kochsalzlösung. Die experimentellen Bedingungen entsprachen weitgehend den unter 5.3.3. beschriebenen. Im Fall der intranasalen Applikation der Baclofenester betrug das maximale Applikationsvolumen 20 µl pro Nasenloch. Zu definierten Zeitpunkten (5, 20 und 60 min) wurden die Tiere getötet und Blut sowie Gehirnmateriale entnommen, stabilisiert bzw. homogenisiert und stabilisiert und bei <-20°C gelagert.

5.3.5. In-vivo-Verteilungsstudie mit Baclofenbutylester und Talinolol

Für die Verteilungsstudien wurden männliche White-Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 244 ± 13 g verwendet (n=3 pro Behandlung und Zeitpunkt). Den Tieren wurde 18 Stunden vor Beginn der Studie das Futter entzogen. Dagegen hatten sie bis zum Beginn des Experimentes freien Zugang zu Leitungswasser (ad libitum).

Die Ratten erhielten eine der folgenden Behandlungen:

- Baclofenbutylester (10 mg/kg KG)
- Baclofenbutylester (10 mg/kg KG) + Talinolol (4 mg/kg KG)
- Talinolol (4 mg/kg KG)

Die Substanzen (Baclofenbutylester, Talinolol) wurden für die intravenöse Applikation in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und als einmalige Dosis appliziert. Zu 4 definierten Zeitpunkten (0,5, 1, 2 und 4 Stunden) wurden jeweils 3 Tiere durch Genickschlag getötet und Blut sowie andere Organe bzw. Gewebe entnommen. Die Blutproben wurden in Heparin enthaltenden Gefäßen gesammelt und bis zur HPLC-Analytik bei <-20°C tiefgefroren. Die Gewebeprobe (Gehirn, Niere, Leber, Jejunum, Ileum) wurden vor Entnahme aus dem getöteten Tier sorgfältig mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, anschließend gewogen, mit einer gewichtsäquivalenten Menge 0,25 M Saccharoselösung (1:1, m/m) homogenisiert und ebenfalls bis zur HPLC-analytischen Aufarbeitung bei <-20°C gelagert.

5.3.6. In-vivo-Konzentrations-Zeit-Profile nach Applikation von Baclofen bzw. Gabapentin und Einfluss potentieller Inhibitoren (Taurin, Coffein, Zucker, Energy Drink)

Für die Bestimmung der individuellen Konzentrations-Zeit-Verläufe nach peroraler Applikation wurde Baclofen bzw. Gabapentin entweder allein oder in Kombination mit potentiellen Inhibitoren (Taurin, Coffein, Zucker) männlichen White-Wistar-Ratten (n=3, Körpergewicht 246 ± 12 g) appliziert. Des Weiteren wurden Baclofen bzw. Gabapentin direkt in einem Taurin- sowie Coffein-haltigen Energy Drink (Red Bull®) gelöst und ebenfalls peroral appliziert. Die Baclofenlösungen wurden so hergestellt, dass den Tieren maximal ein Volumen von 5 ml mittels einer Pharyngealsonde peroral appliziert wurde. Die Baclofen- sowie die Gabapentindosis betrug 1,0 mg/kg KG. Die Konzentrationen an Taurin und Coffein wurden so gewählt, dass sie der Konzentration im Energy Drink entsprachen (Taurin: 400 mg/dl, 32,0 mM; Coffein 30 mg/dl, 0,6 mM). Entsprechend wurde den Tieren 80 mg/kg KG Taurin bzw. 6 mg/kg KG Coffein verabreicht. Ein Tag vor Applikation der Arzneistoff-haltigen Applikationslösung wurde den Tieren ein heparinisierter Katheter in die Beinvene implantiert (Harvard-Swivel-Modell). Dies ermöglichte über einen längeren Zeitraum die Blutentnahme am frei beweglichen, wachen Tier. Zunächst wurden die Tiere leicht mit Ether narkotisiert, da die Katheterisierungen dann aufgrund fehlender Abwehrreflexe leichter durchgeführt werden konnten. Im Anschluss an die perorale Applikation wurde zu festgelegten Entnahmezeitpunkten (15, 30, 60, 120, 240 und 360 min) Blut entnommen. Die erhaltenen Blutproben wurden heparinisiert und bis zur HPLC-analytischen Bestimmung bei <-20°C tiefgefroren. Nach der letzten Blutentnahme wurden die Tiere getötet.

5.3.7. Datenanalyse

Die Auswertung der individuellen Konzentrations-Zeit-Profile im Blut bzw. in den Organgeweben wurde mit Hilfe des Datenanalysensystems TopFit, Version 2.0 [Heinzel et al., 1993] durchgeführt. Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte auf der Basis der linearen Trapezregel durch nicht-kompartimentelle Verfahren.

Die Berechnung der Gewebe/Blut-Quotienten erfolgte durch Quotientenbildung der entsprechenden Konzentrationen in [ng/g] desselben Entnahmezeitpunktes und desselben Tieres nach folgender Gleichung:

$$\text{Gewebe / Blut - Quotient} = \frac{C_{\text{Gewebe}}}{C_{\text{Blut}}}$$

5.4. Statistische Auswertung

Für die In-situ-Untersuchungen wurden während der Steady-state-Periode aus den jeweiligen Permeabilitäten der Sammelintervalle die mittleren effektiven Permeabilitäten für jede Ratte und für jede Perfusionsperiode bestimmt. Die Daten sind als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung ($SD_{(n-1)}$) angegeben.

Lag eine Messreihe vor, die (wie im Fall der 30minütigen Steady-state-Periode der In-situ-Perfusionsstudien) in Abhängigkeit von der Zeit systematische Abweichungen aufweisen könnte, so wurde geprüft, ob ein Trend in den Beobachtungen statistisch nachzuweisen ist. Der Trend-Test nach Cox und Stuart ($p \leq 0,01$) wurde z.B. angewendet, um nachzuweisen, dass die Baclofenpermeabilitäten unter dem Einfluss des nicht neutralisierten (pH 3,1) Energy Drinks einem Trend folgend ansteigen [Sachs, 1992], die Baclofenpermeabilitäten bei Verwendung von neutralisiertem Energy Drink dagegen nicht. Auch für andere Perfusionsbedingungen (Perfusion mit oder ohne Inhibitor) konnte kein zeitabhängiger Trend nachgewiesen werden. Somit lagen in allen anderen Fällen Steady-state-Bedingungen vor.

Der t-Test nach Student (zweiseitig) wurde zur Beurteilung der statistischen Signifikanz des Unterschiedes zwischen zwei Gruppen (ungepaart) oder zwei Behandlungen (gepaart) bei Perfusionsstudien und Verteilungsstudien angewendet. Ein Wert von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgesetzt [Sachs, 1992].

5.5. HPLC-Analytik

5.5.1. Chemikalien und Geräte

5.5.1.1. Chemikalien

N-Acetyl-L-Cystein	E. Merck, Darmstadt, Deutschland
rac-Baclofen	(R/S)-4-Amino-3-(4-Chlorphenyl)buttersäure, Ciba-Geigy GmbH, Wehr/Baden, Deutschland
Baclofenester: Methyl-, Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-, Butylester	Synthese und Charakterisierung durch B. Herber [2002]
rac-CGP 11.130	(R/S)-4-Amino-3-(4-Fluorphenyl)buttersäure, Ciba-Geigy Ltd., Basel, Schweiz
R/S-Chlorphenylalanin	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Dichlormethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanolamin	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gabapentin	1-(Aminomethyl)cyclohexanessigsäure, Parke-Davis GmbH/Gödecke AG, Freiburg, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄ , Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
R-(-)-1-(1-Naphthyl)ethylisocyanat	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃ , Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Natronlauge (1N)	NaOH, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
o-Phthaldialdehyd	Benzol-1,2-dialdehyd, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
rac-Pindolol	(R/S)-4-[2-Hydroxy-3-(isopropylamino)-propoxy]-indol, Sandoz AG, Basel, Schweiz
Puffer pH 10	Borsäure/Kaliumchlorid-Natronlauge, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Puffer pH 11	Borsäure/Kaliumchlorid-Natronlauge, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (1N)	HCl, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
rac-Talinolol	(R/S)-1-{4-[3-(tert-Butylamino)-2-hydroxypropoxy]phenyl}-3-cyclohexylurea, Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul, Deutschland
Taurin	2-Aminoethansulfonsäure, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Triethylamin	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Tetrahydrofuran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Toluol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

5.5.1.2. Geräte (inkl. stationäre Phasen)

Analytische Waage	Mettler H20T, Firma Mettler Instrumente AG, Greifensee-Zürich, Schweiz
Datenauswertung	Windows 98, Microsoft Excel 97, Microsoft Corporation, USA
Heizblock	SC-3/DB-3, Techne Cambridge Ltd., Coxford Cambridge, Großbritannien
Homogenisator	Ultra-Turrax, Typ: TP 18/10, Nr: 15918, Janke & Kunkel KG IKA-Werk, Staufen, Deutschland
HPLC-Ausstattung	
<i>Fluoreszenz-Detektion</i>	
Autosampller	Merck Hitachi AS-4000A, Intelligent Autosampller, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Detektor	Merck Hitachi FL Detector L-7480, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Pumpe	Merck Hitachi L-6000A Pump, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>UV-Detektion</i>	
Autosampller	Jasco 851-AS Intelligent Autosampller, Jasco, Groß-Zimmern, Deutschland
Detektor	Jasco UV-975 UV/VIS Detector, Jasco, Groß-Zimmern, Deutschland
Pumpe	Jasco PU-980 Intelligent HPLC-Pump, Jasco, Groß-Zimmern, Deutschland
<i>HPLC-Säulen</i>	
Baclofen	Hauptsäule: Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 250*4,6 mm ID, Bischoff, Leonberg, Deutschland Vorsäule: LiChrocart C ₈ -Vorsäulenkartuschen, 5 µm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
CGP 11.130	Hauptsäule: Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 250*4,6 mm ID, Bischoff, Leonberg, Deutschland Vorsäule: LiChrocart C ₈ -Vorsäulenkartuschen, 5 µm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Gabapentin	Hauptsäule: Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 250*4,6 mm ID, Bischoff, Leonberg, Deutschland Vorsäule: LiChrocart C ₈ -Vorsäulenkartuschen, 5 µm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Baclofenester	Hauptsäule: Zorbax C ₈ , 5 µm, 250*4,6 mm ID, Bischoff, Leonberg, Deutschland Vorsäule: LiChrocart C ₈ -Vorsäulenkartuschen, 5 µm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Talinolol	Hauptsäule: Chiraspher NT, 5 µm, 250*4,0 mm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland Vorsäule: LiChroCART 4-4, Lichrospher 100 Diol, 5 µm, 4*4 mm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Software	Borwin, JMBS Developments, Le Fontanil, Frankreich
Magnetrührer	Magnetic Stirrex HI 300 N, Hanna Instruments, Vertrieb durch Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Microshaker	Typ 326, Premed, Warschau, Polen
PH-Meter	Jonway 3051, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Schüttler	Thys2, VEB MLW Labortechnik, Ilmenau, Deutschland
Stickstoff 5.0	Messer Griesheim, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex RK 510 H, Firma Baudelin Elektronik, Berlin, Deutschland
Zentrifuge	Labofuge 400 R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

5.5.2. Pufferlösungen und Derivatisierungsreagenzien

Ethanolamin-Reagenz	100 µl Ethanolamin ad 10 ml Methanol
Methanolische NaOH-Lösung	910 µl 1N Natronlauge ad 10 ml Methanol
NAC-Reagenz	20 mg N-Acetyl-L-Cystein in 2,5 ml Puffer pH 11 (E. Merck, Darmstadt, Deutschland) lösen
NaHCO ₃ -Lösung	8,4 g Natriumhydrogencarbonat ad 250 ml Wasser
NEIC-Reagenz	10 µl R-(-)-1-(1-Naphthyl)ethylisocyanat ad 10 ml Toluol
OPA-Reagenz	5 mg o-Phthaldialdehyd in 250 µl Ethanol lösen und mit 2,5 ml Puffer pH 11 (E. Merck, Darmstadt, Deutschland) verdünnen. Täglich frische Herstellung und lichtgeschützte Lagerung.
Phosphatpuffer pH 2,5	100 g Kaliumdihydrogenphosphat in 800 ml Wasser lösen, mit 1N HCl auf pH 2,5 einstellen und anschließend verdünnen ad 1000 ml Wasser
Phosphatpuffer pH 6,6 (1/15 M)	Lösung A: 9,07 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 ml Wasser Lösung B: 11,87 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ad 1000 ml Wasser Puffer: 653 ml Lösung A ad 1000 ml mit Lösung B
TEA-Reagenz	100 µl Triethylamin ad 10 ml Methanol

5.5.3. Bioanalytische Bestimmung von Baclofen

5.5.3.1. Probenvorbereitung

5.5.3.1.1. Probenvorbereitung für die Bestimmung von Baclofen aus Tyrodepuffer

Die Bestimmung von Baclofen aus den In-situ-Perfusionsstudien beruhte auf einer HPLC-analytischen Trennung, die eine Detektion mittels Fluoreszenz einschließt [Spahn et al., 1988; Herber, 2002; Wuis et al., 1985; Wuis et al., 1987]. Zu 100 µl einer Tyrode-haltigen Probe wurden 100 µl des internen Standards (R/S-Chlorphenylalanin) und 800 µl Wasser zugesetzt. Nach kurzem Vortexen der Probe wurden 50 µl dieser Mischung entnommen und mit 50 µl einer methanolischen Natriumhydroxid-Lösung sowie 250 µl Wasser versetzt. Unmittelbar vor der HPLC-analytischen Trennung über eine Zorbax C₁₈-Säule (250*4,6 mm, 5 µm) wurde eine Derivatisierung mit 50 µl o-Phthaldialdehyd (OPA) und 50 µl N-Acetyl-L-Cystein (NAC) bei Raumtemperatur (Derivatisierungszeit 5 min) durchgeführt. Die entstehenden Isoindolderivate wurden mittels Fluoreszenz vermessen. Das Reaktionsschema für die bei der Umsetzung mit OPA und NAC entstehenden Isoindolderivate ist in Abbildung 34 angegeben. Repräsentative Chromatogramme (inklusive Leerchromatogramm) sind in Abbildung 35 dargestellt. Die Daten zur Validierung sind im Anhang zusammengefasst.

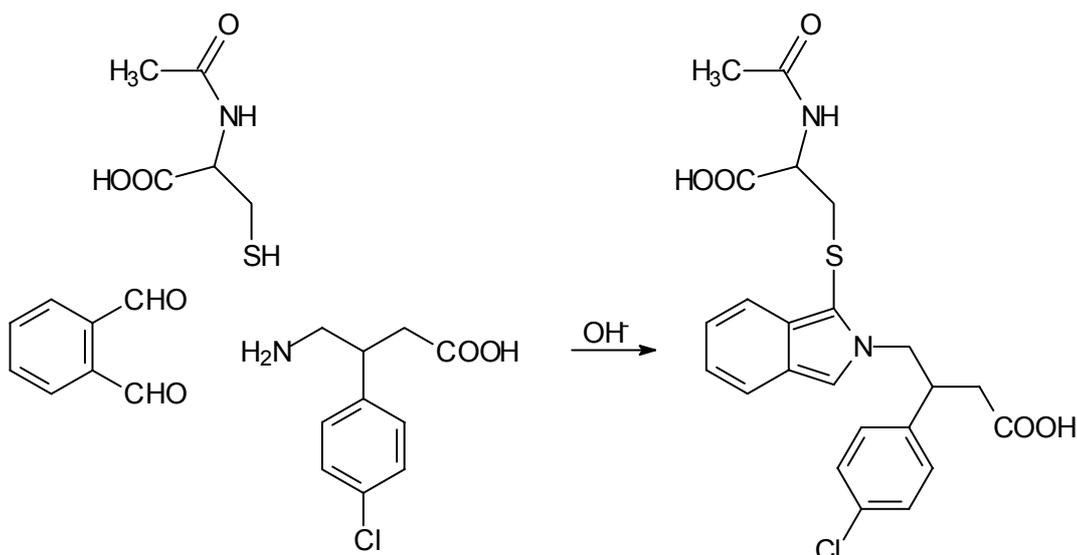


Abbildung 34: Umsetzung mit N-Acetyl-L-Cystein und o-Phthaldialdehyd: Bildung fluoreszierender Isoindolderivate, hier am Beispiel von Baclofen

5.5.3.1.2. Probenvorbereitung für die Bestimmung von Baclofen aus Blut

Die Probenaufarbeitung erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Herber [2002]. Das Probenmaterial (300 μl) wurde nach Zusatz des internen Standards R/S-Chlorphenylalanin (25 ng in 50 μl Wasser) mit 750 μl Methanol zur Präzipitation der Plasmaproteine versetzt. Nach intensivem Vortexen (30 s) erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 Upm (10 min, 0°C). Der wässrige Überstand wurde von den zellulären Bestandteilen abgetrennt und 50 μl des Überstandes mit 50 μl einer methanolischen Natriumhydroxid-Lösung sowie 250 μl Wasser versetzt. Nach Derivatisierung (5 min, Raumtemperatur) mittels o-Phthaldialdehyd und N-Acetyl-L-Cystein (Kapitel 5.5.3.1.1.) erfolgte die HPLC-analytische Trennung. Repräsentative Chromatogramme (inklusive Leerchromatogramm) sind in Abbildung 35 dargestellt. Die Daten zur Validierung sind im Anhang zusammengefasst.

5.5.3.2. Chromatographische Bedingungen

Stationäre Phase	Hauptsäule	Zorbax C_{18} , 5 μm , 250*4,6 mm ID, Bischoff, Leonberg, Deutschland
	Vorsäule	LiChrocart C_8 -Vorsäulenkartuschen, 5 μm , E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Mobile Phase	v/v/v	Phosphatpuffer pH 6,6 / MeOH / THF 50 / 47,5 / 2,5
Flussrate		0,6 ml/min
Fluoreszenzdetektion	Exzitation	345 nm
	Emission	443 nm
Retentionszeiten	Baclofen	11,5 min
	R/S-Chlorphenylalanin	20,8; 23,4 min

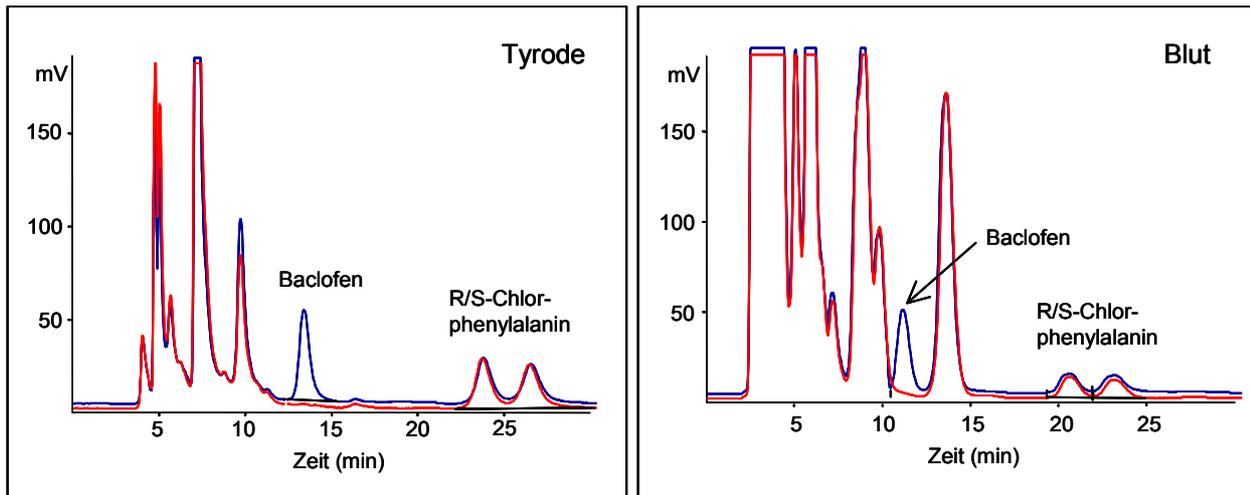


Abbildung 35: Baclofen in Perfusionspuffer und Blut: HPLC-Chromatogramme nach Derivatisierung mit NAC und OPA und Detektion des entstehenden Isoindolderivates im Vergleich zur jeweiligen Leermatrix (Probenkonzentration 0,5 µg/ml)

5.5.4. Bioanalytische Bestimmung von CGP 11.130

5.5.4.1. Probenvorbereitung für die Bestimmung von CGP 11.130 aus Tyrodepuffer

Die Analytik der fluoranalogen Verbindung des Baclofens erfolgte – in Anlehnung an die HPLC-analytische Methode zur Bestimmung von Baclofen – ebenfalls durch Derivatisierung mit N-Acetyl-L-Cystein und o-Phthaldialdehyd und Detektion des entstehenden fluoreszierenden Isoindolderivates. Das methodische Vorgehen entspricht dem in Kap. 5.5.3.1.1. beschriebenen. Als interner Standard diente bei der Bestimmung von CGP 11.130 statt R/S-Chlorphenylalanin die Muttersubstanz Baclofen. Aufgrund der geringen Retentionszeit des CGP 11.130 im etablierten System war zur Abtrennung von Störpeaks eine Erhöhung des Phosphatpufferanteils in der mobilen Phase erforderlich. Ein repräsentatives Chromatogramm (inklusive Leerchromatogramm) ist in Abbildung 36 dargestellt. Die Daten zur Validierung sind im Anhang zusammengefasst.

5.5.4.2. Chromatographische Bedingungen

Stationäre Phase	Hauptsäule	Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 250*4,6 mm ID, Bischoff, Leonberg, Deutschland
	Vorsäule	LiChrocart C ₈ -Vorsäulenkartuschen, 5 µm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Mobile Phase	v/v/v	Phosphatpuffer pH 6,6 / MeOH / THF 62,0 / 35,5 / 2,5
Flussrate		1,2 ml/min
Fluoreszenzdetektion	Exzitation	345 nm
	Emission	443 nm
Retentionszeiten	CGP 11.130	16,3 min
	Baclofen	31,5 min

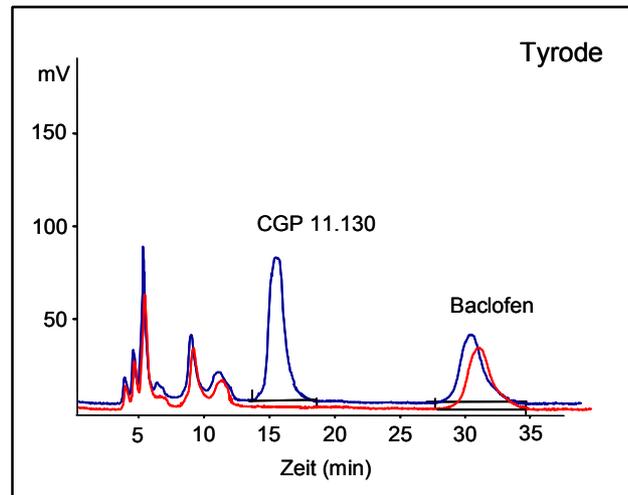


Abbildung 36: CGP 11.130 in Perfusionspuffer: HPLC-Chromatogramm nach Derivatisierung mit NAC und OPA und Detektion des entstehenden Isoindolderivates (Leermatrix rot; Konzentration: 0,5 µg/ml)

5.5.5. Bioanalytische Bestimmung von Gabapentin

5.5.5.1. Probenvorbereitung für die Bestimmung von Gabapentin aus Tyrodepuffer und Blut

Die analytische Methode zur Bestimmung von Gabapentin in Tyrode und Blut ist in Probenvorbereitung und Derivatisierung mittels o-Phthaldialdehyd und N-Acetyl-L-Cystein identisch zur Bestimmung von Baclofen in Tyrode bzw. Blut (Kap. 5.5.3.1.1. und Kap. 5.5.3.1.2.). Als interner Standard wurde ebenfalls R/S-Chlorphenylalanin verwendet. Um eine optimale Trennung von Gabapentin zu erreichen wurde der Methanolanteil im Fließmittel geringfügig erhöht. Repräsentative Chromatogramme sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Daten zur Validierung sind im Anhang zusammengefasst.

5.5.5.2. Chromatographische Bedingungen

Stationäre Phase	Hauptsäule	Zorbax C ₁₈ , 5 µm, 250*4,6 mm ID, Bischoff, Leonberg, Deutschland
	Vorsäule	LiChrocart C ₈ -Vorsäulenkartuschen, 5 µm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Mobile Phase	v/v/v	Phosphatpuffer pH 6,6 / MeOH / THF 48,75 / 48,75 / 2,5
Flussrate		0,6 ml/min
Fluoreszenzdetektion	Exzitation	345 nm
	Emission	443 nm
Retentionszeiten	Gabapentin	10,5 min
	R/S-Chlorphenylalanin	14,9; 16,3 min

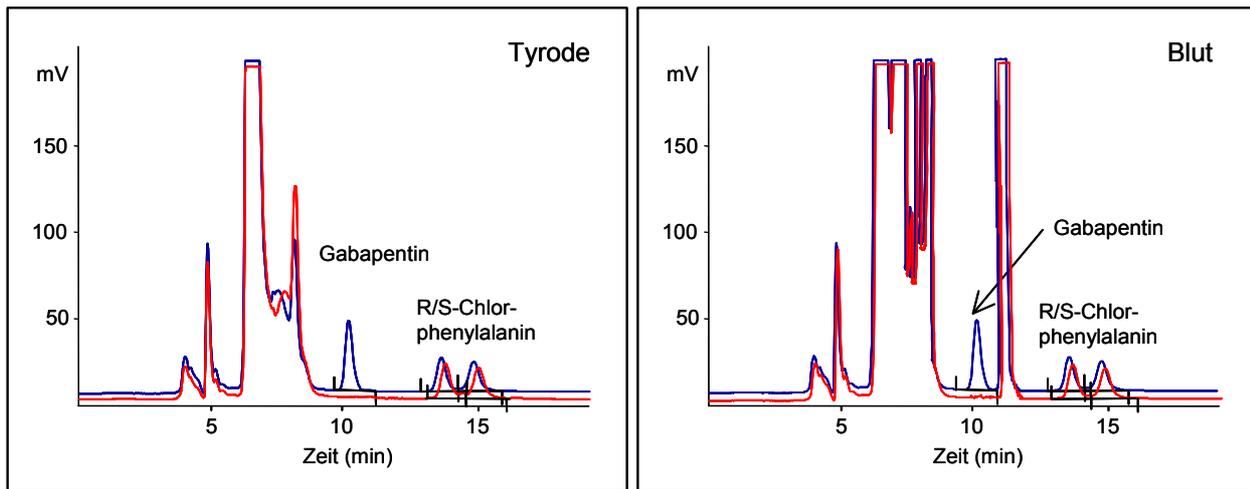


Abbildung 37: Gabapentin in Perfusionspuffer und Blut: HPLC-Chromatogramme nach Derivatisierung mit NAC und OPA (Leermatrix rot; Konzentration: 0,5 µg/ml)

5.5.6. Bioanalytische Bestimmung der Baclofenester

Zur Bestimmung der Baclofenester in biologischer Matrix war die Entwicklung einer neuen analytischen Methode notwendig, da sich eine Derivatisierung mit Hilfe von *o*-Phthaldialdehyd und *N*-Acetyl-L-Cystein als nicht möglich herausgestellt hatte [Herber, 2002] und sich die Eigenabsorption der Baclofenester als zu gering erwies, um ausreichend niedrige Konzentrationen, wie sie in biologischer Matrix zu erwarten sind, mit ausreichender Präzision ohne Derivatisierung nachzuweisen. Herber [2002] versuchte in seinen Studien, die Baclofenester unter verschiedenen Bedingungen hydrolytisch zur Muttersubstanz zu spalten und das daraus entstehende Baclofen nach der etablierten OPA/NAC-Methode zu derivatisieren und zu analysieren. Die höchsten Spaltungsausbeuten wurden dabei erzielt, wenn KOH (1M) als Reagenz eingesetzt wurde und das Reaktionsgemisch nach 60 Minuten bei 105°C mit 1M Salzsäure neutralisiert wurde. Als problematisch erwiesen sich allerdings die großen Schwankungen im Ausmaß der Spaltung.

Im weiteren Verlauf sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine direkte Bestimmung der Baclofenester durch Derivatisierung erzielt werden. Als funktionelle Gruppe bietet sich bei den Baclofenestern alleine die Aminofunktion an. Als geeignetes Derivatisierungsreagenz stellte sich *R*-(-)-1-(1-Naphthyl)ethylisocyanat (NEIC) heraus [Shimada und Hirakata, 1992; Dunlop und Neidle, 1987]. Nach 30minütiger Derivatisierung mit NEIC-Lösung (20 µl; 0,1% in Toluol) und Triethylamin-Reagenz (50 µl; 1% in Methanol) wurde die Reaktion mit Ethanolamin (50 µl; 1% in Methanol) abgestoppt. Nach Eindampfen bei 50°C im Stickstoffstrom wurden die entstandenen diastereomeren *N,N*-disubstituierten Harnstoffderivate im Fließmittel aufgenommen und der Gehalt der Probe mittels Fluoreszenzmessung (Exzitation: 235 nm, Emission: 333 nm) bestimmt. Zunächst wurde eine Enantiomerentrennung unter Verwendung einer polaren Silikagelsäule durchgeführt. Die chromatographischen Bedingungen sind in Tabelle 17 dargestellt. Die Methode erwies sich als geeignet für die Bestimmung aller untersuchten Baclofenester. Für die lipophilsten der Baclofenester (Butyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl-) konnte sogar eine sehr gute Trennung in die jeweiligen Enantiomere erzielt werden. Der Ethylester konnte mit Hilfe dieser Methode angetrennt werden, für den Methylester konnte jedoch keine Trennung der Enantiomere erzielt werden. Im Verlauf der Validierung zeigten sich allerdings Schwierigkeiten, weshalb sich die HPLC-analytische Trennung auf einer Kieselgelsäule für die Routineanalytik als kompliziert herausstellte. Unter anderem konnte nur eine begrenzte Zahl an Proben analysiert werden, bevor die Säule zur Regeneration gründlich gespült werden musste. Ein weiterer limitierender Faktor war der hohe Verbrauch an kostenintensiven organischen Lösungsmitteln.

Tabelle 17: Chromatographische Bedingungen für die Trennung der Baclofenester auf einer Kieselgelsäule nach Derivatisierung mit NEIC

Stationäre Phase	Hauptsäule	Zorbax Sil, 5 µm, 250*4,6 mm ID, Bischoff, Leonberg, Deutschland
	Vorsäule	Zorbax Sil-Vorsäulenkartuschen, 5 µm, Bischoff, Leonberg, Deutschland
Mobile Phase	v/v/v	n-Hexan / Dichlormethan / Ethanol 100 / 9,4 / 1,6
Flussrate		1,0 ml/min
Fluoreszenzdetektion	Exzitation	235 nm
	Emission	333 nm
Retentionszeiten	Methylester	41,3 min
	Ethylester	26,1; 26,6 min
	1-Propylester	19,1; 20,1 min
	2-Propylester	21,5; 22,3 min
	Butylester	17,6; 18,5 min

Alternativ wurde eine HPLC-analytische Methode entwickelt, bei der als stationäre Phase eine Reversed-Phase-Säule verwendet wurde. Dieses System erwies sich als deutlich stabiler. Eine wesentlich größere Zahl an Proben konnte analysiert werden, ohne dass dies zu einem Qualitätsverlust in der Trennleistung der Säule führte. Allerdings konnte mit der Reversed-Phase-Säule keine Trennung der Enantiomeren erreicht werden.

Im folgenden Schritt der Etablierung dieser Methode wurden verschiedene Extraktionsmittel getestet, um die Ester möglichst quantitativ und gleichzeitig selektiv aus der wässrigen biologischen Matrix in eine organische Phase zu überführen. Es wurden folgende organische Lösungsmittel für die Extraktion verwendet:

- Dichlormethan
- Essigsäureethylester
- Dichlormethan / Essigsäureethylester 9/1 (v/v)
- Dichlormethan / Isopropanol 9,5/0,5 (v/v)

Die beste Extraktionsrate wurde mit einem Gemisch von Dichlormethan und Ethylacetat (9/1, v/v) erzielt. Allerdings führte der Zusatz an Essigsäureethylester zu Dichlormethan dazu, dass in verstärktem Maße auch unerwünschte Substanzen aus der Matrix extrahiert wurden. Diese erzeugten Störsignale im Chromatogramm. Im Falle von Dichlormethan wurden dagegen die saubersten Extrakte bei nur geringfügig geringerer Sensitivität erzielt.

Durch Verlängerung der Derivatisierungszeit konnte die Bestimmungsgrenze auf 10 ng/ml verbessert werden. Als interner Standard wurde jeweils ein Baclofenester ausgewählt, der sich im etablierten System durch eine vollständige Trennung von dem zu bestimmenden Analyten (Tabelle 18) auszeichnete. Als Lösungsmittel für die Kalibrierlösungen wurde Methanol verwendet. Aufgrund der im Methanol auftretenden Umesterung der Baclofenester zum Baclofenmethylester wurden die Kalibrierlösungen monatlich neu hergestellt.

Die optimierte Methode zur Extraktion und Derivatisierung sowie zu den chromatographischen Bedingungen ist in den folgenden Kapiteln dargestellt.

5.5.6.1. Bestimmung von Baclofenestern in Blut und Gewebe (außer Gehirn)

Nach Zusatz von 500 ng internem Standard (s. Tabelle 18) zu einem Matrixvolumen von 1,0 g, wurde eine Extraktion mit 3,0 ml Dichlormethan auf einem horizontalen Schüttler durchgeführt. Die Proben wurden 15 Minuten horizontal geschüttelt, anschließend zentrifugiert (4°C, 4500 Upm, 5 min)

und die organische Phase zur Trockne eingedampft (50°C, N₂). Daraufhin wurde der Rückstand in 50 µl Triethylamin-Reagenz und 25 µl Naphthylethylisocyanat-Reagenz rekonstituiert. Die Derivatisierung wurde über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend durch Zugabe von 50 µl Ethanolamin-Reagenz gestoppt. Vor der Injektion in das HPLC-System wurden die Proben noch einmal zur Trockne eingedampft (50°C, N₂) und im Anschluss in 100 µl Methanol aufgenommen. Das Injektionsvolumen betrug 50 µl. Das Derivatisierungsschema für die bei der Umsetzung mit NEIC entstehenden N,N-disubstituierten Harnstoffderivate ist in Abbildung 38 dargestellt. Ein repräsentatives Chromatogramm für die Trennung aller fünf untersuchten Baclofenester in Rattenblut ist in Abbildung 40 dargestellt. Des Weiteren finden sich in Abbildung 39 repräsentative Chromatogramme (inklusive Leerchromatogramm) für die Bestimmung des Baclofenbutylesters in verschiedenen relevanten Matrices. Die Daten zur Validierung sind im Anhang zusammengefasst.

5.5.6.2. Bestimmung von Baclofenestern in Gehirnhomogenat

Nach Zusatz von 500 ng des internen Standards (s. Tabelle 18) und 2 ml Phosphatpuffer pH 2,5 zu 300 mg Gehirnhomogenat (1:1, m:m mit physiologischer Kochsalzlösung bzw. 0,25 M Saccharoselösung) wurden die Proben für 15 Minuten auf einem horizontalen Schüttler extrahiert. Im Anschluss an die Zentrifugation (4°C, 4500 Upm, 5 min) wurde der wässrige Überstand mit 1,0 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert und erneut mit 2,0 ml Dichlormethan extrahiert (15 min). Die organische Phase wurde anschließend durch Zentrifugation abgetrennt (5 min, 4°C, 4500 Upm) und zur Trockne eingedampft (50°C, N₂). Das weitere Vorgehen entsprach dem in Kapitel 5.5.6.1. beschriebenen.

5.5.6.3. Chromatographische Bedingungen

Stationäre Phase	Hauptsäule	Zorbax C ₈ , 5 µm, 250*4,6 mm ID, Bischoff, Leonberg, Deutschland
	Vorsäule	LiChrocart C ₈ -Vorsäulenkartuschen, 5 µm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Mobile Phase	v/v/v	MeOH / H ₂ O / THF in variierenden Anteilen (s. Tabelle 18)
Flussrate		1,2 ml/min
Fluoreszenzdetektion	Exzitation	235 nm
	Emission	333 nm
Retentionszeiten		s. Tab. 18

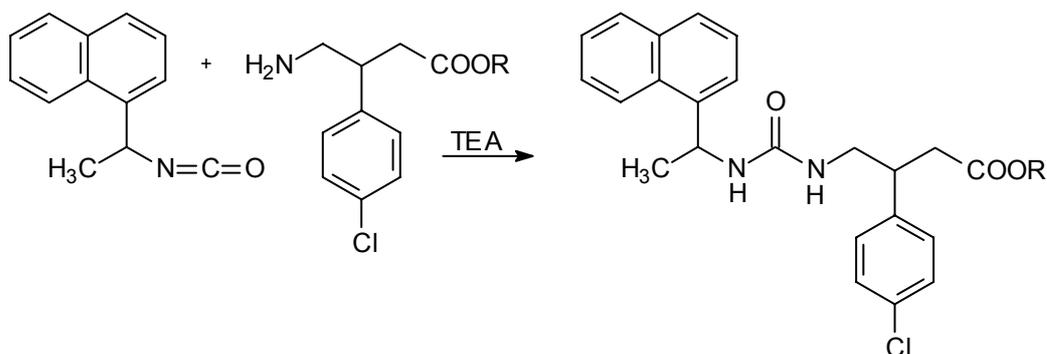


Abbildung 38: Reaktion der Baclofenester mit NEIC unter Wasserausschluss: Bildung fluoreszierender N,N-disubstituierter Harnstoffderivate

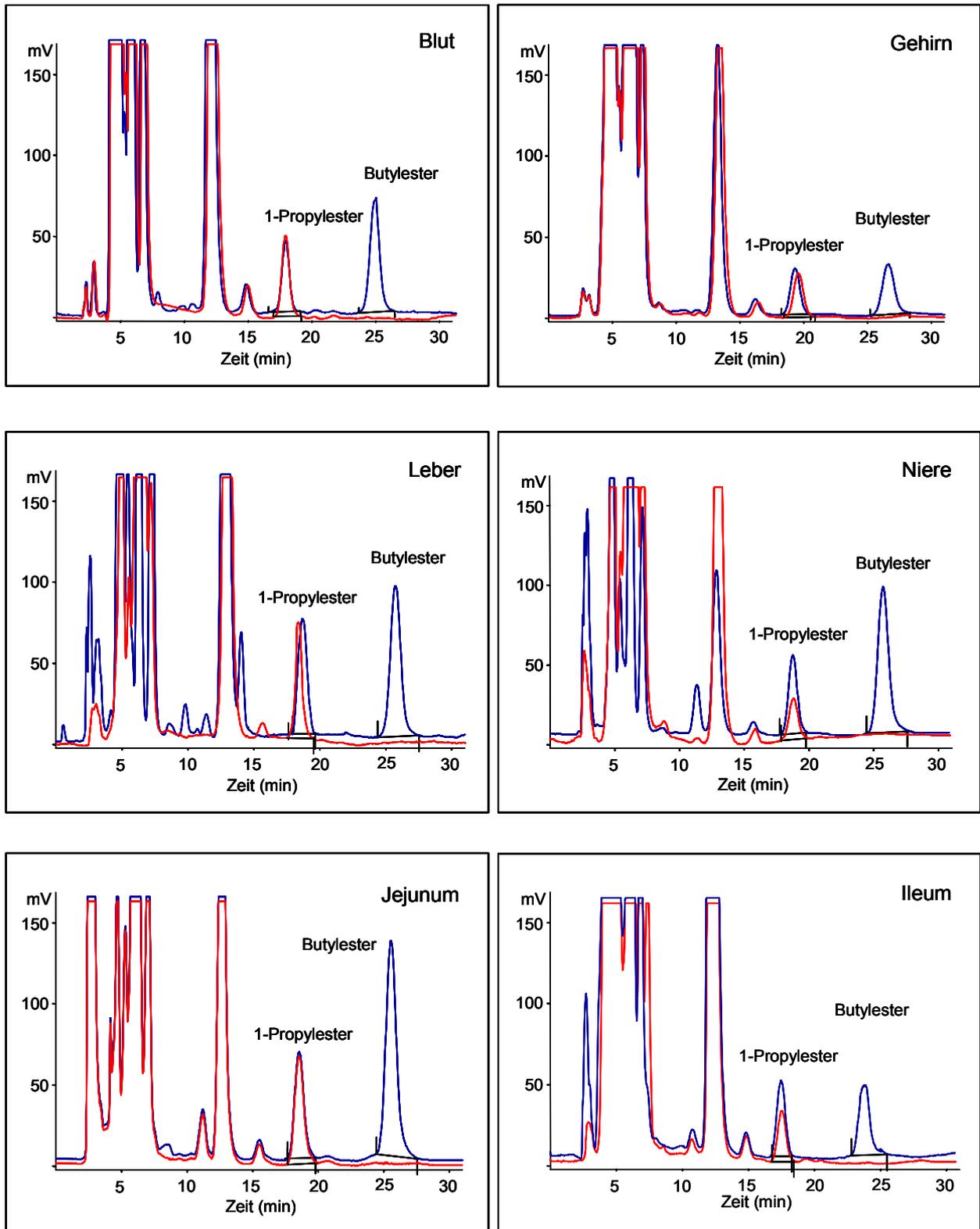


Abbildung 39: Baclofenbutylester in verschiedenen biologischen Matrices: HPLC-Chromatogramme der entstehenden N,N-disubstituierten Harnstoffderivate (Derivatisierung mit NEIC). Die Konzentrationen in den Matrices waren Folgende: Blut 1,0 $\mu\text{g/g}$, Gehirn 1,0 $\mu\text{g/g}$, Leber 1,0 $\mu\text{g/g}$, Niere 0,5 $\mu\text{g/g}$, Jejunum 1,5 $\mu\text{g/g}$, Ileum 0,5 $\mu\text{g/g}$.

Tabelle 18: Interne Standards, Fließmittelzusammensetzungen und mittlere Retentionszeiten für die Bestimmung der Baclofenester

Zu bestimmender Baclofenester (Analyt)	Interner Standard (IS)	Mobile Phase MeOH / H ₂ O / THF (v/v/v)	Retentionszeit (min)	
			Analyt	IS
Methylester	1-Propylester	68,5 / 29,0 / 2,5	17,2	32,4
Ethylester	1-Propylester	68,5 / 29,0 / 2,5	23,0	32,5
1-Propylester	Butylester	71,0 / 26,5 / 2,5	18,0	24,4
2-Propylester	Butylester	71,0 / 26,5 / 2,5	16,6	24,2
Butylester	1-Propylester	71,0 / 26,5 / 2,5	24,5	17,7

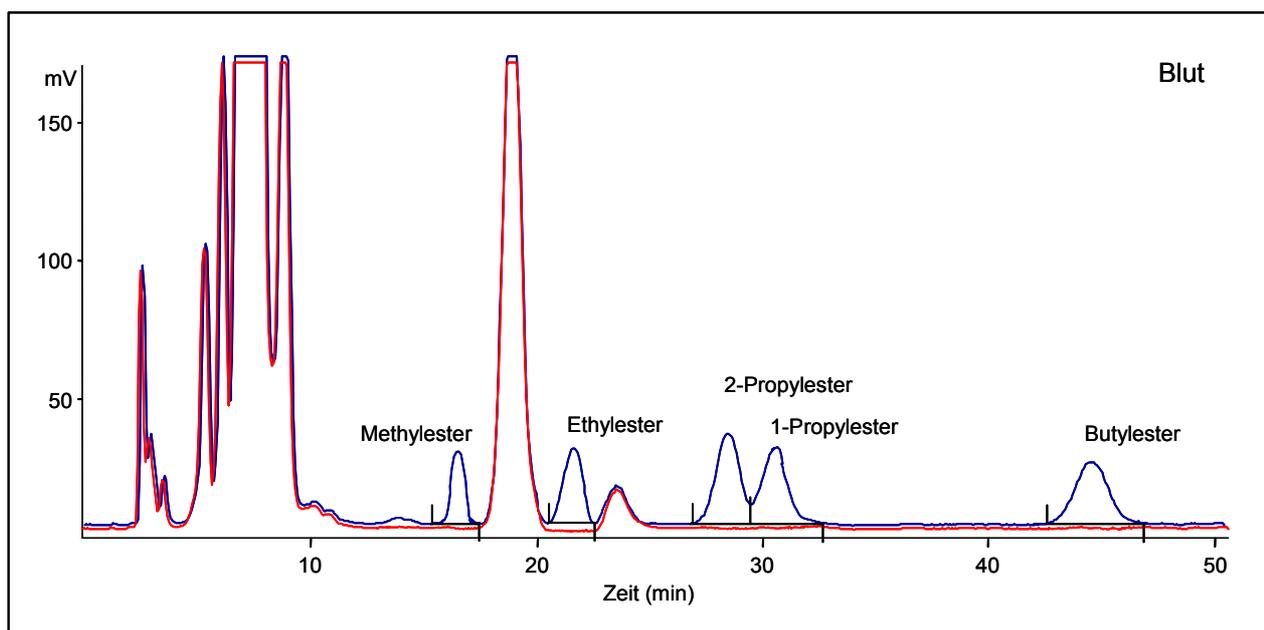


Abbildung 40: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm zur chromatographischen Trennung der untersuchten Baclofenester im Blut nach Derivatisierung mit NEIC. Die Konzentration der Baclofenester betrug jeweils 0,5 µg/g Blut (Fließmittel: MeOH / Wasser / THF 68,5 / 29,0 / 2,5).

5.5.7. Bioanalytische Methode für Talinolol

Die Bestimmung von Talinolol mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion und chiraler Trennung mit Hilfe der chiralen stationären Phase ChiraSpher NT erfolgte nach der Publikation von Wetterich et al. [1996]. Chiraspher NT besteht aus 5 µm Kieselgelpartikeln, deren Oberfläche mit Poly(N-acryloyl-S-Phenylalaninethylester beschichtet ist (Abbildung 41).

5.5.7.1. Bestimmung von Talinolol in Blut und Gewebe (außer Gehirn)

Die Matrix (100 µg Blut oder Gewebehomogenat (1:1, m:m mit 0,25 M Saccharoselösung)) wurde mit 0,5 ml eines Borsäure/Kaliumchlorid-Natronlauge Puffers pH 11 sowie 100 µl rac-Pindolol (2,0 µg/ml) als internem Standard versetzt und mit 2 ml einer Mischung von Dichlormethan und Isopropanol (90/10, v/v) extrahiert. Nach 15minütigem Schütteln sowie Zentrifugation (4500 Upm,

15 min, 4°C) wurde die organische Phase bei 40°C in einer Stickstoff-Atmosphäre zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 75 µl Methanol aufgenommen. Das Injektionsvolumen betrug 50 µl.

5.5.7.2. Bestimmung von Talinolol in Gehirnhomogenat

Für die Bestimmung der Gehirnproben war ein zusätzlicher Extraktionsschritt notwendig. Ein Gramm Homogenat (1:1, m:m mit 0,25 M Saccharose) wurde mit dem internen Standard Pindolol (0,2 µg) versetzt. Zunächst erfolgte eine Extraktion unter sauren Bedingungen, indem die Probe mit 1,0 ml 10%igem KH₂PO₄-Puffer versetzt und mit 2,0 ml Dichlormethan/Isopropanol (90:10, v/v) extrahiert wurde. Nach 15 minütigem Schütteln und Zentrifugation wurde die organische Phase verworfen. Nach Alkalisierung der wässrigen Phase mit 1,0 ml 1N Natronlauge wurde erneut mit 2,0 ml des Extraktionsgemisches Dichlormethan/Isopropanol (90:10, v/v) extrahiert. Nach erneutem Schütteln sowie Zentrifugation (4500 Upm, 15 min, 4°C) der Proben wurde die organische Phase bei 40°C in einer Stickstoff-Atmosphäre zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 75 µl Methanol aufgenommen und 50 µl in das HPLC-System injiziert. Repräsentative Chromatogramme sind in Abbildung 42 dargestellt. Die Validierungsparameter entsprachen weitgehend den von Hanafy [2001] ermittelten Werten.

5.5.7.3. Chromatographische Bedingungen

Stationäre Phase	Hauptsäule	Chiraspher NT, 5 µm, 250*4,0 mm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
	Vorsäule	LiChroCART 4-4, Lichrospher 100 Diol, 5 µm, 4*4 mm, E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Mobile Phase	v/v	Ethanol / Triethylamin 1000,0 / 0,5
Flussrate		0,5 ml/min
UV-Detektion		245 nm
Retentionszeiten	S-Talinolol	16,4 min
	R-Talinolol	18,8 min
	S-Pindolol	24,3 min
	R-Pindolol	26,1 min

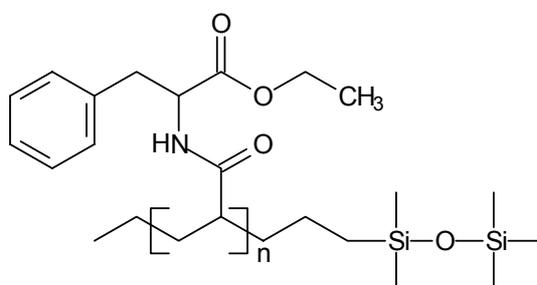


Abbildung 41: Chemische Struktur des Chiraspher NT-Säulenmaterials

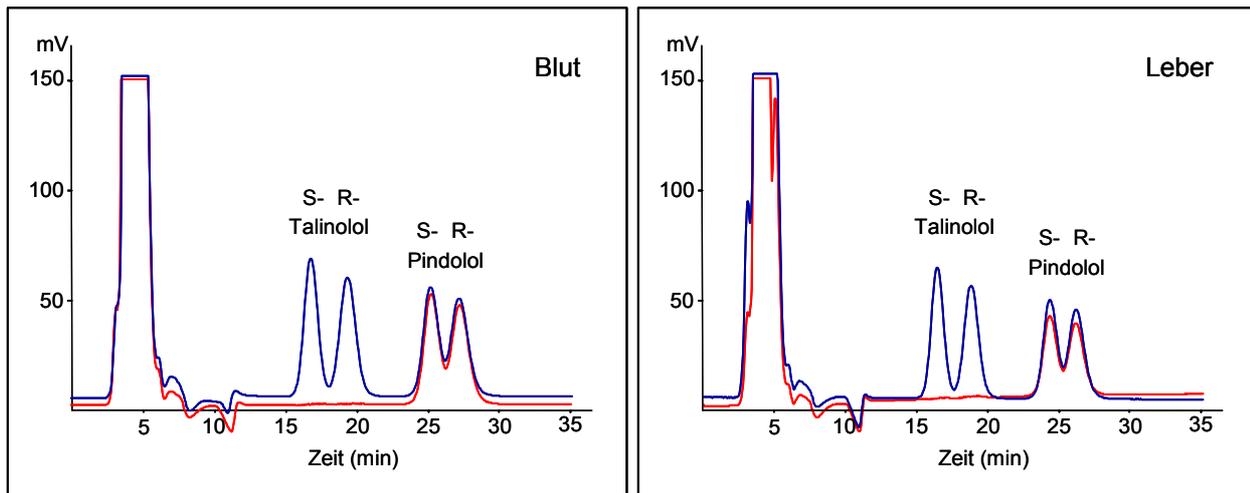


Abbildung 42: Talinolol in Blut und Leberhomogenat: HPLC-Chromatogramme der enantiospezifischen Quantifizierung von Talinolol nach Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Blut und aus Leberhomogenat (Leermatrix rot). Die Konzentration an R- und S-Talinolol betrug jeweils 0,2 µg/g.

5.5.8. Validierung

Die Validierung einer analytischen Methode umfasst alle Arbeiten zum Beleg, dass diese Methode geeignet ist, zuverlässig richtige Ergebnisse zu liefern. Im Jahr 1990 wurden auf einer Konferenz in Washington DC Richtlinien für die Validierung analytischer Methoden herausgegeben (Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies). Dieser "Concensus Report" wurde in der Folge in fünf internationalen Zeitschriften veröffentlicht [Shah et al., 1992; Shah et al., 2000] und stellt neben der Arbeit von Karnes et al. [1991] einen Standard für die Zuverlässigkeit einer analytischen Methode dar. Diese Richtlinien wurden auch bei der Validierung der hier verwendeten HPLC-analytischen Methoden berücksichtigt.

Die erhaltenen Validierungsparameter sind im Anhang dargestellt.

5.5.8.1. Selektivität

Bei der Entwicklung einer chromatographischen Methode muss die Spezifität/Selektivität nachgewiesen werden. Unter Selektivität versteht man die Eigenschaft, dass bei Injektion der Probe ein Analysensignal erhalten wird, das nur von der Konzentration des Analyten abhängig ist, dagegen von der Probenmatrix oder zusätzlich enthaltenen Stoffen unabhängig ist. Anhand unterschiedlicher relevanter Leermatrizes wurde eine analytische Interferenz von Matrixbestandteilen mit dem Analysensignal ausgeschlossen. Für den Fall, dass zusätzliche Substanzen im Probenmaterial vorhanden waren (z.B. potentielle Inhibitoren des Taurintransporters bzw. P-GP-Inhibitoren), wurde die Selektivität der Methode in Gegenwart dieser Substanzen bestimmt.

5.5.8.2. Linearität

Ziel einer Studie zur Linearität ist die Bestätigung, dass die Substanz im untersuchten Konzentrationsbereich ein Analysensignal erzeugt, das (linear) abhängig ist von der Konzentration des Analyten. Als Kriterium für die Linearität gelten hierbei die Steigung (m) und der y-Achsenabschnitt (b) der Kalibriergeraden sowie der Korrelationskoeffizient (r) über den gesamten Bereich der Kalibriergeraden, sowie separat für den niedrigeren bzw. höheren Bereich der Kalibrierproben.

5.5.8.3. Präzision und Richtigkeit

Die Präzision und Richtigkeit der verwendeten analytischen Methoden wurde aus Proben mit bekanntem Gehalt (n=6) in verschiedenen Matrices bestimmt.

Als Maß für die Präzision einer Methode gilt die relative Standardabweichung (relative standard deviation, RSD%) der Mehrfachbestimmung von Proben bekannter Konzentration. Die Richtigkeit (relative error, RE%) ist definiert als die Abweichung des mit Hilfe der etablierten Methode ermittelten Wertes vom richtigen Wert, also die Übereinstimmung zwischen dem "wahren" Wert und dem (im Mittel) gefundenen Wert. Die Präzision ist somit ein Maß für den zufälligen Fehler, die Richtigkeit dagegen ein Maß für den systematischen Fehler einer Methode.

5.5.8.4. Bestimmungsgrenze – Limit of Quantitation

Die Bestimmungsgrenze einer Methode stellt die Konzentration dar, bis zu der zuverlässige Ergebnisse ermittelt werden können. Dementsprechend erfolgt die Definition der Bestimmungsgrenze über die maximal zulässige Präzision und Richtigkeit der Methode. Nach internationalen Richtlinien [Shah et al., 1992] werden Abweichungen von 15% vom richtigen Wert akzeptiert. Unter der Nachweisgrenze (Limit of Detection) versteht man dagegen die Konzentration, die ein Detektorsignal erzeugt, das größer ist als das Dreifache des "Grundrauschens" im Leerwert. Sie stellt somit die geringste Substanzmenge dar, die detektiert, aber nicht unbedingt präzise und richtig quantifiziert werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch solche Konzentrationen mitaufgenommen, die unterhalb der Bestimmungsgrenze, aber oberhalb der Nachweisgrenze lagen, wenn die Qualität des Chromatogramms dies zuließ. Diese Konzentrationen sind im Anhang jeweils durch (*) gekennzeichnet.

6. Zusammenfassung

Der Wirkung eines Pharmakons im Organismus gehen eine Reihe verschiedener komplexer Vorgänge voraus. Der Distribution in die Organe bzw. zum Zielort muss, sofern der Arzneistoff nicht intravasal appliziert wird, eine Resorption vorangehen. Äußere Schranken wie die intestinale Membran stellen Resorptionsbarrieren dar. Die Blut-Gewebe-Schranken, zu denen auch die Blut-Hirn-Schranke gehört, werden dagegen als Distributionsbarrieren bezeichnet. Rein passive Diffusion, Carrier-vermittelte erleichterte Diffusion und aktiver Transport stellen die wichtigsten Mechanismen bei der Passage der Resorptions- und Distributionsbarrieren dar. Die meisten Arzneistoffe werden durch Diffusion resorbiert, für andere existieren dagegen effiziente absorptive Transportsysteme, die zu einer guten Bioverfügbarkeit beitragen. Die kompetitive Inhibition solcher Carrier durch andere Arzneistoffe, Chemikalien oder Nahrungsmittelbestandteile bedingt die Reduktion der Resorptionsquote und – je nach Ausmaß der Hemmung – kann dies zum Ausbleiben des therapeutischen Effektes führen. Interaktionen dieser Art sind in der Regel unerwünscht. Neben Prozessen, die zur Resorption von Xenobiotika beitragen, existieren auch Mechanismen, die dem Organismus als Schutz vor potentiell toxischen Substanzen dienen sollen. Hierzu gehören einerseits die Auswärts-Transporter, die die Sekretion vor allem passiv aufgenommener Substanzen katalysieren und damit zur Elimination beitragen, und andererseits die metabolischen Prozesse. Die Hemmung dieser bioverfügbarkeitslimitierenden Prozesse führt zu einem Ansteigen der Resorptionsquote. Interaktionen dieser Art sind entweder unerwünscht, wenn es hierdurch zu einem Ansteigen des Arzneistoffspiegels über den therapeutischen Bereich hinaus und damit zu Intoxikationen kommt, andere Wechselwirkungen werden gezielt genutzt, um überhaupt ausreichende Wirkstoffspiegel erzielen zu können.

Um eine optimale Therapie mit Arzneistoffen sicherzustellen, ist es daher unter anderem wichtig, den Applikationsort so zu wählen, dass der Arzneistoff einerseits optimal resorbiert wird und andererseits die Compliance beim Patienten gesichert ist. Der Mechanismus der Resorption sollte bekannt sein, um das Interaktionspotential mit Nahrungsmitteln, Chemikalien und Arzneistoffen einschätzen zu können.

Baclofen, ein selektiver GABA_B-Agonist, weist nach peroraler Applikation eine gute und rasche Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt auf. Aufgrund der γ -Aminobuttersäurestruktur des Baclofens erfolgt die Resorption unter Ausnutzung der Affinität zu verschiedenen Aminosäuretransportern. Trotz der guten intestinalen Permeabilität werden häufig keine ausreichenden Wirkstoffspiegel im Erfolgsorgan ZNS erzielt. Ein Einsetzen der antispastischen Wirkung kann in diesen Fällen oft nur durch eine intrathekale Applikation erzielt werden. Baclofenesterprodrugs, von denen nach peroraler Gabe eine gute intestinale Resorption in Kombination mit einer im Vergleich zum Baclofen verbesserten Passage durch die Blut-Hirn-Schranke erwartet wurde, standen bei den hier vorgestellten Untersuchungen im Zentrum des Interesses.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Studien mit dem Ziel durchgeführt

- in vitro die Affinität von Baclofen sowie einigen Baclofenesterprodrugs zum Effluxtransporter P-Glykoprotein zu charakterisieren und in Bezug auf das Interaktionspotential am Beispiel des Baclofenbutylesters mit Hilfe des P-GP-Modellsubstrates Talinolol in vivo zu bestätigen.
 - die Ester des Baclofens hinsichtlich ihrer BHS-Gängigkeit zu charakterisieren und mit Baclofen zu vergleichen.
 - den Einfluss der Applikationsart (intravenös, intraperitoneal und intranasal) auf die Gehirn/Blut-Quotienten sowie die Gehirnkonzentrationen zu untersuchen.
 - den Einfluss von Nahrungsmittelbestandteilen auf die Permeabilität von Baclofen und CGP 11.130 sowie von Gabapentin zu bestimmen.
-

Voraussetzung für die Durchführung der In-vivo-Studien zu den Estern war die Entwicklung einer neuen HPLC-analytischen Methode, die auf der Derivatisierung der Aminofunktion der Baclofenester mit Naphthylethylisocyanat beruht und die selektive und präzise Bestimmung der Baclofenesterprodrugs in biologischen Matrices ermöglichte.

Zunächst wurden in In-vitro-Studien die Affinitäten von Baclofen und seinen Esterprodrugs zum sekretorischen Membrantransporter P-Glykoprotein untersucht. Im Gegensatz zum Baclofen wiesen die Ester Affinitäten zum P-Glykoprotein auf. Die ermittelten IC_{50} -Werte zeigten, dass mit zunehmender Kettenlänge in der Estergruppierung die Affinität zum P-Glykoprotein ansteigt. Es konnte eine lineare Korrelation der Octanol/Wasser-Distributionskoeffizienten als Maß für die Lipophilie, sowie der Anzahl der C-Atome der Estergruppierung mit den IC_{50} -Werten nachgewiesen werden.

Die Daten zur P-GP-Affinität der Baclofenesterprodrugs ließen vermuten, dass nicht nur für das Baclofen sondern auch für die Ester aufgrund der aktiven Sekretion durch das P-Glykoprotein eine Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke problematisch sein könnte. Dies konnte in In-vivo-Untersuchungen nicht bestätigt werden. Sowohl nach intravenöser als auch nach intraperitonealer und intranasaler Applikation waren sowohl die Konzentrationen im Gehirn als auch die Gehirn/Blut-Quotienten, als Maß für die Gewebeselektivität, für die Ester des Baclofens signifikant höher als für die Muttersubstanz Baclofen. Dies verdeutlicht, dass die Fraktion eines Arzneistoffes, die in ein bestimmtes Kompartiment eindringt, nicht allein von der Präsenz von Transportern in der entsprechenden Schranke abhängt, sondern von dem Verhältnis zwischen der Affinität zum Transporter und der passiven Permeabilität. Die höhere Lipophilie scheint im Falle der Baclofenester den nach außen gerichteten Transport in der Blut-Hirn-Schranke mehr als zu kompensieren.

Als besonders vorteilhaft in Bezug auf die ZNS-Selektivität erwies sich die intranasale Applikation der Baclofenester, da die Resorption im Vergleich zur intraperitonealen Applikation rascher erfolgte und höhere Konzentrationen im Gehirn erzielt wurden. Für eine perorale Applikation der Ester ist zu vermuten, dass sie nicht in ausreichendem Maße resorbiert werden.

In der In-vivo-Verteilungsstudie wurde der Einfluss des Baclofenbutylesters auf die Verteilung von Talinolol und umgekehrt der Effekt des P-GP-Modellsubstrates Talinolol auf die Distribution des Butylesters untersucht. Maximale Konzentrationen des Butylesters wurden im Gehirn unabhängig von der Coadministration von Talinolol bestimmt, nur sehr geringe Konzentrationen dagegen im Blut. In allen Organen – außer im Blut – bewirkte der Talinololzusatz zur Applikationslösung einen Anstieg der Konzentration im entsprechenden Organ. Die Gewebe/Blut-Quotienten waren unter dem Einfluss von Talinolol teilweise signifikant erhöht.

Der Baclofenbutylester beeinflusste ebenfalls die Verteilung von Talinolol, allerdings trat ein Effekt nicht in allen Organen auf. Vor allem in der Leber und der Niere sank die Talinololkonzentration durch die Coadministration des Baclofenesters.

Zusammen mit anderen Strukturanaloga sollten die Ester in In-situ-Perfusionen in Bezug auf ihre Resorbierbarkeit und ihr Interaktionspotential charakterisiert werden. Allerdings konnten die Ester wegen ihrer unterschiedlich starken Affinität zu Schlauchmaterialien in diesem Modell nicht systematisch untersucht werden. Daher beschränkten sich die weiteren Untersuchungen auf Baclofen, CGP 11.130 und Gabapentin.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Studien durchgeführt, die potentielle Interaktionen von Baclofen, seinem Struktur analogon CGP 11.130 und Gabapentin mit Taurin und Coffein aufklären sollten. Beide Substanzen sind in den sogenannten Energy Drinks als pharmakologisch aktive Substanzen enthalten. Zusätzliche Untersuchungen wurden mit Creatin, das von Sportlern zur Erhöhung der Leistungsfähigkeit in hohen Konzentrationen eingesetzt wird, durchgeführt.

In den entsprechenden In-situ-Perfusionsstudien wurde zunächst die Permeabilität der Substanzen in drei verschiedenen Darmsegmenten (Jejunum, Ileum und Colon) bestimmt, wobei die Permeabilität im Colon signifikant höher war als in den Dünndarmsegmenten. Nachfolgend wurden Interaktionsstudien durchgeführt, in denen ein sehr starker inhibitorischer Effekt von Taurin auf alle drei untersuchten Substanzen nachgewiesen wurde. Die Inhibition der Permeabilität wird für alle drei

Substanzen mit einer Konkurrenz an intestinalen Aminosäuretransportern erklärt. Der Zusatz von Coffein bewirkte ebenfalls eine ausgeprägte Reduktion der P_{eff} -Werte. Auch der Zusatz von Creatin zum Perfusat äußerte sich in der Reduktion der intestinalen Basispermeabilität von Gabapentin und Baclofen.

Die in den In-situ-Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse wurden abschließend mit den Resultaten einer In-vivo-Studie an Ratten verglichen. In vivo war der Effekt sowohl von Taurin als auch von Coffein wesentlich geringer ausgeprägt als in situ. Die gleichzeitige Applikation von Baclofen und Taurin bewirkte eine Reduktion von C_{max} sowie der AUD von Baclofen. Coffein führte bei Baclofen zu einer Resorptionsverzögerung, aber insgesamt zu einer AUD-Erhöhung. Die resorptionsverzögernde Wirkung verstärkte sich durch Applikation von Baclofen mit dem Energy Drink Red Bull®. Während nach allen anderen untersuchten Applikationsvarianten maximale Konzentrationen bereits 30 Minuten nach Applikation auftraten, wurde C_{max} nach einer kombinierten Red Bull® und Baclofendosierung erst eine Stunde nach Applikation beobachtet. Die AUD als Maß für die Bioverfügbarkeit blieb dagegen nahezu unverändert.

Die "Rechtsverschiebung" der Konzentrations-Zeit-Profile wurde auch in der In-vivo-Studie mit Gabapentin und einem Energy Drink festgestellt. Hier trat eine Verzögerung der t_{max} von einer auf zwei Stunden nach Applikation auf, die AUD blieb ebenfalls nahezu konstant.

In der Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass

- Baclofenester im Gegensatz zu den Strukturanaloga mit Aminosäurestruktur Affinität zum sekretorischen Transporter P-GP haben.
 - im Falle des Baclofens und der Baclofenester eine gute Korrelation besteht zwischen Lipophilie und kinetischen Charakteristika, auch der P-GP-Affinität, sowie der ZNS-Selektivität bei der Nasalapplikation.
 - sowohl bei den Verbindungen mit P-GP-Affinität als auch solchen, die Substrate für Aminosäuretransporter sind, ein Interaktionspotential in Bezug auf zusätzlich applizierte Xenobiotika bzw. Nahrungsmittelbestandteile besteht.
-

7. Literaturverzeichnis

- Adibi S.A.** The oligopeptide transporter (PEPT1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterology* 1997;**113**:332-340.
- Alford C., Cox H., Wescott R.** The effects of red bull energy drink on human performance and mood. *Amino Acids* 2001;**21**:139-150.
- Barker G.A., Wilkins R.J., Golding S., Ellory J.C.** Neutral amino acid transport in bovine articular chondrocytes. *Journal of Physiology* 1999;**514**:795-808.
- Baron J.M., Goh L.B., Yao D., Wolf C.R., Friedberg T.** Modulation of P450 CYP3A4-dependent metabolism by P-glycoprotein: Implications for P450 phenotyping. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001;**296**:351-358.
- Barone G.W., Gurley B.J., Ketel B.L., Lightfoot M.L., Abul-Ezz S.R.** Drug interaction between St. John's wort and cyclosporine. *The Annals of Pharmacotherapy* 2000;**34**:1013-1016.
- Barthe L., Woodley J., Houin G.** Gastrointestinal absorption of drugs: Methods and studies. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 1999;**13**:154-166.
- Baselt R.C., Yoshikawa D., Chang J., Li J.** Improved long-term stability of blood cocaine in evacuated collection tubes. *Journal of Forensic Sciences* 1993;**38**:935-937.
- Begley D.J.** The blood-brain barrier: Principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1996;**48**:136-146.
- Benet L.Z., Izumi T., Zhang Y., Silverman J.A., Wachter V.J.** Intestinal MDR transport proteins and P450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *Journal of Controlled Release* 1999;**62**:25-31.
- Benke D., Honer M., Michel C., Bettler B., Mohler H.** γ -Aminobutyric acid type B receptor splice variant proteins GBR1a and GBR1b are both associated with GBR2 in situ and display differential regional and subcellular distribution. *Journal of Biological Chemistry* 1999;**274**:27323-27330.
- Biaggioni I., Paul S., Puckett A., Arzubiaga C.** Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1991;**258**:588-593.
- Bitoun M., Levillain O., Tappaz M.** Gene expression of the taurine transporter and taurine biosynthetic enzymes in rat kidney after antidiuresis and salt loading. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2001;**442**:87-95.
- Boado R.J., Li J.Y., Nagaya M., Zhang C., Pardridge W.M.** Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;**96**:12079-12084.
- Borden L.A., Smith K.E., Hartig P.R., Branchek T.A., Weinshank R.I.** Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system: Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. *Journal of Neurochemistry* 1992;**267**:21098-21104.
- Bormann J.** The 'ABC' of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 2000;**21**:16-19.
- Bowery N.G., Enna S.J.** γ -Aminobutyric acid_B receptors: First of the functional metabotropic heterodimers. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000;**292**:2-7.
- Brecha N.C., Weigmann C.** Expression of GAT-1, a high-affinity γ -aminobutyric acid plasma membrane transporter in the rat retina. *Journal of Comparative Neurology* 1994;**345**:602-611.
- Brownlees J., Williams C.H.** Peptidases, peptides, and the mammalian blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry* 1993;**60**:793-803.
- Brownson E.A., Abbruscato T.J., Gillespie T.J., Hrubby V.J., Davis T.P.** Effect of peptidases at the blood-brain barrier on the permeability of enkephalin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994;**270**:675-680.
- Brunstrom J.E., Bastian A.J., Wong M., Mink J.W.** Motor benefit from levodopa in spastic quadriplegic cerebral palsy. *Annals of Neurology* 2000;**47**:662-665.
- Burtis C.A., Ashwood E.R.** (eds) Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. *W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo* 1996.
-

- Butt A.M., Jones H.C., Abbott N.J.** Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: A developmental study. *Journal of Physiology* 1990;**429**:47-62.
- Cejudo-Ferragud E., Nacher A., Polache A., Cercos-Forteza T., Merino M., Casabo V.G.** Evidence of competitive inhibition for the intestinal absorption of baclofen by phenylalanine. *International Journal of Pharmaceutics* 1996;**132**:63-69.
- Cercos-Forteza T., Polache A., Nacher A., Cejudo-Ferragud E., Casabo V.G., Merino M.** Influence of leucine on intestinal baclofen absorption as a model compound of neutral α -amino acids. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 1995;**16**:563-577.
- Chadwick D.** Gabapentin. *Lancet* 1994;**343**:89-91.
- Chiou W.L.** New perspectives on the theory of permeability and resistance in the study of drug transport and absorption. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 1996;**24**:433-442.
- Chishty M., Reichel A., Siva J., Abbott N.J., Begley D.J.** Affinity for the P-glycoprotein efflux pump at the blood-brain barrier may explain the lack of CNS side-effects of modern antihistamines. *Journal of Drug Targeting* 2001;**9**:223-228.
- Clark J.A., Deutch A.Y., Gallipoli P.Z., Amara S.G.** Functional expression and CNS distribution of a β -alanine-sensitive neuronal GABA transporter. *Neuron* 1992;**9**:337-348.
- Conseil G., Baubichan-Corlay H., Dayun G., Jault J.-M., Barron D., Di Petro A.** Flavonoids: A class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;**95**:9831-9836.
- Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Boccia J., Casals D., Bertino J.R., Melamed M.R.** Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1990;**38**:1277-1287.
- Curran M., Noble S.** Valganciclovir. *Drugs* 2001;**61**:1145-1150.
- Dagenais C., Zong J., Ducharme J., Pollack G.M.** Effect of mdr1a P-glycoprotein gene disruption, gender, and substrate concentration on brain uptake of selected compounds. *Pharmaceutical Research* 2001;**18**:957-963.
- Davidoff R.A.** Antispasticity drugs: Mechanism of action. *Annals of Neurology* 1985;**17**:107-117.
- Deguchi Y., Inabe K., Tomiyasu K., Nozawa K., Yamada S., Kimura R.** Study on brain interstitial fluid distribution and blood-brain barrier transport of baclofen in rats by microdialysis. *Pharmaceutical Research* 1995;**12**:1838-1844.
- Devomanoharan P.S., Ali A.H., Varma S.D.** Oxidative stress to rat lens in vitro: Protection by taurine. *Free Radical Research* 1999;**29**:189-195.
- Dichter M.A., Brodie M.J.** New antiepileptic drugs. *New England Journal of Medicine* 1996;**334**:1583-1590.
- Döppenschmitt S., Eggers H., Herber B., Langguth P., Spahn-Langguth H.** Enantioselektive GC-ECD Bestimmung für Ester des Baclofens in biologischem Material: Trennung der Pentafluorpropionsäure-Amide an CHIRASIL-VAL. *APV-Kurs Entwicklung und Validierung bioanalytischer Methoden*, Kurs 339 vom 28.-29.9.1998 in Eisenach, Workshop der APV Fachgruppe Biopharmazie und Pharmakokinetik 1998.
- Döppenschmitt S., Langguth P., Regardh C.G., Andersson T.B., Hilgendorf C., Spahn-Langguth H.** Characterization of binding properties to human P-glycoprotein: Development of a [3 H]-verapamil radioligand-binding assay. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999;**288**:348-357.
- Doluisio J.T., Billups N.F., Dittert L.W., Sugita E.T., Swintosky J.V.** Drug absorption. I. An in situ gut technique yielding realistic absorption rates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1969;**58**:1196-1200.
- Dressler C.** Interaktionen von Losartan und seinem Hauptmetaboliten EXP 3174 mit Membrantransportern in vitro, in situ und in vivo: Affinitäts- und Transportparameter und ihre Abhängigkeit von experimentellen Bedingungen sowie von der Anwesenheit ausgewählter Inhibitoren. *Dissertation* Martin-Luther-Universität, Halle 2002.
- Drewes L.R.** What is the blood-brain barrier? A molecular perspective. *Cerebral vascular biology. Advances in Experimental Medicine and Biology* 1999;**474**:111-122.
-

- Dunevsky A., Perel A.** Gabapentin for relief of spasticity associated with multiple sclerosis. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation* 1998;**77**:451-454.
- Dunlop D.S., Neidle A.** The separation of D/L-amino acid pairs by high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with optically active naphthylethyl isocyanate. *Analytical Biochemistry* 1987;**165**:38-44.
- Durr D., Stieger B., Kullak-Ublick G.A., Rentsch K.M., Steinert H.C., Meier P.J., Fattinger K.** St John's wort induces P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2000;**68**:598-604.
- Eksborg S., Pal N., Kalin M., Palm C., Soderhall S.** Pharmacokinetics of acyclovir in immunocompromized children with leukopenia and mucositis after chemotherapy: Can intravenous acyclovir be substituted by oral valacyclovir? *Medical and Pediatric Oncology* 2002;**38**:240-246.
- Endicott J.A., Ling V.** The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annual Review of Biochemistry* 1989;**58**:137-171.
- Eppler B., Dawson R.** Dietary taurine manipulations in aged male Fischer 344 rat tissue: Taurine concentrations, taurine biosynthesis, and oxidative markers. *Biochemical Pharmacology* 2001;**62**:29-39.
- Eriksson J., Olausson B., Jankowska E.** Antispastic effects of L-Dopa. *Experimental Brain Research* 1996;**111**:296-304.
- Fojo A.T., Ueda K., Slamon D.J., Poplack D.G., Gottesman M.M., Pastan I.** Expression of a multidrug resistance gene in human tumors and tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;**84**:265-269.
- Ganapathy M.E., Brandsch M., Prasad P.D., Ganapathy V., Leibach F.H.** Differential recognition of β -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT1 and PEPT2. *Journal of Biological Chemistry* 1995;**270**:25672-25677.
- Gidal B.E., Maly M.M., Budde J., Lensmeyer G.L., Pitterle M.E., Jones J.C.** Effect of a high-protein meal on gabapentin pharmacokinetics. *Epilepsy Research* 1996;**23**:71-76.
- Goldstein G.W., Betz A.L.** The blood-brain barrier. *Scientific American* 1986;**255**:74-83.
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E.** Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer* 2002;**2**:48-58.
- Gottesman M.M., Pastan I.** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry* 1993;**62**:385-427.
- Gracies J.-M., Elovic E., MacGuire J., Simpson D.** Traditional pharmacological treatments for spasticity part II: General and regional treatments. *Muscle and Nerve* 1997;**20**:S92-S120.
- Gramatte T., Oertel R.** Intestinal secretion of intravenous talinolol is inhibited by luminal R-verapamil. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1999;**66**:239-245.
- Gros P., Raymond M., Bell J., Housman D.** Cloning and characterization of a second member of the mouse mdr gene family. *Molecular and Cellular Biology* 1988;**8**:2770-2778.
- Guastella J., Nelson N., Nelson H., Czyzyk L., Keynan S., Miedel M.C., Davidson N., Lester H.A., Kanner B.I.** Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 1990;**249**:1303-1306.
- Han H.K., de Vruh R.L.A., Rhie J.K., Covitz K.M.Y., Smith P.L., Lee C.P., Oh D.M., Sadee W., Amidon G.L.** 5'-Amino esters of antiviral nucleosides, acyclovir, and AZT are absorbed by the intestinal PEPT1 transporter. *Pharmaceutical Research* 1998;**15**:1382-1386.
- Hanafy A.** Transport inhibition and induction as sources for absorption- and disposition-related drug-drug interactions: Talinolol as model substrate for the ABC-transporter P-glycoprotein. *Dissertation* Martin-Luther-Universität, Halle 2001.
- Heinzel G., Woloszczak R., Thomann P.** TopFit: Version 2.0: Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system for the PC. *Gustav Fischer Verlag* 1993.
- Herber B.** Verteilung von Pharmaka ins Gehirn: Korrelation mit der Lipophilie und Abhängigkeit vom Applikationsweg. *Dissertation* Martin-Luther-Universität, Halle 2002.
- Higgins C.F., Callaghan R., Linton K.J., Rosenberg M.F., Ford R.C.** Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. *Seminars in Cancer Biology* 1997;**8**:135-142.

- Hill D.R., Bowery N.G. [³H]-Baclofen and [³H]-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature* 1981;**290**:149-152.
- Hill D.R., Suman-Chauhan N., Woodruff G.N. Localization of [³H]-gabapentin to a novel site in rat brain: Autoradiographic studies. *European Journal of Pharmacology* 1993;**224**:303-309.
- Honc F., Kershaw R.A., Kochak G.M., Rakhit A., Wagner W.E., Waldes L. The pharmacokinetics of baclofen derived from intestinal infusion. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1985;**38**:251-257.
- Hunter J., Hirst B.H., Simmons N.L. Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *Pharmaceutical Research* 1993;**10**:743-749.
- Huxtable R.J. Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews* 1992;**72**:101-163.
- Ioannides C. Pharmacokinetic interactions between herbal remedies and medicinal drugs. *Xenobiotica* 2002;**32**:451-478.
- Ito S. Drug secretion systems in renal tubular cells: Functional models and molecular identity. *Pediatric Nephrology* 1999;**13**:908-988.
- Ito S., Woodland C., Harper P.A., Koren G. The mechanism of verapamil-digoxin interaction in renal tubular cells (LLC-PK1). *Life Sciences* 1993;**53**:399-403.
- Jansson T. Amino acid transporters in the human placenta. *Pediatric Research* 2001;**49**:141-147.
- Jodoin J., Demeule M., Beliveau R. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein activity by green tea polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002;**1542**:149-159.
- Johne A., Brockmoller J., Bauer S., Maurer A., Langheinrich M., Roots I. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1999;**66**:338-345.
- Jolliet-Riant P., Tillement J.-P. Drug transfer across the blood-brain barrier and improvement of brain delivery. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 1999;**13**:16-26.
- Jones K.A., Borowsky B., Tamm J.A., Criag D.A., Durkin M.M., Dai M., Yao W.-J., Johnson M., Gunwaldsen C., Huang L.-Y., Tang C., Shen Q., Salon J.A., Morse K., Laz T., Smith K.E., Nagarthnam D., Noble S., Branchek T.A., Gerald C. GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature* 1998;**396**:674-678.
- Kanai Y., Segawa H., Miyamoto K., Uchino H., Takeda E., Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *Journal of Biological Chemistry* 1998;**273**:23629-23632.
- Kanamitsu S.L., Ito K., Okuda H., Ogura K., Watabe T., Muro K., Sugiyama Y. Prediction of in vivo drug-drug interactions based on mechanism-based inhibition from in vitro data: Inhibition of 5-fluorouracil metabolism by (E)-5-(2-Bromovinyl)uracil. *Drug Metabolism and Disposition* 2000;**28**:467-474.
- Karnes H.T., Shiu G., Shah V.P. Validation of bioanalytical methods. *Pharmaceutical Research* 1991;**8**:421-426.
- Kaupmann K., Malitschek B., Schuler V., Heid J., Froestl W., Beck P., Mosbacher J., Bischoff S., Kulik A., Shigemoto R., Karschin A., Bettler B. GABA_B receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 1998;**396**:683-686.
- Kido Y., Tamai I., Uchino H., Suzuki F., Sai Y., Tsuji A. Molecular and functional identification of large neutral amino acid transporters LAT1 and LAT2 and their pharmacological relevance at the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2001;**53**:497-503.
- Kita M., Goodkin D.E. Drugs used to treat spasticity. *Drugs* 2000;**59**:487-495.
- Koggel A. *Dissertation* Johannes-Gutenberg Universität Mainz, 2002.
- Koggel A., Spahn-Langguth H., Langguth P. Correlation of P-glycoprotein affinity and lipophilicity of several β -adrenoceptor blockers. European Graduate Student Meeting (Abstract) 2002.
- Kreydiyyeh S.I. Inhibitors in tea of intestinal absorption of phenylalanine in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 1996;**113**:67-71.
- Kuner R., Köhr G., Grünewald S., Eisenhardt G., Bach A., Kornau H.-C. Role of heteromer formation in GABA_B receptor function. *Science* 1999;**283**:74-77.

- Kusuhara H., Suzuki H., Sugiyama Y.** The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organ anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998;**87**:1025-1040.
- Laidlaw S.A., Grosvener M., Korpe J.P.** The taurine content of common food stuffs. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1990;**14**:183-188.
- Langguth P.** Pharmakokinetik. In: Herzfeldt: Propädeutikum der Arzneiformenlehre. Galenik. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2000.
- Langguth P., Amidon G.L., Lipka E., Spahn-Langguth H.** Gastrointestinal transport processes: Potentials for stereoselectivities at substrate-specific and nonspecific epithelial transport systems. In: Stereochemistry in Drug Development and Use. Aboul-Enein H.Y., Wainer I.W. (Eds.) John Wiley and Sons New York 1997:611-632.
- Leach J.P., Brodie M.J.** New antiepileptic drugs: An explosion of activity. *Seizure* 1995;**4**:5-17.
- Leibach F.H., Ganapathy V.** Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annual Review of Nutrition* 1996;**16**:99-119.
- Leveque D., Jehl F.** P-Glycoprotein and pharmacokinetics. *Anticancer Research* 1995;**15**:331-336.
- Liu W., Liang R., Ramamoorthy S., Fei Y.J., Ganapathy M.E., Hediger M.A., Ganapathy V., Leibach F.H.** Molecular cloning of PEPT2, a new member of the H⁺/peptide cotransporter family, from human kidney. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995;**1235**:461-466.
- Lown K.S., Bailey D.G., Fontana R.J., Janardan S.K., Adair C.H., Fortlage L.A., Brown M.B., Guo W., Watkins P.B.** Grapefruit juices increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *Journal of Clinical Investigation* 1997;**99**:2545-2553.
- Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A.** Taschenatlas der Pharmakologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1996.
- Luer M.S., Hamani C., Dujovny B., Gidal B., Cwik M., Deyo K., Fischer J.H.** Saturable transport of gabapentin at the blood-brain barrier. *Neurological Research* 1999;**21**:559-562.
- Marroum P., Spahn-Langguth H., Langguth P.** Metabolism, transport, and drug interactions. Chapter 9 in: Sahajwalla C. New Drug Application: Regulatory and scientific principles for clinical pharmacology and biopharmaceutics, 2002, in Vorbereitung.
- Martin C., Berridge G., Mistry P., Higgins C., Mistry P., Charlton P., Callaghan R.** Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP-binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry* 2000;**39**:11901-11906.
- McLean M.J.** Clinical pharmacokinetics of gabapentin. *Neurology* 1994;**44**:S17-S22.
- Merino M., Peris-Ribera J.E., Torres-Molina F., Sanchez-Pico A., Garcia-Crabonell M.C., Casabo V.G., Martin-Villodre A., Pla-Delfina J.M.** Evidence of a specialized transport mechanism for the absorption of baclofen. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 1989;**10**:279-297.
- Militante J.D., Lombardini J.B.** Taurine uptake activity in the rat retina: Protein kinase C-independent inhibition by chelerythrine. *Brain Research* 1999;**818**:369-374.
- Minelli A., DeBiasi S., Brecha N.C., Zuccarello L.V., Conti F.** GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience* 1996;**16**:6255-6264.
- Minn A., Gherzi-Egea J.F., Perrin R., Leininger B., Siest G.** Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels. *Brain Research Reviews* 1991;**16**:65-82.
- Moll-Navarro M.J., Merino M., Casabo V.G., Nacher A., Polache A.** Interaction of taurine on baclofen intestinal absorption: A nonlinear mathematical treatment using differential equations to describe kinetic inhibition models. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996;**85**:1248-1254.
- Moyle G.J., Back D.** Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement. *HIV Medicine* 2001;**2**:105-113.
- Müller H., Borner U., Zierski J., Hempelmann G.** Intrathecal baclofen for treatment of tetanus-induced spasticity. *Anesthesiology* 1987;**66**:76-79.
- Munck L.K., Munck B.G.** Amino acid transport in the small intestine. *Physiological Research* 1995;**44**:335-346.

- Nacher A., Polache A., Moll-Navarro M.J., Pla-Delfina J.M., Merino M.** Intestinal absorption pathways of γ -aminobutyric acid in rat small intestine. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 1994;**15**:373-382.
- Ng G.Y.K., Bertrand S., Sullivan R., Ethier N., Wang J., Yergey J., Belley M., Trimble L., Bateman K., Alder L., Smith A., McKernan R., Metters K., O'Neill G.P., Lacaille J.-C., Hebert T.E.** γ -Aminobutyric acid Type B receptors with specific heterodimer composition and postsynaptic actions in hippocampal neurons are targets of anticonvulsant gabapentin action. *Molecular Pharmacology* 2001;**59**:144-152.
- Noth J.** Pharmakologie der Spastik: Ruht die Therapie im Dornröschenschlaf? *Der Nervenarzt* 2000;**71**:927-928.
- O'Flaherty L., Stapleton P.P., Redmond H.P., Bouchier-Hayes D.J.** Intestinal taurine transport: A review. *European Journal of Clinical Investigation* 1997;**27**:873-880.
- Ogawa M., Suzuki H., Sawada Y., Hanano M., Sugiyama Y.** Kinetics of active efflux via choroid plexus of β -lactam antibiotics from the CSF into the circulation. *American Journal of Physiology* 1994;**266**:R392-R399.
- Olpe H.R., Demieville H., Baltzer V., Bencze W.L., Koella W.P.X.W., Haas H.L.** The biological activity of D- and L-baclofen (Lioresal). *European Journal of Pharmacology* 1978;**52**:133-136.
- Palacin M., Estevez R., Bertran J., Zorzano A.** Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiological Reviews* 1998;**78**:969-1054.
- Pardridge W.M.** Recent advances in blood-brain barrier transport. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1988;**28**:25-39.
- Pardridge W.M.** Transport of insulin-related peptides and glucose across the blood-brain barrier. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993;**692**:126-137.
- Pavek P., Fendrich Z., Staud F., Malakova J., Brozmanova H., Laznicek M., Semecky V., Grundmann M., Palick V.** Influence of P-glycoprotein on the transplacental passage of cyclosporine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001;**90**:1583-1592.
- Persky A.M., Brazeau G.A.** Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacological Reviews* 2001;**53**:161-176.
- Peterson G.M., McLean S., Millingen K.S.** Food does not affect the bioavailability of baclofen. *Medical Journal of Australia* 1985;**142**:689-690.
- Philipps A.F., Holzman I.R., Teng C., Battaglia F.C.** Tissue concentrations of free amino acids in term human placentas. *American Journal of Obstetric Gynecology* 1978;**131**:881-887.
- Piyapolrunroj N., Li C., Bockbrader H., Liu G., Fleisher D.** Mucosal uptake of gabapentin (Neurontin) vs. pregabalin in the small intestine. *Pharmaceutical Research* 2001;**18**:1126-1130.
- Polache A., Munck L.K., Munck B.G.** Baclofen (β -p-chlorophenyl- γ -aminobutyric acid) transport across rat jejunum. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993;**1147**:267-272.
- Polache A., Pla-Delfina J.M., Merino M.** Partially competitive inhibition of intestinal baclofen absorption by β -alanine, a nonessential dietary amino acid. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 1991;**12**:647-660.
- Priebe M.M., Sherwood A.M., Graves D.E., Mueller M., Kornhuber H.H.** Effectiveness of gabapentin in controlling spasticity: A quantitative study. *Spinal Cord* 1997;**35**:171-175.
- Ramamoorthy S., Leibach F.H., Mahesh V.B., Han H., Yang-Feng T., Blakeley R.D., Ganapathy V.** Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta. *Biochemical Journal* 1994;**300**:893-900.
- Redmond H.P., Stapleton P.P., Neary P., Bouchier-Hayes D.** Immunonutrition: The role of taurine. *Nutrition* 1998;**14**:599-604.
- Richens A.** Clinical pharmacokinetics of gabapentin. In: Chadwick (ed.) New trends in epilepsy management: The role of gabapentin. London: Royal Society of Medicine Services 1993:41-46.
- Roberts D.C.S., Andrews M.M.** Baclofen suppression of cocaine self-administration: Demonstration using a discrete trials procedure. *Psychopharmacology* 1997;**131**:271-277.
- Roninson I.B., Chin J.E., Choi K.G., Gros P., Housman D.E., Fojo A., Shen D.W., Gottesman M.M., Pastan I.** Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;**83**:4538-4542.

- Rossier G.H., Meier C., Bauch C., Summa V., Sordat B., Verrey F., Kuhn L.C.** LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *Journal of Biological Chemistry* 1999;**274**:34948-34954.
- Sachs L.** Angewandte Statistik. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1992.
- Saeki T., Ueda K., Tanigawara Y., Hori R., Komano T.** Human P-glycoprotein transports cyclosporine A and FK506. *Journal of Biological Chemistry* 1993;**268**:6077-6080.
- Saissy J.M., Demaziere J., Vitris M., Seck M., Marcoux L., Gaye M., Ndiaye M.** Treatment of severe tetanus by intrathecal injections of baclofen without artificial ventilation. *Intensive Care Medicine* 1992;**18**:241-244.
- Sakane T., Yamashita S., Yata N., Sezaki H.** Transnasal delivery of 5-fluorouracil to the brain in the rat. *Journal of Drug Targeting* 1999;**7**:233-240.
- Salphati L., Benet L.Z.** Effects of ketoconazole on digoxin absorption and disposition in rat. *Pharmacology* 1998;**56**:308-313.
- Sato M., Nakamura Y., Sogawa T., Yang Q., Taniguchi T., Taniguchi E., Kagiya T., Nakamura M., Mori I., Kakudo K.** Immunolocalization of glucose transporter 1 and 3 in the placenta: Application to cytodagnosis of Papanicolaou smear. *Diagnostic Cytopathology* 2002;**26**:373-379.
- Sawada K., Terada T., Saito H., Hashimoto Y., Inui K.I.** Recognition of L-amino acid ester compounds by rat peptide transporters PEPT1 and PEPT2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1999;**291**:705-709.
- Schaffer S., Takahashi K., Azuma J.** Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* 2000;**19**:527-546.
- Schinkel A.H.** P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999;**36**:179-194.
- Schinkel A.H., Wagenaar E., Mol C.A.A.M., van Deemter L.** P-Glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *Journal of Clinical Investigation* 1996;**97**:2517-2524.
- Schuetz E., Strom S.** Promiscuous regulator of xenobiotic removal. *Nature Medicine* 2001;**7**:536-537.
- Schwarz U.I., Gramatte T., Krappweis J., Oertel R., Kirch W.** P-Glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2000;**38**:161-167.
- Scism J.L., Powers K.M., Artru A.A., Lewis L., Shen D.D.** Probenecid-inhibitable efflux transport of valproic acid in the brain parenchymal cells of rabbits: A microdialysis study. *Brain Research* 2000;**884**:77-86.
- Seelig A.** A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *European Journal of Biochemistry* 1998;**251**:252-261.
- Seelig A., Blatter L., Wohnsland F.** Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: A comparison. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2000;**38**:111-121.
- Seidl R., Peyrl A., Nicham R., Hauser E.** A taurine and caffeine-containing drink stimulates cognitive performance and well-being. *Amino Acids* 2000;**19**:635-642.
- Shah V.P., Midha K.K., Dighe S., McGilveray I.J., Skelly J.P., Yacobi A., Layloff T., Viswanathan C.T., Cook C.E., McDowall R.D., Pittman K.A., Spector S.** Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Pharmaceutical Research* 1992;**9**:588-592.
- Shah V.P., Midha K.K., Findlay J.W.A., Hill H.M., Hulse J.D., McGilveray I.J., McKay G., Miller K.J., Patnaik R.N., Powell M.L., Tonelli A., Viswanathan C.T., Yacobi A.** Bioanalytical method validation: A revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical Research* 2000;**17**:1551-1557.
- Shapiro A.B., Ling V.** Effect of quercetin on Hoechst 33342 transport by purified and reconstituted P-glycoprotein. *Biochemical Pharmacology* 1997;**21**:587-596.
- Sharom F.J.** The P-glycoprotein efflux pump: How does it transport drugs? *Journal of Membrane Biology* 1997;**160**:161-175.

- Shellenberger M.K., Groves L., Shah J., Novack G.D.** A controlled pharmacokinetic evaluation of tizanidine and baclofen at steady state. *Drug Metabolism and Disposition* 1999;**27**:201-204.
- Shimada K., Hirakata K.** Retention behavior of derivatized amino acids and dipeptides in high-performance liquid chromatography using cyclodextrin as a mobile phase additive. *Journal of Liquid Chromatography* 1992;**15**:1763-1771.
- Sinha V.R., Kumria R.** Colonic drug delivery: Prodrug approach. *Pharmaceutical Research* 2001;**18**:557-564.
- Sivenius J., Ylinen A., Kalviainen R., Riekkinen P.J.** Long-term study with gabapentin in patients with drug-resistant epileptic seizures. *Archives of Neurology* 1994;**51**:1047-1050.
- Snow R.J., Murphy R.M.** Creatine and the creatine transporter: A review. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2001;**224**:169-181.
- Soldner A., Christians U., Susanto M., Wachter V.J., Silverman J.A., Benet L.Z.** Grapefruit juice activates P-glycoprotein-mediated drug transport. *Pharmaceutical Research* 1999;**16**:478-485.
- Sora I., Richman J., Santoro G., Wei H., Wang Y., Vanderah T., Hovarth R., Nguyen M., Waite S., Roeske W.R., Yamamura H.I.** The cloning and expression of a human creatine transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;**204**:317-324.
- Spahn H., Krauss D., Mutschler E.** Enantiospecific high-performance liquid chromatographic (HPLC) determination of baclofen and its fluoro analogue in biological material. *Pharmaceutical Research* 1988;**5**:107-112.
- Spahn-Langguth H., Baktir G., Radschuweit A., Okyar A., Terhaag B., Ader P., Hanafy A., Langguth P.** P-Glycoprotein transporters and the gastrointestinal tract: Evaluation of the potential in vivo relevance of in vitro data employing talinolol as model compound. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1998;**36**:16-24.
- Spahn-Langguth H., Benet L.Z., Möhrke W., Langguth P.** First-pass-phenomena: Sources of stereoselectivities and variabilities of concentration-time profiles after oral dosage. In: Stereochemistry in Drug Development and Use. Aboul-Enein H.Y., Wainer I.W. (Eds.) *John Wiley and Sons New York* 1997:573-610.
- Spahn-Langguth H., Dressler C., Leisen C.** Intestinal drug transport: Stereochemical aspects. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 153, Chapter 11 Stereochemical aspects of drug action and disposition. Eichelbaum M., Testa B., Somogyi A. (Eds.) *Springer Verlag Heidelberg* 2002, im Druck.
- Spahn-Langguth H., Langguth P.** Grapefruit juice enhances intestinal absorption of the P-glycoprotein substrate talinolol. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001;**12**:361-367.
- Stapleton P.P., O'Flaherty L., Redmond H.P., Bouchier-Hayes D.J.** Host defense: A role for the amino acid taurine? *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1998;**22**:42-48.
- Stewart B.H., Kugler A.R., Thompson P.R., Bockbrader H.N.** Saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. *Pharmaceutical Research* 1993;**10**:276-281.
- Stewart B.H., Reyner E.L., Lu R.H.** Gabapentin (Neurontin) transport across Caco-2 cell monolayers: Interaction with zwitterionic and cationic amino acid carriers. *Pharmaceutical Research* 1994;**11**(Suppl. 10):S254.
- Su T.Z., Lunney E., Campbell G., Oxender D.L.** Transport of gabapentin, a γ -amino acid drug, by system L α -amino acid transporters: A comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells. *Journal of Neurochemistry* 1995;**64**:2125-2131.
- Synold T.W., Dussault L., Forman B.M.** The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature Medicine* 2001;**7**:584-590.
- Tamai I., Nakanishi T., Nakahara H., Sai Y., Ganapathy V., Leibach F.H., Tsuji A.** Improvement of L-dopa absorption by dipeptidyl derivation, utilizing peptide transporter PEPT1. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998;**87**:1542-1546.
- Tamai I., Tsuji A.** Transporter-mediated permeation of drugs across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000;**89**:1371-1388.
- Tanigawara Y., Okamura N., Hirai M., Yasuhara M., Ueda K., Kioka N., Komao T., Hori R.** Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1992;**263**:840-845.

- Tatsuta T., Naito M., Oh-hara T., Sugawara I., Tsuruo T.** Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *Journal of Biological Chemistry* 1992;**267**:20383-20391.
- Terada T. Saito H., Mukai M., Inui K.** Characterization of stably transfected kidney epithelial cell line expressing rat H⁺/peptide cotransporter PEPT1 and transport of β -lactam antibiotics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1997;**281**:1415-1421.
- Tsuji A.** P-Glycoprotein-mediated efflux transport of anticancer drugs at the blood-brain barrier. *Therapeutic Drug Monitoring* 1998;**20**:588-590.
- Tsuji A., Tamai I.** Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharmaceutical Research* 1996;**13**:963-977.
- Tsuji A., Tamai I.** Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999;**36**:277-290.
- Tsuji A., Terasaki T., Takabatake Y., Tenda Y., Tamai I., Yamashita J., Moritani S., Tsuruo T., Yamashita J.** P-Glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured brain capillary endothelial cells. *Life Sciences* 1992;**51**:1427-1437.
- Tsunoda S.M., Harris R.Z., Christians U., Velez R.L., Freeman R.B., Benet L.Z., Warshaw A.** Red wine decreases cyclosporine bioavailability. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2001;**70**:462-467.
- Ugawa S., Sunouchi Y., Ueda T., Takahashi E., Saishin Y., Shimada S.** Characterization of a mouse colonic system B⁰⁺ amino acid transporter related to amino acid absorption in colon. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2001;**281**:G365-G370.
- Ushigome F., Takanaga H., Matsuo H., Yanai S., Tsukimori K., Nakano H., Uchiumi T., Nakamura T., Kuwano M., Ohtani H., Sawada Y.** Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: Contribution of P-glycoprotein. *European Journal of Pharmacology* 2000;**408**:1-10.
- US Gabapentin Study Group No. 5.** Gabapentin as add-on therapy in refractory partial epilepsy: A double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 1993;**43**:2292-2298.
- van Asperen J., Mayer U., van Tellingen O., Beijnen J.H.** The functional role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1997;**86**:881-884.
- van Bree J.B.M.M., Heijligers-Feijen C.D., de Boer A.G., Danhof M., Breimer D.D.** Stereoselective transport of baclofen across the blood-brain barrier in rats as determined by the unit impulse response methodology. *Pharmaceutical Research* 1991;**8**:259-262.
- Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W.** The sequence of the human genome. *Science* 2001;**291**:1304-1351.
- Verrey F., Jack D.L., Paulsen I.T., Saier M.H., Pfeiffer R.** New glycoprotein-associated amino acid transporters. *Journal of Membrane Biology* 1999;**172**:181-192.
- Verrey F., Meier C., Rossier G., Kuhn L.C.** Glycoprotein-associated amino acid exchangers: Broadening the range of transport specificity. *Pflügers Archiv* 2000;**440**:506-512.
- Vinnakota S., Qian X., Egal H., Sarthy V., Sarkar H.K.** Molecular characterization and in situ localization of a mouse retinal transporter. *Journal of Neurochemistry* 1997;**69**:2238-2250.
- Vogt T., Urban P.P.** Optimierte Therapie des spastischen Syndroms durch Kombination von intrathekalem Baclofen mit Botulinumtoxin. *Der Nervenarzt* 2000;**71**:1007-1011.
- Vollmer K.O., von Hodenberg A., Kolle E.U.** Pharmacokinetics and metabolism of gabapentin in rat, dog and man. *Arzneimittel-Forschung* 1986;**36**:830-839.
- Yamada K., Yu B., Gallagher J.P.** Different subtypes of GABA_B receptors are present at pre- and postsynaptic sites within the rat dorsolateral septal nucleus. *Journal of Neurophysiology* 1999;**81**:2875-2883.
- Wagner D., Spahn-Langguth H., Hanafy A., Koggel A., Langguth P.** Intestinal drug efflux: Formulation and food effects. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001;**50**:S13-S31.
- Waterfield C.J., Mesquita M., Parnham P., Timbrell J.A.** Taurine protects against the cytotoxicity of hydrazine, 1,4-naphthoquinone and carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* 1993;**46**:589-595.

- Westphal K., Weinbrenner A., Giessmann T., Stuhr M., Franke G., Zschiesche M., Oertel R., Terhaag B., Kroemer H.K., Siegmund W.** Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: Evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2000;**68**:6-12.
- Wetterich U., Spahn-Langguth H., Mutschler E., Terhaag B., Rösch W., Langguth P.** Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinolol enantiomers: Concentration- and dose-dependent absorption in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Research* 1996;**13**:514-522.
- White J.H., Wise A., Main M.J., Green A., Fraser N.J., Disney G.H., Barnes A.A., Emson P., Foord S.M., Marshall F.H.** Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_B receptor. *Nature* 1998;**396**:679-682.
- Wuis E.W., Beneken E.W.J, van Beijsterveldt L.E.C., Burgers R.C.M., Vree T.B., van der Kleyn E.** Enantioselective high-performance liquid chromatographic determination of baclofen after derivatization with a chiral adduct of o-phthalaldehyde. *Journal of Chromatography* 1987;**415**:419-422.
- Wuis E.W., Dirks M.J.M., Termond E.F.S., Vree T.B., van der Kleijn E.** Plasma and urinary excretion kinetics of oral baclofen in healthy subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1989a;**10**:239-246.
- Wuis E.W., Dirks M.J.M., Termond E.F.S., Vree T.B., van der Kleijn E.** Comparison of the pharmacokinetics of intravenously administered rac-baclofen and its (-)-(R)- and (+)-(S)-enantiomers in dogs. *International Journal of Clinical Pharmacology Research* 1989b;**37**:181-184.
- Wuis E.W., Dirks M.J.M., Vree T.B., van der Kleyn E.** High-performance liquid chromatographic analysis of baclofen in plasma and urine of man after precolumn extraction and derivatization with o-phthalaldehyde. *Journal of Chromatography* 1985;**337**:341-350.
- Zorzano A., Fandos C., Palacin M.** Role of plasma membrane transporters in muscle metabolism. *Biochemical Journal* 2000;**349**:667-688.
-

– Anhang –

A. In-vitro-Untersuchungen – Radioligandenbindungsassay

A.1. Testung der P-GP-Affinität verschiedener Substanzen – Bestimmung von IC₅₀-Werten

A.1.1. Baclofen

Baclofen-Bindungsdaten: Radioaktivität [DPM/Filter] bei konzentrationsabhängiger Verdrängung des Radioliganden [³H]-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% [³H]-Talinolol)

A.1.1.1. Totale Bindung [DPM]

Konzentration [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	7172,23	7285,36	7228,80	79,99
1333,33	4697,26	4545,04	4621,15	107,64
666,67	5096,25	5214,30	5155,28	83,47
333,33	6091,76	6064,49	6078,13	19,28
111,11	7408,50	7484,47	7446,49	53,72
37,037	6115,46	6216,80	6166,13	71,66
12,346	7653,07	7811,47	7732,27	112,01
4,115	8520,67	8410,05	8465,36	78,22
1,372	8588,35	8489,34	8538,85	70,01
0,457	8830,50	9048,88	8939,69	154,42
0,046	9807,12	9795,70	9801,41	8,08
0	8374,67	8345,35	8360,01	20,73

A.1.1.2. Spezifische Bindung [%]

Konzentration [µM]	% der gebundenen Radioaktivität			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	85,64	87,30	86,47	1,17
1333,33	56,09	54,46	55,28	1,15
666,67	60,85	62,48	61,67	1,15
333,33	72,74	72,67	72,70	0,05
111,11	88,46	89,68	89,07	0,86
37,037	73,02	74,49	73,76	1,04
12,346	91,38	93,60	92,49	1,57
4,115	101,74	100,78	101,26	0,68
1,372	102,55	101,73	102,14	0,58
0,457	105,44	108,43	106,94	2,11
0,046	117,10	117,38	117,24	0,19
0	100,00	100,00	100,00	0,00

A.1.2. Baclofenmethylester

Baclofenmethylester-Bindungsdaten: Radioaktivität [DPM/Filter] bei konzentrationsabhängiger Verdrängung des Radioliganden [³H]-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% [³H]-Talinolol)

A.1.2.1. Totale Bindung [DPM]

Konzentration [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	3920,77	3908,15	3914,46	8,92
1333,33	4372,04	4581,54	4476,79	148,14
666,67	4974,80	5159,11	5066,96	130,33
333,33	4170,42	4222,00	4196,21	36,47
111,11	6964,77	6845,17	6904,97	84,57
37,037	6469,23	6566,17	6517,70	68,55
12,346	4965,75	4935,80	4950,78	21,18
4,115	5540,35	5380,53	5460,44	113,01
1,372	4884,05	4869,31	4876,68	10,42
0,457	5368,49	5361,31	5364,90	5,08
0,046	4917,46	4893,77	4905,62	16,75
0	5412,54	5434,87	5423,71	15,79

A.1.2.2. Spezifische Bindung [%]

Konzentration [µM]	% der gebundenen Radioaktivität			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	72,44	71,91	72,17	0,37
1333,33	80,78	84,30	82,54	2,49
666,67	91,91	94,93	93,42	2,13
333,33	77,05	77,68	77,37	0,45
111,11	128,68	125,95	127,31	1,93
37,037	119,52	120,82	120,17	0,91
12,346	91,75	90,82	91,28	0,66
4,115	102,36	99,00	100,68	2,38
1,372	90,24	89,59	89,91	0,45
0,457	99,19	98,65	98,92	0,38
0,046	90,85	90,04	90,45	0,57
0	100,00	100,00	100,00	0,00

A.1.3. Baclofenethylester

Baclofenethylester-Bindungsdaten: Radioaktivität [DPM/Filter] bei konzentrationsabhängiger Verdrängung des Radioliganden [³H]-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% [³H]-Talinolol)

A.1.3.1. Totale Bindung [DPM]

Konzentration [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	3052,30	3152,56	3102,43	70,89
1333,33	3533,25	3454,40	3493,83	55,76
666,67	4086,52	4051,70	4069,11	24,62
333,33	4646,95	4673,30	4660,13	18,63
111,11	5682,56	6550,16	6116,36	613,49
37,037	5845,02	5683,71	5764,37	114,06
12,346	5741,28	5718,60	5729,94	16,04
4,115	5602,15	5759,20	5680,68	111,05
1,372	5710,65	5672,38	5691,52	27,06
0,457	5682,04	5626,04	5654,04	39,60
0,046	5446,36	5444,60	5445,48	1,24
0	5120,98	5235,70	5178,34	81,12

A.1.3.2. Spezifische Bindung [%]

Konzentration [µM]	% der gebundenen Radioaktivität			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	59,60	60,21	59,91	0,43
1333,33	69,00	65,98	67,49	2,13
666,67	79,80	77,39	78,59	1,71
333,33	90,74	89,26	90,00	1,05
111,11	110,97	125,11	118,04	10,00
37,037	114,14	108,56	111,35	3,95
12,346	112,11	109,22	110,67	2,04
4,115	109,40	110,00	109,70	0,43
1,372	111,51	108,34	109,93	2,24
0,457	110,96	107,46	109,21	2,48
0,046	106,35	103,99	105,17	1,67
0	100,00	100,00	100,00	0,00

A.1.4. Baclofen-1-propylester

Baclofen-1-propylester-Bindungsdaten: Radioaktivität [DPM/Filter] bei konzentrationsabhängiger Verdrängung des Radioliganden [³H]-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% [³H]-Talinolol)

A.1.4.1. Totale Bindung [DPM]

Konzentration [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	3065,06	2914,72	2989,89	106,31
1333,33	3108,48	3085,69	3097,09	16,11
666,67	3641,96	3662,95	3652,46	14,84
333,33	4218,39	4276,79	4247,59	41,30
111,11	5590,83	5742,77	5666,80	107,44
37,037	6072,03	6182,37	6127,20	78,02
12,346	6175,99	6340,79	6258,39	116,53
4,115	6236,12	6110,95	6173,54	88,51
1,372	6248,90	6232,63	6240,77	11,50
0,457	6146,67	5961,04	6053,86	131,26
0,046	6816,13	6854,28	6835,21	26,98
0	7237,55	7335,10	7286,33	68,98

A.1.4.2. Spezifische Bindung [%]

Konzentration [µM]	% der gebundenen Radioaktivität			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	42,35	39,74	41,04	1,85
1333,33	42,95	42,07	42,51	0,62
666,67	50,32	49,94	50,13	0,27
333,33	58,28	58,31	58,30	0,01
111,11	77,25	78,29	77,77	0,74
37,037	83,90	84,28	84,09	0,27
12,346	85,33	86,44	85,89	0,79
4,115	86,16	83,31	84,74	2,02
1,372	86,34	84,97	85,65	0,97
0,457	84,93	81,27	83,10	2,59
0,046	94,18	93,44	93,81	0,52
0	100,00	100,00	100,00	0,00

A.1.5. Baclofen-2-propylester

Baclofen-2-propylester-Bindungsdaten: Radioaktivität [DPM/Filter] bei konzentrationsabhängiger Verdrängung des Radioliganden [³H]-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% [³H]-Talinolol)

A.1.5.1. Totale Bindung [DPM]

Konzentration [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			
	Count 1	Count 2	MW	SD
2000	3228,54	3116,98	3172,76	78,88
1333,33	3059,59	3027,42	3043,51	22,75
666,67	3573,40	3546,30	3559,85	19,16
333,33	4270,67	4180,77	4225,72	63,57
111,11	5080,38	5053,94	5067,16	18,70
37,037	6813,73	6839,45	6826,59	18,19
12,346	6533,21	6614,71	6573,96	57,63
4,115	8062,08	8057,13	8059,61	3,50
1,372	6449,22	6346,78	6398,00	72,44
0,457	6481,07	6418,35	6449,71	44,35
0,046	7225,31	7118,66	7171,99	75,41
0	5705,48	5756,93	5731,21	36,38

A.1.5.2. Spezifische Bindung [%]

Konzentration [µM]	% der gebundenen Radioaktivität			
	Count 1	Count 2	MW	SD
2000	56,59	54,14	55,36	1,73
1333,33	53,63	52,59	53,11	0,73
666,67	62,63	61,60	62,12	0,73
333,33	74,85	72,62	73,74	1,58
111,11	89,04	87,79	88,42	0,89
37,037	119,42	118,80	119,11	0,44
12,346	114,51	114,90	114,70	0,28
4,115	141,30	139,96	140,63	0,95
1,372	113,04	110,25	111,64	1,97
0,457	113,59	111,49	112,54	1,49
0,046	126,64	123,65	125,15	2,11
0	100,00	100,00	100,00	0,00

A.1.6. Baclofenbutylester

Baclofenbutylester-Bindungsdaten: Radioaktivität [DPM/Filter] bei konzentrationsabhängiger Verdrängung des Radioliganden [³H]-Talinolol (1 µM Talinolol mit 20% [³H]-Talinolol)

A.1.6.1. Totale Bindung [DPM]

Konzentration [µM]	Radioaktivität [DPM/Filter]			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	2052,99	2034,62	2043,81	12,99
1333,33	2351,79	2358,42	2355,11	4,69
666,67	3149,40	3209,43	3179,42	42,45
333,33	3803,18	3998,71	3900,95	138,26
111,11	5323,36	5310,72	5317,04	8,94
37,037	6022,46	5910,25	5966,36	79,34
12,346	6155,00	6240,90	6197,95	60,74
4,115	6257,58	6192,76	6225,17	45,83
1,372	5918,45	5993,33	5955,89	52,95
0,457	5685,58	5809,88	5747,73	87,89
0,046	5856,41	5895,78	5876,10	27,84
0	6538,92	6398,69	6468,81	99,16

A.1.6.2. Spezifische Bindung [%]

Konzentration [µM]	% der gebundenen Radioaktivität			SD
	Count 1	Count 2	MW	
2000	31,40	31,80	31,60	0,28
1333,33	35,97	36,86	36,41	0,63
666,67	48,16	50,16	49,16	1,41
333,33	58,16	62,49	60,33	3,06
111,11	81,41	83,00	82,20	1,12
37,037	92,10	92,37	92,23	0,19
12,346	94,13	97,53	95,83	2,41
4,115	95,70	96,78	96,24	0,77
1,372	90,51	93,66	92,09	2,23
0,457	86,95	90,80	88,87	2,72
0,046	89,56	92,14	90,85	1,82
0	100,00	100,00	100,00	0,00

B. In-situ-Untersuchungen – Rattendarm-Perfusionsstudien**B.1. In-situ-Perfusionen mit Baclofen****B.1.1. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der effektiven intestinalen Baclofenpermeabilität (P_{eff})**

B.1.1.1. 0,05 mM Baclofen: Effektive intestinale Baclofenbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		379	360	370	13
	Darmsegmentlänge [cm]		4,5	5,6	5,1	0,8
	Zeit [min]	5	12,27	14,34	13,31	1,46
		10	13,11	13,17	13,14	0,04
		15	14,50	11,55	13,03	2,09
		20	14,04	9,67	11,86	3,09
		25	11,79	12,64	12,22	0,60
		30	12,21	12,87	12,54	0,47
		MW	12,99	12,37		
		SD	1,09	1,60		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		379	360	370	13
	Darmsegmentlänge [cm]		3,9	3,9	3,9	0
	Zeit [min]	5	10,60	12,66	11,63	1,46
		10	11,68	11,26	11,47	0,30
		15	13,01	12,24	12,63	0,54
		20	10,46	11,41	10,94	0,67
		25	11,96	10,93	11,45	0,73
		30	11,72	11,12	11,42	0,42
		MW	11,57	11,60		
		SD	0,94	0,69		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		379	360	370	13
	Darmsegmentlänge [cm]		2,5	1,4	2,0	0,8
	Zeit [min]	5	23,50	21,26	22,38	1,58
		10	19,61	22,89	21,25	2,32
		15	19,47	23,76	21,62	3,03
		20	21,62	20,92	21,27	0,49
		25	18,31	17,88	18,10	0,30
		30	19,10	20,57	19,84	1,04
		MW	20,27	21,22		
		SD	1,93	2,04		

B.1.1.2. **0,1 mM Baclofen: Effektive intestinale Baclofenbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon**

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		379	360	370	13
	Darmsegmentlänge [cm]		4,5	5,6	5,1	0,8
	Zeit [min]	5	26,85	25,87	25,37	1,78
		10	25,35	17,24	21,30	5,73
		15	17,30	19,29	18,30	1,41
		20	23,01	17,49	20,25	3,90
		25	24,84	24,96	24,90	0,08
		30	18,35	23,39	22,23	3,45
			MW	22,62	21,37	
		SD	3,92	3,84		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		379	360	370	13
	Darmsegmentlänge [cm]		3,9	3,9	3,9	0
	Zeit [min]	5	19,42	16,64	19,79	3,35
		10	18,12	19,39	18,76	0,90
		15	21,73	18,56	20,15	2,24
		20	23,40	17,23	20,23	4,36
		25	20,06	19,20	19,90	0,99
		30	23,30	16,40	19,85	4,88
			MW	21,01	17,90	
		SD	2,16	1,31		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		379	360	370	13
	Darmsegmentlänge [cm]		2,5	1,4	2,0	0,8
	Zeit [min]	5	39,69	34,49	37,09	3,68
		10	34,42	36,19	35,31	1,25
		15	39,41	35,18	37,30	2,99
		20	35,03	38,37	36,70	2,36
		25	36,44	38,98	37,71	1,80
		30	41,18	33,08	37,13	5,73
			MW	37,69	36,05	
		SD	2,77	2,28		

B.1.1.3. 0,5 mM Baclofen: Effektive intestinale Baclofenbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		379	360	370	13
	Darmsegmentlänge [cm]		4,5	5,6	5,1	0,8
	Zeit [min]	5	32,20	24,93	28,57	5,14
		10	24,94	24,12	24,53	0,58
		15	24,51	24,32	24,42	0,13
		20	26,63	22,56	24,60	2,88
		25	26,16	24,85	25,51	0,93
		30	28,18	23,90	26,04	3,03
			MW	27,10	24,11	
		SD	2,82	0,86		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		379	360	370	13
	Darmsegmentlänge [cm]		3,9	3,9	3,9	0
	Zeit [min]	5	26,70	24,60	25,65	1,48
		10	25,02	24,21	24,62	0,57
		15	24,36	23,48	23,92	0,62
		20	25,17	23,26	24,22	1,35
		25	22,32	22,15	22,24	0,12
		30	22,72	20,57	21,65	1,52
			MW	24,38	23,00	
		SD	1,64	1,65		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		379	360	370	13
	Darmsegmentlänge [cm]		2,5	1,4	2,0	0,8
	Zeit [min]	5	36,59	38,83	37,71	1,58
		10	39,17	34,93	37,05	3,00
		15	36,65	42,26	39,46	3,97
		20	44,91	39,94	42,43	3,51
		25	46,42	42,26	44,34	2,94
		30	40,98	36,55	38,77	3,13
			MW	41,11	39,13	
		SD	4,56	2,99		

B.1.2. Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die effektive intestinale Baclofenpermeabilität

B.1.2.1. Baclofen ohne Inhibitor: Effektive intestinale Baclofenbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	333	300	280	284	299	24,1	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,6	6,0	6,9	8,1	6,2	1,9	
	Zeit [min]	5	29,57	21,58	24,98	23,64	24,94	3,39
		10	26,91	22,79	23,51	21,30	23,63	2,37
		15	26,86	23,28	25,12	25,73	25,25	1,50
		20	24,61	22,31	30,04	23,69	25,16	3,39
		25	25,89	21,23	24,57	24,81	24,13	2,01
		30	27,42	20,52	23,19	23,11	23,56	2,86
		MW	26,88	21,95	25,24	23,71		
		SD	1,65	1,03	2,48	1,51		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	333	300	280	284	299	24,1	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,4	4,9	5,1	9,1	5,9	2,2	
	Zeit [min]	5	28,13	27,32	23,10	21,95	25,13	3,06
		10	29,02	25,87	23,85	28,92	26,92	2,51
		15	26,90	29,12	19,10	22,21	24,33	4,52
		20	22,91	25,69	23,61	21,93	23,54	1,59
		25	24,83	25,41	21,83	22,64	23,68	1,71
		30	27,61	29,85	24,27	18,50	25,06	4,94
		MW	26,57	27,21	22,63	22,69		
		SD	2,28	1,90	1,92	3,40		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	333	300	280	284	299	24,1	
	Darmsegmentlänge [cm]	2,1	2,7	3,9	2,6	2,8	0,8	
	Zeit [min]	5	31,74	38,35	35,75	36,89	35,68	2,84
		10	39,76	39,70	28,85	39,87	37,05	5,46
		15	39,01	34,93	28,08	37,84	34,97	4,90
		20	40,38	32,73	40,23	42,26	38,90	4,22
		25	28,63	37,94	35,28	33,74	33,90	3,92
		30	36,85	38,94	40,56	41,30	39,41	1,97
		MW	36,06	37,10	34,79	38,65		
		SD	4,81	2,69	5,37	3,14		

B.1.2.2. Baclofen mit Taurin: Einfluss von Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) auf die effektive intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	297	338	355	350	335	26,3	
	Darmsegmentlänge [cm]	8,0	6,7	6,9	7,8	7,4	0,6	
	Zeit [min]	5	5,24	5,76	5,06	4,65	5,18	0,46
		10	4,75	4,98	4,79	4,71	4,81	0,12
		15	3,50	4,95	4,14	5,70	4,57	0,96
		20	5,28	3,99	4,37	4,75	4,60	0,55
		25	4,74	4,72	4,51	4,50	4,62	0,13
		30	5,07	5,37	4,36	4,48	4,82	0,48
		MW	4,76	4,96	4,54	4,80		
		SD	0,66	0,60	0,33	0,46		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	297	338	355	350	335	26,3	
	Darmsegmentlänge [cm]	5,7	4,9	4,9	4,7	5,1	0,4	
	Zeit [min]	5	4,17	4,21	5,28	4,98	4,66	0,56
		10	5,47	4,61	3,55	4,25	4,47	0,80
		15	3,93	5,37	6,48	4,62	5,10	1,09
		20	5,14	4,67	5,28	4,79	4,97	0,29
		25	4,55	5,63	5,62	5,29	5,27	0,51
		30	4,85	5,62	3,78	5,46	4,93	0,83
		MW	4,69	5,02	5,00	4,90		
		SD	5,85	0,60	1,13	0,44		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	297	338	355	350	335	26,3	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,4	3,2	2,7	2,1	2,9	0,6	
	Zeit [min]	5	4,66	4,89	4,96	4,32	4,71	0,29
		10	5,89	4,55	5,42	4,92	5,20	0,58
		15	5,89	5,38	6,65	4,71	5,65	0,83
		20	6,41	4,56	4,22	4,71	4,98	0,98
		25	4,75	6,06	5,33	5,39	5,38	0,54
		30	6,04	6,09	5,09	4,56	5,45	0,75
		MW	5,61	5,26	5,28	4,77		
		SD	0,07	0,70	0,80	0,36		

B.1.2.3. Baclofen mit Coffein: Einfluss von Coffein (30 mg/dl; 0,6 mM) auf die effektive intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]					SD
			Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	
	Tiergewicht [g]		366	385	367	335	363	20,8
	Darmsegmentlänge [cm]		6,3	7,8	6,2	6,8	6,8	0,7
	Zeit [min]	5	10,23	10,46	10,88	11,56	10,78	0,58
		10	12,59	10,95	11,25	11,36	11,54	0,72
		15	10,33	11,19	10,72	9,29	10,38	0,81
		20	13,09	11,58	10,14	11,01	11,46	1,24
		25	9,90	12,05	11,18	10,43	10,89	0,93
		30	13,03	10,99	9,04	13,26	11,58	1,98
	MW		11,53	11,20	10,53	11,15		
	SD		1,52	0,55	0,83	1,32		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]					SD
			Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	
	Tiergewicht [g]		366	385	367	335	363	20,8
	Darmsegmentlänge [cm]		5,2	4,9	4,1	4,4	4,7	0,5
	Zeit [min]	5	11,00	11,52	10,14	11,46	11,03	0,64
		10	11,82	12,00	11,74	11,63	11,80	0,16
		15	12,65	10,92	10,69	10,94	11,30	0,91
		20	12,65	11,21	11,68	11,87	11,85	0,60
		25	11,52	12,65	11,76	10,99	11,73	0,69
		30	11,04	10,20	11,44	11,82	11,13	0,69
	MW		11,78	11,42	11,24	11,45		
	SD		0,74	0,86	0,67	0,40		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]					SD
			Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	
	Tiergewicht [g]		366	385	367	335	363	20,8
	Darmsegmentlänge [cm]		2,7	1,7	1,5	1,3	1,8	0,6
	Zeit [min]	5	20,97	23,12	23,25	27,05	23,60	2,53
		10	30,15	23,25	23,09	23,89	25,10	3,39
		15	22,23	26,47	27,70	23,80	25,05	2,49
		20	24,17	22,05	23,22	23,57	23,25	0,89
		25	27,68	22,47	20,40	21,42	22,99	3,24
		30	22,99	23,28	27,55	24,84	24,67	2,09
	MW		24,70	23,44	24,20	24,09		
	SD		3,52	1,56	2,86	1,84		

B.1.2.4. Baclofen mit Taurin und Coffein: Einfluss einer Mischung von Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) und Coffein (30 mg/dl; 0,6 mM) auf die effektive intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	333	300	280	284	299	24,1	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,6	6,0	6,9	8,1	6,2	1,9	
	Zeit [min]	5	2,52	4,40	2,46	2,60	3,00	0,94
		10	2,37	2,20	3,35	2,39	2,58	0,52
		15	2,51	2,46	2,89	2,16	2,51	0,30
		20	1,39	2,85	2,53	2,82	2,40	0,69
		25	1,82	4,19	2,14	2,23	2,60	1,08
		30	2,22	3,03	1,85	1,84	2,24	0,56
		MW	2,14	3,19	2,54	2,34		
		SD	0,45	0,91	0,53	0,34		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	333	300	280	284	299	24,1	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,4	4,9	5,1	9,1	5,9	2,2	
	Zeit [min]	5	2,99	2,83	1,82	2,18	2,46	0,55
		10	2,55	3,66	3,02	2,07	2,83	0,68
		15	3,18	2,25	2,86	2,48	2,69	0,41
		20	2,53	2,82	2,53	2,13	2,50	0,28
		25	2,66	3,12	2,13	2,40	2,58	0,42
		30	4,62	2,73	1,73	2,38	2,87	1,24
		MW	3,09	2,90	2,35	2,27		
		SD	0,79	0,47	0,54	0,17		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	333	300	280	284	299	24,1	
	Darmsegmentlänge [cm]	2,1	2,7	3,9	2,6	2,8	0,8	
	Zeit [min]	5	2,69	3,20	2,68	2,53	2,78	0,29
		10	3,17	2,61	2,59	2,45	2,71	0,32
		15	2,02	2,74	2,40	2,72	2,47	0,34
		20	3,21	3,17	2,31	2,28	2,74	0,52
		25	3,16	2,86	2,18	2,77	2,74	0,41
		30	2,49	2,40	2,29	2,73	2,48	0,19
		MW	2,79	2,83	2,41	2,58		
		SD	0,48	0,31	0,19	0,19		

B.1.2.5. Baclofen mit neutralisiertem Energy Drink: Einfluss eines neutralisierten (pH 7,0) Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks (Taurin: 400 mg/dl, 32,0 mM; Coffein: 30 mg/dl, 0,6 mM) auf die effektive intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	410	386	372	349	379	25,6	
	Darmsegmentlänge [cm]	7,7	6,9	6,1	6,7	6,9	0,7	
	Zeit [min]	5	3,10	3,06	3,02	3,74	3,23	0,34
		10	4,01	3,63	3,31	3,71	3,67	0,29
		15	3,87	3,59	3,35	2,92	3,43	0,40
		20	3,83	2,69	4,64	3,28	3,61	0,83
		25	3,69	3,44	3,17	3,15	3,36	0,26
		30	3,10	2,90	3,49	2,97	3,12	0,26
		MW	3,60	3,22	3,50	3,30		
		SD	0,41	0,39	0,59	0,36		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	410	386	372	349	379	25,6	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,2	4,8	5,1	4,0	4,5	0,5	
	Zeit [min]	5	3,76	2,82	3,31	3,32	3,30	0,38
		10	3,21	3,21	3,33	3,36	3,28	0,08
		15	3,68	2,21	2,78	4,15	3,21	0,87
		20	3,09	2,80	3,69	3,70	3,32	0,45
		25	3,47	3,26	3,48	3,38	3,40	0,10
		30	3,28	4,21	3,92	4,25	3,92	0,45
		MW	3,41	3,08	3,42	3,69		
		SD	0,27	0,67	0,39	0,42		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	410	386	372	349	379	25,6	
	Darmsegmentlänge [cm]	2,0	1,8	1,6	2,0	1,9	0,2	
	Zeit [min]	5	2,81	3,04	3,05	2,89	2,95	0,12
		10	2,93	3,15	3,95	3,34	3,34	0,44
		15	3,03	3,56	3,08	3,33	3,25	0,24
		20	3,25	2,71	3,78	3,76	3,38	0,51
		25	3,18	3,12	3,19	3,30	3,20	0,08
		30	3,50	3,17	3,45	3,22	3,34	0,16
		MW	3,12	3,13	3,42	3,31		
		SD	0,25	0,27	0,38	0,28		

B.1.2.6. Baclofen mit nicht neutralisiertem Energy Drink: Einfluss eines nicht neutralisierten (pH 3,1) Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks (Taurin: 400 mg/dl, 32,0 mM; Coffein: 30 mg/dl, 0,6 mM) auf die effektive intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	410	386	372	349	379	25,6	
	Darmsegmentlänge [cm]	7,7	6,9	6,1	6,7	6,9	0,7	
	Zeit [min]	5	4,01	1,88	2,63	3,12	2,91	0,89
		10	5,17	3,55	3,89	2,02	3,66	1,30
		15	5,72	9,40	4,57	3,10	5,70	2,69
		20	10,44	20,27	4,62	3,74	9,77	7,61
		25	11,73	16,99	5,18	3,67	9,39	6,16
		30	15,05	16,28	7,09	4,05	10,62	5,98
		MW	8,69	11,40	4,66	3,28		
		SD	4,38	7,62	1,48	0,72		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	410	386	372	349	379	25,6	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,2	4,8	5,1	4,0	4,5	0,5	
	Zeit [min]	5	2,91	1,92	2,10	2,49	2,36	0,44
		10	4,83	1,83	3,69	2,88	3,31	1,27
		15	7,80	5,96	4,97	3,64	5,59	1,75
		20	12,41	10,89	3,98	4,09	7,84	4,44
		25	11,25	15,19	4,62	3,42	8,62	5,57
		30	7,73	21,19	3,36	2,46	8,69	8,65
		MW	7,82	9,49	3,79	3,17		
		SD	3,63	7,74	1,02	0,66		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	410	386	372	349	379	25,6	
	Darmsegmentlänge [cm]	2,0	1,8	1,6	2,0	1,9	0,2	
	Zeit [min]	5	2,94	3,09	2,98	3,43	3,11	0,22
		10	6,22	4,62	2,50	3,86	4,30	1,55
		15	9,26	11,03	3,67	5,22	7,30	3,43
		20	11,64	13,51	4,63	5,29	8,77	4,47
		25	13,92	16,72	4,86	5,36	10,22	6,01
		30	7,96	17,82	3,00	5,21	8,50	6,54
		MW	8,66	11,13	3,61	4,73		
		SD	3,90	6,14	0,96	0,85		

B.1.2.7. **Baclofen mit Creatin:** Einfluss von Creatin auf die effektive intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

B.1.2.7.1. **Baclofen ohne Inhibitor:** Effektive intestinale Baclofenbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	280	301	291	14,8	
	Darmsegmentlänge [cm]	5,1	6,3	5,7	0,8	
	Zeit [min]	5	23,72	21,17	22,45	1,80
		10	21,29	23,35	22,32	1,46
		15	19,87	19,43	19,65	0,31
		20	20,04	18,98	19,51	0,75
		25	20,28	22,05	21,17	1,25
		30	23,67	21,56	22,62	1,49
		MW	21,48	21,09		
		SD	1,79	1,64		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	280	301	291	14,8	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,7	4,3	4,0	0,4	
	Zeit [min]	5	21,61	18,65	20,13	2,09
		10	17,00	19,09	18,05	1,48
		15	22,22	21,33	21,78	0,63
		20	23,92	20,76	22,34	2,23
		25	25,71	21,88	23,80	2,71
		30	20,52	23,78	22,15	2,31
		MW	21,83	20,92		
		SD	2,99	1,89		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	280	301	291	14,8	
	Darmsegmentlänge [cm]	1,9	2,5	2,2	0,4	
	Zeit [min]	5	33,19	31,22	32,21	1,39
		10	34,87	29,76	32,32	3,61
		15	31,68	33,56	32,62	1,33
		20	30,95	32,90	31,93	1,38
		25	33,20	29,28	31,24	2,77
		30	29,03	32,22	30,63	2,26
		MW	32,15	31,49		
		SD	2,05	1,72		

B.1.2.7.2. **Baclofen mit Creatin:** Einfluss von Creatin (100 mg/dl; **7,6 mM**) auf die effektive intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		280	301	291	14,8
	Darmsegmentlänge [cm]		5,1	6,3	5,7	0,8
	Zeit [min]	5	4,84	6,22	5,53	0,98
		10	7,66	7,09	7,38	0,40
		15	7,35	5,86	6,61	1,05
		20	6,10	4,99	5,55	0,78
		25	7,86	7,55	7,71	0,22
		30	5,07	6,63	5,85	1,10
			MW	6,48	6,39	
		SD	1,33	0,91		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		280	301	291	14,8
	Darmsegmentlänge [cm]		3,7	4,3	4,0	0,4
	Zeit [min]	5	5,07	7,11	6,09	1,44
		10	6,34	6,84	6,59	0,35
		15	7,38	5,43	6,41	1,38
		20	5,71	6,33	6,02	0,44
		25	5,83	6,10	5,97	0,19
		30	5,56	5,31	5,44	0,18
			MW	5,98	6,19	
		SD	0,80	0,73		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		280	301	291	14,8
	Darmsegmentlänge [cm]		1,9	2,5	2,2	0,4
	Zeit [min]	5	11,63	13,27	12,45	1,16
		10	11,21	11,76	11,49	0,39
		15	13,91	12,34	13,13	1,11
		20	14,35	12,98	13,67	0,97
		25	12,69	11,58	12,14	0,78
		30	11,26	12,84	12,05	1,12
			MW	12,51	12,46	
		SD	1,37	0,69		

B.1.2.7.3. **Baclofen mit Creatin:** Einfluss von Creatin (1000 mg/dl; **76,3 mM**) auf die effektive intestinale Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		280	301	291	14,8
	Darmsegmentlänge [cm]		5,1	6,3	5,7	0,8
	Zeit [min]	5	4,93	5,63	5,28	0,49
		10	6,76	4,89	5,83	1,32
		15	5,25	6,22	5,74	0,69
		20	4,86	5,43	5,15	0,40
		25	5,60	6,11	5,86	0,36
		30	6,33	5,43	5,88	0,64
		MW	5,62	5,62		
		SD	0,77	0,49		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		280	301	291	14,8
	Darmsegmentlänge [cm]		3,7	4,3	4,0	0,4
	Zeit [min]	5	5,28	5,11	5,20	0,12
		10	5,57	6,43	6,00	0,61
		15	5,05	4,87	4,96	0,13
		20	6,44	5,87	6,16	0,40
		25	5,94	5,32	5,63	0,44
		30	6,61	6,39	6,50	0,16
		MW	5,82	5,67		
		SD	0,63	0,67		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		280	301	291	14,8
	Darmsegmentlänge [cm]		1,9	2,5	2,2	0,4
	Zeit [min]	5	14,38	13,21	13,80	0,83
		10	12,27	14,65	13,46	1,68
		15	10,55	12,43	11,49	1,33
		20	12,35	13,76	13,06	1,00
		25	13,48	12,78	13,13	0,49
		30	11,80	11,65	11,73	0,11
		MW	12,47	13,08		
		SD	1,33	1,05		

B.1.3. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der effektiven intestinalen Baclofenpermeabilität von der Taurinkonzentration im Perfusat

B.1.3.1. *Baclofen mit Taurin: Effektive intestinale Baclofenpermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon nach Zusatz von 50 mg/dl Taurin (4,0 mM) bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen*

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	372	340	356	22,6	
	Darmsegmentlänge [cm]	6,4	6,0	6,2	0,3	
	Zeit [min]	5	16,14	16,50	16,32	0,25
		10	15,71	17,01	16,36	0,92
		15	14,94	18,27	16,61	2,35
		20	17,04	15,36	16,20	1,19
		25	19,93	17,45	18,69	1,75
		30	16,51	20,13	18,32	2,56
		MW	16,71	17,45		
		SD	1,73	1,63		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	372	340	356	22,6	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,8	4,3	4,6	0,4	
	Zeit [min]	5	15,93	16,44	16,19	0,36
		10	15,20	15,55	15,38	0,25
		15	15,38	16,78	16,08	0,99
		20	16,17	18,08	17,13	1,35
		25	16,64	15,19	15,92	1,03
		30	16,18	16,72	16,45	0,38
		MW	15,92	16,46		
		SD	0,54	1,02		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	372	340	356	22,6	
	Darmsegmentlänge [cm]	1,5	1,6	1,6	0,1	
	Zeit [min]	5	26,01	22,61	24,31	2,40
		10	22,88	24,61	23,75	1,22
		15	27,20	26,48	26,84	0,51
		20	22,55	25,95	24,25	2,40
		25	25,58	22,51	24,05	2,17
		30	24,13	22,85	23,49	0,91
		MW	24,73	24,17		
		SD	1,84	1,77		

B.1.3.2. **Baclofen mit Taurin:** Effektive intestinale Baclofenpermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon nach Zusatz von 100 mg/dl Taurin (8,0 mM) bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		372	340	356	22,6
	Darmsegmentlänge [cm]		6,4	6,0	6,2	0,3
	Zeit [min]	5	7,72	6,20	6,96	1,07
		10	5,55	6,73	6,14	0,83
		15	7,11	6,06	6,59	0,74
		20	5,53	6,38	5,96	0,60
		25	4,95	6,84	5,90	1,34
		30	5,87	6,37	6,12	0,35
			MW	6,12	6,43	
		SD	1,06	0,30		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		372	340	356	22,6
	Darmsegmentlänge [cm]		4,8	4,3	4,6	0,4
	Zeit [min]	5	7,48	6,03	6,76	1,03
		10	6,33	7,47	6,90	0,81
		15	5,83	7,01	6,42	0,83
		20	7,32	6,47	6,90	0,60
		25	6,49	6,77	6,63	0,20
		30	7,17	6,74	6,96	0,30
			MW	6,77	6,75	
		SD	0,65	0,49		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		372	340	356	22,6
	Darmsegmentlänge [cm]		1,5	1,6	1,6	0,1
	Zeit [min]	5	11,17	11,43	11,30	0,18
		10	12,91	11,27	12,09	1,16
		15	10,98	10,51	10,75	0,33
		20	10,82	12,16	11,49	0,95
		25	9,85	10,49	10,17	0,45
		30	11,09	11,34	11,22	0,18
			MW	11,14	11,20	
		SD	0,99	0,63		

B.1.3.3. Baclofen mit Taurin: Effektive intestinale Baclofenpermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon nach Zusatz von 200 mg/dl Taurin (16,0 mM) bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Baclofen

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		372	340	356	22,6
	Darmsegmentlänge [cm]		6,4	6,0	6,2	0,3
	Zeit [min]	5	3,51	1,91	2,71	1,13
		10	3,10	2,64	2,87	0,33
		15	3,49	3,13	3,31	0,25
		20	2,43	3,36	2,90	0,66
		25	3,13	2,67	2,90	0,33
		30	3,65	2,81	3,23	0,59
			MW	3,22	2,75	
		SD	0,44	0,50		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		372	340	356	22,6
	Darmsegmentlänge [cm]		4,8	4,3	4,6	0,4
	Zeit [min]	5	3,09	3,03	3,06	0,04
		10	2,63	3,34	2,99	0,50
		15	2,98	2,45	2,72	0,37
		20	2,74	3,10	2,92	0,25
		25	2,67	2,46	2,57	0,15
		30	2,17	2,91	2,54	0,52
			MW	2,71	2,88	
		SD	0,32	0,36		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		372	340	356	22,6
	Darmsegmentlänge [cm]		1,5	1,6	1,6	0,1
	Zeit [min]	5	2,91	3,26	3,09	0,25
		10	3,92	3,96	3,94	0,03
		15	3,52	2,88	3,20	0,45
		20	3,01	3,74	3,38	0,52
		25	3,09	2,87	2,98	0,16
		30	3,14	3,45	3,30	0,22
			MW	3,27	3,36	
		SD	0,38	0,45		

B.1.4. Stereochemische Aspekte bei der effektiven Baclofenpermeabilität: Intestinale Permeabilitäten der Baclofenenantiomeren im Vergleich zum Razemat

B.1.4.1. Effektive intestinale Permeabilitäten von (+)-Baclofen

B.1.4.1.1. (+)-Baclofen ohne Inhibitor: Effektive intestinale Permeabilitäten von (+)-Baclofen im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,05 mM (+)-Baclofen

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	322	359	341	26,2	
	Darmsegmentlänge [cm]	6,2	5,9	6,1	0,2	
	Zeit [min]	5	11,40	10,51	10,96	0,63
		10	12,30	10,29	11,30	1,42
		15	10,94	10,40	10,67	0,38
		20	12,05	10,86	11,46	0,84
		25	11,60	12,07	11,84	0,33
		30	12,94	11,68	12,31	0,89
		MW	11,87	10,97		
	SD	0,71	0,74			

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	322	359	341	26,2	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,8	3,6	4,2	0,8	
	Zeit [min]	5	11,74	11,21	11,48	0,37
		10	12,28	11,57	11,93	0,50
		15	12,49	11,20	11,85	0,91
		20	10,78	10,32	10,55	0,33
		25	11,12	10,67	10,90	0,32
		30	12,12	10,58	11,35	1,09
		MW	11,76	10,93		
	SD	0,68	0,47			

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	322	359	341	26,2	
	Darmsegmentlänge [cm]	1,6	2,1	1,9	0,4	
	Zeit [min]	5	19,76	18,91	19,34	0,60
		10	21,67	20,41	21,04	0,89
		15	19,86	16,97	18,42	2,04
		20	21,27	18,82	20,05	1,73
		25	23,42	17,19	20,31	4,41
		30	20,75	21,60	21,18	0,60
		MW	21,12	18,98		
	SD	1,36	1,80			

B.1.4.1.2. **(+)-Baclofen mit Taurin:** Einfluss von Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) auf die effektive intestinale (+)-Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,05 mM (+)-Baclofen

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		322	359	341	26,2
	Darmsegmentlänge [cm]		6,2	5,9	6,1	0,2
	Zeit [min]	5	3,27	3,05	3,16	0,16
		10	2,75	3,39	3,07	0,45
		15	2,79	3,30	3,05	0,36
		20	2,95	3,57	3,26	0,44
		25	2,83	2,93	2,88	0,07
		30	3,56	2,80	3,18	0,54
			MW	3,02	3,17	
		SD	0,32	0,29		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		322	359	341	26,2
	Darmsegmentlänge [cm]		4,8	3,6	4,2	0,8
	Zeit [min]	5	3,30	3,36	3,33	0,04
		10	3,32	3,19	3,26	0,09
		15	2,74	3,08	2,91	0,24
		20	3,79	2,76	3,28	0,73
		25	3,27	2,83	3,05	0,31
		30	2,83	2,80	2,82	0,02
			MW	3,21	3,00	
		SD	0,38	0,24		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		322	359	341	26,2
	Darmsegmentlänge [cm]		1,6	2,1	1,9	0,4
	Zeit [min]	5	4,32	4,38	4,35	0,04
		10	4,59	4,06	4,33	0,37
		15	3,30	5,09	4,20	1,27
		20	3,72	4,20	3,96	0,34
		25	3,24	3,93	3,59	0,49
		30	4,57	5,09	4,83	0,37
			MW	3,96	4,46	
		SD	0,62	0,51		

B.1.4.2. Effektive intestinale Permeabilitäten von (-)-Baclofen

B.1.4.2.1. (-)-Baclofen ohne Inhibitor: Effektive intestinale Permeabilitäten von (-)-Baclofen im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,05 mM (-)-Baclofen

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	348	406	370	41,0	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,7	6,2	5,5	1,1	
	Zeit [min]	5	10,49	9,74	10,12	0,53
		10	11,72	11,21	11,47	0,36
		15	11,20	9,48	10,34	1,22
		20	10,03	9,93	9,98	0,07
		25	10,69	11,43	11,06	0,52
		30	10,54	8,29	9,42	1,59
		MW	10,80	10,01		
		SD	0,60	1,16		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	348	406	370	41,0	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,7	4,3	4,5	0,3	
	Zeit [min]	5	10,47	11,54	11,01	0,76
		10	10,79	10,39	10,59	0,28
		15	9,52	9,69	9,61	0,12
		20	11,47	10,75	11,11	0,51
		25	9,93	10,96	10,45	0,73
		30	10,01	11,17	10,59	0,82
		MW	10,37	10,75		
		SD	0,70	0,65		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	348	406	377	41,0	
	Darmsegmentlänge [cm]	2,0	2,9	2,5	0,6	
	Zeit [min]	5	21,00	18,25	19,63	1,94
		10	20,82	15,95	18,39	3,44
		15	22,90	17,84	20,37	3,58
		20	22,60	17,03	19,82	3,94
		25	20,01	19,25	19,63	0,54
		30	19,20	20,32	19,76	0,79
		MW	21,14	18,11		
		SD	1,60	1,56		

B.1.4.2.2. **(-)-Baclofen mit Taurin:** Einfluss von Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) auf die effektive intestinale (-)-Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,05 mM (-)-Baclofen

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			SD
			Ratte 1	Ratte 2	MW	
	Tiergewicht [g]		348	406	377	41,0
	Darmsegmentlänge [cm]		4,7	6,2	5,5	1,1
	Zeit [min]	5	3,55	2,98	3,27	0,40
		10	3,45	2,69	3,07	0,54
		15	3,13	3,19	3,16	0,04
		20	3,16	2,77	2,97	0,28
		25	2,85	2,36	2,61	0,35
		30	3,74	2,55	3,15	0,84
			MW	3,31	2,76	
		SD	0,32	0,30		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			SD
			Ratte 1	Ratte 2	MW	
	Tiergewicht [g]		348	406	377	41,0
	Darmsegmentlänge [cm]		4,7	4,3	4,5	0,3
	Zeit [min]	5	2,99	3,31	3,15	0,23
		10	3,08	3,43	3,26	0,25
		15	3,79	2,36	3,08	1,01
		20	4,45	2,87	3,66	1,12
		25	3,20	2,46	2,83	0,52
		30	3,80	3,01	3,41	0,56
			MW	3,55	2,91	
		SD	0,56	0,44		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			SD
			Ratte 1	Ratte 2	MW	
	Tiergewicht [g]		348	406	377	41,0
	Darmsegmentlänge [cm]		2,0	2,9	2,5	0,6
	Zeit [min]	5	4,83	4,51	4,67	0,23
		10	4,38	3,84	4,11	0,38
		15	3,93	4,71	4,32	0,55
		20	4,66	4,26	4,46	0,28
		25	4,93	4,43	4,68	0,35
		30	4,35	4,36	4,36	0,01
			MW	4,51	4,35	
		SD	0,37	0,29		

B.1.4.3. Effektive intestinale Permeabilitäten von rac-Baclofen

B.1.4.3.1. **rac-Baclofen ohne Inhibitor:** Effektive intestinale Permeabilitäten von rac-Baclofen im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,05 mM rac-Baclofen

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	380	357	369	16,3	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,6	5,7	5,2	0,8	
	Zeit [min]	5	10,79	11,81	11,30	0,72
		10	12,02	10,62	11,32	0,99
		15	12,07	12,45	12,26	0,27
		20	12,01	11,39	11,70	0,44
		25	12,27	10,72	11,50	1,10
		30	10,81	11,98	11,40	0,83
		MW	11,66	11,50		
		SD	0,67	0,72		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	380	357	369	16,3	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,7	3,4	3,6	0,2	
	Zeit [min]	5	11,90	10,62	11,26	0,91
		10	11,41	11,92	11,67	0,36
		15	11,56	9,34	10,45	1,57
		20	9,77	11,35	10,56	1,12
		25	11,23	10,71	10,97	0,37
		30	10,59	11,01	10,80	0,30
		MW	11,08	10,83		
		SD	0,77	0,87		

		Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	380	357	369	16,3	
	Darmsegmentlänge [cm]	2,4	2,1	2,3	0,2	
	Zeit [min]	5	22,93	18,10	20,52	3,42
		10	22,07	21,02	21,55	0,74
		15	17,77	19,68	18,73	1,35
		20	23,44	22,24	22,84	0,85
		25	17,98	21,00	19,49	2,14
		30	18,31	19,39	18,85	0,76
		MW	20,42	20,24		
		SD	2,67	1,47		

B.1.4.3.2. **rac-Baclofen mit Taurin:** Einfluss von Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) auf die effektive intestinale rac-Baclofenpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,05 mM rac-Baclofen

Jejunum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		380	357	369	16,3
	Darmsegmentlänge [cm]		4,6	5,7	5,2	0,8
	Zeit [min]	5	2,85	3,01	2,93	0,11
		10	3,15	3,24	3,20	0,06
		15	3,02	2,87	2,95	0,11
		20	3,10	2,99	3,05	0,08
		25	3,39	3,16	3,28	0,16
		30	3,37	3,39	3,38	0,01
			MW	3,15	3,11	
		SD	0,21	0,19		

Ileum			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		380	357	369	16,3
	Darmsegmentlänge [cm]		3,7	3,4	3,6	0,2
	Zeit [min]	5	3,00	2,94	2,97	0,04
		10	3,76	3,19	3,48	0,40
		15	2,84	3,40	3,12	0,40
		20	3,11	3,24	3,18	0,09
		25	4,18	3,56	3,87	0,44
		30	3,71	3,49	3,60	0,16
			MW	3,43	3,30	
		SD	0,53	0,23		

Colon			Baclofen P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		380	357	369	16,3
	Darmsegmentlänge [cm]		2,4	2,1	2,3	0,2
	Zeit [min]	5	4,79	4,32	4,56	0,33
		10	3,91	4,01	3,96	0,07
		15	4,20	4,56	4,38	0,25
		20	4,00	3,78	3,89	0,16
		25	4,04	4,23	4,14	0,13
		30	4,18	3,99	4,09	0,13
			MW	4,19	4,15	
		SD	0,32	0,28		

B.2. In-situ-Perfusionen mit CGP 11.130, dem Fluoranalogen des Baclofens

B.2.1. CGP 11.130 ohne Inhibitor: Effektive intestinale Permeabilitäten von CGP 11.130 im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM CGP 11.130

Jejunum			CGP 11.130 P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		342	392	367	35,4
	Darmsegmentlänge [cm]		4,8	5,5	5,2	0,5
	Zeit [min]	5	13,66	14,73	14,20	0,76
		10	16,40	12,20	14,30	2,97
		15	13,71	14,53	14,12	0,58
		20	12,59	14,33	13,46	1,23
		25	14,84	14,14	14,49	0,49
		30	14,03	14,60	14,32	0,40
	MW		14,21	14,09		
	SD		1,30	0,95		

Ileum			CGP 11.130 P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		342	392	367	35,4
	Darmsegmentlänge [cm]		4,3	4,0	4,2	0,2
	Zeit [min]	5	13,35	15,03	14,19	1,19
		10	13,99	12,65	13,32	0,95
		15	15,44	11,63	13,54	2,69
		20	14,84	14,91	14,88	0,05
		25	12,70	13,28	12,99	0,41
		30	12,46	13,63	13,05	0,83
	MW		13,80	13,52		
	SD		1,18	1,31		

Colon			CGP 11.130 P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		342	392	367	35,4
	Darmsegmentlänge [cm]		2,1	2,9	2,5	0,6
	Zeit [min]	5	17,53	18,64	18,09	0,78
		10	18,86	21,55	20,21	1,90
		15	23,13	19,08	21,11	2,86
		20	19,24	20,46	19,85	0,86
		25	21,06	16,38	18,72	3,31
		30	20,62	21,24	20,93	0,44
	MW		20,07	19,56		
	SD		1,96	1,94		

B.2.2. CGP 11.130 mit Taurin: Einfluss von Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) auf die effektive intestinale CGP 11.130-Permeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM CGP 11.130

Jejunum			CGP 11.130 P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		342	392	367	35,4
	Darmsegmentlänge [cm]		4,8	5,5	5,2	0,5
	Zeit [min]	5	3,34	2,91	3,13	0,30
		10	4,02	4,10	4,06	0,06
		15	3,27	3,89	3,58	0,44
		20	3,68	3,97	3,83	0,21
		25	3,97	3,53	3,75	0,31
		30	3,50	2,98	3,24	0,37
		MW	3,63	3,56		
		SD	0,32	0,52		

Ileum			CGP 11.130 P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		342	392	367	35,4
	Darmsegmentlänge [cm]		4,3	4,0	4,2	0,2
	Zeit [min]	5	3,20	2,84	3,02	0,25
		10	2,87	3,74	3,31	0,62
		15	3,74	3,34	3,54	0,28
		20	4,31	3,23	3,77	0,76
		25	3,55	2,88	3,22	0,47
		30	4,00	3,67	3,84	0,23
		MW	3,61	3,28		
		SD	0,53	0,38		

Colon			CGP 11.130 P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		342	392	367	35,4
	Darmsegmentlänge [cm]		2,1	2,9	2,5	0,6
	Zeit [min]	5	4,11	4,06	4,09	0,04
		10	3,89	4,36	4,13	0,33
		15	3,93	4,49	4,21	0,40
		20	3,97	4,08	4,03	0,08
		25	4,33	4,49	4,41	0,11
		30	4,11	4,54	4,33	0,30
		MW	4,06	4,34		
		SD	0,16	0,21		

B.3. In-situ-Perfusionen mit Gabapentin

B.3.1. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der effektiven intestinalen Gabapentinpermeabilität

B.3.1.1. 0,05 mM Gabapentin: Effektive intestinale Gabapentinbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	300	352	326	36,8	
	Darmsegmentlänge [cm]	8,7	6,7	7,7	1,4	
	Zeit [min]	5	5,42	3,98	4,70	1,02
		10	6,58	4,56	5,57	1,43
		15	5,73	4,61	5,17	0,79
		20	4,30	5,32	4,81	0,72
		25	4,28	5,98	5,13	1,20
		30	4,52	5,21	4,87	0,49
		MW	5,14	4,94		
	SD	0,93	0,70			

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	300	352	326	36,8	
	Darmsegmentlänge [cm]	6,3	4,3	5,3	1,4	
	Zeit [min]	5	6,29	4,98	5,64	0,93
		10	5,30	5,27	5,29	0,02
		15	5,75	5,12	5,44	0,45
		20	6,06	5,93	6,00	0,09
		25	5,60	5,69	5,65	0,06
		30	6,27	6,13	6,20	0,10
		MW	5,88	5,51		
	SD	0,40	0,46			

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	300	352	326	36,8	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,2	2,1	2,7	0,8	
	Zeit [min]	5	13,31	11,15	12,23	1,53
		10	14,65	13,75	14,20	0,64
		15	13,92	12,09	13,01	1,29
		20	10,85	12,93	11,89	1,47
		25	12,68	13,32	13,00	0,45
		30	10,02	11,97	11,00	1,38
		MW	12,57	12,54		
	SD	1,80	0,97			

B.3.1.2. **0,1 mM Gabapentin: Effektive intestinale Gabapentinbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon**

Jejunum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		300	352	326	36,8
	Darmsegmentlänge [cm]		8,7	6,7	7,7	1,4
	Zeit [min]	5	9,57	11,23	10,40	1,17
		10	10,26	10,86	10,56	0,42
		15	10,57	9,34	9,96	0,87
		20	10,23	10,26	10,25	0,02
		25	9,34	10,28	9,81	0,66
		30	11,89	11,85	11,87	0,03
			MW	10,31	10,64	
		SD	0,90	0,87		

Ileum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		300	352	326	36,8
	Darmsegmentlänge [cm]		6,3	4,3	5,3	1,4
	Zeit [min]	5	10,89	9,83	10,36	0,75
		10	11,24	10,92	11,08	0,23
		15	10,32	11,24	10,78	0,65
		20	10,76	10,18	10,47	0,41
		25	10,35	10,76	10,56	0,29
		30	11,74	10,51	11,13	0,87
			MW	10,88	10,57	
		SD	0,54	0,51		

Colon			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		300	352	326	36,8
	Darmsegmentlänge [cm]		3,2	2,1	2,7	0,8
	Zeit [min]	5	22,03	20,89	21,46	0,81
		10	20,45	19,65	20,05	0,57
		15	18,98	21,34	20,16	1,67
		20	20,01	19,11	19,56	0,64
		25	18,65	20,77	19,71	1,50
		30	22,07	21,38	21,73	0,49
			MW	20,37	20,52	
		SD	1,46	0,93		

B.3.1.3. 0,5 mM Gabapentin: Effektive intestinale Gabapentinbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon

Jejunum			Gabapentin P _{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		300	352	326	36,8
	Darmsegmentlänge [cm]		8,7	6,7	7,7	1,4
	Zeit [min]	5	10,86	12,89	11,88	1,44
		10	11,90	13,10	12,50	0,85
		15	11,12	11,95	11,54	0,59
		20	12,23	14,23	13,23	1,41
		25	11,51	12,74	12,13	0,87
		30	13,01	12,43	12,72	0,41
		MW	11,77	12,89		
		SD	0,79	0,77		

Ileum			Gabapentin P _{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		300	352	326	36,8
	Darmsegmentlänge [cm]		6,3	4,3	5,3	1,4
	Zeit [min]	5	12,82	13,11	12,97	0,21
		10	11,09	13,95	12,52	2,02
		15	11,75	14,02	12,89	1,61
		20	12,39	12,74	12,57	0,25
		25	12,01	11,05	11,53	0,68
		30	12,82	13,73	13,28	0,64
		MW	12,15	13,10		
		SD	0,67	1,12		

Colon			Gabapentin P _{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		300	352	326	36,8
	Darmsegmentlänge [cm]		3,2	2,1	2,7	0,8
	Zeit [min]	5	23,78	21,47	22,63	1,63
		10	24,90	23,75	24,33	0,81
		15	21,12	24,35	22,74	2,28
		20	22,93	22,92	22,93	0,01
		25	23,06	23,90	23,48	0,59
		30	24,38	21,02	22,70	2,38
		MW	23,26	22,90		
		SD	1,33	1,37		

B.3.2. Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die effektive intestinale Gabapentinpermeabilität

B.3.2.1. Gabapentin ohne Inhibitor: Effektive intestinale Gabapentinbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	320	335	353	335	336	14	
	Darmsegmentlänge [cm]	10,1	6,0	7,0	5,8	7,2	2,0	
	Zeit [min]	5	10,89	9,98	9,98	9,35	10,05	0,63
		10	9,59	9,58	9,10	10,66	9,73	0,66
		15	10,63	9,52	10,88	9,68	10,18	0,68
		20	9,59	9,22	8,72	8,76	9,07	0,41
		25	9,27	8,92	9,60	10,53	9,58	0,69
		30	9,98	9,48	9,77	8,97	9,55	0,44
		MW	9,99	9,45	9,68	9,66		
		SD	0,64	0,36	0,75	0,79		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	320	335	353	335	336	14	
	Darmsegmentlänge [cm]	7,5	6,3	4,5	7,2	6,4	1,4	
	Zeit [min]	5	10,52	9,54	10,41	9,21	9,92	0,65
		10	11,63	10,14	10,32	10,05	10,54	0,74
		15	9,75	9,83	9,80	9,69	9,77	0,06
		20	11,09	9,76	11,05	9,73	10,41	0,77
		25	9,80	9,88	10,21	10,65	10,14	0,39
		30	10,00	11,41	10,85	9,32	10,40	0,92
		MW	10,46	10,09	10,44	9,78		
		SD	0,77	0,68	0,45	0,53		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	320	335	353	335	336	14	
	Darmsegmentlänge [cm]	2,0	2,6	2,2	1,4	2,1	0,5	
	Zeit [min]	5	20,87	17,51	21,86	18,30	19,64	2,06
		10	23,59	15,93	17,27	21,46	19,56	3,57
		15	22,53	19,61	21,80	20,32	21,07	1,34
		20	19,71	18,03	19,73	18,39	18,97	0,88
		25	20,46	17,92	20,28	18,68	19,34	1,24
		30	16,57	18,74	21,40	16,88	18,40	2,22
		MW	20,62	17,96	20,39	19,01		
		SD	2,44	1,24	1,75	1,63		

B.3.2.2. Gabapentin mit Taurin: Einfluss von Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) auf die effektive intestinale Gabapentinpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

Jejunum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]					SD
			Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	
	Tiergewicht [g]		320	335	353	335	336	14
	Darmsegmentlänge [cm]		10,1	6,0	7,0	5,8	7,2	2,0
	Zeit [min]	5	2,96	2,88	3,22	2,83	2,97	0,17
		10	3,60	3,42	2,83	3,00	3,21	0,36
		15	2,97	2,99	2,92	2,81	2,92	0,08
		20	3,08	3,18	2,79	3,00	3,01	0,17
		25	2,83	3,03	3,45	2,99	3,08	0,26
		30	3,29	3,67	2,76	3,19	3,23	0,37
		MW	3,12	3,19	3,00	2,97		
		SD	0,28	0,30	0,29	0,14		

Ileum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]					SD
			Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	
	Tiergewicht [g]		320	335	353	335	336	14
	Darmsegmentlänge [cm]		7,5	6,3	4,5	7,2	6,4	1,4
	Zeit [min]	5	3,57	3,05	3,04	3,29	3,24	0,25
		10	3,74	3,15	3,31	3,24	3,36	0,26
		15	3,75	2,94	3,01	3,00	3,18	0,38
		20	3,31	3,62	3,21	2,76	3,23	0,36
		25	3,40	3,03	3,01	3,18	3,16	0,18
		30	3,64	2,64	3,48	3,20	3,24	0,44
		MW	3,57	3,07	3,17	3,11		
		SD	0,18	0,32	0,19	0,20		

Colon			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]					SD
			Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	
	Tiergewicht [g]		320	335	353	335	336	14
	Darmsegmentlänge [cm]		2,0	2,6	2,2	1,4	2,1	0,5
	Zeit [min]	5	4,37	4,67	4,80	4,58	4,61	0,18
		10	4,88	4,45	4,44	4,59	4,59	0,21
		15	4,63	4,81	4,64	4,95	4,76	0,15
		20	4,05	4,50	4,94	4,34	4,46	0,37
		25	4,10	4,29	4,18	4,66	4,31	0,25
		30	4,89	4,95	4,68	4,69	4,80	0,14
		MW	4,48	4,61	4,61	4,63		
		SD	0,37	0,25	0,27	0,20		

B.3.2.3. Gabapentin mit Coffein: Einfluss von Coffein (30 mg/dl; 0,6 mM) auf die effektive intestinale Gabapentinpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	310	322	330	326	322	9	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,5	5,8	3,9	5,0	4,8	0,8	
	Zeit [min]	5	7,44	7,45	8,08	8,22	7,80	0,41
		10	8,94	8,01	9,01	7,99	8,49	0,56
		15	7,05	8,44	8,94	9,20	8,41	0,96
		20	8,76	7,90	8,89	9,42	8,74	0,63
		25	9,67	7,75	8,73	8,15	8,58	0,83
		30	7,83	7,57	8,31	6,82	7,63	0,62
		MW	8,28	7,85	8,30	8,30		
		SD	1,00	0,35	0,38	0,93		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	310	322	330	326	322	9	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,9	5,2	3,9	3,5	4,1	0,7	
	Zeit [min]	5	8,78	7,07	10,09	7,95	8,47	1,28
		10	7,21	7,46	8,53	8,29	7,87	0,64
		15	7,53	9,04	8,68	9,44	8,67	0,82
		20	9,23	7,69	8,90	6,68	8,13	1,17
		25	7,65	7,72	9,08	8,88	8,33	0,75
		30	8,23	7,81	7,15	8,76	7,99	0,68
		MW	8,10	7,80	8,74	8,33		
		SD	0,79	0,66	0,95	0,96		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	310	322	330	326	322	9	
	Darmsegmentlänge [cm]	2,1	2,3	2,2	2,2	2,2	0,1	
	Zeit [min]	5	14,14	13,79	13,87	10,93	13,18	1,51
		10	14,88	12,26	13,44	13,00	13,40	1,10
		15	14,09	12,73	13,33	13,79	13,49	0,59
		20	13,02	12,85	11,35	13,13	12,59	0,83
		25	11,81	13,65	12,85	12,79	12,78	0,75
		30	13,21	12,14	11,38	13,21	12,49	1,30
		MW	13,53	12,91	12,70	12,81		
		SD	1,08	0,69	1,09	0,98		

B.3.2.4. Gabapentin mit Taurin und Coffein: Einfluss einer Mischung von Taurin (400 mg/dl; 32,0 mM) und Coffein (30 mg/dl; 0,6 mM) auf die effektive intestinale Gabapentinpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	310	322	330	326	322	9	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,5	5,8	3,9	5,0	4,8	0,8	
	Zeit [min]	5	1,70	2,40	1,98	2,01	2,02	0,29
		10	1,85	1,88	3,35	3,30	2,60	0,84
		15	2,28	2,03	2,83	2,63	2,44	0,36
		20	1,85	2,30	2,21	1,54	1,98	0,35
		25	2,16	2,37	1,99	2,47	2,25	0,21
		30	2,25	2,16	1,52	2,57	2,13	0,44
		MW	2,02	2,19	2,31	2,41		
		SD	0,24	0,20	0,66	0,60		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	310	322	330	326	322	9	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,9	5,2	3,9	3,5	4,1	0,7	
	Zeit [min]	5	1,90	2,49	2,18	1,78	2,09	0,32
		10	2,18	1,87	2,19	3,03	2,32	0,50
		15	1,92	2,23	2,74	2,98	2,47	0,48
		20	1,87	2,32	1,89	2,41	2,12	0,28
		25	2,28	1,75	2,54	2,02	2,15	0,34
		30	2,41	2,44	2,26	2,10	2,30	0,16
		MW	2,09	2,18	2,30	2,39		
		SD	0,27	0,30	0,30	0,52		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	310	322	330	326	322	9	
	Darmsegmentlänge [cm]	2,1	2,3	2,2	2,2	2,2	0,1	
	Zeit [min]	5	3,62	3,40	2,69	2,96	3,17	0,42
		10	3,77	3,37	3,68	3,96	3,70	0,25
		15	3,45	4,42	3,30	3,43	3,65	0,52
		20	3,69	2,97	3,44	2,66	3,19	0,46
		25	2,91	3,52	2,36	2,96	2,94	0,47
		30	3,08	3,21	2,99	3,10	3,10	0,09
		MW	3,42	3,48	3,08	3,18		
		SD	0,35	0,50	0,49	0,46		

B.3.2.5. Gabapentin mit neutralisiertem Energy Drink: Einfluss eines neutralisierten (pH 7,0) Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks (Taurin: 400 mg/dl, 32,0 mM; Coffein: 30 mg/dl, 0,6 mM) auf die effektive intestinale Gabapentinpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	321	357	365	326	342	22	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,3	4,1	7,1	5,0	5,1	1,4	
	Zeit [min]	5	2,09	2,30	1,90	1,86	2,04	0,20
		10	2,02	2,16	1,84	1,84	1,97	0,16
		15	1,92	1,86	1,71	1,84	1,83	0,09
		20	2,01	1,84	2,03	1,93	1,95	0,09
		25	2,41	2,21	2,18	1,78	2,15	0,26
		30	2,29	1,79	1,91	2,16	2,04	0,23
		MW	2,12	2,03	1,93	1,90		
		SD	0,19	0,22	0,16	0,14		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	321	357	365	326	342	22	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,9	3,8	5,1	3,6	4,1	0,7	
	Zeit [min]	5	1,73	2,27	2,16	1,94	2,03	0,24
		10	1,92	1,90	1,88	2,26	1,99	0,18
		15	2,27	1,77	2,18	1,87	2,02	0,24
		20	1,98	2,31	2,08	1,83	2,05	0,20
		25	2,22	1,90	2,12	1,82	2,02	0,19
		30	1,82	1,91	1,97	2,13	1,96	0,13
		MW	1,99	2,01	2,07	1,98		
		SD	0,22	0,22	0,12	0,18		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	321	357	365	326	342	22	
	Darmsegmentlänge [cm]	1,7	1,6	2,4	2,0	1,9	0,4	
	Zeit [min]	5	3,65	4,10	3,83	3,92	3,88	0,19
		10	3,45	3,35	3,65	3,71	3,54	0,17
		15	3,60	3,72	2,92	3,78	3,51	0,40
		20	4,13	3,69	3,26	3,31	3,60	0,40
		25	3,62	3,59	3,37	3,79	3,59	0,17
		30	3,50	3,42	3,55	3,21	3,42	0,15
		MW	3,66	3,64	3,43	3,62		
		SD	0,24	0,27	0,32	0,29		

B.3.2.6. Gabapentin mit nicht neutralisiertem Energy Drink: Einfluss eines nicht neutralisierten (pH 3,1) Taurin- und Coffein-haltigen Energy Drinks (Taurin: 400 mg/dl, 32,0 mM; Coffein: 30 mg/dl, 0,6 mM) auf die effektive intestinale Gabapentinpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	321	357	365	326	342	22	
	Darmsegmentlänge [cm]	4,3	4,1	7,1	5,0	5,1	1,4	
	Zeit [min]	5	2,07	1,88	1,79	1,79	1,88	0,13
		10	2,46	2,09	2,27	1,84	2,17	0,26
		15	2,20	1,79	1,96	2,03	2,00	0,17
		20	1,80	2,16	1,73	1,74	1,86	0,20
		25	2,19	1,98	1,86	1,69	1,93	0,21
		30	1,86	1,57	1,70	2,24	1,84	0,29
		MW	2,10	1,91	1,88	1,89		
		SD	0,25	0,22	0,21	0,21		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	321	357	365	326	342	22	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,9	3,8	5,1	3,6	4,1	0,7	
	Zeit [min]	5	2,21	1,82	1,88	1,75	1,92	0,20
		10	1,84	2,39	2,02	2,15	2,10	0,23
		15	1,77	1,78	1,99	1,88	1,86	0,10
		20	1,82	2,34	1,85	2,21	2,06	0,26
		25	2,09	1,96	2,23	2,06	2,09	0,11
		30	2,07	1,92	2,35	2,03	2,09	0,18
		MW	1,97	2,03	2,04	2,01		
		SD	0,18	0,26	0,17	0,17		

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]						
		Ratte 1	Ratte 2	Ratte 3	Ratte 4	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	321	357	365	326	342	22	
	Darmsegmentlänge [cm]	1,7	1,6	2,4	2,0	1,9	0,4	
	Zeit [min]	5	3,61	3,61	3,52	3,48	3,56	0,07
		10	3,39	3,68	3,49	3,32	3,47	0,16
		15	3,77	3,56	4,07	3,57	3,74	0,24
		20	3,38	3,17	3,55	3,90	3,50	0,31
		25	3,83	3,17	3,41	3,52	3,48	0,27
		30	3,40	3,56	3,19	3,16	3,33	0,19
		MW	3,56	3,46	3,54	3,49		
		SD	0,20	0,22	0,29	0,25		

B.3.2.7. Gabapentin mit Creatin: Einfluss von Creatin auf die effektive intestinale Gabapentinpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

B.3.2.7.1. Gabapentin ohne Inhibitor: Effektive intestinale Gabapentinbasispermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM

		Gabapentin P _{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	293	305	299	8,5	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,1	4,6	3,9	1,1	
	Zeit [min]	5	11,02	10,35	10,69	0,47
		10	11,78	9,87	10,83	1,35
		15	8,73	10,87	9,80	1,51
		20	10,04	9,54	9,79	0,35
		25	9,47	9,23	9,35	0,17
		30	9,00	10,67	9,84	1,18
		MW	10,01	10,09		
		SD	1,19	0,65		

		Gabapentin P _{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	293	305	299	8,5	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,2	4,1	3,7	0,6	
	Zeit [min]	5	11,70	9,86	10,78	1,30
		10	8,42	10,65	9,54	1,58
		15	10,96	8,43	9,70	1,79
		20	8,85	10,21	9,53	0,96
		25	9,47	11,56	10,52	1,48
		30	10,06	9,33	9,70	0,52
		MW	9,91	10,01		
		SD	1,25	1,08		

		Gabapentin P _{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	293	305	299	8,5	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,2	2,5	2,9	0,50	
	Zeit [min]	5	18,84	19,65	19,25	0,57
		10	19,15	21,54	20,35	1,69
		15	21,04	19,03	20,04	1,42
		20	18,14	18,43	18,29	0,21
		25	18,94	18,32	18,63	0,44
		30	20,15	19,65	19,90	0,35
		MW	19,38	19,44		
		SD	1,04	1,18		

B.3.2.7.2. **Gabapentin mit Creatin:** Einfluss von Creatin (100 mg/dl; **7,6 mM**) auf die effektive intestinale Gabapentinpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

Jejunum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		293	305	299	8,5
	Darmsegmentlänge [cm]		3,1	4,6	3,9	1,1
	Zeit [min]	5	4,57	5,34	4,96	0,54
		10	5,88	4,87	5,38	0,71
		15	5,95	5,06	5,51	0,63
		20	5,78	6,32	6,05	0,38
		25	4,57	5,21	4,89	0,45
		30	5,03	5,38	5,21	0,25
			MW	5,30	5,36	
		SD	0,65	0,50		

Ileum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		293	305	299	8,5
	Darmsegmentlänge [cm]		3,2	4,1	3,7	0,6
	Zeit [min]	5	4,71	5,32	5,02	0,43
		10	4,73	5,89	5,31	0,82
		15	5,06	4,76	4,91	0,21
		20	5,77	5,32	5,55	0,32
		25	5,02	4,95	4,99	0,05
		30	4,81	5,67	5,24	0,61
			MW	5,02	5,32	
		SD	0,40	0,42		

Colon			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		293	305	299	8,5
	Darmsegmentlänge [cm]		3,2	2,5	2,9	0,50
	Zeit [min]	5	7,94	9,27	8,61	0,94
		10	9,40	8,45	8,93	0,67
		15	7,99	8,97	8,48	0,69
		20	9,17	8,21	8,69	0,68
		25	9,91	7,78	8,85	1,51
		30	7,37	8,76	8,07	0,98
			MW	8,63	8,57	
		SD	1,00	0,54		

B.3.2.7.3. **Gabapentin mit Creatin:** Einfluss von Creatin (1000 mg/dl; **76,3 mM**) auf die effektive intestinale Gabapentinpermeabilität im Jejunum, Ileum und Colon bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

Jejunum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		293	305	299	8,5
	Darmsegmentlänge [cm]		3,1	4,6	3,9	1,1
	Zeit [min]	5	4,29	5,28	4,79	0,70
		10	4,41	5,19	4,80	0,55
		15	5,35	4,46	4,91	0,63
		20	5,46	4,87	5,17	0,42
		25	5,38	4,78	5,08	0,42
		30	4,65	5,21	4,93	0,40
		MW	4,92	4,97		
		SD	0,53	0,32		

Ileum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		293	305	299	8,5
	Darmsegmentlänge [cm]		3,2	4,1	3,7	0,6
	Zeit [min]	5	5,97	5,21	5,59	0,54
		10	5,80	4,87	5,34	0,66
		15	5,21	4,98	5,10	0,16
		20	4,95	5,34	5,15	0,28
		25	4,89	5,62	5,26	0,52
		30	6,15	4,99	5,57	0,82
		MW	5,50	5,17		
		SD	0,55	0,28		

Colon			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		293	305	299	8,5
	Darmsegmentlänge [cm]		3,2	2,5	2,9	0,50
	Zeit [min]	5	7,59	7,23	7,41	0,25
		10	7,26	7,89	7,58	0,45
		15	7,15	8,24	7,70	0,77
		20	7,54	7,44	7,49	0,07
		25	7,09	7,65	7,37	0,40
		30	7,85	6,98	7,42	0,62
		MW	7,41	7,57		
		SD	0,30	0,46		

B.3.3. Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der effektiven intestinalen Gabapentinpermeabilität von der Taurinkonzentration im Perfusat

B.3.3.1. *Gabapentin mit Taurin: Effektive intestinale Gabapentinpermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon nach Zusatz von 50 mg/dl Taurin (4,0 mM) bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin*

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Jejunum	Tiergewicht [g]	405	352	379	37,5	
	Darmsegmentlänge [cm]	6,3	4,7	5,5	1,1	
	Zeit [min]	5	4,46	4,83	4,65	0,26
		10	4,80	4,38	4,59	0,30
		15	4,68	4,83	4,76	0,11
		20	4,97	5,16	5,07	0,13
		25	4,99	4,43	4,71	0,40
		30	5,04	4,50	4,77	0,38
		MW	4,82	4,69		
	SD	0,22	0,30			

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Ileum	Tiergewicht [g]	405	352	379	37,5	
	Darmsegmentlänge [cm]	3,3	3,0	3,2	0,2	
	Zeit [min]	5	5,45	4,33	4,89	0,79
		10	5,12	5,07	5,10	0,04
		15	4,65	4,95	4,80	0,21
		20	5,21	5,01	5,11	0,14
		25	5,17	4,65	4,91	0,37
		30	4,86	5,53	5,20	0,47
		MW	5,08	4,92		
	SD	0,28	0,41			

		Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]				
		Ratte 1	Ratte 2	MW	SD	
Colon	Tiergewicht [g]	405	352	379	37,5	
	Darmsegmentlänge [cm]	1,8	2,5	2,2	0,5	
	Zeit [min]	5	9,89	11,31	10,60	1,00
		10	10,51	10,26	10,39	0,18
		15	10,70	10,71	10,71	0,01
		20	10,78	10,03	10,41	0,53
		25	10,15	10,36	10,26	0,15
		30	10,73	9,28	10,01	1,03
		MW	10,46	10,33		
	SD	0,36	0,68			

B.3.3.2. Gabapentin mit Taurin: Effektive intestinale Gabapentinpermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon nach Zusatz von 100 mg/dl Taurin (8,0 mM) bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

Jejunum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		405	352	379	37,5
	Darmsegmentlänge [cm]		6,3	4,7	5,5	1,1
	Zeit [min]	5	4,07	3,88	3,98	0,13
		10	3,87	4,23	4,05	0,25
		15	4,28	4,39	4,34	0,08
		20	3,98	4,62	4,30	0,45
		25	3,83	4,01	3,92	0,13
		30	3,57	3,89	3,73	0,23
			MW	3,93	4,17	
		SD	0,24	0,30		

Ileum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		405	352	379	37,5
	Darmsegmentlänge [cm]		3,3	3,0	3,2	0,2
	Zeit [min]	5	3,70	3,96	3,83	0,18
		10	4,11	4,44	4,28	0,23
		15	4,29	4,10	4,20	0,13
		20	3,56	4,03	3,80	0,33
		25	3,94	3,96	3,95	0,01
		30	4,05	3,92	3,99	0,09
			MW	3,94	4,07	
		SD	0,27	0,20		

Colon			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		405	352	379	37,5
	Darmsegmentlänge [cm]		1,8	2,5	2,2	0,5
	Zeit [min]	5	5,22	5,52	5,37	0,21
		10	5,99	5,94	5,97	0,04
		15	5,80	5,60	5,70	0,14
		20	5,64	5,45	5,55	0,13
		25	5,45	6,17	5,81	0,51
		30	5,77	5,51	5,64	0,18
			MW	5,64	5,70	
		SD	0,28	0,29		

B.3.3.3. Gabapentin mit Taurin: Effektive intestinale Gabapentinpermeabilitäten im Jejunum, Ileum und Colon nach Zusatz von 200 mg/dl Taurin (16,0 mM) bei einer initialen Konzentration von 0,1 mM Gabapentin

Jejunum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		405	352	379	37,5
	Darmsegmentlänge [cm]		6,3	4,7	5,5	1,1
	Zeit [min]	5	3,34	3,56	3,45	0,16
		10	3,57	3,40	3,49	0,12
		15	3,20	3,12	3,16	0,06
		20	3,53	3,58	3,56	0,04
		25	3,07	3,23	3,15	0,11
		30	3,69	3,52	3,61	0,12
			MW	3,40	3,40	
		SD	0,24	0,19		

Ileum			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		405	352	379	37,5
	Darmsegmentlänge [cm]		3,3	3,0	3,2	0,2
	Zeit [min]	5	3,62	3,14	3,38	0,34
		10	3,58	3,29	3,44	0,21
		15	3,30	3,29	3,30	0,01
		20	3,81	3,56	3,69	0,18
		25	3,37	3,60	3,49	0,16
		30	3,59	3,21	3,40	0,27
			MW	3,55	3,35	
		SD	0,18	0,19		

Colon			Gabapentin P_{eff} [$\cdot 10^{-5}$ cm/s]			
			Ratte 1	Ratte 2	MW	SD
	Tiergewicht [g]		405	352	379	37,5
	Darmsegmentlänge [cm]		1,8	2,5	2,2	0,5
	Zeit [min]	5	4,97	5,50	5,24	0,37
		10	5,56	5,62	5,59	0,04
		15	5,41	4,87	5,14	0,38
		20	5,41	5,28	5,35	0,09
		25	5,60	5,61	5,61	0,01
		30	5,22	5,01	5,12	0,15
			MW	5,36	5,32	
		SD	0,23	0,32		

C. In-vivo-Untersuchungen

C.1. In-vivo-Untersuchungen mit Baclofenestern

C.1.1. Intravenöse Applikation von Baclofen und seinen Estern an Ratten (Baclofen 1,0 mg/kg KG; die Dosis der Ester entsprach 1,0 mg/kg KG unverestertem Baclofen)

C.1.1.1. Individuelle Konzentrations-Zeit-Profile

		Konzentrationen [ng/g]													Gehirn	
		Blut														
		Ratte	Gewicht [g]	Zeit [min]												
3	10			20	40	60	90	120	150	210	210					
Methyl-ester	1	327	254,20	-	225,10	143,30	306,20	257,50	249,50	252,20	-	681,50	1366,32			
	2	333	628,00	231,00	247,40	173,60	-	699,80	1342,35							
	3	309	4039,70	550,40	835,60	216,00	518,40	378,00	144,60	63,40	133,90	2388,94				
	MW	323	1640,63	390,70	436,03	177,63	412,30	317,75	197,05	338,47	407,70	1699,20				
	SD	12,5	2086,04	225,85	346,21	36,52	150,05	85,21	74,18	326,85	387,21	597,45				
Ethyl-ester	1	307	82,17	35,07	13,22*	6,49*	-	-	-	-	-	172,41				
	2	317	159,35	86,79	63,67	15,20*	6,81*	-	-	-	-	331,45				
	3	318	225,91	83,23	41,22	26,67	17,98*	-	-	-	-	266,82				
	MW	314	192,63	84,06	46,65	18,36	10,43	-	-	-	-	256,89				
	SD	6,1	47,07	2,42	15,05	7,26	6,54	-	-	-	-	79,99				
1-Propyl-ester	1	337	147,77	61,95	31,34	15,93*	6,82*	-	-	-	-	146,18				
	2	302	24,69	65,14	12,70*	30,42	4,87*	-	-	-	-	346,64				
	3	304	186,93	103,01	55,98	16,96*	4,14*	-	-	-	-	242,65				
	MW	314	183,13	76,70	33,34	21,10	5,28	-	-	-	-	245,16				
	SD	19,7	33,62	22,84	21,71	8,08	1,38	-	-	-	-	100,25				
2-Propyl-ester	1	374	161,00	85,38	36,39	15,41*	6,62*	-	-	-	-	199,07				
	2	319	160,89	80,71	53,61	14,52*	6,27*	-	-	-	-	395,28				
	3	321	192,26	87,54	35,52	29,49	19,19*	-	-	-	-	262,39				
	MW	338	171,38	84,54	41,84	19,81	10,69	-	-	-	-	285,58				
	SD	31,2	18,08	3,49	10,20	8,40	7,36	-	-	-	-	100,13				
Butyl-ester	1	306	168,09	93,60	60,46	33,19	34,95	-	-	-	-	179,50				
	2	327	144,48	86,51	45,64	40,06	31,15	-	-	-	-	174,05				
	3	310	124,17	74,88	44,05	49,86	-	-	-	-	-	191,72				
	MW	314	145,58	84,99	50,05	41,04	26,60	-	-	-	-	181,76				
	SD	11,2	21,98	9,45	9,05	8,38	6,44	-	-	-	-	9,05				

C.1.2. Intraperitoneale Applikation von Baclofen und seinen Estern an Ratten (Baclofen 1,0 mg/kg KG; die Dosis der Ester entsprach 1,0 mg/kg KG unverestertem Baclofen) – Konzentration im Blut und Gehirn

Ratte	Konzentrationen [ng/g]												Organgewichte		
	Gewicht [g]						Blut			Gehirn			Gehirn		
	5 min	20 min	60 min	5	20	60	5	20	60	5	20	60	5	20	60
Methylester	1	255	218	233	270,72	390,06	130,93	209,43	1210,65	647,73	1,99	1,84	2,04	2,00	2,00
	2	275	233	198	114,34	567,91	183,45	294,54	1110,77	569,23	2,03	2,05	1,85	1,97	1,97
	3	255	223	195	434,42	495,03	154,94	360,71	1046,8	646,53	1,94	1,92	1,95	1,95	1,95
	<i>MW</i>	261	225	209	273,16	484,33	156,44	288,23	1122,74	621,16	1,99	1,94	1,94	1,94	1,94
	<i>SD</i>	11,5	7,6	21,1	160,05	89,41	26,29	75,84	82,58	44,98	0,05	0,11	0,10	0,10	0,10
	1	266	222	195	40,08	57,66	43,61	209,89	314,79	303,08	1,91	1,86	1,95	1,95	1,95
Ethylester	2	291	196	214	56,43	70,51	47,96	557,40	259,46	162,54	2,05	1,88	1,89	1,89	1,89
	3	305	211	211	93,10	83,39	44,98	310,45	263,02	248,25	2,04	1,91	2,01	2,01	2,01
	<i>MW</i>	287	210	207	63,20	70,52	45,52	359,25	279,09	237,96	2,00	1,88	1,95	1,95	1,95
	<i>SD</i>	19,8	13,1	10,2	19,51	7,43	1,59	178,82	30,97	70,84	0,08	0,03	0,06	0,06	0,06
	1	286	229	235	5,90*	28,89	10,48*	228,67	320,52	311,38	2,14	1,89	2,08	2,08	2,08
	2	257	216	221	11,94*	23,50	11,18*	644,58	318,96	167,75	2,06	2,01	1,97	1,97	1,97
1-Propylester	3	265	230	232	20,01*	13,74*	12,52*	297,04	280,98	308,22	1,97	1,98	1,98	1,98	1,98
	<i>MW</i>	269	225	229	12,62	22,04	11,39	390,10	306,82	262,45	2,06	1,96	2,01	2,01	2,01
	<i>SD</i>	15,0	7,8	7,4	7,08	7,68	1,04	223,02	22,39	82,03	0,09	0,06	0,06	0,06	0,06
	1	280	256	213	61,46	57,74	38,23	226,15	351,23	320,61	1,99	1,93	1,95	1,95	1,95
	2	294	238	224	63,29	78,72	50,72	488,54	246,36	167,03	2,11	2,03	1,98	1,98	1,98
	3	332	254	253	70,81	48,73	53,19	321,44	274,77	312,19	2,19	1,92	2,00	2,00	2,00
2-Propylester	<i>MW</i>	302	249	230	65,18	61,73	47,38	345,38	290,79	266,61	2,10	1,96	1,98	1,98	1,98
	<i>SD</i>	26,9	9,9	20,7	4,95	15,39	8,02	132,82	54,24	86,34	0,10	0,06	0,03	0,03	0,03
	1	278	274	280	24,68	40,14	21,91	-	286,59	445,11	2,01	2,91	1,85	1,85	1,85
	2	285	257	253	59,31	11,80*	21,71	620,63	379,53	340,74	2,07	2,05	2,12	2,12	2,12
	3	274	245	257	31,17	13,66*	33,19	369,57	486,00	280,81	1,76	1,91	2,00	2,00	2,00
	<i>MW</i>	279	259	263	38,39	21,87	25,61	495,10	384,04	355,49	1,95	2,29	1,99	1,99	1,99
<i>SD</i>	5,6	14,6	14,6	18,41	15,85	6,57	125,53	60,21	39,66	0,16	0,54	0,14	0,14	0,14	
Butylester	1	278	274	280	24,68	40,14	21,91	-	286,59	445,11	2,01	2,91	1,85	1,85	1,85
	2	285	257	253	59,31	11,80*	21,71	620,63	379,53	340,74	2,07	2,05	2,12	2,12	2,12
	3	274	245	257	31,17	13,66*	33,19	369,57	486,00	280,81	1,76	1,91	2,00	2,00	2,00
	<i>MW</i>	279	259	263	38,39	21,87	25,61	495,10	384,04	355,49	1,95	2,29	1,99	1,99	1,99
	<i>SD</i>	5,6	14,6	14,6	18,41	15,85	6,57	125,53	60,21	39,66	0,16	0,54	0,14	0,14	0,14

C.1.3. Intranasale Applikation von Baclofen und seinen Estern an Ratten (Baclofen 1,0 mg/kg KG; die Dosis der Ester entsprach 1,0 mg/kg KG unverestertem Baclofen) – Konzentration im Blut und Gehirn

Ratte	Konzentrationen [ng/g]										Organgewichte		
	Blut					Gehirn					Gehirn		
	Zeit [min]					Zeit [min]					[g]		
	5 min	20 min	60 min	5	20	60	5	20	60	5	20	60	
Methylester	1	302	222	-	131,02	384,23	92,84	663,20	513,32	897,13	1,85	1,94	
	2	288	219	219	247,21	185,31	104,80	780,31	834,42	487,32	2,03	1,94	
	3	296	270	204	199,24	119,52	118,5	780,52	735,71	581,34	2,01	2,02	
	<i>MW</i>	295	237	212	192,49	229,69	105,38	741,34	694,48	655,26	1,96	1,97	
	<i>SD</i>	7,0	28,6	10,6	58,39	137,82	12,84	67,67	164,47	214,67	0,10	0,04	
	1	281	259	257	41,72	104,56	48,62	832,89	317,59	271,48	2,02	1,92	
Ethylester	2	257	271	260	76,45	84,37	83,79	1020,89	418,98	218,14	2,09	2,02	
	3	265	261	265	56,37	56,37	47,12	664,64	427,48	262,44	1,97	2,16	
	<i>MW</i>	268	264	261	58,18	81,77	59,84	839,48	388,01	250,69	2,03	2,03	
	<i>SD</i>	12,2	6,4	4,0	11,11	15,47	18,62	178,22	61,14	28,54	0,06	0,12	
	1	261	254	279	54,09	29,65	17,58*	1033,12	360,06	201,80	1,91	2,00	
	2	266	230	243	43,36	14,90*	11,13*	1018,72	378,45	251,13	1,87	1,90	
1-Propylester	3	270	239	235	36,07	10,38*	17,66*	732,44	454,23	324,13	2,08	1,98	
	<i>MW</i>	266	241	252	44,51	18,31	15,46	928,09	397,58	259,02	1,95	1,96	
	<i>SD</i>	4,5	12,1	23,4	9,06	10,08	3,75	169,59	49,91	61,55	0,11	0,05	
	1	297	258	267	73,62	57,16	43,86	1038,06	332,98	265,56	2,10	1,91	
	2	319	284	277	90,48	61,08	53,58	909,05	439,00	253,99	2,06	2,10	
	3	286	249	197	63,66	53,12	44,90	599,68	434,62	306,69	2,00	1,97	
2-Propylester	<i>MW</i>	301	264	247	75,92	57,12	47,45	848,93	402,20	275,41	2,05	1,99	
	<i>SD</i>	16,8	18,2	43,6	13,56	3,98	5,33	225,29	59,98	27,70	0,05	0,10	
	1	305	259	266	49,62	25,28	16,97*	1041,71	881,67	814,39	1,95	1,93	
	2	291	231	269	30,69	25,41	53,36	1161,00	868,28	765,59	2,02	1,98	
	3	296	215	208	22,34	22,00	13,84*	1138,57	1010,34	517,81	2,07	1,93	
	<i>MW</i>	297	235	248	34,21	24,23	28,06	1113,76	920,10	699,26	2,01	1,95	
Butylester	<i>SD</i>	7,1	22,3	34,4	21,97	1,93	21,97	63,40	71,89	128,27	0,06	0,03	

C.1.4. In-vivo-Verteilungsstudie mit Baclofenbutylester und Talinolol nach intravenöser Applikation an Ratten

C.1.4.1. Ratten- und Organgewichte (in g)

Zeit [h]	Ratte	Butylester				Butylester + Talinolol				Talinolol				
		Gewicht	Gehirn	Leber	Niere	Gewicht	Gehirn	Leber	Niere	Gewicht	Gehirn	Leber	Niere	
0,5	1	216	1,74	7,96	2,33	230	1,91	8,05	1,96	267	1,95	9,29	2,65	
	2	237	1,84	8,38	2,61	243	1,91	9,26	2,33	246	1,65	9,01	2,37	
	3	240	1,79	7,08	2,66	235	1,67	9,02	2,02	225	1,95	8,07	1,94	
	<i>MW</i>	231	1,79	7,81	2,53	236	1,83	8,78	2,10	246	1,85	8,79	2,32	
	<i>SD</i>	13,1	0,05	0,66	0,18	6,6	0,14	0,64	0,20	21,0	0,17	0,64	0,36	
		1	258	1,80	8,73	2,57	245	2,01	8,80	2,37	248	1,54	9,10	2,54
1	2	238	1,93	10,07	2,24	253	1,93	8,53	2,23	261	1,98	9,28	2,25	
	3	223	1,93	7,28	2,51	234	1,88	8,28	2,33	258	1,98	7,70	2,43	
	<i>MW</i>	240	1,89	8,69	2,44	244	1,94	8,54	2,31	256	1,83	8,69	2,41	
	<i>SD</i>	17,6	0,08	1,40	0,18	9,5	0,07	0,26	0,07	6,8	0,25	0,86	0,15	
		1	240	1,74	8,23	2,51	249	2,12	8,42	2,62	236	1,90	7,82	2,28
		2	237	1,90	8,25	2,44	232	1,82	7,93	2,23	266	1,92	9,01	2,47
2	3	220	1,74	7,30	2,67	236	1,86	7,74	2,06	233	1,90	7,78	2,53	
	<i>MW</i>	232	1,79	7,93	2,54	239	1,93	8,03	2,30	245	1,91	8,20	2,43	
	<i>SD</i>	10,8	0,09	0,54	0,12	8,9	0,16	0,35	0,29	18,2	0,01	0,70	0,13	
		1	256	1,83	9,83	2,12	230	1,91	8,69	2,48	260	1,91	9,59	2,66
		2	222	1,89	8,08	1,99	231	1,88	8,01	2,19	250	2,01	8,70	2,37
		3	237	1,89	9,01	2,81	254	1,92	7,08	2,64	230	1,70	7,99	2,52
4	<i>MW</i>	238	1,87	8,97	2,31	238	1,90	7,93	2,44	247	1,87	8,76	2,52	
	<i>SD</i>	17,0	0,03	0,88	0,44	13,6	0,02	0,81	0,23	15,3	0,16	0,80	0,15	

C.1.4.2. Einfluss des P-GP-Substrates Talinolol auf die In-vivo-Verteilung des Baclofenbutylesters

C.1.4.2.1. **Butylester:** Konzentrationen von Baclofenbutylester nach i.v.-Applikation von 10 mg/kg KG Butylester mit bzw. ohne gleichzeitige Applikation von Talinolol (4 mg/kg KG, i.v.)

		Konzentration Baclofenbutylester [ng/g]													
		Butylester							Butylester + Talinolol						
Zeit [h]	Ratte	Blut	Gehirn	Leber	Niere	Jejunum	Ileum	Blut	Gehirn	Leber	Niere	Jejunum	Ileum		
0,5	1	161,78	18001,15	415,09	4818,17	903,08	77,52	94,45	25179,99	3184,21	8755,00	2601,73	139,47		
	2	269,43	19163,12	342,57	4440,96	914,48	176,29	209,64	24598,86	2715,21	5721,85	1763,82	98,30		
	3	321,09	21060,12	422,50	5729,77	1379,56	118,55	123,19	21587,50	3013,76	5113,13	2108,26	70,55		
	MW	250,7	19408,13	393,39	4996,30	1065,71	124,12	142,43	23788,78	2971,08	6529,99	2157,94	102,77		
	SD	81,28	1544,13	44,16	662,61	271,86	49,62	59,96	1928,38	237,37	1950,80	421,16	34,68		
1	1	29,13	9124,74	239,75	1820,79	542,21	63,77	19,37	11815,43	218,39	2279,74	589,25	152,16		
	2	81,02	11265,19	294,74	3795,67	644,38	-	46,47	14285,90	1006,50	2781,66	905,27	195,00		
	3	126,42	12455,03	243,88	2629,83	397,72	82,28	103,92	12768,30	1045,99	2117,20	816,34	166,66		
	MW	78,86	10948,32	259,46	2748,76	528,10	73,03	56,59	12956,54	756,96	2392,87	770,29	171,27		
	SD	48,68	1687,61	30,63	992,80	123,93	13,09	43,17	1245,95	466,83	346,37	162,97	21,79		
2	1	24,35	4695,21	280,88	936,75	-	67,10	24,19	5039,64	864,36	1487,54	437,39	117,68		
	2	30,56	4384,84	413,11	1186,96	489,91	68,73	30,33	5754,89	640,90	1063,72	188,66	137,24		
	3	54,60	5515,39	321,99	1447,90	654,09	49,33	19,19	4401,55	203,92	1458,34	400,38	185,84		
	MW	36,50	4865,15	338,66	1190,54	572,00	61,72	24,57	5065,36	569,73	1336,53	342,14	146,92		
	SD	15,98	584,12	67,67	255,59	116,09	10,76	5,58	677,04	335,92	236,71	134,20	35,10		
4	1	2,56	692,45	212,33	172,49	232,68	-	2,00	867,02	167,32	209,14	85,10	156,10		
	2	3,89	764,46	-	154,97	174,85	-	2,08	987,15	265,64	367,28	211,99	141,77		
	3	8,78	1061,89	264,16	346,27	136,84	-	1,39	1218,02	183,80	218,12	133,64	128,13		
	MW	5,08	839,60	238,25	224,58	181,46	-	1,82	1024,06	205,59	264,85	143,58	142,00		
	SD	3,28	195,85	36,65	105,75	48,26	-	0,38	178,39	52,66	88,82	64,03	13,99		

C.1.4.2.2. **Talinolol**: Konzentrationen von Talinolol nach intravenöser Applikation von 4 mg/kg KG ohne gleichzeitige Applikation von Baclofenbutylester

Konzentration Talinolol [ng/g]													
Zeit [h]	Ratte	Blut		Gehirn		Leber		Niere		Jejunum		Ileum	
		R-TAL	S-TAL	R-TAL	S-TAL	R-TAL	S-TAL	R-TAL	S-TAL	R-TAL	S-TAL	R-TAL	S-TAL
0,5	1	441,55	477,47	-	-	5616,99	5423,90	2029,42	2166,66	1125,71	1178,89	2017,81	1480,04
	2	252,00	212,22	-	-	5398,74	4860,45	1421,97	1745,11	1210,21	1200,95	1129,17	930,03
	3	306,72	261,12	-	-	4324,52	4314,68	2758,89	2590,75	1009,89	1015,56	1883,41	1537,35
	<i>MW</i>	333,42	316,94	-	-	5113,41	4866,34	2070,09	2167,50	1115,27	1131,80	1676,80	1315,80
	<i>SD</i>	97,56	141,16	-	-	691,86	554,63	669,39	422,81	100,57	101,27	479,00	335,32
	1	219,82	200,82	-	-	6959,82	7006,69	966,32	1339,28	1132,32	1050,78	2041,55	1868,16
1	2	211,31	179,18	-	-	4550,27	4009,22	1248,38	1090,50	545,85	565,96	2151,59	1741,18
	3	212,24	155,63	-	-	5372,62	5210,55	1685,06	1617,30	1076,47	1083,50	3252,28	3474,78
	<i>MW</i>	214,46	178,54	-	-	5627,57	5408,82	1299,92	1349,03	918,21	900,08	2481,81	2361,37
	<i>SD</i>	4,67	22,60	-	-	1224,84	1508,54	362,13	263,53	323,69	289,82	669,51	966,33
	1	71,89	61,59	-	-	4331,76	4143,39	542,47	543,23	816,84	702,68	1894,33	1928,41
	2	59,21	49,37	-	-	4069,20	3778,84	613,49	450,92	462,19	422,70	2597,71	2713,96
2	3	95,95	81,14	-	-	4382,88	4115,25	576,49	492,45	835,76	738,80	2543,18	2491,60
	<i>MW</i>	75,68	64,03	-	-	4162,28	4012,49	577,48	495,53	704,93	621,39	2345,08	2377,99
	<i>SD</i>	18,66	16,02	-	-	168,30	202,84	35,52	46,23	210,43	173,02	391,31	404,91
	1	47,61	39,58	-	-	3958,13	3617,96	421,22	437,33	131,64	111,71	708,89	814,82
	2	50,58	38,73	-	-	2649,46	2358,92	550,28	324,00	413,44	311,36	889,83	716,67
	3	47,42	34,86	-	-	3079,04	2715,03	327,10	262,59	411,17	361,78	570,52	478,70
4	<i>MW</i>	48,54	37,72	-	-	3228,88	2897,30	432,87	341,31	318,75	261,62	723,08	670,06
	<i>SD</i>	1,77	2,51	-	-	667,08	649,01	112,04	88,65	162,05	132,25	160,13	172,84

C.2. In-vivo-Untersuchungen mit Baclofen

C.2.1. Konzentrationen von Baclofen nach peroraler Applikation von 1,0 mg/kg KG und Konzentrationen nach gleichzeitiger Gabe von Taurin, Coffein, Zucker oder einem Energy Drink (Red Bull®)

Behandlung	Ratte	Gewicht [g]	Zeit [min]					
			15	30	60	120	240	360
Baclofen	1	250	278,18	660,96	320,37	120,35	71,16	35,32
	2	249	222,87	572,59	369,80	189,07	86,73	31,87
	3	242	246,65	958,92	376,71	254,17	129,19	119,42
	MW	247	249,23	730,82	355,63	187,86	95,69	62,20
	SD	4,4	27,75	202,42	30,73	66,92	30,04	49,58
		246	266,08	393,21	253,81	110,68	81,42	40,43
Baclofen + Taurin	1	254	233,15	418,40	361,42	232,96	119,65	70,69
	2	267	238,90	712,87	429,36	201,59	93,24	60,26
	3	256	246,04	508,16	348,20	181,74	98,10	57,13
	MW	256	246,04	508,16	348,20	181,74	98,10	57,13
	SD	10,6	17,59	177,73	88,52	63,51	19,57	15,37
		252	191,89	712,95	429,32	271,08	143,10	79,79
Baclofen + Coffein	1	274	175,12	677,25	515,21	221,36	122,60	81,15
	2	243	136,28	916,91	488,34	233,57	136,92	82,88
	3	256	167,76	769,04	477,62	242,00	134,21	81,27
	MW	256	167,76	769,04	477,62	242,00	134,21	81,27
	SD	15,9	28,53	129,30	43,94	25,91	10,52	1,55
		254	52,10	439,67	626,54	224,56	88,87	39,49
Baclofen + Energy Drink	1	258	69,04	465,35	572,70	381,70	90,79	32,90
	2	258	58,54	471,81	597,96	239,35	89,95	101,17
	3	257	59,89	459,04	599,07	281,87	89,84	57,82
	MW	257	59,89	459,04	599,07	281,87	89,84	57,82
	SD	2,3	8,55	17,05	26,94	86,77	0,96	41,09
		245	282,90	810,06	416,15	267,77	104,59	44,84
Baclofen + Zucker	1	245	262,76	698,14	401,35	195,44	96,43	45,19
	2	252	209,65	608,76	397,94	170,97	80,74	68,47
	3	247	251,77	705,65	405,15	211,39	93,92	52,83
	MW	247	251,77	705,65	405,15	211,39	93,92	52,83
	SD	4,0	37,84	100,86	9,68	50,33	12,12	13,54
		4,0	37,84	100,86	9,68	50,33	12,12	13,54

C.2.2. Baclofen: Pharmakokinetische Parameter von Baclofen nach peroraler Applikation an Ratten (1,0 mg/kg KG) und Veränderung durch gleichzeitige Gabe von Taurin, Coffein, Zucker bzw. durch einen Energy Drink

Behandlung	Pharmakokinetische Parameter									
	Ratte	Gewicht [g]	k_{el} [min ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	AUD [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{g}$]	AUC_{∞} [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{g}$]	MRT [min]	CL_{tot} [ml/min]	V_D [l]	
Baclofen	1	250	0,0078	88,80	52,55	58,19	98,40	17,20	2,20	
	2	249	0,0073	94,80	60,42	66,60	106,80	15,00	2,05	
	3	242	0,0045	154,80	86,06	86,06	122,40	9,07	2,03	
	<i>MW</i>	247	0,0065	112,80	66,34	70,28	109,20	13,76	2,09	
	<i>SD</i>	4,4	0,0018	36,50	17,52	14,29	12,18	4,21	0,09	
Baclofen + Taurin	1	246	0,0066	105,00	37,11	49,96	86,40	20,00	3,04	
	2	254	0,0045	155,40	55,57	86,43	96,60	11,60	2,59	
	3	267	0,0061	114,60	70,10	80,84	109,20	12,40	2,04	
	<i>MW</i>	256	0,0057	125,00	54,26	72,41	97,40	14,67	2,56	
	<i>SD</i>	10,6	0,0011	26,76	16,53	19,64	11,42	4,64	0,50	
Baclofen + Coffein	1	252	0,0047	148,20	83,16	102,54	123,60	9,75	2,08	
	2	274	0,0050	139,20	67,01	95,11	88,20	10,50	2,11	
	3	243	0,0046	151,80	86,05	105,64	117,60	9,47	2,08	
	<i>MW</i>	256	0,0047	146,40	78,74	101,10	109,80	9,91	2,09	
	<i>SD</i>	15,9	0,0002	6,49	10,26	5,41	18,95	0,53	0,02	
Baclofen + Energy Drink	1	254	0,0055	124,80	71,15	79,04	106,80	12,70	2,28	
	2	258	0,0060	115,80	83,81	91,53	109,80	10,90	1,82	
	3	258	0,0028	244,20	76,36	110,87	121,20	9,02	3,18	
	<i>MW</i>	257	0,0048	161,60	77,11	93,82	112,60	10,87	2,43	
	<i>SD</i>	2,3	0,0017	71,68	6,36	16,04	7,60	1,84	0,69	
Baclofen + Zucker	1	245	0,0070	98,40	78,43	87,13	106,80	11,50	1,63	
	2	245	0,0067	102,60	67,61	76,16	107,40	13,10	1,94	
	3	252	0,0061	114,00	61,42	70,74	108,60	14,10	2,32	
	<i>MW</i>	247	0,0066	105,00	69,15	78,01	107,60	12,90	1,96	
	<i>SD</i>	4,0	0,0005	8,07	8,61	8,35	0,92	1,31	0,35	

C.3. In-vivo-Untersuchungen mit Gabapentin

C.3.1. Konzentrationen von Gabapentin nach peroraler Applikation von 1,0 mg/kg KG und Konzentrationen nach gleichzeitiger Applikation eines Energy Drinks

Behandlung	Ratte	Gewicht [g]	Zeit [min]					
			15	30	60	120	240	360
Gabapentin	1	242	770,42	943,63	1242,41	578,17	139,54	72,43
	2	245	634,54	923,34	1189,72	621,34	181,00	71,99
	3	253	577,14	979,59	1021,73	742,71	232,04	78,85
	<i>MW</i>	247	660,70	948,85	1151,29	647,41	184,19	74,42
	<i>SD</i>	5,7	99,26	28,49	115,25	85,31	46,33	3,84
	Gabapentin + Energy Drink	1	236	299,77	440,21	644,80	805,35	236,63
2		234	264,03	428,21	643,21	819,23	254,81	75,29
3		247	240,19	476,73	563,30	835,48	285,76	96,53
<i>MW</i>		239	268,00	448,38	617,10	820,02	259,07	78,27
<i>SD</i>		7,0	29,99	25,27	46,60	15,08	24,84	16,97

C.3.2. Gabapentin: Pharmakokinetische Parameter von Gabapentin nach peroraler Applikation an Ratten (1,0 mg/kg KG) und Veränderung durch gleichzeitige Gabe eines Energy Drinks

Behandlung	Pharmakokinetische Parameter										
	Ratte	Gewicht [g]	k_{el} [min ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	AUD [µg*min/g]	AUC _∞ [µg*min/g]	MRT [min]	CL _{tot} [ml/min]	V _d [l]		
Gabapentin	1	242	0,0081	85,20	156,04	170,24	99,00	5,87	0,72		
	2	245	0,0075	91,80	161,03	176,20	105,00	5,68	0,75		
	3	253	0,0069	100,20	171,77	189,96	113,40	5,26	0,76		
	<i>MW</i>	244	0,0075	92,40	162,95	178,80	105,80	5,60	0,75		
	<i>SD</i>	5,7	0,0006	7,52	8,03	10,12	7,23	0,31	0,02		
Gabapentin + Energy Drink	1	236	0,0053	131,40	145,83	166,73	128,40	6,00	1,14		
	2	234	0,0046	151,80	149,39	177,07	131,40	5,65	1,24		
	3	247	0,0037	186,00	153,15	194,43	136,80	5,14	1,38		
	<i>MW</i>	239,0	0,0045	156,40	149,45	179,41	132,20	5,60	1,25		
	<i>SD</i>	7,0	0,0008	27,59	3,66	14,00	4,26	0,43	0,12		

D. Validierungsparameter der verwendeten bioanalytischen Methoden

D.1. Linearität

Substanz	Matrix	Konzentrationsbereich [ng/g]	Steigung [m]	y-Achsenabschnitt [b]	Korrelationskoeffizient [r]
Baclofen	Perfusat	2000 - 50	0,0423 ± 0,0053	-0,0892 ± 0,0843	0,9994
		2000 - 200	0,0423 ± 0,0053	-0,0902 ± 0,0968	0,9993
		200 - 50	0,0426 ± 0,0047	-0,0651 ± 0,0573	0,9991
	Blut	2000 - 20	0,0483 ± 0,0047	-0,0952 ± 0,0103	0,9990
		2000 - 200	0,0489 ± 0,0049	-0,0999 ± 0,0740	0,9989
		200 - 30	0,0455 ± 0,0047	-0,0859 ± 0,0533	0,9995
CGP 11.130	Perfusat	2000 - 50	0,0239 ± 0,0005	-0,0316 ± 0,0155	0,9996
		2000 - 200	0,0239 ± 0,0005	-0,0370 ± 0,0177	0,9995
		200 - 50	0,0242 ± 0,0013	-0,0263 ± 0,0109	0,9977
Gabapentin	Perfusat	2000 - 50	0,0711 ± 0,0052	-0,0741 ± 0,0414	0,9998
		2000 - 200	0,0713 ± 0,0054	-0,0875 ± 0,0558	0,9997
		200 - 50	0,0695 ± 0,0068	-0,0573 ± 0,0369	0,9992
	Blut	2000 - 20	0,0682 ± 0,0044	-0,0921 ± 0,0365	0,9997
		2000 - 200	0,0718 ± 0,0050	-0,0788 ± 0,0477	0,9997
		200 - 20	0,0702 ± 0,0073	-0,0621 ± 0,0432	0,9993
Baclofenmethylester	Blut	2000 - 20	0,0252 ± 0,0088	-0,0562 ± 0,0362	0,9997
		2000 - 200	0,0246 ± 0,0074	-0,0543 ± 0,0465	0,9998
		200 - 20	0,0245 ± 0,0101	-0,0622 ± 0,0401	0,9982
	Gehirn	2000 - 20	0,0289 ± 0,0086	-0,0555 ± 0,0387	0,9997
		2000 - 200	0,0276 ± 0,0093	-0,0622 ± 0,0500	0,9991
		200 - 25	0,0287 ± 0,0079	-0,0598 ± 0,0543	0,9989
Baclofenethylester	Blut	2000 - 20	0,0277 ± 0,0078	-0,0494 ± 0,0411	0,9998
		2000 - 200	0,0279 ± 0,0081	-0,0611 ± 0,0489	0,9999
		200 - 20	0,0263 ± 0,0094	-0,0562 ± 0,0385	0,9976
	Gehirn	2000 - 20	0,0298 ± 0,0068	-0,0339 ± 0,0425	0,9994
		2000 - 200	0,0303 ± 0,0075	-0,0644 ± 0,0511	0,9993
		200 - 25	0,0267 ± 0,0078	-0,0231 ± 0,0522	0,9986
Baclofen-1-propylester	Blut	2000 - 20	0,0242 ± 0,0070	0,0046 ± 0,0463	0,9998
		2000 - 200	0,0242 ± 0,0081	0,0060 ± 0,0472	0,9997
		200 - 20	0,0265 ± 0,0078	-0,0055 ± 0,0275	0,9983
	Gehirn	2000 - 20	0,0298 ± 0,0064	-0,0333 ± 0,0435	0,9996
		2000 - 200	0,0302 ± 0,0074	-0,0563 ± 0,0505	0,9980
		200 - 25	0,0302 ± 0,0073	-0,0346 ± 0,0481	0,9974

Substanz	Matrix	Konzentrationsbereich [ng/g]	Steigung [m]	y-Achsenabschnitt [b]	Korrelationskoeffizient [r]
Baclofen-2-propylester	Blut	2000 - 20	0,0272 ± 0,0063	-0,0496 ± 0,0455	0,9988
		2000 - 200	0,0274 ± 0,0062	-0,0567 ± 0,0464	0,9985
		200 - 20	0,0274 ± 0,0061	-0,0414 ± 0,0492	0,9998
	Gehirn	2000 - 20	0,0298 ± 0,0059	-0,0416 ± 0,0441	0,9994
		2000 - 200	0,0303 ± 0,0066	-0,0644 ± 0,0434	0,9993
		200 - 25	0,0262 ± 0,0064	-0,0231 ± 0,0467	0,9970
Baclofen-butylester	Blut	2000 - 20	0,0383 ± 0,0043	0,0260 ± 0,0321	0,9999
		2000 - 200	0,0383 ± 0,0044	0,0243 ± 0,0211	0,9998
		200 - 10	0,0370 ± 0,0041	0,0301 ± 0,0093	0,9993
	Gehirn	2000 - 20	0,0263 ± 0,0027	0,0034 ± 0,0432	0,9999
		2000 - 200	0,0262 ± 0,0026	0,0074 ± 0,0367	0,9999
		200 - 10	0,0265 ± 0,0031	0,0016 ± 0,0256	0,9987
	Leber	2000 - 20	0,0248 ± 0,0038	-0,0702 ± 0,0185	0,9995
		2000 - 200	0,0248 ± 0,0040	-0,0703 ± 0,0167	0,9995
		200 - 20	0,0251 ± 0,0034	-0,0630 ± 0,0342	0,9987
	Niere	2000 - 20	0,0248 ± 0,0033	-0,0158 ± 0,0099	0,9999
		2000 - 200	0,0250 ± 0,0033	-0,0286 ± 0,0125	0,9999
		200 - 20	0,0241 ± 0,0032	-0,0079 ± 0,0118	0,9994
	Jejunum	2000 - 20	0,0231 ± 0,0021	0,0270 ± 0,0266	0,9999
		2000 - 200	0,0231 ± 0,0021	0,0296 ± 0,0231	0,9999
		200 - 20	0,0243 ± 0,0018	0,0232 ± 0,0176	0,9983
	Ileum	2000 - 20	0,0310 ± 0,0026	-0,0122 ± 0,0327	0,9999
		2000 - 200	0,0311 ± 0,0027	-0,0189 ± 0,0215	0,9998
		200 - 20	0,0308 ± 0,0026	-0,0089 ± 0,0275	0,9980

D.2. Präzision und Richtigkeit

Substanz	Matrix	Konzentration [ng/g]	Präzision [RSD%]	Richtigkeit [RE%]
Baclofen	Perfusat	2000	1,24	0,33
		1000	4,00	0,08
		500	3,53	-0,66
		200	5,79	-0,03
		100	4,26	2,16
		50	8,07	-1,64
	Blut	2000	1,22	0,66
		1000	3,94	-1,89
		500	3,46	-2,70
		100	2,28	-0,13
		50	5,03	4,85
		30	9,26	1,66
CGP 11.130	Perfusat	2000	2,77	0,75
		1000	3,99	-1,69
		500	2,12	0,16
		200	0,74	5,23
		100	1,21	5,47
		50	8,84	2,63
Gabapentin	Perfusat	2000	0,68	0,05
		1000	1,93	-0,30
		500	1,46	-0,66
		200	2,71	-0,44
		100	4,86	1,26
		50	1,64	7,14
	Blut	2000	1,27	0,03
		1000	1,83	-1,07
		500	2,87	-0,29
		100	5,30	1,76
		50	6,15	1,70
		20	8,43	4,21
Baclofen- methylester	Blut	2000	0,87	0,68
		1000	3,31	3,11
		500	2,87	2,32
		100	4,32	-3,98
		50	6,54	5,66
		20	9,21	-6,43

Substanz	Matrix	Konzentration [ng/g]	Präzision [RSD%]	Richtigkeit [RE%]
Baclofen- methylester	Gehirn	2000	1,56	0,57
		1000	0,98	-1,78
		500	1,53	-3,45
		100	0,76	-0,98
		50	2,47	-3,21
		25	8,79	4,67
Baclofen- ethylester	Blut	2000	0,02	-0,06
		1000	0,53	0,66
		500	1,86	-1,44
		100	1,52	-2,85
		50	5,17	-4,59
		20	8,83	4,53
	Gehirn	2000	0,16	0,94
		1000	2,00	-0,55
		500	1,56	-0,80
		100	0,43	5,17
		50	1,95	8,21
		25	5,14	2,43
Baclofen- 1-propylester	Blut	2000	0,68	-0,54
		1000	2,13	2,53
		500	3,13	-1,56
		100	3,44	-5,03
		50	5,44	-5,59
		20	8,83	2,55
	Gehirn	2000	0,12	0,91
		1000	2,09	-0,59
		500	1,18	-1,39
		100	0,46	0,14
		50	0,94	-2,23
		25	8,72	0,93
Baclofen- 2-propylester	Blut	2000	1,14	0,73
		1000	1,65	1,47
		500	0,73	-0,66
		100	0,31	-2,02
		50	6,49	-3,66
		20	5,55	2,00
	Gehirn	2000	1,12	0,84
		1000	1,58	-0,55
		500	1,46	-0,80
		100	2,43	5,17
		50	0,95	8,21
		25	9,04	2,13

Substanz	Matrix	Konzentration [ng/ml]	Präzision [RSD%]	Richtigkeit [RE%]
Baclofen- butylester	Blut	2000	0,26	-0,03
		1000	1,82	0,44
		500	0,15	0,34
		100	4,06	0,14
		50	0,59	-0,91
		20	1,09	7,33
	Gehirn	2000	0,16	-0,15
		1000	2,03	0,56
		500	0,13	0,23
		100	1,61	-3,91
		50	9,56	-2,38
		20	0,38	2,33
	Leber	2000	0,23	-0,06
		1000	0,33	1,59
		500	1,62	-5,47
		100	10,20	3,70
		50	5,19	4,41
		20	6,56	7,80
	Niere	2000	0,41	0,07
		1000	1,83	0,52
		500	1,07	-3,66
		100	4,11	8,04
		50	2,14	9,90
		20	3,32	5,28
	Jejunum	2000	0,23	0,27
		1000	0,52	-0,04
		500	1,62	-1,70
		100	2,65	0,33
		50	3,78	-4,32
		20	1,78	9,18
Ileum	2000	0,23	0,26	
	1000	0,77	0,26	
	500	0,92	-2,00	
	100	2,38	2,12	
	50	0,88	8,05	
	20	6,13	-0,75	

D.3. Bestimmungsgrenze – Limit of Quantitation

Substanz	Matrix	Bestimmungsgrenze [ng/g]
Baclofen	Blut, Perfusat	30
CGP 11.130	Perfusat	50
Gabapentin	Blut, Perfusat	20
Baclofenmethylester	Blut	20
	Gehirn	25
Baclofenethylester	Blut	20
	Gehirn	25
Baclofen-1-propylester	Blut	20
	Gehirn	25
Baclofen-2-propylester	Blut	20
	Gehirn	25
Baclofenbutylester	Blut	10
	Gehirn	10
	Leber	20
	Niere	20
	Jejunum	20
	Ileum	20

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde bisher keiner anderen Universität oder Hochschule im In- und Ausland vorgelegt.

Trier, 20.12.2002

Lebenslauf

Christiane Elisabeth Leisen

29. August 1973 geboren in Trier als Tochter von Maria Leisen, geb. Aßmann, und Günther Leisen
- 1980 – 1984 Grundschule Trier-Ehrang
1984 – 1993 Staatliches Friedrich-Spee-Gymnasium Trier
Juni 1993 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1993 – 1997 Studium der Pharmazie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- September 1995 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Oktober 1997 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1997 – April 1998 Pharmaziepraktikum in der "Apotheke im Rad", Wiesbaden
Mai 1998 – Oktober 1998 Pharmaziepraktikum in der Apotheke der Basildon and Thurrock General Hospitals (NHS Trust), Basildon, Essex, Großbritannien
- November 1998 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 1998 Approbation als Apothekerin
- seit Februar 1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. H. Spahn-Langguth am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Trier, 20.12.2002
-

Präsentationen

Publikationen

Spahn-Langguth H., Dressler C., Leisen C.

Intestinal drug transport: Stereochemical aspects.

In: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 153, Stereochemical aspects of drug action and disposition.

Eichelbaum M., Testa B., Somogyi A. (Eds.) Springer-Verlag Heidelberg, 2002, Chapter 11; im Druck

Leisen C., Dressler C., Herber B., Langguth P., Spahn-Langguth H.

Lipophilicities of baclofen ester prodrugs correlate with affinities to the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein: Relevance for their permeation across the blood-brain barrier?

Pharmaceutical Research; eingereicht

Leisen C., Hanafy A., Spahn-Langguth H.

Taurine and caffeine-containing energy drinks: Luminal presence of taurine reduces baclofen intestinal absorption in rats.

European Journal of Pharmaceutical Sciences; eingereicht

Leisen C., Hanafy A., Spahn-Langguth H.

Taurine affects the absorption of amino acid-type drugs from rat intestinal segments: Comparison between baclofen and its fluoro analogue.

Die Pharmazie; eingereicht

Posterpräsentationen

Leisen C., Dressler C., Herber B., Langguth P., Spahn-Langguth H.

Correlation of lipophilicities of baclofen ester prodrugs and affinities to the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein.

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG, 4.-10.10.2000, Münster

Archiv der Pharmazie, 2000, 333 (Suppl. 2), 50

Leisen C., Hanafy A., Spahn-Langguth H.

Addition of taurine reduces baclofen intestinal absorption in rats: Consequences for taurine-containing energy drinks?

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG, 10.-13.10.2001, Halle/Saale

Archiv der Pharmazie, 2001, 334 (Suppl. 2), 41

Dressler C., Neuhoff S., Andersson T.B., Regardh C.G., Leisen C., Langguth P., Spahn-Langguth H.

The duration of culturing may affect active transport in Caco-2 cells: Amino acid- and peptide transporter vs. P-glycoprotein.

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG, 10.-13.10.2001, Halle/Saale

Archiv der Pharmazie, 2001, 334 (Suppl. 2), 34

Leisen C., Spahn-Langguth H.

Taurine and caffeine containing energy drinks: Luminal presence of taurine reduces baclofen intestinal absorption in rats.

Pfizer Global Research and Development, 11.-13.09.2002, Sandwich, Kent, Großbritannien

Drug Discovery, 2002, 65

Leisen C., Hanafy A., Langguth P., Spahn-Langguth H.

γ -Aminobutyric acid derivative drugs and energy drinks: Luminal presence of taurine reduces intestinal drug absorption in rats.

European Intestinal Transport Group (EITG), 18th meeting, 28.09.-01.10.2002, Egmond aan Zee, Niederlande

Journal of Physiology and Biochemistry, eingereicht

Leisen C., Hanafy A., Spahn-Langguth H.

Intestinal absorption of γ -aminobutyric acid derivatives: Evidence of drug-food interaction with taurine-containing energy drinks in situ and in vivo in rats.

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG, 10.-12.10.2002, Berlin

Archiv der Pharmazie, 2002, 335 (Suppl. 1), 88
