

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
-Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka-
angefertigt im Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

**Entwicklung neuer Strategien zur Überwindung transporter-
basierter Pharmakoresistenz bei Epilepsien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Marion Czapp
aus
Geseke

München, 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. H. Potschka
Korreferent:	Priv. Doz. Dr. A. Fischer

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

1	EINLEITUNG.....	1
2	KENNTNISSTAND.....	3
2.1	EPILEPSIEN.....	3
2.1.1	DEFINITION UND BEDEUTUNG.....	3
2.1.2	TEMPORALLAPPENEPILEPSIE.....	6
2.1.3	PHARMAKORESISTENZ.....	7
2.1.3.1	BEDEUTUNG.....	7
2.1.3.2	MÖGLICHE URSACHEN.....	9
2.1.4	TIERMODELLE.....	18
2.1.4.1	DAS AMYGDALA-KINDLING-MODELL DER TEMPORALLAPPEN-EPILEPSIE.....	19
2.1.5	ANTIEPILEPTIKA.....	20
2.2	INTRANASALE APPLIKATION.....	21
2.2.1	ÜBERBLICK UND BEDEUTUNG DER INTRANASALEN APPLIKATION.....	21
2.2.2	AUFBAU DER NASENHÖHLE.....	22
2.2.3	AUFBAU DES NASALEN EPITHEL.....	23
2.2.4	SUBSTANZAUFNAHME NACH INTRANASALER APPLIKATION.....	24
2.2.4.1	NEURONALE TRANSPORTWEGE.....	24
2.2.4.2	SYSTEMISCHE AUFNAHME.....	26
2.2.5	EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE EFFEKTIVITÄT INTRANASALER APPLIKATION.....	26
2.3	RNA-INTERFERENZ.....	28
2.3.1	PRINZIP UND BEDEUTUNG.....	28
2.3.2	MECHANISMUS DER RNA-INTERFERENZ.....	29
2.3.3	KLINISCH RELEVANTER EINSATZ VON RNAI.....	30
2.3.4	STABILITÄT, SPEZIFITÄT UND ZIELSTEUERUNG VON siRNA.....	32
2.3.4.1	BESTIMMUNG DER siRNA-INTEGRITÄT.....	33
2.3.5	APPLIKATIONSWEGE.....	34
3	ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG.....	36
3.1	INTRANASALE APPLIKATION.....	36
3.2	RNA-INTERFERENZ.....	37
4	MATERIAL UND METHODEN.....	39
4.1	INTRANASALE APPLIKATION.....	39
4.1.1	FORMULIERUNG DER APPLIZIERTEN ANTIEPILEPTIKA.....	39
4.1.1.1	PHENOBARBITAL.....	39
4.1.1.2	LAMOTRIGIN.....	41
4.1.1.3	CARBAMAZEPIN.....	41
4.1.2	INTRANASALE APPLIKATION AM RATTENMODELL.....	42
4.1.2.1	INTRANASALE APPLIKATION IM WACHZUSTAND.....	42
4.1.2.2	APPLIKATION UNTER PROPOFOL-ANÄSTHESIE.....	43
4.1.3	MIKRODIALYSE.....	44
4.1.3.1	VERSUCHSTIERE.....	44
4.1.3.2	IMPLANTATION DER FÜHRUNGSKANÜLEN.....	45
4.1.3.3	VERSUCHSAUFBAU.....	49
4.1.3.4	VERSUCHSABLAUF UND PROBENGEWINNUNG.....	50
4.1.3.5	PROBENANALYSE MITTELS HPLC.....	55
4.1.3.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	60
4.1.4	GEHIRNPRÄPARATIONEN.....	61
4.1.4.1	VERSUCHSTIERE.....	61
4.1.4.2	VERSUCHSAUFBAU UND –DURCHFÜHRUNG.....	61
4.1.5	INTRANASALE APPLIKATION IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL.....	67
4.1.5.1	VERSUCHSTIERE.....	67
4.1.5.2	IMPLANTATION DER STIMULATIONS- UND ABLEITELEKTRODEN.....	67

4.1.5.3	KINDLING-PROZESS	68
4.1.5.4	VERSUCHSABLAUF.....	73
4.1.5.5	KONTROLLE DER ELEKTRODENLOKALISATION.....	74
4.1.5.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER VERSUCHE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL	76
4.2	siRNA-UNTERSUCHUNGEN	79
4.2.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSIONSREGULATION VON P-GLYCOPROTEIN	79
4.2.1.1	siRNA-SEQUENZ UND KOPPLUNG MIT FLUOROPHOREN	79
4.2.1.2	VERPACKUNG DER siRNA IN LIPOSOMEN	79
4.2.1.3	VERSUCHSTIERE	82
4.2.1.4	VERSUCHSABLAUF.....	82
4.2.1.5	QUANTIFIZIERUNG DER P-GLYCOPROTEIN EXPRESSION	84
4.2.1.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	88
4.2.2	UNTERSUCHUNG DER VERTEILUNG UND INTEGRITÄT DER siRNA	89
4.2.2.1	VERSUCHSTIERE	89
4.2.2.2	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG.....	89
5	ERGEBNISSE.....	92
5.1	INTRANASALE APPLIKATION	92
5.1.1	MIKRODIALYSE	92
5.1.1.1	CARBAMAZEPIN.....	92
5.1.1.2	LAMOTRIGIN.....	93
5.1.1.3	PHENOBARBITAL.....	99
5.1.2	GEHIRNPRÄPARATIONEN	104
5.1.2.1	CARBAMAZEPIN	104
5.1.2.2	PHENOBARBITAL IM GESAMTGEHIRN.....	105
5.1.2.3	PHENOBARBITAL IN PRÄPARIERTEN GEHIRNREGIONEN	110
5.1.3	AMYGDALA-KINDLING-MODELL	112
5.1.3.1	INTRANASALE APPLIKATION VON PHENOBARBITAL IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL ..	112
5.2	siRNA-UNTERSUCHUNGEN	119
5.2.1	EXPRESSIONSREGULATION VON P-GLYCOPROTEIN.....	119
5.2.1.1	STATISTISCHE AUSWERTUNG DER UNTERSUCHUNGEN DER P-GP-EXPRESSION.....	123
5.2.2	siRNA-VERTEILUNG UND –INTEGRITÄT.....	123
6	DISKUSSION	125
6.1	INTRANASALE APPLIKATION	126
6.1.1	ETABLIERUNG EINES RATTENMODELLS ZUR INTRANASALEN APPLIKATION	127
6.1.2	INTRANASALE APPLIKATION VON CARBAMAZEPIN	127
6.1.3	INTRANASALE APPLIKATION VON LAMOTRIGIN	129
6.1.4	INTRANASALE APPLIKATION VON PHENOBARBITAL.....	132
6.1.4.1	MIKRODIALYSE	133
6.1.4.2	GEHIRNPRÄPARATIONEN.....	134
6.1.4.3	VERSUCHE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL	137
6.1.5	EXTRAPOLATION.....	139
6.1.6	AUSBLICK.....	141
6.2	RNA-INTERFERENZ	142
6.2.1	EXPRESSIONSREGULATION VON P-GLYCOPROTEIN	142
6.2.2	VERTEILUNG UND INTEGRITÄT DER siRNA	145
6.2.3	AUSBLICK.....	148
7	ZUSAMMENFASSUNG	150
8	LITERATUR	155
	ANHANG.....	168

ABKÜRZUNGEN

ADD1	Afterdischarge duration (Nachentladungsdauer) 1
ADD2	Afterdischarge duration (Nachentladungsdauer) 2
ADT	Afterdischarge treshold (Nachentladungsschwelle)
BLA	Basolaterale Amygdala
CBP	Carbopol
CBZ	Carbamazepin
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
EEG	Elektroenzephalogramm
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Fa.	Firma
GABA	Gammaaminobuttersäure
GD	Gyrus dentatus
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HRP	Horseraddish Peroxidase
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KGW	Körpergewicht
LTG	Lamotrigin
miRNA	micro RNA
MW	Molekulargewicht
p.a.	pro analytica
PB	Phenobarbital
PBS	Phospat-gepufferte Kochsalzlösung
P-gp	P-Glykoprotein
s.c.	subcutan
SD1	Seizure duration (Anfallsdauer) 1
SD2	Seizure duration (Anfallsdauer) 2
SEM	Standard error of the mean (Mittelwertfehler)
siRNA	small (short) interfering RNA
shRNA	short hairpin RNA
SNALP	stable nucleic acid lipid particle
SS	Seizure severity (Anfallsschwere)
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TLE	Temporallappen-Epilepsie
Vol.	Volumen
ZNS	zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Epilepsie ist die häufigste chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems bei Hund, Katze und Mensch (Hauser et al., 1993; Löscher, 1994; 2003). Etwa 30% der Veterinär- und Humanpatienten sprechen nicht ausreichend eine Behandlung mit Antiepileptika an (Schwartz-Porsche et al., 1985; Regesta & Tanganelli, 1999; Kwan & Brodie, 2000; Löscher, 2003). Bei der Temporallappen-Epilepsie als häufigster Epilepsieform beträgt der Anteil an therapieresistenten Patienten sogar 60-70% (Leppik, 1992).

Für die Pharmakotherapie der Epilepsien von Hund und Katze sind nur wenige der auf dem Markt befindlichen Antiepileptika geeignet, so dass für pharmakoresistente Patienten kaum medikamentelle Alternativen zur Verfügung stehen (Löscher, 2003). Obgleich in den letzten Jahrzehnten zahlreiche neue Antiepileptika entwickelt wurden, stellt die Pharmakoresistenz auch bei Humanpatienten mit Epilepsie ein nach wie vor ungelöstes Problem dar.

Als Ursache der Pharmakoresistenz wird neben Strukturveränderungen der Angriffspunkte von Antiepileptika (Target-Hypothese) die Überexpression von Multidrug-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke (Transporter-Hypothese) diskutiert (Löscher & Potschka, 2005b). Man geht davon aus, dass durch den Efflux-Transport aus den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke zurück in das kapilläre Lumen keine ausreichende Wirkstoff-Konzentration im Bereich des epileptischen Fokus erreicht werden kann (Löscher & Potschka, 2005a; Löscher & Potschka, 2005c; Sisodiya & Thom, 2003). Untersuchungen in Tiermodellen und am Menschen unterstützen diese Hypothese, indem sie zeigen, dass der Multidrug-Transporter P-Glycoprotein bei pharmakoresistenten Individuen vermehrt exprimiert wird. Der Efflux-Transporter P-Glycoprotein spielt eine bedeutende Rolle im Zusammenhang mit Pharmakoresistenz bei Epilepsien von Tier und Mensch (Löscher & Potschka, 2005b). Diverse gängige Antiepileptika wurden als Substrate von P-Glycoprotein beschrieben (Potschka & Löscher, 2001; Potschka et al., 2001; Potschka et al., 2002; Rizzi et al., 2002). Zudem konnte durch eine selektive Hemmung von P-Glycoprotein im Tiermodell die Überwindung der Pharmakoresistenz erreicht werden (Brandt et al., 2006; van Vliet et al., 2006).

Basierend auf der Multidrug-Transporter-Hypothese können neue Strategien zur Überwindung von Pharmakoresistenz bei Epilepsien entwickelt werden. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen hatten zum Ziel, wichtige Erkenntnisse über zwei mögliche neue Behandlungsstrategien zu erbringen, die sich auf die Multidrug-Transporter-Hypothese als Erklärung für die Pharmakoresistenz bei Epilepsien stützen.

Eine zunehmende Anzahl an Studien beschreibt die Arzneimittelaufnahme aus der Nasenhöhle über neuronale Transportwege direkt in das Gehirn. Basierend hierauf bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, diese Möglichkeit zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke mit den dort lokalisierten Transportern durch die intranasale Applikation von Antiepileptika zu überprüfen.

Die Möglichkeit einer Inhibition der P-Glycoprotein-Expression durch den Mechanismus der RNA-Interferenz wurde als zweite Strategie zur Überwindung der transporter-basierten Pharmakoresistenz im Tiermodell untersucht. In diesem Zusammenhang kam die Applikation der siRNA in einer neuartigen liposomalen Verpackung zum Einsatz.

2 KENNTNISSTAND

2.1 Epilepsien

2.1.1 DEFINITION UND BEDEUTUNG

Epilepsien gehören bei kleinen Haustieren (Hund und Katze) und beim Menschen zu den häufigsten Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Browne & Holmes, 2001; Löscher, 2003). Etwa 1,4 – 5,7% der Weltbevölkerung sind im Laufe des Lebens betroffen, was mehr als 50 Millionen Menschen entspricht (Hauser et al., 1993). Beim Tier treten Epilepsien vor allem beim Hund und seltener auch bei der Katze mit ähnlicher Symptomatik wie beim Menschen auf und stellen hier ebenso wie in der Humanmedizin die häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen dar (Löscher, 1994; 2003).

Der Begriff Epilepsie steht für kein umschriebenes Krankheitsbild, sondern umfasst eine Gruppe von Störungen als Ausdruck einer zugrunde liegenden zerebralen Dysfunktion unterschiedlicher Genese (Fisher et al., 2005).

Die Internationale Liga gegen Epilepsie (International League against Epilepsy; ILAE) hat 2005 gemeinsam mit dem Internationalen Büro für Epilepsie (International Bureau for Epilepsy; IBE) Konsensusdefinitionen erarbeitet, nach denen man unter Epilepsie „eine Störung des Gehirns“ versteht, „die durch eine dauerhafte Neigung zur Entwicklung epileptischer Anfälle sowie durch die neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen dieses Zustands gekennzeichnet ist“ (Fisher et al., 2005). Voraussetzung für das Vorliegen einer Epilepsie ist, dass mindestens ein epileptischer Anfall, der durch eine dauerhafte epileptogene Störung verursacht wird, auftritt. Das englische Wort für „Anfall“ (seizure) stammt von der griechischen Bezeichnung für „ergriffen werden“ ab. Ein epileptischer Anfall ist definiert als das „vorübergehende Auftreten krankhafter Befunde oder Symptome aufgrund einer pathologisch exzessiven oder synchronen neuronalen Aktivität im Gehirn“ (Fisher et al., 2005). Häufig kommt es dabei zu einer pathologisch verstärkten, multizellulären Synchronisation von Neuronen. Das „Feuern“ der Neuronen während eines epileptischen Anfalls kann sowohl zu der Verstärkung einer

Hemmung als auch zu einer Erregung führen. Epileptische Anfälle haben einen eindeutigen Beginn und ein eindeutiges Ende, die anhand von Verhaltens- und EEG-Merkmalen bestimmt werden können. EEG-Entladungen während eines epileptischen Anfalls sind regelmäßig und überwiegend stereotyp (Fisher et al., 2005). Der primäre Ort für die Generierung epileptischer Anfälle ist die Hirnrinde. Unter bestimmten Bedingungen können Anfälle ihren Ausgang aber auch vom interaktiven thalamokortikalen System oder dem Hirnstamm nehmen (Fisher et al., 2005).

Die Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Behandlung von Epilepsien ist eine korrekte Diagnose, da die zu wählende Therapie maßgeblich von der Art des epileptischen Syndroms und der epileptischen Anfälle abhängt (Browne & Holmes, 2001). Epileptische Syndrome und Anfälle werden anhand der Merkmale Anfallsmuster, Ursache, Alter bei Krankheitsbeginn, auslösende Faktoren und elektroenzephalographische Befunde klassifiziert.

Beim Anfallsmuster unterscheidet man fokale (oder partielle) und generalisierte Anfälle. Fokale Anfälle sind lokalisationsbezogen und nehmen ihren Ursprung in einer umschriebenen Gehirnregion. Klinisch äußern sie sich als unwillkürliche Bewegungen einzelner Muskelgruppen. Die häufigsten Anfälle dieser Art sind einfach-fokal (keine Bewusstseinsstörung), komplex-fokal (mit Bewusstseinsstörung) oder sekundär-generalisierend (Fisher et al., 2005; McNamara, 1994). Bei letzteren kommt es zu einer Ausweitung der epileptogenen Entladungen vom initialen Fokus auf das gesamte Gehirn. Primär generalisierte Anfälle weisen von Beginn an eine epileptische Aktivität in beiden Großhirnhemisphären auf (Fisher et al., 2005; McNamara, 1994).

Anhand der auftretenden motorischen Funktionsstörungen werden primär und sekundär generalisierte Anfälle in tonische (Streckkrämpfe), klonische (Ruderkrämpfe), tonisch-klonische, myoklonische (Muskelzuckungen ohne Bewegungseffekt) und atonische Krämpfe (Erschlaffung der Muskulatur) sowie so genannte Abscencen (Bewusstseinsminderung mit anschließender Amnesie) eingeteilt (Westbrook, 2000). In der Veterinärmedizin werden epileptische Anfälle entsprechend der Klassifikation für die Humanmedizin unterteilt. Bei Hund und Katze

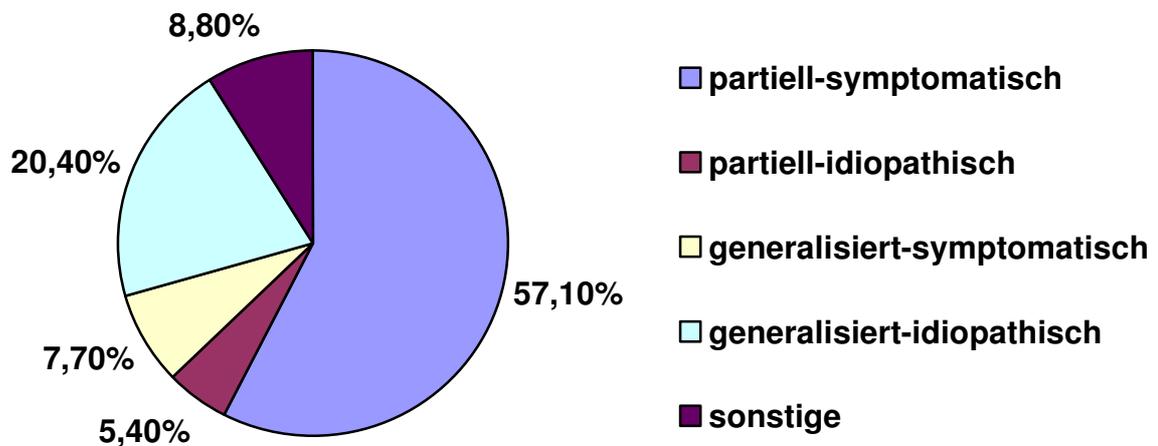


Abbildung 2.1: Relative Häufigkeit der verschiedenen Epilepsieformen beim Menschen nach Avanzini et al. (1996).

werden am häufigsten generalisierte Anfälle mit einer klonisch-tonischen Krampfaktivität diagnostiziert (Dewey et al., 2004). Das Vorkommen von Absencen beim Tier kann nur schwierig beurteilt werden.

Zusätzlich zu fokalen und generalisierten Epilepsien unterscheidet man unklassifizierbare Epilepsien und weitere spezielle Syndrome. Zu letzteren zählt unter anderem der Status epilepticus, der durch einen anhaltenden epileptischen Zustand oder eine Serie von Anfällen ohne Wiedererlangung des Bewusstseins gekennzeichnet ist (Lowenstein et al., 1999).

Bei den Anfallsursachen werden idiopathische, kryptogene oder symptomatische Ursachen unterschieden (Fisher et al., 2005; Avanzini et al., 1996). Von symptomatischer Epilepsie spricht man bei Anfällen, die aus einer eindeutig feststellbaren Grunderkrankung resultieren. Kryptogene Epilepsien beruhen auf vermuteten, aber nicht identifizierten organischen Ursachen. Idiopathische Epilepsien haben keine erkennbare Ursache und entstehen „aus sich heraus“. In der Regel basieren sie auf genetischen Faktoren (Fisher et al., 2005). In Abbildung 2.1 ist die relative Häufigkeit verschiedener Formen von Epilepsien beim Menschen dargestellt.

Bei Hund und Katze werden symptomatische Epilepsien als häufigste Form diagnostiziert (Podell et al., 1995). Bei etwa 90% dieser Patienten liegen als Ursache chronische Gehirnerkrankungen zugrunde (Podell et al., 1995). Als häufige Ursachen für Epilepsien des Menschen, die vor Erreichen des 20. Lebensjahres auftreten, sind angeborene Entwicklungsstörungen oder perinatale Beeinträchtigungen sowie genetische und neurometabolische Schädigungen des Gehirns zu nennen. Bei älteren Menschen führen zerebrovaskuläre Störungen und Hirntumoren am häufigsten zu Epilepsien (Hauser et al., 1993).

2.1.2 TEMPORALLAPPENEPILEPSIE

Beim Menschen treten am häufigsten komplex-fokale Anfälle auf, die teilweise sekundär generalisieren (Hauser et al., 1993). Etwa 70-80% der komplex-fokalen Anfälle nehmen ihren Ursprung in den Temporallappen und dort überwiegend im Hippocampus, der Amygdala und dem parahippocampalen Cortex (Chang & Lowenstein, 2003). Diese Form der Epilepsie wird als mesiale Temporallappenepilepsie (TLE) bezeichnet (Chang & Lowenstein, 2003; Wolf, 1994).

Komplex-fokale Anfälle, die im mesialen Temporallappen ihren Ursprung nehmen, entwickeln sich oft als Folge primärer Insulte, wie Schädel-Hirn-Traumata, Schlaganfälle oder Tumoren (Benbadis, 2001; Chang & Lowenstein, 2003). Auch Infektionen des ZNS oder ein Status epilepticus können der Ausgangspunkt für die Entwicklung dieser Epilepsieform sein.

Die TLE besitzt einen progressiven Charakter. Bei der Mehrheit der Patienten werden Läsionen und kompensatorische Umbauprozesse im Hippocampus festgestellt, welche das Auftreten weiterer Anfälle begünstigen (Hippocampussklerose). Im Bereich des Hippocampus ist der auftretende Neuronenverlust am stärksten ausgeprägt, jedoch wurden in neueren Untersuchungen auch in der Amygdala und dem piriformen Cortex gleichartige Veränderungen angetroffen (Yilmazer-Hanke et al., 2000; Salmenperä et al., 2001).

Untersuchungen an den Hippocampi nicht epileptischer Hunde und denen von Hunden mit pharmakoresistenter Epilepsie ergaben keine Hinweise auf das

Vorliegen vergleichbarer neuropathologischer Veränderungen bei Hunden wie sie bei Humanpatienten mit TLE auftreten (Buckmaster et al., 2002).

2.1.3 PHARMAKORESISTENZ

2.1.3.1 BEDEUTUNG

Nach wie vor besteht die bedeutendste Behandlungsform von Epilepsien in einer dauerhaften Pharmakotherapie (Löscher & Potschka, 2002). In der Humanmedizin stehen derzeit mehr als 20 verschiedene Antiepileptika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung, zu denen beispielsweise Phenytoin, Phenobarbital (PB) oder Carbamazepin (CBZ) als Wirkstoffe der ersten Generation und Lamotrigin (LTG), Vigabatrin oder Levetiracetam als Antiepileptika der zweiten Generation zählen. Unterschiede in der Pharmakokinetik von Mensch und kleinen Haustieren tragen dazu bei, dass viele der in der Humanmedizin eingesetzten Antiepileptika nicht zur Langzeitbehandlung von Hunden und Katzen geeignet sind (Löscher, 2003). Eine ausreichend lange Eliminationshalbwertszeit, die ein entscheidendes Kriterium für die Eignung eines Antiepileptikums zur Langzeittherapie darstellt, weisen bei Hund und Katze nur PB, Primidon, Bromidsalze, Felbamat und Zonisamid auf (Löscher, 2003). Alle weiteren Wirkstoffe werden von Hund und Katze innerhalb kurzer Zeit eliminiert, so dass zur Aufrechterhaltung eines therapeutischen Plasmaspiegels kurze und damit für eine langfristige Behandlung durch den Tierbesitzer unpraktikable Applikationsintervalle ergeben.

Für den größeren Teil der Epilepsiepatienten (etwa 60%) in der Human- und Veterinärmedizin ist die Behandlungsprognose gut, das heißt, das Auftreten epileptischer Anfälle kann erfolgreich unterdrückt werden. Eine Epilepsitherapie im Sinne einer Heilung ist allerdings bisher nicht möglich (Löscher, 2002).

Ein nicht unerheblicher Anteil von 30-40% der epileptischen Tiere und Menschen spricht jedoch von Therapiebeginn an nicht oder im Laufe der Zeit nur noch unvollständig oder gar nicht mehr auf eine Therapie mit Antiepileptika an (Regesta & Tanganelli, 1999; Löscher, 2003; Schwartz-Porsche et al., 1985;

Schwartz-Porsche & Jurgens, 1991). Auch die Entwicklung neuer Antiepileptika mit anderen Wirkmechanismen oder die Kombination zweier Wirkstoffe konnte diesbezüglich bis dato keine Abhilfe schaffen (Kwan & Brodie, 2006a). Klinische Faktoren, die möglicherweise mit der Entwicklung einer Pharmakoresistenz in positiver Korrelation stehen, sind die Anzahl der Anfälle vor Behandlungsbeginn, die Frequenz der Anfälle oder auch das Auftreten von Anfällen während des ersten Lebensjahres.

Obwohl in der Humanmedizin bisher eine einheitliche Definition von Pharmakoresistenz bei Epilepsien fehlt, geht man im Allgemeinen davon aus, dass ein Patient als pharmakoresistent einzustufen ist, wenn bei ausreichender Therapiedauer und angemessener Auswahl und Dosierung von mindestens zwei Antiepileptika kein Therapieerfolg zu erzielen ist. Unter Therapieerfolg versteht man dabei eine Anfallsfreiheit oder eine mindestens 50%ige Reduktion der Anfallsfrequenz (Regesta & Tanganelli, 1999). Ausgehend von dieser Definition sprechen 20-40% der Hunde (Schwartz-Porsche et al., 1985; Schwartz-Porsche & Jurgens, 1991) und mehr als 30% der Humanpatienten mit Epilepsie nicht oder nur unzureichend auf eine adäquate Pharmakotherapie an (Kwan & Brodie, 2000; Regesta & Tanganelli, 1999). Vergleichbare klinische Studien zur Wirksamkeit von Antiepileptika bei Katzen wurden bisher nicht durchgeführt.

Eine unzureichende Kontrolle der epileptischen Anfallsaktivität resultiert in einer gesteigerten Häufigkeit sekundärer Gesundheitsprobleme sowie einer höheren Mortalität der betroffenen Patienten (Kwan & Brodie, 2002). In der Humanmedizin bedeutet es zudem eine Einschränkung der Lebensqualität und Probleme in der sozialen Eingliederung (Kwan & Brodie, 2002). Pharmakoresistente Patienten in der Veterinärmedizin, die eine hohe Anfallsfrequenz aufweisen, werden häufig euthanasiert (Hass & Fenner, 1989; Löscher, 2003).

Die TLE mit komplex-fokalen Anfällen ist die beim erwachsenen Menschen am häufigsten als pharmakoresistent eingestufte Epilepsieform. Bei 70-80% der TLE-Patienten ist eine erfolgreiche Therapie mit den zur Auswahl stehenden Antiepileptika nur schwer oder überhaupt nicht zu erreichen (Leppik, 1992). Für diese pharmakoresistenten Patienten bleibt oft als letzte Alternative nur ein

neurochirurgischer Eingriff (Foldvary et al., 2001). Allerdings ist die chirurgische Entfernung des epileptischen Fokus nur dann möglich, wenn der Bereich lokal begrenzt und gut abgrenzbar ist. Nach Entfernung des epileptischen Fokus muss die Pharmakotherapie trotzdem fortgeführt werden, da eine Kontrolle der Anfallsaktivität oft ohne diese nicht zu gewährleisten ist (Löscher & Schmidt, 2002). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass durch den neurochirurgischen Eingriff nur der Teil des epileptischen Netzwerkes entfernt werden konnte, der für die Pharmakoresistenz verantwortlich war (Coulter et al., 2002).

Als weitere mögliche Therapieansätze bei Pharmakoresistenz stehen in der Humanmedizin die Vagusnervstimulation, die ketogene Diät oder die transkranielle Magnetstimulation zur Verfügung (Kwan & Brodie, 2006b; Löscher & Potschka, 2002), die für Therapie von Epilepsiepatienten in der Veterinärmedizin nicht etabliert sind.

2.1.3.2 MÖGLICHE URSACHEN

Trotz eines verbesserten Verständnisses der Pathogenese von Anfällen und Epilepsie (McNamara, 1999) sind die Ursachen und Mechanismen der Pharmakoresistenz weitgehend unbekannt (Löscher & Schmidt, 2002). Es wird vermutet, dass es sich um einen multifaktoriellen Prozess unter möglicher Beteiligung von genetischen, krankheitsbedingten oder pharmakotherapiebedingten Einflüssen handelt (Kwan & Brodie, 2002; Löscher & Potschka, 2002; Regesta & Tanganelli, 1999).

Genetische Faktoren, wie Polymorphismen, könnten erklären, warum zwei Patienten mit gleicher Epilepsieform und bei gleicher Therapie unterschiedlich gut auf die Therapie ansprechen.

Unter krankheitsbedingten Faktoren fasst man die Entstehungsursachen der Epilepsie, die Progression der Erkrankung während der Pharmakotherapie, neurodegenerative Veränderungen im epileptischen Fokus und Veränderungen an Angriffspunkten („Targets“) sowie Aufnahmemechanismen der Antiepileptika (durch die Blut-Hirn-Schranke) zusammen (Löscher & Potschka, 2002; Regesta & Tanganelli, 1999).

Auch pharmakotherapiebedingte Faktoren sind nicht selten mitverantwortlich für die unzureichende Wirkung von Antiepileptika. Im Laufe der Therapie kann die Wirkung des Pharmakons beispielsweise abnehmen, es entwickelt sich eine Toleranz. Bei bestimmten Anfallsformen ist die Wirksamkeit an den Targetstrukturen des Medikaments, wie GABA- und Glutamatrezeptoren, nicht ausreichend (Löscher & Potschka, 2002; Löscher & Schmidt, 2006).

2.1.3.2.1 Targetstruktur-Veränderungen

Die meisten Antiepileptika zur Behandlung der TLE, wie CBZ, PB, Phenytoin und LTG üben ihre Wirkung aus, indem sie die Aktivität spannungsabhängiger Natriumkanäle oder Rezeptoren, wie den GABA_A-Rezeptor beeinflussen (Löscher, 2005). Veränderungen in der Pharmakosensitivität der Zielstrukturen von Antiepileptika können in Pharmakoresistenz resultieren (Elger, 2003).

Es wurden verschiedene Veränderungen in der Zusammensetzung, Verteilung und Sensitivität von GABA_A- und Glutamat-Rezeptoren im epileptischen Gewebe festgestellt (Kwan & Brodie, 2002). Fasst man die Ergebnisse molekularer und funktioneller Studien zusammen, wird eine transkriptionsvermittelte Änderung in der Zusammensetzung der α -Untereinheiten von GABA_A-Rezeptoren in epileptischen Tieren wahrscheinlich (Brooks-Kayal et al., 1998; Remy & Beck, 2006).

Beck et al. (1997) und Reckziegel et al. (1998) wiesen im Hippocampus pharmakoresistenter TLE-Patienten veränderte Eigenschaften spannungsabhängiger Calcium- und Natriumkanäle nach. Remy und Beck (2006) gehen davon aus, dass epileptische Anfälle Veränderungen in Transkription oder Splicing von Ionenkanal-Untereinheiten hervorrufen und/oder Variationen in der posttranslationalen Modifikation bedingen. Auch eine Änderung in Verteilung und Dichte der Ionenkanäle konnte gezeigt werden (Lombardo et al., 1996).

An hippocampalem Resektionsgewebe CBZ-resistenter TLE-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von CBZ auf spannungsabhängige Natriumkanäle vollständig verloren war. Auch in Tiermodellen für Epilepsie wurden vergleichbare Beobachtungen gemacht (Remy et al., 2003; Kapur & Macdonald, 1997).

2.1.3.2.2 Überexpression von Multidrug-Transportern

Gegen eine Targetstruktur-Veränderung als einziger Hauptmechanismus der Pharmakoresistenz spricht, dass die meisten pharmakoresistenten Epilepsiepatienten parallel auf mehrere Antiepileptika unterschiedlicher Wirkmechanismen nicht ansprechen. Wird ein zweites Antiepileptikum mit einem anderen Wirkungsmechanismus eingesetzt, beträgt die Chance auf einen Therapieerfolg nur 10-15% (Kwan & Brodie, 2000; 2002; Regesta & Tanganelli, 1999). Diese Tatsache spricht dafür, dass unspezifische und adaptative Mechanismen für die Ausprägung von Pharmakoresistenz bei Epilepsie verantwortlich sind.

In der Krebsforschung wurde vor mehr als 30 Jahren festgestellt, dass die vermehrte Expression von Multidrug-Transportern eine Pharmakoresistenz zur Folge haben kann (Juliano & Ling, 1976). Übertragen auf pharmakoresistente Epilepsiepatienten geht man davon aus, dass aufgrund einer Überexpression von Multidrug-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke keine therapeutisch wirksame Konzentration des Antiepileptikums im Bereich des epileptischen Fokus erreicht werden kann, obwohl der Wirkstoffgehalt im Blut ausreichend hoch ist (siehe Abbildung 2. 2) (Löscher & Potschka, 2005b). Ergebnisse zahlreicher aktueller Untersuchungen aus der Epilepsieforschung stützen diese Multidrug-Transporter-Hypothese. So konnte sowohl in Tiermodellen als auch in humanem Resektionsgewebe eine Überexpression von Multidrug-Transportern wie P-Glycoprotein (P-gp) im Zusammenhang mit epileptischen Syndromen und Krampfanfällen gezeigt werden (Kwan et al., 2002; Seegers et al., 2002; Sisodiya et al., 2002; Tishler et al., 1995). Die Ergebnisse dieser und weiterer Studien sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Um in das Gehirn zu gelangen, müssen pharmakologische Wirkstoffe die Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke überqueren. Die Blut-Hirn-Schranke stellt im menschlichen wie tierischen Organismus eine der striktesten Barrieren für den Arzneimitteltransport in das Gehirn dar (Löscher & Potschka, 2005b). Sie setzt sich aus kapillären Endothelzellen, die von einer Basallamina umgeben sind, und astrozytären perivaskulären Endfüßen zusammen (Pardridge, 2005). Die Astrozyten

Modell	P-gp-Überexpression in			Quelle
	Endothelzellen	Gliazellen	Neuronen	
Kindling-Modell	+	?	?	Volk et al. (2004b)
Kainat-Modell	+	+	+	Zhang et al. (1999) Seegers et al. (2002) Volk et al. (2004b; 2004a)
Pilocarpin-Modell	+	+	+	Volk et al. (2004a)
Elektrisch induzierter SE	+	+	-	Van Vliet et al. (2004)
Humanpatienten	+	+	+	Tishler et al. (1995) Sisodiya et al. (1999; 2002) Dombrowski et al. (2001) Aronica et al. (2003; 2004)

Tabelle 2.1: Nachweis einer P-gp-Überexpression in verschiedenen Epilepsiemodellen (Ratte) und bei Humanpatienten (SE = Status epilepticus; + = Nachweis erfolgt; - = kein Nachweis; ? = Ergebnisse nicht eindeutig).

ermöglichen die Verbindung zu den Nervenzellen. Zusätzlich sind Perizyten am Schrankenaufbau beteiligt. Die Zellen der Blut-Hirn-Schranke sind über *tight junctions* verbunden, die den parazellulären Substanztransport verhindern und trennen gemeinsam Gehirn und Cerebrospinalflüssigkeit vom Blut (Abbott et al., 2006). Pinozytische Transportvesikel sind kaum vorhanden, so dass Endo- oder Transzytose nur sehr eingeschränkt stattfinden können (Lee et al., 2001). Weiterhin bilden Stoffwechsellenzyme der Endothelzellen eine enzymatische Barriere. Aufgrund dieser besonderen Gegebenheiten entspricht die Funktionsweise der kapillären Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke der einer Phospholipidmembran (Spector et

al., 2000). Lipophile Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 500 Da können die Blut-Hirn-Schranke per Diffusion oder carriervermittelten Transport überschreiten. Große, hydrophile Moleküle und monoklonale Antikörper, rekombinante Proteine oder Gentherapeutika sind nicht in der Lage, über die BHS in das Gehirn zu gelangen (Pardridge, 2005; Spector et al., 2000).

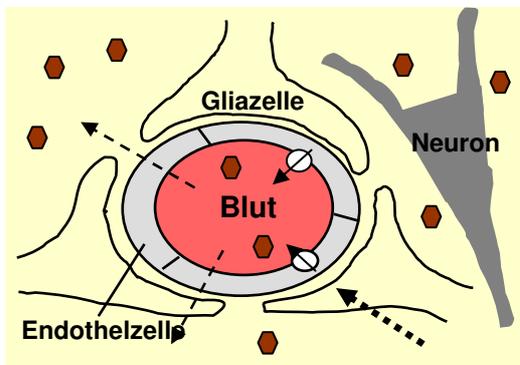
Die Zellen der Blut-Hirn-Schranke besitzen zusätzlich aktive Efflux-Transportsysteme, die Substrate nach der Diffusion in die Zelle energieabhängig zurück ins Blut transportieren (de Boer et al., 2003; Lee et al., 2001; Pardridge, 2005). Diese Transporter sind in der luminalen oder in der basolateralen Membran positioniert. Einige der Transporter sind auf beiden Seiten der Zellen anzutreffen.

Für einige Mitglieder der ABC (**A**TP-**B**inding-**C**assette)-Superfamilie wurde eine Lokalisation an der Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke nachgewiesen (Lee et al., 2001). Dazu gehört P-gp als Genprodukt des humanen *multidrug-resistance-1 gene* (*MDR1*; *ABCB1*). Neben P-gp sind auch Vertreter der MRP-Familie (*multidrug resistance-associated protein-family*; ABCC-Familie) anzutreffen, wobei insbesondere die Bedeutung von MRP2 diskutiert wird (Löscher & Potschka, 2002; 2005b; Sisodiya et al., 2002).

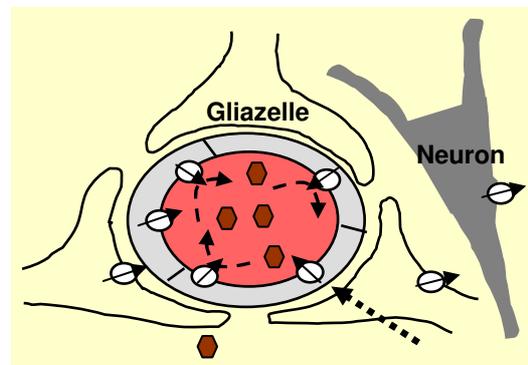
Bei Mensch und Hund existiert nur eine Isoform von P-gp (*MDR1*). Beim Nager hingegen treten zwei Isoformen auf, die von den Genen *mdr1a* und *mdr1b* kodiert werden (Schinkel, 1999; Mealey et al., 2001). Die Substratspezifität von *mdr1a* und *mdr1b* P-gp ist unterschiedlich, aber teilweise überlappend (Schinkel, 1999).

Schinkel (1999) schließt anhand der Gewebeverteilung der beiden Nager-Isoformen darauf, dass sie gemeinsam die gleiche Funktion erfüllen, wie die eine Isoform des Menschen. *mdr1a* P-gp ist in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke anzutreffen, während *mdr1b* P-gp im Gehirnparenchym anzutreffen ist (Demeule et al., 2002). Neben der Expression in der Blut-Hirn- und der Blut-Liquor-Schranke wird P-gp auch in anderen Organen, wie Niere, Leber und Dünndarm sowie an der Plazentar- und Blut-Hoden-Schranke exprimiert (Fromm, 2000; 2004; Raub, 2006). In Abbildung 2.3 ist die Lokalisation von P-gp in verschiedenen Organ-Blut-Grenzen oder exkretorischen Organen gezeigt.

Expression an der Blut-Hirn-Schranke



Überexpression im epileptischen Fokus



⬡ = Antiepileptikum

⊗ = Multidrug-Transporter

Abbildung 2. 2: Expression von Multidrug-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke (modifiziert nach Löscher und Potschka (2002)). Im physiologischen Zustand kann ausreichend Antiepileptikum in das Gehirnparenchym gelangen (links), da Antiepileptika nur schwache Substrate der Efflux-Transporter sind; in Folge einer Überexpression (rechts) wird das Antiepileptikum vermehrt zurück in das kapilläre Lumen transportiert, so dass keine ausreichende Konzentration des Antiepileptikums im Gehirnparenchym erreicht wird.

Die physiologische Schutzfunktion des Multidrug-Transporters P-gp besteht im ATP-abhängigen Auswärtstransport von körpereigenen Substanzen und Xenobiotika und damit auch in der Begrenzung des Arzneimittelzutritts in das Gehirn und in andere Gewebe (Jette et al., 1995). Die strukturellen Gemeinsamkeiten der bevorzugt transportierten Substrate liegen in dem lipophilen Charakter, der planaren Struktur und einer Molekülgröße von über 400 Da (Schinkel, 1999; Seelig & Landwojtowicz, 2000). Einige Hunderassen (Collie und weitere Hütehunderassen) weisen einen Defekt des *MDR1*-Gens auf (Mealey et al., 2001; Geyer et al., 2005). Durch mangelnden Efflux-Transport kommt es bei diesen Hunden beispielsweise zu einer Ivermectin-Überempfindlichkeit mit Symptomen einer Neurotoxizität. Schinkel et al. (1994) entwickelten ein *mdr1a* Knockout-Mausmodell, in dem eine signifikant erhöhte Gehirngängigkeit verschiedener Substanzen (Ivermectin, Digoxin,

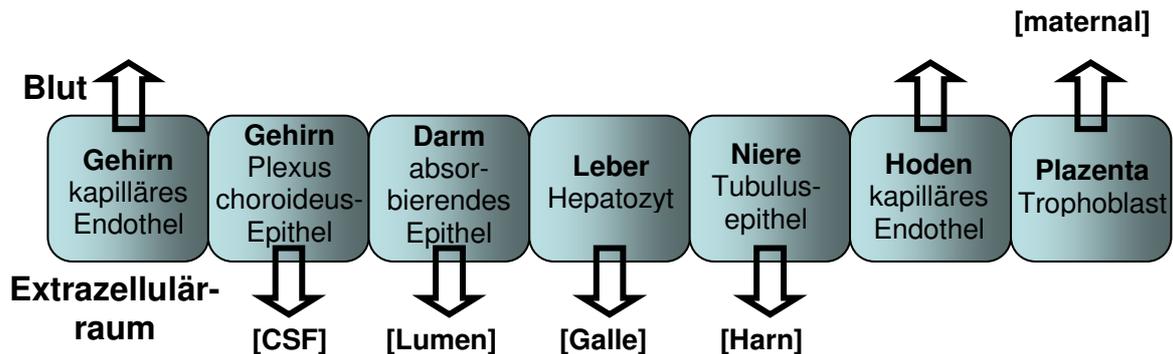


Abbildung 2.3: Expression und Efflux-Richtung von P-gp in verschiedenen Organen (Raub, 2006)

Cyclosporin A, Vinblastin und Dexamethason) gezeigt werden konnte (Schinkel et al., 1995)

Eine P-gp-Expression wurde sowohl in den Endfüßen der perivaskulären Astrozyten (Pardridge et al., 1997; Schlachetzki & Pardridge, 2003; Löscher & Potschka, 2005b) als auch in der luminalen Membran der kapillären Endothelzellen beschrieben (Schinkel, 1999; Löscher & Potschka, 2005b). Die Ergebnisse der meisten Untersuchungen sprechen für eine höhere Expression in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (Löscher & Potschka, 2005b). Volk et al. (2004a; 2005) stellten fest, dass epileptische Anfälle auch in den Neuronen zu einer P-gp-Expression führen kann.

Im Gehirn gesunder Menschen konnte P-gp mittels immunhistochemischer Färbung in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke, aber nicht in Astrozyten und Neuronen (Gehirnparenchym) detektiert werden (Sisodiya et al., 2002; Tishler et al., 1995). Bei epileptischen Patienten konnte P-gp auch in den Parenchymzellen nachgewiesen werden (Sisodiya et al., 2002; Aronica et al., 2003).

Aufgrund seiner breiten Substratspezifität hat P-gp im Zusammenhang mit Pharmakoresistenzen eine besondere klinische Relevanz (Löscher & Potschka, 2002). Es wird bei pharmakoresistenter Epilepsie dafür verantwortlich gemacht, dass trotz ausreichender Plasma-Konzentrationen von Antiepileptika keine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Gehirnparenchym erreicht werden kann (siehe Abbildung 2. 2) (Löscher & Schmidt, 2002; Löscher & Potschka, 2005b). Dieses wird durch

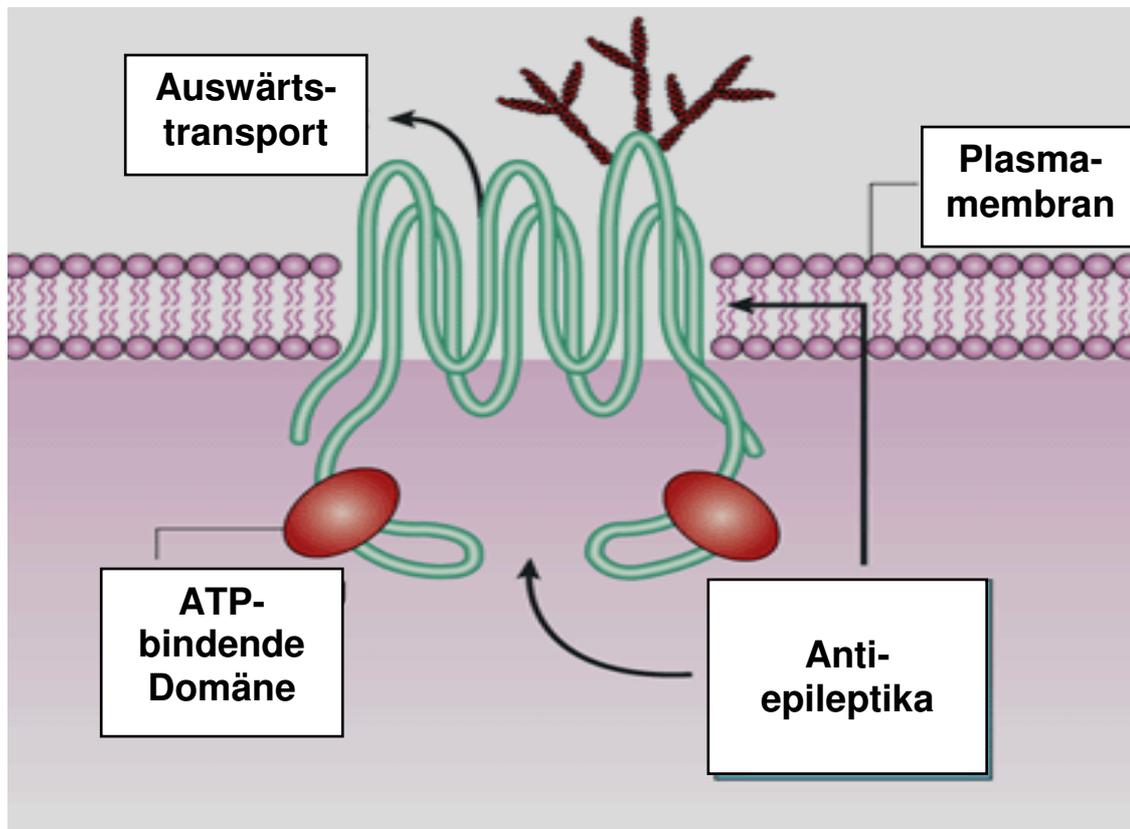


Abbildung 2.4: Struktur des ATP-abhängigen Effluxtransporters P-gp (modifiziert nach www.promega.com).

Untersuchungen an Gehirnresektionspräparaten pharmakoresistenter Epilepsiepatienten gestützt, bei denen *MDR1*-mRNA vermehrt vorhanden war (Tishler et al., 1995). Immunhistochemische Untersuchungen ergaben eine verstärkte Expression von P-gp in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke und zum Teil auch in Neuronen und Astrozyten (Aronica et al., 2003; 2004; Sisodiya et al., 1999; 2002; Tishler et al., 1995).

In verschiedenen Tiermodellen der Epilepsie, insbesondere bei pharmakoresistenten Tieren, wurde ebenfalls eine erhöhte P-gp-Expression festgestellt (siehe Tabelle 2.1) (Seegers et al., 2002; Volk et al., 2004b; 2004a; Zhang et al., 1999). Zusätzlich gibt es deutliche Hinweise, dass auch Antiepileptika von P-gp transportiert werden (siehe Tabelle 2.1). Man geht jedoch davon aus, dass Antiepileptika relativ schwache P-gp-Substrate sind, da bevorzugt transportierte Substanzen, wie beispielsweise Ivermectin, nahezu gar nicht in das Gehirn gelangen (Schinkel, 1999).

Antiepileptikum	Quelle
Phenytoin	Potschka & Löscher (2001); Rizzi et al. (2002);
Carbamazepin	Potschka & Löscher (2001); Sills et al., (2002)
Oxcarbazepin	Clinckers et al. (2005); Marchi et al. (2005)
Phenobarbital	Potschka et al. (2002)
Felbamat	Potschka et al. (2002)
Lamotrigin	Potschka et al. (2002)
Topiramamat	Sills et al. (2002)

Tabelle 2.2: Als P-gp-Substrate nachgewiesene Antiepileptika.

Die überwiegend lipophilen Antiepileptika können die Blut-Hirn-Schranke jedoch normalerweise in einem für die Therapie ausreichendem Maß passieren.

Die Multidrug-Transporter-Hypothese geht aus diesen Gründen davon aus, dass es erst bei einer Überexpression von Multidrug-Transportern im Bereich des epileptischen Fokus zu einer funktionellen Auswirkung auf die Wirkstoffkonzentration im Gehirnparenchym kommt (siehe Abbildung 2. 2) (Löscher & Potschka, 2002).

Da pharmakoresistente Patienten unter einer Medikation mit Antiepileptika die gleichen zentralnervös bedingten Nebenwirkungen zeigen, wie nicht-resistente Patienten, kann man daraus schließen, dass die Überexpression zumindest bei einem Teil der Patienten nur im Bereich des epileptischen Fokus und den Gehirnregionen, über die sich epileptische Anfälle ausbreiten, stattfindet (Löscher & Potschka, 2005a; Sills et al., 2002).

Kürzlich stellten Baltés et al. (Baltés et al., 2007) in Zellkultur-Untersuchungen Speziesunterschiede im Transport der Antiepileptika Phenytoin, Levetiracetam und CBZ zwischen humanem und Nager-P-gp fest. Vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme eines starken P-gp-Substrates an Ratten, Mäusen und Meerschweinchen ergaben 5fach höhere Konzentrationen in den Meerschweinchen-Gehirnen (Cutler et al., 2006). Die Relevanz dieser Speziesunterschiede wird in zukünftigen Studien zu klären sein.

2.1.4 TIERMODELLE

Um neue pharmakotherapeutische Ansätze oder Therapiestrategien überprüfen zu können, sind geeignete Tiermodelle unabdingbar. Dies hat ethische aber auch versuchstechnische Gründe, wie ein Mangel an Kontrollen (z.B. Kontrollgewebe) oder eine zu große Varianz innerhalb der Testgruppe (Löscher, 2002). Von Tiermodellen wird erwartet, dass sie die Pathogenese und Symptome einer Krankheit widerspiegeln und hinsichtlich der klinischen Wirksamkeit von Arzneimitteln prädiktive Aussagen ermöglichen.

Im Zusammenhang mit Epilepsie werden verschiedene Tiermodell-Typen unterschieden. Zum einen gibt es Modelle, bei denen ein epileptischer Anfall elektrisch oder chemisch akut ausgelöst werden kann; ohne den „Auslöser“ tritt in diesen Modellen kein Anfall auf (Löscher, 2002). Zwei wichtige Modelle zur Prüfung der akuten antikonvulsiven Wirkung bei der Entwicklung neuer Antiepileptika sind der „Maximale-Elektroschock-Test“ und der „Pentylentetrazoltest“. Bei ersterem wird ein generalisierter tonisch-klonischer Anfall akut durch eine elektrische Stimulation über die Cornea ausgelöst. Bei letzterem können Myoklonien und tonische Krämpfe durch die Verabreichung von Pentylentetrazol akut hervorgerufen werden.

Beim Amygdala-Kindling-Modell (siehe Kapitel 2.1.4.1) treten chronische Veränderungen im Gehirn auf, nachdem wiederholt epileptische Anfälle durch elektrische Reize induziert worden sind.

In anderen Modellen werden Tiere einem bestimmten elektrischen oder chemischen Reiz ausgesetzt und entwickeln nach einer gewissen Zeitspanne spontan epileptische Anfälle. Diese Tiere sind als chronisch epileptisch anzusehen und stellen die Situation jener Menschen dar, die nach einem primären Insult (Schädel-Hirn-Trauma, Status epilepticus) eine TLE entwickeln (Löscher, 1997).

Pathophysiologische Untersuchungen zur Epileptogenese komplex-fokaler Anfälle und Pharmakoresistenz lassen sich mit Hilfe genetischer Modelle (z.B. epileptische Hunde (Löscher, 1997)), chemischer Modelle, wie Kainsäure (Ben-Ari et al., 1981) oder Pilocarpin (Honchar et al., 1983), sowie elektrischer Modelle, wie dem Kindling-Modell (Goddard et al., 1969) durchführen.

Die Verwendung dieser „chronischen“ Modelle erlaubt daneben auch die Untersuchung der Effekte antikonvulsiver Substanzen. Die Prädiktivität hinsichtlich der klinischen und unerwünschter Effekte einer Substanz in diesen „chronischen“ Modellen ist vergleichsweise besser als in den „akuten“ Modellen (Löscher, 2002; 2006).

2.1.4.1 DAS AMYGDALA-KINDLING-MODELL DER TEMPORALLAPPEN-EPILEPSIE

Das Amygdala-Kindling-Modell ist ein seit längerem verwendetes Modell der TLE, bei dem durch wiederholte subkonvulsive elektrische Stimulation einerseits der fortschreitende Prozess der Epileptogenese und andererseits der Zustand permanent erhöhter Anfallsbereitschaft erreicht wird. Der Psychologe Graham Goddard (1969) wollte ursprünglich ein Modell zur Beeinflussung von Lernverhalten durch elektrische Stimuli entwickeln. Der Begriff „Kindling“ („to kindle“=entflammen) beinhaltet diese beiden Eigenschaften. Während des Kindling-Prozesses reagiert das Gehirn zunehmend empfindlicher auf die subkonvulsiven elektrischen Stimuli, die einem Bereich des limbischen Systems (z.B. Amygdala oder Hippokampus) über eine unilaterale Reiz- und Ableitelektrode zugeführt werden. Ab einem bestimmten Zeitpunkt jedoch ändert sich der Grad der Empfindlichkeit nicht mehr und die Tiere werden als „voll gekindelt“ betrachtet (Goddard et al., 1969; Löscher, 2002; McNamara, 1984). Generalisierte epileptische Anfälle können dann konstant ausgelöst werden.

Das Kindling-Modell wird häufig verwendet, da die klinischen Phänomene der komplex-partiellen und sekundär-generalisierenden Anfälle sowie die Pharmakologie der Anfälle im Kindling-Modell den klinischen Bedingungen sehr ähnlich sind (Löscher, 2002; Sato et al., 1990). Weiterhin ist es ein etabliertes Modell, das die Überprüfung neuer Arzneimittel hinsichtlich ihrer Wirkung auf partielle und generalisierte Anfälle erlaubt. Allerdings wird der Einsatz im Bereich der Arzneimittelentwicklung durch die zeitaufwändige Erzeugung gekindelter Ratten begrenzt (Löscher, 2002).

Eine modifizierte Form des Kindling-Modells bietet außerdem die Möglichkeit, Untersuchungen zu pharmakoresistenter Epilepsie durchzuführen. Löscher und

Rundfeldt (1991) zeigten, dass unter Verwendung des Antiepileptikums Phenytoin eine Selektion gekindelter Ratten in pharmakosensitive Tiere (Responder) und pharmakoresistente Tiere (Nonresponder) möglich ist. Dieses Phenytoin-Selektions-Modell erwies sich zur Untersuchung pharmakoresistenter Epilepsie als gut geeignet; es ist jedoch ein zeitlich sehr aufwändiges und dadurch zudem teures Modell.

2.1.5 ANTIEPILEPTIKA

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden das häufig in der Veterinärmedizin eingesetzte Antiepileptikum Phenobarbital sowie die in der Humanmedizin gängigen Antiepileptika Carbamazepin und Lamotrigin verwendet, die sämtlich als P-gp-Substrate beschrieben wurden (Potschka et al., 2001; Potschka et al., 2002; Rizzi et al., 2002).

Phenobarbital (PB) ist ein Hypnotikum mit zentraler Wirkung aus der Gruppe der Barbiturate. PB interagiert mit dem GABA_A-Rezeptor und verstärkt durch Verlängerung der Kanalöffnungszeit den Einstrom von GABA in den synaptischen Spalt. Es kommt zu einem gesteigerten Chlorid-Einstrom und damit zur Hyperpolarisation der postsynaptischen neuronalen Zellmembran. Dadurch wird die Ansprechbarkeit auf ankommende Reize vermindert und deren Weiterleitung gehemmt (Kwan & Brodie, 2004; Remy & Beck, 2006). PB bewirkt weiterhin über eine Blockade von Calciumkanälen die Freisetzung erregender Neurotransmitter wie Glutamat und Dopamin. PB ist das weltweit am häufigsten zur Epilepsiebehandlung eingesetzte Arzneimittel (Kwan & Brodie, 2004). Es wird von der WHO (World Health Organization) als Arzneimittel der ersten Wahl für partielle und generalisierte tonisch-klonische Anfälle in den Entwicklungsländern empfohlen. Auch in den Industrieländern wird PB nach wie vor häufig eingesetzt (Kwan & Brodie, 2004). Bei Hund und Katze dient es zur Therapie fokaler und generalisierter epileptischer Anfälle und ist das Mittel der ersten Wahl für eine Langzeittherapie (Löscher, 2003). Allerdings sprechen, wie bereits erwähnt, 20-40% der Veterinärpatienten nicht auf die Behandlung mit PB an (Löscher, 2003).

Carbamazepin (CBZ) wirkt über eine Hemmung spannungsabhängiger Natriumkanäle und wird beim Menschen vor allem zur Behandlung fokaler aber auch

generalisierter epileptischer Anfälle eingesetzt. Des Weiteren hat es auch eine antipsychotische Wirkungskomponente. In der Tiermedizin wird es aufgrund kurzer Halbwertszeiten kaum verwendet.

Lamotrigin (LTG) ist ein gut verträgliches Antiepileptikum der zweiten Generation, und weist eine Wirksamkeit gegen partielle, primär und sekundär-generalisierte Anfälle sowie Absencen auf. LTG hemmt Natrium- und Calciumkanäle, wodurch die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter (Glutamat und Aspartat) verhindert wird (Castel-Branco et al., 2003). Es findet wie CBZ aufgrund kurzer Halbwertszeiten keinen Einsatz beim Tier. Für den Hund wurden zudem kardiotoxische Effekte beschrieben (Wong & Lhatoo, 2000).

2.2 Intrasale Applikation

2.2.1 ÜBERBLICK UND BEDEUTUNG DER INTRANASALEN APPLIKATION

Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.1.3.2.2), stellt die Blut-Hirn-Schranke *in vivo* eine der striktesten Barrieren für den Arzneimitteltransport dar (Pardridge, 2005; Talegaonkar & Mishra, 2004). Die intranasale (i.n.) Applikation bietet die Möglichkeit, Substanzen unter Umgehung des Blutweges und damit auch der Blut-Hirn-Schranke in das Gehirngewebe zu verbringen (Talegaonkar & Mishra, 2004; Frey II, 2002), und wurde in den letzten Jahren als Administrationsart für diverse Wirkstoffe am Tiermodell und am Menschen untersucht (Illum, 2004). Auch als nicht-invasive Applikationstechnik für eine schnelle systemische Substanzaufnahme in das Blut und anschließender Absorption von dort in das Gehirn erwies sie sich als geeignet (Gizurason et al., 1999; Li et al., 2006; Lindhardt et al., 2002). Nasenhöhle und Gehirn sind über den N. olfactorius und N. trigeminus miteinander verbunden. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit des Substanztransportes von der Nasenhöhle in das Gehirn (Talegaonkar & Mishra, 2004; Frey II, 2002). Bei anatomischen Untersuchungen der Nasenhöhle im Zusammenhang mit dem Übertritt von Infektionserregern aus der Nase in das ZNS (Clark & Le Gros, 1929; Faber, 1937; Holl, 1980) konnte gezeigt werden, dass auch verschiedene Farbstoffe vom nasalen Epithel in das Gehirn wanderten. Czerniawska (1970), Perl und Good, (1987) und

Evans und Hastings (1992) demonstrierten zudem den Eintritt von Metallen (Kolloidales Gold, Aluminium, Cadmium) von der Nase in das Gehirn.

2.2.2 AUFBAU DER NASENHÖHLE

Die Nasenhöhle (Cavum nasi) stellt anatomisch den ersten Abschnitt des Respirationssystems dar. Durch das mediane Septum nasi wird sie in eine laterale und eine mediale Hälfte unterteilt. Nach rostral öffnet sich die Nasenhöhle über die Nasenöffnungen in das Gesicht, nach caudal erweitert sie sich in den Nasopharynx. In der Nasenhöhle liegen die Nasenmuscheln (Conchae nasales) und die Verbindungsöffnungen zu den Sinus paranasales (siehe Abbildung 4.1).

Die Nasenhöhle wird in drei funktionelle Bereiche eingeteilt (Mathison et al., 1998; Vyas et al., 2005): Die am Naseneingang gelegene vestibuläre Region filtert die einströmende Luft durch Haare von groben Partikeln. Im Hinblick auf die Absorption von Substanzen ist sie die am wenigsten relevante der drei Regionen (Merkus et al., 2001). Die sich anschließende respiratorische Region ist mit zilienbesetztem Epithel ausgekleidet, dessen Ziliarstrom feinere Partikel in die Mundhöhle befördert (Talegaonkar & Mishra, 2004). Die starke Vaskularisation ermöglicht Substanzen hier eine schnelle Absorption in den Blutkreislauf (Vyas et al., 2005). Das olfaktorische Epithel befindet sich am höchsten Punkt (caudodorsal) der menschlichen Nasenhöhle über der dorsalen Nasenmuschel (Talegaonkar & Mishra, 2004). Hier findet der N. olfactorius in Form freier Nervenendigungen seinen Ursprung. Diese nackten Axonenden im nasalen Epithel stehen in direktem Kontakt zu den epithelialen Zellen (Nickel et al., 1992).

Die Axone ziehen vom olfaktorischen Epithel durch die Lamina cribriforma des Os ethmoidale (Siebbein) in den Bulbus olfactorius (Frey II, 2002). Ein Nervenfaserbündel verbindet den Bulbus mit der olfaktorischen Region des Temporallappens, wo die Informationen in Duftwahrnehmung umgewandelt werden. Als zweiter Nerv entspringt der maxillare Ast (N. maxillaris) des N. trigeminus im Bereich des respiratorischen Epithels (Talegaonkar & Mishra, 2004). Seine

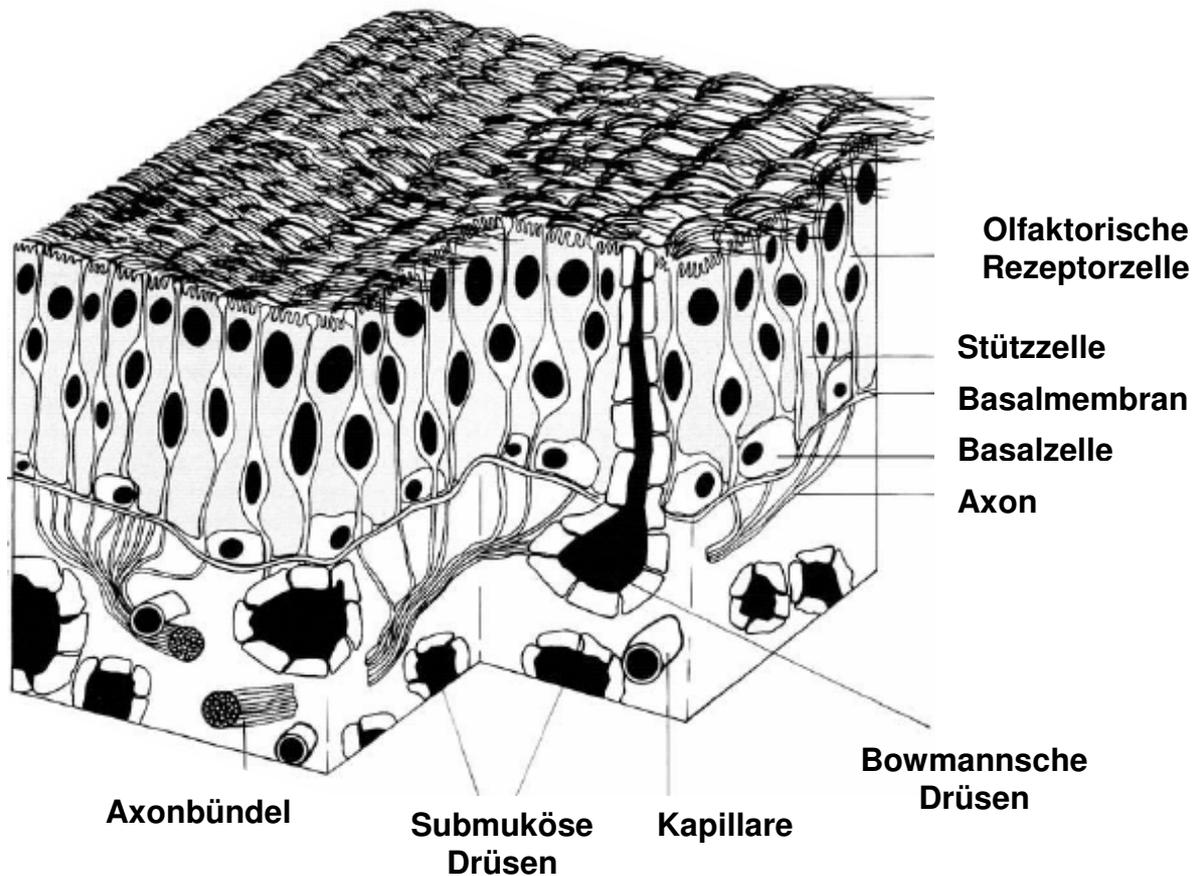


Abbildung 2.5: Aufbau des nasalen Epithels (Krieger & Breer, 1994).

afferenten Fasern ergänzen die Geruchsempfindung des N. olfactorius (Nickel et al., 1992).

Die Zellen des olfaktorischen Epithels sind nicht mit Zilien besetzt, so dass eine längere Verweildauer von Wirkstoffen möglich ist (Mathison et al., 1998). Allerdings können muköse Sekrete (pH 5,5 bis 6,5) den direkten Kontakt zu den Nervenendigungen behindern (Vyas et al., 2005).

2.2.3 AUFBAU DES NASALEN EPITHELIS

Das nasale Epithel besteht überwiegend aus vier Zelltypen (Gizurarson et al., 2006): Den ziliären Zellen, deren Hauptfunktion darin besteht, durch wellenartige

Bewegungen der Zilien den Mucus in Richtung Pharynx zu transportieren; den Becherzellen, die den Mucus sezernieren, der alle 10 bis 15 min erneuert wird (Vyas et al., 2005); den Basalzellen als sogenannte Ersatzzellen, die der Basalmembran direkt aufsitzen, keinen Kontakt zum nasalen Lumen haben und die anderen Zelltypen nach Differenzierung ersetzen und den säulenförmigen Zellen ohne Zilienbesatz, deren Funktion in schnellem Flüssigkeitstransport liegt. Gelegentlich sind auch nicht-epitheliale Zellen, wie z. B. inflammatorische Zellen, anzutreffen. Die theoretische Halbwertszeit der mucozilären Clearance beträgt beim Menschen 15 min (Gizurarson, 1990; Vyas et al., 2005), bei der Ratte 5 min (Gizurarson, 1990). Beim Menschen wird der überwiegende Teil der Nasenhöhle (ca. 92%) von respiratorischem und ein kleiner Anteil (ca. 8%) von olfaktorischem Epithel ausgekleidet (Merkus et al., 2001; Vyas et al., 2005). Bei der Ratte liegt der prozentuale Anteil an respiratorischem und olfaktorischem Epithel bei jeweils etwa 50% (Merkus et al., 2001).

Die epithelialen Zellen der nasalen Mukosa sind über *tight junctions* miteinander verbunden (Vyas et al., 2005). Die Mukosa steht in räumlicher Verbindung mit dem subarachnoidalen Raum (Thorne & Frey II, 2001). Die darin befindliche Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) umspült die Axonbündel des N. olfactorius und N. trigeminus und das Gehirn; am Nasendach mündet die CSF in die nasalen Lymphbahnen (Frey II, 2002). Das olfaktorische Epithel stellt die Eintrittspforte für Substanzen aus der Nase in das Gehirn oder die CSF dar (Vyas et al., 2005).

2.2.4 SUBSTANZAUFNAHME NACH INTRANASALER APPLIKATION

2.2.4.1 NEURONALE TRANSPORTWEGE

Grundsätzlich können i.n.-applizierte Substanzen, abgesehen von der Absorption in die Blutbahn, zwei Wege von der Nasenhöhle in das Gehirn beschreiten, einen intraneuronalen und einen extraneuronalen Weg (Frey II, 2002; Vyas et al., 2005).

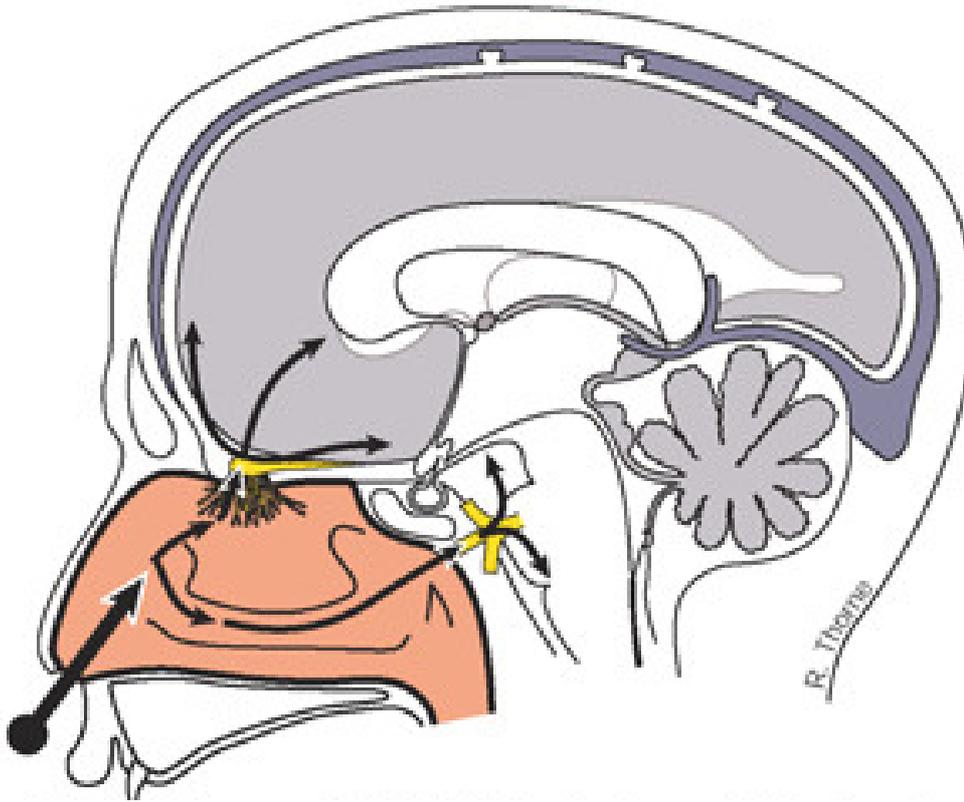


Abbildung 2.6: Mögliche Transportwege für i.n. applizierte Substanzen (R. Thorne in (Frey II, 2002)).

Der intraneuronale Transport in den Axonen des N. olfactorius und N. trigeminus findet langsam und passiv statt und kann für das Erreichen bestimmter Hirnregionen bis zu Stunden und Tage benötigen (Frey II, 2002).

Der extraneuronale Transportweg beinhaltet den Substanz-Übertritt durch die Mukosa und das darunter liegende Gewebe in den von CSF angefüllten subarachnoidalen Raum oder über perineurale Kanäle direkt in das Gehirnparenchym (Frey II, 2002; Mathison et al., 1998; Thorne & Frey II, 2001). Lipophile Substanzen können extraneuronale durch rezeptor-vermittelte Endozytose, Diffusion oder Transzytose in Carrier-Vesikeln schnell (innerhalb von Minuten) in den subarachnoidalen Raum gebracht werden (Vyas et al., 2005). Der extraneuronale Transport hydrophiler Substanzen durch die Mukosa in die CSF verläuft langsam durch passiven parazellulären Transport durch die *tight junctions* (Vyas et al., 2005).

Diese Form des extraneuronalen Transports korreliert positiv mit der Hydrophilität und dem Molekulargewicht von Substanzen (Vyas et al., 2005).

2.2.4.2 SYSTEMISCHE AUFNAHME

Eine Absorption der i.n.-applizierten Substanz über submukös gelegene Kapillaren in die Blutbahn und von dort in das Gehirn findet zum überwiegenden Teil im Bereich des stark vaskularisierten respiratorischen Epithels statt, kann aber auch im Bereich des olfaktorischen Epithels auftreten (Mathison et al., 1998). Die systemische Aufnahme von Substanzen über die Nase kann durch Vermeidung des "first pass"-Effektes in der Leber und Umgehung einer Metabolisierung im Magen-Darm-Trakt sowie der Lunge zu einer höheren Bioverfügbarkeit der verabreichten Substanzen führen (Talegaonkar & Mishra, 2004; Illum, 2003). Für Benzodiazepine, die zur Therapie des Status epilepticus eingesetzt werden, wurde für den Menschen eine schnelle Absorption nach i.n.-Applikation beschrieben (Lindhardt et al., 2002).

2.2.5 EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE EFFEKTIVITÄT INTRANASALER APPLIKATION

Chemische Eigenschaften einer Substanz sowie die Formulierung für die Applikation haben einen starken Einfluss darauf, ob, wie schnell und in welcher Menge Substanzen den extra- oder intraneuronalen Weg von der Nasenhöhle in das ZNS oder die CSF betreten. Sakane et al. (1995) stellten fest, dass eine Zunahme des Molekulargewichtes negativ mit der Transporteffizienz korreliert. Aus den Daten geht hervor, dass Moleküle bis zu einer Grösse von 2 kDa von der Nasenhöhle in die CSF transportiert werden können (Sakane et al., 1995). Weiterhin steigt der Transport von Substanzen von der Nase in die CSF mit zunehmender Lipophilität an (Sakane et al., 1991). Der Transport wird außerdem durch den Ionisierungsgrad beeinflusst; nicht dissoziierte Substanzen werden besser transportiert (Sakane et al., 1994).

Weitere Einflussfaktoren auf die Effektivität des Transportes ergeben sich durch die physiologischen Gegebenheiten der Nasenhöhle. So stellt der Ziliarstrom des respiratorischen Epithels einen limitierenden Faktor für die Verweildauer der applizierten Substanz auf der Mukosa dar (Barakat et al., 2006). Die Verwendung

mukoadhäsiver Trägerstoffe, wie Zellulose, Dextran, Chitosan oder Polymere, kann die Retentionszeit der Formulierung auf der nasalen Mukosa verlängern und infolgedessen die Substanzaufnahme erhöhen (Illum et al., 2002; Ugwoke et al., 2001; Vyas et al., 2006). Barakat et al. (2006) beispielsweise verwendeten für die i.n.-Applikation von CBZ an Ratten ein Gel aus Zellulose und einem synthetischen Polymer und erreichten damit eine effektive und schnelle Absorption in das Gehirn.

Im Bereich des olfaktorischen Epithels gibt es keinen Ziliarstrom; der Mukus wird bei Überproduktion durch die Becherzellen in Bewegung versetzt (Mathison et al., 1998). Er hat einen leicht sauren pH-Wert von 5,5 bis 6,5 (Mathison et al., 1998). Formulierungen mit sehr saurem oder basischem pH-Wert können zudem Irritationen der Nasenschleimhaut nach sich ziehen und dadurch Transportvorgänge beeinflussen (Talegaonkar & Mishra, 2004). Im Mukus der Nasenhöhle finden weiterhin Metabolisierungsvorgänge statt; es werden zahlreiche Enzyme, wie Cytochrom 450-Isoformen, Carboxylesterasen und Glutathion-S-Transferasen vorgefunden (Lewis et al., 1994; Vyas et al., 2005).

Als weiteres Transporthindernis für hydrophile Stoffe bestehen *tight junctions* zwischen den Epithelzellen der nasalen Mukosa. Durch Konjugation von Meerrettichperoxidase mit einem endocytose-vermittelnden Glycoprotein konnte ein Transport durch die Mukosa in die CSF vermittelt werden (Pardridge, 2005), der sonst nicht zustande kam.

Auch der Ort der Substanzabgabe, das verabreichte Volumen sowie die Positionierung des Tieres während der Applikation nehmen Einfluss auf den Transport (Gizurarson et al., 2006). Da das nasale Aufnahmevolumen begrenzt ist, kann die Löslichkeit von Substanzen einen limitierenden Faktor für die i.n.-Applikation darstellen (Gizurarson, 1990; Gizurarson et al., 2006). Entspricht das applizierte Volumen nicht der Aufnahmekapazität, werden Teile über den Nasopharynx abgeschluckt. Unter Umständen kann die Verwendung von Lösungsvermittlern die ausreichende Lösung einer Substanzmenge in einem kleinen Volumen ermöglichen. Für Diazepam erwies sich Polyethylenglycol 300 als zweckdienlich, um eine therapeutisch ausreichende Menge für die i.n.-Applikation an Schafen in Lösung zu bringen (Lindhardt et al., 2002).

Bei der Ratte verbindet der Ductus nasopalatinus die Nasenhöhle im vorderen Bereich mit der Mundhöhle. Um ein Abfließen applizierter Substanz zu verhindern, ist daher während der Applikation eine Positionierung der Ratte in Rückenlage sinnvoll (Gizurarson et al., 2006). Gizurarson et al. (2006) verglichen zudem die Bioverfügbarkeit von Clonazepam nach i.n.-Applikation an Kaninchen in sitzender und liegender Position. Die Bioverfügbarkeit nach i.n.-Applikation bei den in Rückenlage fixierten Kaninchen betrug das 2,5fache im Vergleich zur Applikation an den sitzenden Tieren (Gizurarson et al., 2006).

Bei der Ratte ist das Septum nasi durch das sog. „septal window“ unterbrochen (Gizurarson, 1990), also fenestriert. Dieser Umstand schließt das Ratten-Modell für Experimente aus, in denen die unbehandelte Nasenhälfte als Kontrolle für die behandelte Hälfte dienen soll (Proctor, 1983).

Weiterhin müssen Erkrankungen des oberen Atemtraktes ausgeschlossen werden, da es ansonsten zu Behinderungen des Transportes kommen kann (Talegaonkar & Mishra, 2004).

2.3 RNA-Interferenz

2.3.1 PRINZIP UND BEDEUTUNG

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlich vorkommender Mechanismus zur Gen-Regulation, der sowohl bei Pflanzen, Würmern, Hefen als auch beim Menschen auftritt (Uprichard, 2005). Die RNAi als biologisches Prinzip wurde erstmalig bei *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). RNAi wird als Abwehrmechanismus gegen Pathogene verstanden, der auf der Erkennung von konservierten molekularen „Markern“ der Erreger beruht (Eggert & Fischer, 2003). Einen solchen Marker kann beispielsweise doppelsträngige RNA darstellen, die bei der Replikation von Viren auftritt, aber vom Wirtsorganismus als solche nicht synthetisiert wird (Eggert & Fischer, 2003). In Pflanzen spielt RNAi eine Rolle auf der Ebene zellulärer Verteidigung. Die Zelle wird vor der irrtümlichen Expression sich wiederholender Sequenzen und viralen Infektionen geschützt (Ding et al., 2004).

2.3.2 MECHANISMUS DER RNA-INTERFERENZ

Der Mechanismus der RNAi setzt sich aus zwei intrazellulär ablaufenden Teilprozessen zusammen (siehe Abbildung 2.7.). Im ersten Schritt wird doppelsträngige Vorläufer-RNA von einer als „Dicer“ bezeichneten Endonuklease in kurze doppelsträngige Fragmente, bestehend aus 21 bis 23 Nukleotiden, gespalten, die als „short“ oder auch „small interfering RNAs“ (siRNAs) bezeichnet werden (Uprichard, 2005). Die siRNAs werden anschließend in den sogenannten „RNA-induced silencing complex“ (RISC) inkorporiert, der die siRNA-Stränge in einer ATP-abhängigen Reaktion entwindet. Bei der Bildung des RISC entscheidet sich, welcher der beiden siRNA-Stränge (sense oder antisense) als führender Guide-Strang eingebunden und welcher als Passenger-Strang davon ausgeschlossen und zerstört wird. Der Guide-Strang dient als Matrize zur Zielerkennung homologer mRNA (z.B. viraler mRNA) und vermittelt deren Degradation durch RISC (Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001a; Novina & Sharp, 2004). Bei RISC handelt es sich um einen Multi-Proteinkomplex, der mRNA-schneidende Proteine besitzt. Nach Ablauf dieser Prozesse werden weitere mRNA-Moleküle analog zerstört.

Auf der Suche nach ähnlichen Verteidigungsmechanismen im Säuger genom wurde eine große Anzahl an Codierungen für kurze RNA-Moleküle gefunden. Diese endogenen RNAs, auch als microRNAs (miRNAs) bezeichnet, werden ebenfalls von „Dicer“ in wirksame siRNAs gespalten. Sie regulieren die Expression von Genen, die in eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Apoptose oder Differenzierung, involviert sind (Ambros, 2004; Nakahara & Carthew, 2004; Xu et al., 2004). Man erkannte, dass chemisch synthetisierte und exogen in Säugerzellen eingebrachte siRNAs ebenfalls in den RISC inkorporiert werden und die Degradation homologer zelleigener RNA vermitteln können (Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001a; Novina & Sharp, 2004).

RNAi ermöglicht die schnelle Identifizierung und Validierung therapeutisch relevanter Genfunktionen und Stoffwechselwege und erlaubt so auf neuartige Weise die Entdeckung neuer Angriffspunkte für Arzneimittel (Novina & Sharp, 2004). Die Möglichkeit, den RNAi-Mechanismus der Genausschaltung therapeutisch nutzen zu

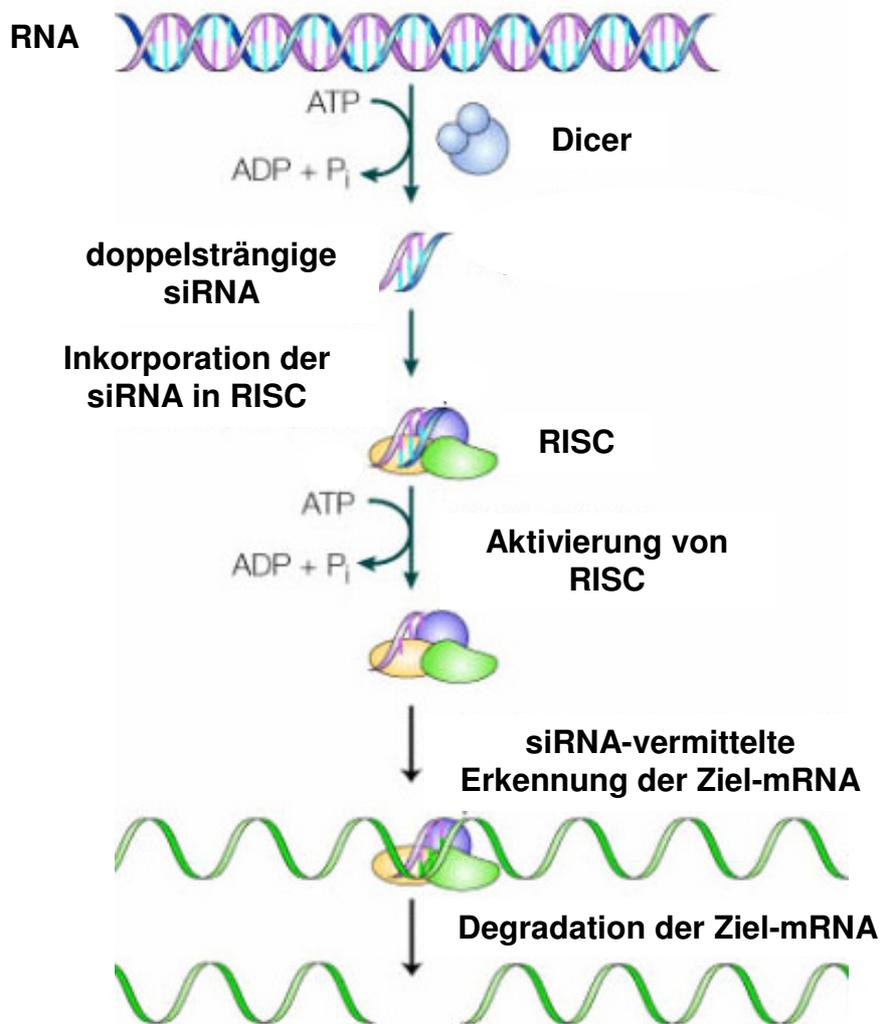


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz (www.life.uiuc.edu/shapiro/RNAiApps.html).

können, wurde in den vergangenen zehn Jahren weltweit als einer der wesentlichen Fortschritte der Biomedizin angesehen (Uprichard, 2005).

2.3.3 KLINISCH RELEVANTER EINSATZ VON RNAI

Der besondere Wert der RNAi liegt darin, dass sie im Rahmen sequenzspezifischer Therapien gegen eine ganze Bandbreite von Erkrankungen eingesetzt werden kann (Beal, 2005).

In Bezug auf Neoplasien und genetisch bedingte ZNS-Erkrankungen konnte dies für Angriffsziele, in denen eine allelspezifische Reduktion der Produkte erwünscht war, bereits aufgezeigt werden (Brummelkamp et al., 2002; Ding et al., 2003; Gonzalez-Alegre et al., 2003; 2005; Wilda et al., 2002; Miller et al., 2004).

Ein Hauptgrund für das Fehlschlagen einer Chemotherapie primärer oder metastasierter Neoplasien ist eine Multidrug-Resistenz, die sich in Form einer Überexpression von Multidrug-Transportern, in der Regel von P-gp, darstellt (siehe Kapitel 2.1.3.2.2) und einen Efflux des Chemotherapeutikums aus den Tumorzellen bedingt. In einer ersten Zellkulturstudie konnten Yague et al. (2004) die Effektivität der RNAi zur Regulation der P-gp-Expression zeigen. Die *mdr1*-orientierte RNAi resultierte in einer Abnahme der *mdr1*-mRNA und der P-gp-Expression, so dass der Phänotyp der resistenten Zellen dem von pharmakosensitiven entsprach.

Kürzlich hat eine japanische Arbeitsgruppe einen erfolgreichen Versuch unternommen, den RNAi-Mechanismus gegen das *mdr1*-Gen auch *in vivo* zu erzeugen. Matsui et al. (2005) applizierten anti-*mdr1*-siRNA in einem „large-volume and high-speed“-Injektionsverfahren i.v. an Mäuse. Der mRNA-Gehalt im Lebergewebe konnte um 50-60% verringert werden. Auf Proteinebene wurde jedoch keine signifikante P-gp-Reduktion erreicht.

Zur RNAi-Therapie von Gehirntumoren wurden bereits erfolgreiche *in vivo*-Untersuchungen an Mäusen beschrieben (Zhang et al., 2004; Boado, 2005). Die bisher einzige veröffentlichte Studie zu RNAi in Primaten wurde im Zusammenhang mit Koronarerkrankungen durchgeführt. Gegen ein lipid-assoziiertes Leberprotein gerichtete siRNA wurde in SNALPs (Stable Nucleic acid lipid particles) verpackt und i.v. an Cynomolgus-Affen verabreicht, was in einer bis zu 90%igen Reduktion des mRNA-Niveaus und der Proteinexpression resultierte.

Auch bei der Behandlung mit siRNA spielen Nebenwirkungen eine nicht zu unterschätzende Rolle. Es wurde gezeigt, dass siRNAs Genbereiche aktivieren können, die in die Interferon-Antwort von Säugerzellen involviert sind (Leung & Whittaker, 2005). In anderen Untersuchungen wurde über die Induktion unspezifischer Immunantworten, wie die Aktivierung von Makrophagen und dendritischer Zellen, berichtet (Karikó et al., 2004). Zurzeit ist noch unklar, wie häufig

und unter welchen Bedingungen siRNAs derartige Effekte erzeugen (Leung & Whittaker, 2005).

Zu so genannten „Off-Target-Effekten“ kann es kommen, wenn zwischen der siRNA-Sequenz und endogenen mRNA-Sequenzen Homologien vorliegen und die Expression endogener mRNAs ungewollt verhindert wird (Leung & Whittaker, 2005)

2.3.4 STABILITÄT, SPEZIFITÄT UND ZIELSTEUERUNG VON siRNA

Für die Entwicklung einer RNAi-Therapie zur klinischen Anwendung ist nicht nur die Inhibitionseffizienz der siRNA ausschlaggebend. Stabilität, Bioverfügbarkeit und vor allem die Spezifität der applizierten siRNA sind ebenfalls maßgebliche Faktoren (Pei & Tuschl, 2006).

Nackte siRNAs überdauern Angriffe von Nukleasen im Blutplasma oder anderen Körperflüssigkeiten nur für sehr kurze Zeit. In diesem Zusammenhang haben sich chemische Modifikationen der Ribose oder Phosphodiesterbindung als stabilitätsfördernd erwiesen. Die siRNA kann beispielsweise durch Thiophosphate am 3'-Ende sowie Methylierung oder Fluoridierung der Ribose vor exonukleolytischem Abbau geschützt werden (Chiu & Rana, 2003; Czauderna et al., 2003; Dykxhoorn & Lieberman, 2006). Jedoch kann die Inhibitions-Effizienz durch chemische Modifikationen beeinträchtigt werden (Dykxhoorn & Lieberman, 2006) und in *in vivo*-Untersuchungen erreichte nur weniger als 1% der modifizierten siRNA das Zielgewebe (Uprichard, 2005).

Weil siRNAs von den meisten Zellen nicht ohne weiteres aufgenommen werden, sind Strategien zur Verbesserung der zellulären Aufnahme erforderlich. Eine Möglichkeit liegt z.B. in der Kopplung mit Cholesterin-Gruppen, die eine zelluläre Aufnahme über Lipoprotein-Rezeptoren vermitteln können (Dykxhoorn & Lieberman, 2006). Soutschek et al. (2004) konjugierten siRNAs mit einer lipophilen Cholesterin-Gruppe, und konnten damit die siRNA-Aufnahme in Leber und Darm verbessern. Die Kopplung mit Cholesterin-Gruppen erhöht gleichzeitig die Halbwertszeit von siRNA im Plasma (de Fougères et al., 2005).

Weitere Verbesserungen für die systemische Applikation von siRNA ergaben sich durch die „Verpackung“ von siRNAs in Nanopartikeln. Boado (2005) und

Zimmermann et al. (2006) verpackten siRNAs in Anlehnung an Jeffs et al. (2005) in polyethylenglycol-haltige, kationische Liposomen, so genannte „Stable Nucleic Acid Lipid Particles“ (SNALPs) und erreichten damit gute Erfolge in Primaten. Als „Pegylierte Immunoliposomen“ (PILs) bezeichnete Liposomen enthalten Polyethylenglykol, wodurch ihre Struktur für die Blutzirkulation *in vivo* stabilisiert wird. An ihre Oberfläche können Antikörper gebunden werden, die über spezifische Bindung an endogene Rezeptoren eine präzise Zielsteuerung ermöglichen (Boado, 2005).

Weiterhin werden auch Plasmide und virale Vektoren für eine Zielsteuerung von siRNA verwendet (Leung & Whittaker, 2005; Uprichard, 2005). Die Plasmide bzw. viralen Vektoren exprimieren shRNA, die von der endogenen miRNA-Maschinerie zu siRNA prozessiert wird. Bei shRNA-Molekülen sind sense- und antisense-Strang über eine Schleife verbunden. Diese Gentherapie ermöglicht eine langfristige Expressionsinhibition und ist deshalb für chronische oder genetisch bedingte Erkrankungen sinnvoll einzusetzen (Dykxhoorn & Lieberman, 2006). Virale Vektoren zeigen einen Gewebstropismus, der für klinische Anwendungen von Vorteil ist und weisen eine gute Transduktions-Effizienz auf, bringen jedoch auch Risiken mit sich (Uprichard, 2005). Beispielsweise traten bei gentherapeutischer Behandlung retrovirus-vermittelte Insertionsmutagenesen auf (Leung & Whittaker, 2005). Lentiviren und Adeno-assoziierte Viren werden unter Nutzen-Risiko-Abwägung jedoch als Vektoren für die klinische Anwendung vorgeschlagen (Uprichard, 2005).

2.3.4.1 BESTIMMUNG DER siRNA-INTEGRITÄT

Die Integrität der siRNA am Wirkort muss für den Ablauf des RNAi-Prozesses gewährleistet sein. Eine Möglichkeit zur Überprüfung der siRNA-Integrität bietet die Nutzung des Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET-) Effektes (Järve, 2006). Bei dem FRET-Effekt handelt es sich um einen physikalischen Prozess, bei dem bei ausreichender Nähe (wenige Nanometer Abstand) zweier Fluoreszenz-Farbstoff-gekoppelter Moleküle ein strahlungsfreier Energietransfer stattfindet (Li et al., 2006) (siehe Abbildung 2.8). Das Emissionsspektrum des Donor-Fluorophors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Zur Messung ihrer Integrität werden die siRNA-Stränge für FRET mit zwei verschiedenen

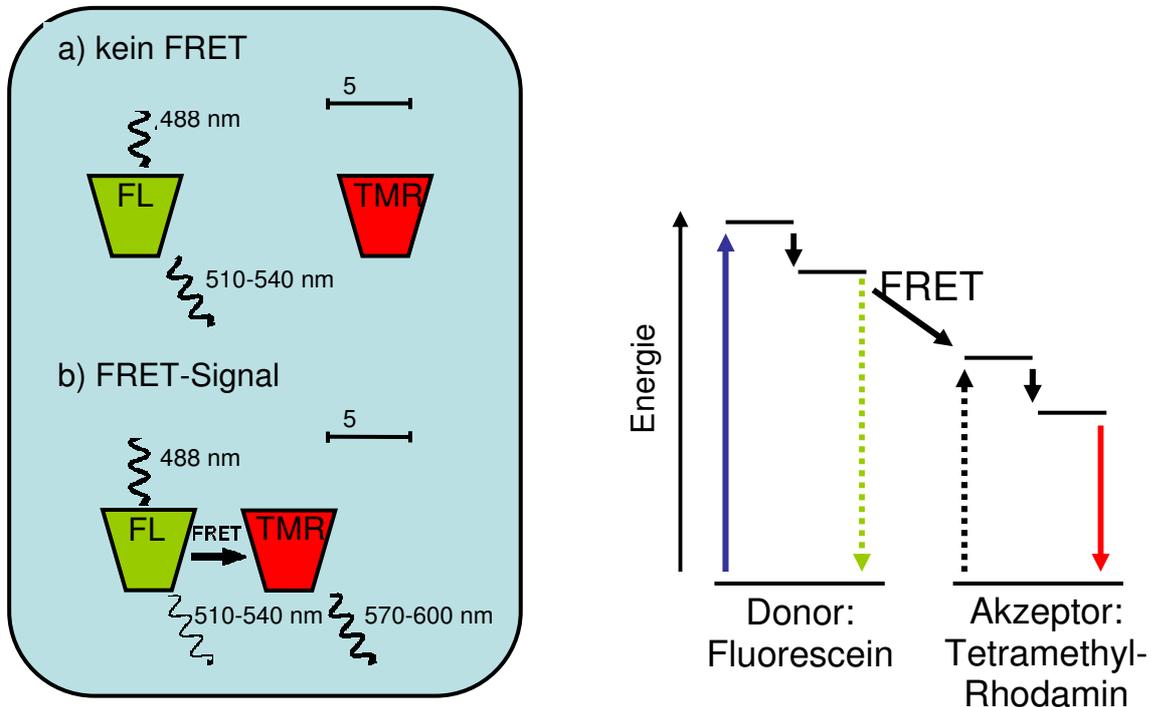


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)- Effektes.

Fluorophoren (Donor und Akzeptor) gekoppelt. Wenn die siRNA degradiert ist, findet kein FRET statt. Ist die siRNA intakt, wird nach Anregung Energie vom Donor auf den Akzeptor übertragen und eine Emission im Bereich des Emissionsspektrums des Akzeptors kann gemessen werden. Die Fluoreszenz des Donors nimmt gleichzeitig ab (siehe Abbildung 2.8).

2.3.5 APPLIKATIONSWEGE

Die siRNA kann *in vivo* durch lokale oder systemische Applikation zum gewünschten Wirkort im Organismus gebracht werden (Uprichard, 2005). Ein einfacher und bevorzugter Weg für die siRNA-Applikation ist die i.v.-Applikation, die potentiell die Möglichkeit bietet, sämtliche Körperregionen zu erreichen. Im Rahmen der systemischen Applikation ist die i.v.-Applikation „nackter“ (= ungeschützter),

modifizierter oder verpackter siRNAs untersucht worden (siehe Kapitel 2.3.4). Lewis und Wolff (2005) erreichten ebenso wie Matsui et al. (2005) mit einer schnellen hydrodynamischen Infusion („hydrodynamic intravascular injection“) gute Erfolge. Allerdings konnten nur bestimmte stark vaskularisierte Gewebe, wie Leber, Milz und Nieren in zufrieden stellendem Maße erreicht werden (Leung & Whittaker, 2005).

Viele verschiedene lokale Applikationsstrategien von siRNA wurden bereits untersucht. Bitko et al. (2005) verabreichten siRNA i.n. an Mäuse. Die siRNAs waren gegen das Respiratory Syncytial Virus (RSV) gerichtet, das sich in Bronchialepithelzellen vermehrt. Neben einer bis zu 4fachen Reduktion des Virustiters konnte auch eine Verbesserung der Krankheitssymptome beobachtet werden (Senkung der Atemfrequenz und der Leukotrien-Induktion) (Fougerolles et al., 2005). Zudem wurde siRNA zur Behandlung viraler Infektionen oder Makuladegeneration direkt in das Auge (Check, 2005) oder das ZNS appliziert (Dorn et al., 2004; Makimura et al., 2002). Zur dermalen Applikation oder um Cervix-Neoplasien zu therapieren, wurden Gele verwendet (Leung & Whittaker, 2005). Ferner gibt es Arbeitsgruppen, die die Elektroporation zum siRNA-Transport in Gehirn, Augen, Nieren, Muskulatur und Haut von Nagern nutzten (Leung & Whittaker, 2005).

3 ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen sollten Erkenntnisse über die Eignung von zwei neuen Behandlungsstrategien zur Therapie transporter-basierter Pharmakoresistenz bei Epilepsie liefern.

3.1 Intranasale Applikation

Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen lassen darauf schließen, dass ein Transport i.n. applizierter Substanzen aus der Nasenhöhle in das Gehirn erfolgen kann, wobei dieser Transport auf intraneuronalem Wege direkt in das Gehirn oder auf extraneuronalem Wege durch die nasale Mukosa in die CSF und von dort in das Gehirn stattfinden kann. Der entscheidende Punkt dieser Behandlungsstrategie für pharmakoresistente Epilepsie ist, dass die Blut-Hirn-Schranke, an der bei pharmakoresistenten Patienten eine Überexpression von Multidrug-Transportern vorliegt, durch die Applikationsroute umgangen werden kann.

Unter Verwendung eines im Rahmen der Arbeit etablierten Tiermodells zur i.n.-Applikation von Antiepileptika an Ratten sollten folgende Fragen beantwortet werden, um die Eignung der i.n.-Applikation als Behandlungsstrategie für pharmakoresistente Epilepsie beurteilen zu können:

- Kann nach i.n.-Applikation von Antiepileptika ein Transport von der Nasenhöhle in das Gehirn beobachtet werden?
- Sind die nach i.n.-Applikation erreichten Wirkstoffkonzentrationen therapeutisch ausreichend?
- Kann die Wirksamkeit eines i.n. verabreichten Antiepileptikums in einem Epilepsie-Modell, wie dem Amygdala-Kindling-Modell, nachgewiesen werden?

Da Antiepileptika lipophile Moleküle sind, erwarteten wir einen intra- oder extraneuronalen Transport in das Gehirn, wie er für andere lipophile Moleküle beschrieben wurde. Durch eine parallele Aufnahme in die Blutbahn war davon auszugehen, dass ein Teil der applizierten Substanzmenge nicht für den direkten Transport von der Nasenhöhle in das Gehirn zur Verfügung stehen, sondern auf dem

Blutweg in das ZNS gelangen würde. Durch Wegfall von Umverteilung und Verstoffwechslung in anderen Organen nach i.n.-Applikation waren dennoch Konzentrationen zu erwarten, die denen nach i.v.-Applikation entsprachen.

Da nach i.n.-Applikation therapeutisch ausreichende Konzentrationen des Antiepileptikums im Gehirn zu erwarten waren, nahmen wir eine Wirksamkeit im Amygdala-Kindling-Modell in Form einer signifikanten Erhöhung der Nachentladungsschwellen und Erniedrigung der Anfallsschwere sowie –dauer im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Im Vergleich zur i.v.-Applikation war von einer vergleichbaren oder höheren Effektivität auszugehen.

3.2 RNA-Interferenz

Die Überexpression des Multidrug-Transporters P-gp spielt eine bedeutende Rolle für die Pharmakoresistenz von Epilepsien. Die Reduktion der P-gp-Expression mittels RNAi könnte eine Möglichkeit zur Überwindung der Pharmakoresistenz darstellen. Der Mechanismus der RNA-Interferenz beruht auf der zielgenauen Ausschaltung der Expression von Genen. Um die Eignung der RNAi als Behandlungsstrategie bei pharmakoresistenter Epilepsie beurteilen zu können, sollten die vorliegenden Untersuchungen folgende Fragen beantworten:

- Erreicht die liposomal verpackte siRNA ihren Zielort und bewahrt sie ihre Integrität?
- Kann die P-gp-Expression an der Blut-Hirn-Schranke über den Mechanismus der RNAi vermindert werden?

Eine Inhibition war vorstellbar, da Untersuchungen einer kooperierenden Gruppe an Endothelzellen aus Gehirnkapillaren von Ratten mit der hier eingesetzten siRNA eine 65-75%ige Reduktion auf mRNA-Ebene ergeben hatten.

Aus der Literatur und Voruntersuchungen einer kooperierenden Gruppe war bekannt, dass ein liposomaler Einschluss die siRNA vor Abbau durch Nukleasen schützt. Auf der Oberfläche trugen die siRNA-Liposomen das Peptid Apo (Apolipoprotein) E4, von dem angenommen wird, dass es eine Endozytose über

LDL-Rezeptoren und Heparan-Sulfat-Proteoglykane vermittelt (Winkler et al., 1999; Sauer et al., 2005), so dass eine Aufnahme der siRNA in die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke zu erwarten war.

4 MATERIAL UND METHODEN

Hinweis:

Im Anhang befindet sich eine Auflistung sämtlicher verwendeter Substanzen und deren Hersteller, eine Auflistung der verwendeten Geräte, Materialien und Versuchstiere sowie deren Hersteller oder Bezugsquellen und die Herstellungsprotokolle sämtlicher verwendeter Lösungen, soweit sie nicht bereits im Text genannt werden.

4.1 Intranasale Applikation

4.1.1 FORMULIERUNG DER APPLIZIERTEN ANTIEPILEPTIKA

4.1.1.1 PHENOBARBITAL

4.1.1.1.1 Erstellung einer wässrigen Lösung für die i.n.- oder i.v.-Applikation

Für die Erstellung der wässrigen Phenobarbital-Lösung für die i.n.-Applikation wurden 108 mg Phenobarbital-Natrium (PB) in einem Schnappdeckelgläschen von 5 ml Volumen vorgelegt und mit 720 µl NaCl-Lösung (0,9%ig) versetzt. Das Gemisch wurde unter vorsichtigem Erwärmen (max. 40 °C) auf einem Magnetrührer so lange gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war. Der pH-Wert der Lösung betrug 11.

Für die i.v.-Applikation wurden je nach Dosierung 5,4 mg, 10 mg oder 30 mg PB pro 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung unter oben beschriebener Vorgehensweise gelöst.

4.1.1.1.2 Erstellung einer Gel-Formulierung für die i.n.-Applikation

Zur Erstellung des Stamm-Gels wurden die in Tabelle 4.1 genannten Substanzen verwendet. Die Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) und das Carbopol (CBP) wurden getrennt abgewogen und anschließend in einer Reibschale mit Hilfe eines Kartenblattes miteinander vermischt. Die vermischten Substanzen wurden unter Verwendung eines Siebes (Sieb aus Siebsatz nach gültigem DAB, Zerkleinerungsgrad 4, Maschenweite nach DIN 4188: 2,0 mm) in ein mit *Aqua bidest.* gefülltes Becherglas gesiebt und die Flüssigkeit solange auf dem Magnetrührer

HPMC	0,375 g
Carbopol	0,125 g
A. dest.	ad 25 ml

Tabelle 4.1: Substanzen zur Herstellung des HPMC-CBP-Gels für die i.n.-Applikation (nach Barakat et al. (2006)).

gerührt, bis ein milchig-trübes Stamm-Gel ohne Konglomerate entstanden war. Dieses Stamm-Gel konnte über mehrere Wochen ohne sensorische Abweichungen im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

Für die i.n.-Applikation der Antiepileptika wurde das HPMC-CBP-Stamm-Gel am jeweiligen Versuchstag in Anlehnung an Barakat et al. (2006) im Verhältnis 1:3 mit *Aqua bidest.* verdünnt. In diesem Zustand betrug der mit einem pH-Meter gemessene pH-Wert des dünnflüssigen Gel-Wasser-Gemisches 4,2. Zur Einstellung eines pH-Wertes von 7,4 wurde unter ständigem Rühren 1 M Natronlauge zugegeben, bis der gewünschte pH-Wert erreicht war. Dabei wurde das Gemisch klar und nahm einen gel-artigen Zustand an.

Dieses Gel konnte durch Erwärmen auf etwa 50 °C verflüssigt werden und nahm bei Abkühlung auf Raumtemperatur seinen Gel-Zustand wieder ein. Dies wurde ausgenutzt, um das Gel in einen pipettierfähigen Zustand zu bringen. Für die i.n.-Applikation wurde die gewünschte Menge PB vorgelegt und mit der entsprechenden Menge des erwärmten Gels versetzt. Das PB-Gel-Gemisch wurde unter Erwärmen (40 °C) auf dem Magnetrührer so lange gerührt, bis das PB in Lösung gegangen war. Hierbei verflüssigte sich das Gel unter pH-Wert-Anstieg auf pH = 9,5 derart, dass es mit einer Mikroliterspritze (10 µl) luftblasenfrei aufgezogen werden konnte.

4.1.1.2 LAMOTRIGIN

4.1.1.2.1 Lösung von LTG in Cremophor EL und Aqua bidest.

Für die i.v.-Applikation von Lamotrigin (LTG) in einer 5%igen Cremophor-EL-*Aqua bidest.*-Lösung wurden 20,5 mg LTG mit 200 µl des Lösungsvermittlers Cremophor EL versetzt und unter Erwärmen auf dem Magnetrührer gerührt. 3800 µl *Aqua bidest.* wurden tropfenweise zugegeben, um ein Verklumpen zu verhindern. Der gemessene pH-Wert der Lösung betrug 6,65. Die Ratten erhielten eine Dosis von 4 mg/kg KGW LTG in 0,78 ml/kg KGW.

Für die i.n.-Applikation in einer 10%igen Cremophor-EL-*Aqua bidest.*-Lösung wurden 80 mg LTG mit 400 µl Cremophor EL unter Erwärmen auf dem Magnetrührer vermischt und 3600 µl *Aqua bidest.* langsam dazugegeben. Der pH-Wert der Lösung betrug 6,40. Den Ratten wurden 4 mg/kg KGW LTG in 200 µl/kg KGW i.n. verabreicht.

4.1.1.2.2 Emulsion aus LTG, Cremophor EL und HPMC-CBP-Gel

Für die i.n.-Applikation von LTG in einer 10%igen Cremophor-EL-Gel-Emulsion wurden 80 mg LTG mit 400 µl Cremophor EL unter Erwärmen auf dem Magnetrührer vermischt und 3600 µl HPMC-CBP-Gel langsam dazugegeben. Den Ratten wurden 4 mg/kg KGW LTG in 200 µl/kg KGW i.n. verabreicht.

4.1.1.3 CARBAMAZEPIN

4.1.1.3.1 Erstellung eines Carbamazepin-haltigen HPMC-CBP-Gels

Für die i.n.-Applikation von Carbamazepin (CBZ) wurde das HPMC-CBP-Stamm-Gel wie in Kapitel 4.1.1.1.2 hergestellt und verdünnt. Es wurden 200 µg CBZ mit 200 mg Gel vermischt (entspricht 200 µg CBZ in 197 µl Gel). Die Ratten erhielten eine Dosis von 0,2 mg/kg KGW.

4.1.1.3.2 Erstellung einer Carbamazepin-Lösung in einem Propylenglycol-Aqua bidest.-Ethanol-Gemisch (5:3:2, v/v/v)

Für die i.v.-Applikation wurden 100 mg CBZ mit 5 ml Propylenglycol, 3 ml *Aqua bidest.* und 2 ml Ethanol (100%) versetzt und gerührt (analog Barakat et al. (2006)). Die Ratten erhielten eine Dosis von 8 mg/kg KGW in 0,8 ml/kg KGW als Bolusinjektion.

4.1.2 INTRANASALE APPLIKATION AM RATTENMODELL

4.1.2.1 INTRANASALE APPLIKATION IM WACHZUSTAND

Für einen Teil der Versuche wurden die Ratten im Wachzustand durch eine Hilfsperson in Rückenlage fixiert. Als Applikationsgerät diente eine Mikroliterspritze (10 µl oder 250 µl), auf die mit Hilfe eines Kunststoffverbindungsstücks ein flexibler, durchsichtiger Plastikschauch von etwa 3 cm Länge aufgesetzt war. Die wässrige Lösung bzw. das Gel wurden nacheinander entweder im vorderen Bereich der beiden Nasenlöcher abgesetzt oder der Schlauchaufsatz nacheinander 2 cm tief in die rechte und linke Hälfte der Nasenhöhle eingeführt und die Substanz dort deponiert (s. Abbildung 4.1).

Die Tiere wurden nach der Applikation für 4 min in Rückenlage fixiert, wobei darauf geachtet wurde, dass sich der Kopf durchgehend in einer horizontalen Position befand. Dadurch sollte ein Abfließen der Substanz von der Nasenhöhle in die Mundhöhle durch den Ductus nasopalatinus oder ein direktes Abschlucken über den Nasopharynx verhindert werden. Die Tiere der Vergleichsgruppe, die eine i.v.-Applikation erhielten, wurden nach der Applikation ebenfalls für 4 min in Rückenlage fixiert.

Während des Applikationsvorganges im Wachzustand führten reflexartige Kopfbewegungen der Ratten beim Einführen des Plastikschauches häufig zu Verletzungen der Nasenschleimhaut. Außerdem wurde deutlich, dass die Fixierung der Ratten in Rückenlage mit horizontaler Position des Kopfes während und nach der Applikation aufgrund von Abwehrbewegungen der Tiere häufig nicht durchzuhalten

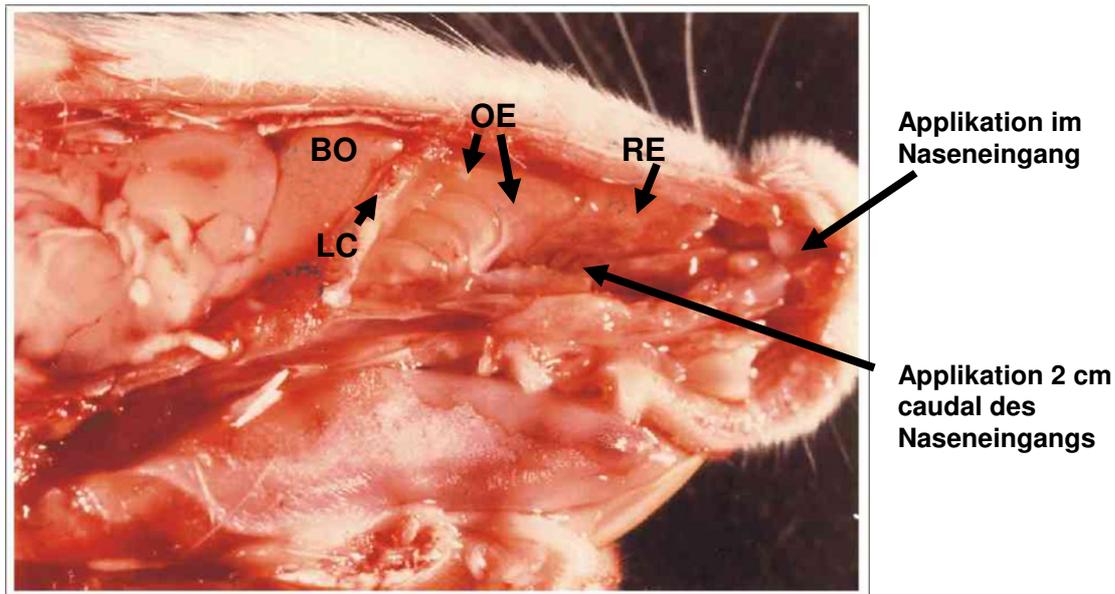


Abbildung 4.1: Sagittalschnitt durch einen Rattenschädel (Bert Menco, Northwestern University, Evanstown, USA). Die Pfeile kennzeichnen die Orte der Substanzapplikation. BO = Bulbus olfactorius, LC = Lamina cribrosa des Os ethmoidale (Siebbein), OE = Olfaktorisches Epithel, RE = Respiratorisches Epithel.

war. Aus diesen Gründen wurde dazu übergegangen, die Applikation unter einer Injektionsnarkose mit Propofol durchzuführen (s. Kapitel 4.1.2.2).

4.1.2.2 APPLIKATION UNTER PROPOFOL-ANÄSTHESIE

Zur Induktion der Kurznarkose durch i.v.-Applikation von Propofol wurden die Tiere durch eine Hilfsperson fixiert. Der Rattenschwanz wurde vor dem Applikationsvorgang für etwa 30 sek in warmes (ca. 42 °C) Leitungswasser gehalten, um eine lokale Gefäßweitung zu erzeugen. Nach Abtrocknen des Schwanzes wurde eine der Schwanzvenen durch die Hilfsperson mit dem Daumen gestaut und ein Venenkatheter eingeführt. Durch vorsichtiges Spülen mit steriler NaCl-Lösung (0,9%ig) wurde der korrekte Sitz des Katheters überprüft. Dann erfolgte die Bolusinjektion einer 10%igen Propofol-Emulsion mit einer Dosis von 1 ml/kg KGW. Die Narkosedauer betrug etwa 6-12 min.

Bei einem Teil der durchgeführten Versuche im Amygdala-Kindling-Modell war eine Verlängerung der Narkosedauer durch Nachdosierung erforderlich (siehe Tabelle 4.8). Durch die Propofol-Kurznarkose konnte das Auftreten von Nasenbluten

größtenteils verhindert werden. Außerdem konnte der Kopf der Tiere während und nach der Applikation zuverlässig und sicher in horizontaler Position gehalten werden. Auch bei der Applikation unter Anästhesie wurden die Ratten für 4 min auf dem Rücken fixiert, bevor sie zum Aufwachen in eine seitliche Position verbracht wurden.

Die i.v.-Applikation erfolgte ebenfalls unter einer Kurznarkose. Nach Propofol-Applikation wurde der Venenkatheter erneut gespült und dann die wässrige PB-Lösung appliziert. Der Katheter wurde nochmals mit NaCl-Lösung (0,9%ig) gespült, um eine Verabreichung der vollständigen PB-Dosis zu gewährleisten.

4.1.3 MIKRODIALYSE

4.1.3.1 VERSUCHSTIERE

Für die Versuche zur Mikrodialyse wurden weibliche Ratten eines Auszuchtstammes (Wistar Unilever) eingesetzt. Bei ihrer Ankunft hatten die Tiere ein Körpergewicht von 200-220 g. Bis zur Operation wurden die Ratten in Makrolonkäfigen (Typ IV) in Gruppen von 5 Tieren untergebracht. In dem Tierraum befanden sich über den gesamten Versuchszeitraum ausschließlich weibliche Ratten.

Die Umgebungstemperatur im Tierraum betrug 22-24 °C, die Luftfeuchtigkeit lag bei 50-60%. Die Regelung des Hell-Dunkel-Rhythmus im Zwölf-Stunden-Intervall übernahm ein Licht-Programm, wobei die Hellphase von 6.00-18.00 Uhr andauerte. Die Ernährung der Versuchstiere bestand aus einer Standardnagerdiät (Altromin 1324) sowie Leitungswasser aus Makrolonflaschen. Beides wurde *ad libitum* angeboten. Einmal wöchentlich wurden die Ratten in mit sauberer Einstreu (Weichholzgranulat Altromin) bestückte Käfige umgesetzt. Gleichzeitig wurden die Futterraufen aufgefüllt. Das Trinkwasser wurde zweimal wöchentlich erneuert.

Nach der Ankunft erhielten die Tiere eine mindestens siebentägige Akklimatisierungsphase, bevor mit den Operationen zur Implantation der Führungskanülen begonnen wurde. Nach der Implantation der Führungskanülen für die Mikrodialyse-Untersuchungen (s. Kapitel 4.1.3.2) wurden die Ratten in Einzelkäfige (Typ III) umgesetzt. Es folgte eine zweiwöchige Erholungsphase,

	rostrocaudal	lateral	ventral
Wistar, ♀	+3,2	-3,2	-2,0

Tabelle 4.2: Koordinaten für die Implantation der Mikrodialyse-Führungskanülen in den rechten frontalen Cortex in mm relativ zu Bregma (nach Paxinos und Watson (1998)).

während der sich die Tiere von dem operativen Eingriff regenerieren konnten. In den ersten sieben Tagen nach der Operation erfolgte eine systemische antibiotische Versorgung der Tiere sowie eine Kontrolle der Wundheilung (s. Kapitel 4.1.3.2).

4.1.3.2 IMPLANTATION DER FÜHRUNGSKANÜLEN

Die Implantation der Führungskanülen für die Mikrodialyse (CMA/12 Guide Cannula) in den rechten frontalen Cortex erfolgte unter tiefer Chloralhydrat-Narkose (360 mg/kg KGW, gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung, i.p.).

Vor Beginn des Eingriffs erhielten die Tiere zur Sicherstellung einer ausreichenden Analgesie Buprenorphin-HCl (0,05 mg/kg KGW, i.m.). Die Narkosetiefe der Ratten wurde anhand des Zwischenzehenreflexes überprüft. Bei Bedarf wurde zum Erhalt der Narkose während der Operation bis zu ein Drittel der Ausgangsdosis nachdosiert.

Nach Entfernung der Haare im Operationsbereich wurde die derart freigelegte Haut über der Schädelkalotte mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Tiere wurden in einen Stereotakten eingespannt, um eine möglichst punktgenaue Positionierung der Führungskanülen zu gewährleisten. Dazu wurde der Rattenschädel über die Gehörgänge durch zwei Ohrstifte und der Oberkiefer mittels eines Schneidezahnbalkens in einem stereotaktischen Apparat (Fa. David Kopf bzw. Stötting) fixiert. Die Höhe der Oberkieferhalterung (incisor bar) wurde zuvor nach Paxinos und Watson (1998) auf 3,3 mm ventral der Interaural-Nulllinie (-3,3) eingestellt, so dass Bregma (= rostraler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte, Sutura sagittalis und Sutura coronalis) und Lambda (= caudaler Kreuzungspunkt der Schädelknochennähte) auf gleicher Höhe lagen (s. Abbildung 4.4).

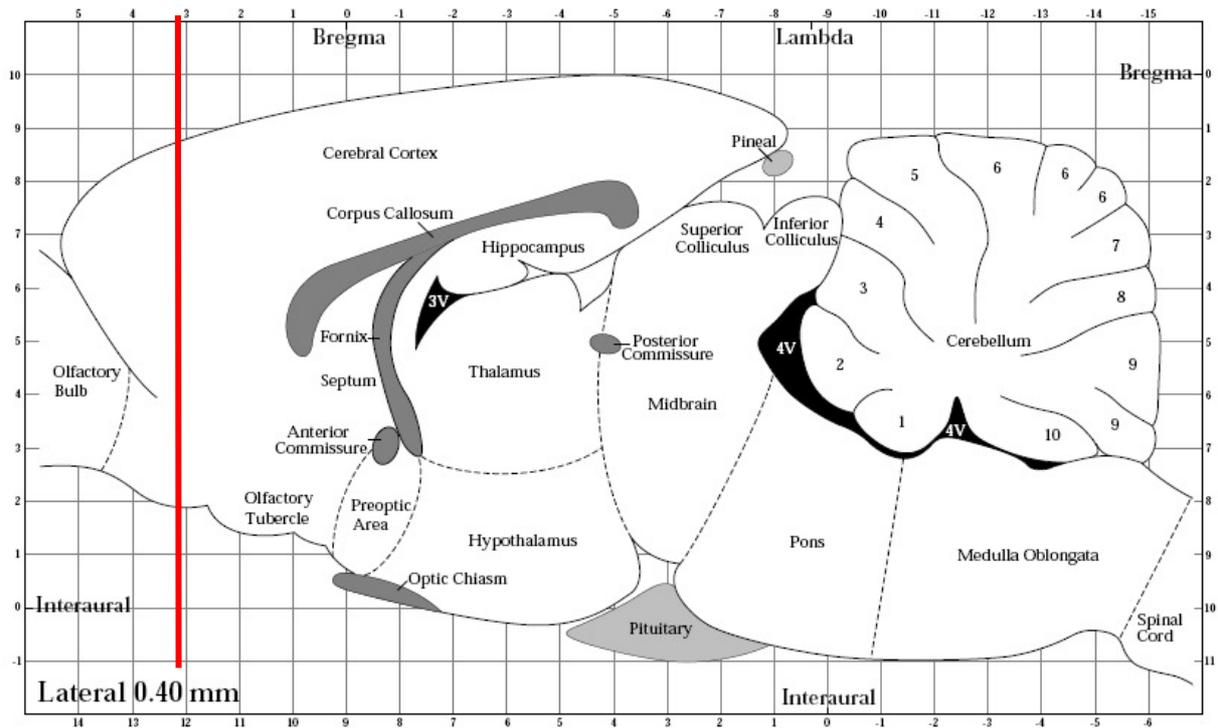


Abbildung 4.2: Lokalisation der Mikrodialyseführungskanüle. Der rote Strich markiert die rostro-caudale Position der Führungskanüle. Saggitalschnitt, mod. nach Paxinos und Watson (1998).

Haut und Unterhaut wurden mit einer Skalpellklinge in der Medianen des Schädels auf einer Länge von ca. 2 cm durchtrennt und von den darunter liegenden Faszien abgehoben. Mittels eines Periostschabers wurde die Knochenhaut der Schädeldecke unter Schonung der angrenzenden Kaumuskulatur entfernt. Die freigelegte Schädeloberfläche wurde zur besseren Darstellung der Knochennähte mit 30%iger Wasserstoffperoxid-Lösung betupft, ohne das umliegende Gewebe zu benetzen. Unter Nutzung einer am Stereotakten fixierbaren Nadel wurde Bregma farbig markiert. Daraufhin wurden die Koordinaten abgelesen und notiert. Zur Orientierung für die richtige Implantation diente ein stereotaktischer Atlas (Paxinos & Watson, 1998), der die Lage der Hirnstrukturen in Bezug auf Bregma wiedergibt. Ausgehend von Bregma wurden die Koordinaten zur Lokalisation der Führungskanüle in Anlehnung an diesen Atlas berechnet und die entsprechende Trepanationsstelle an der Schädeloberfläche ebenfalls farbig markiert. Die

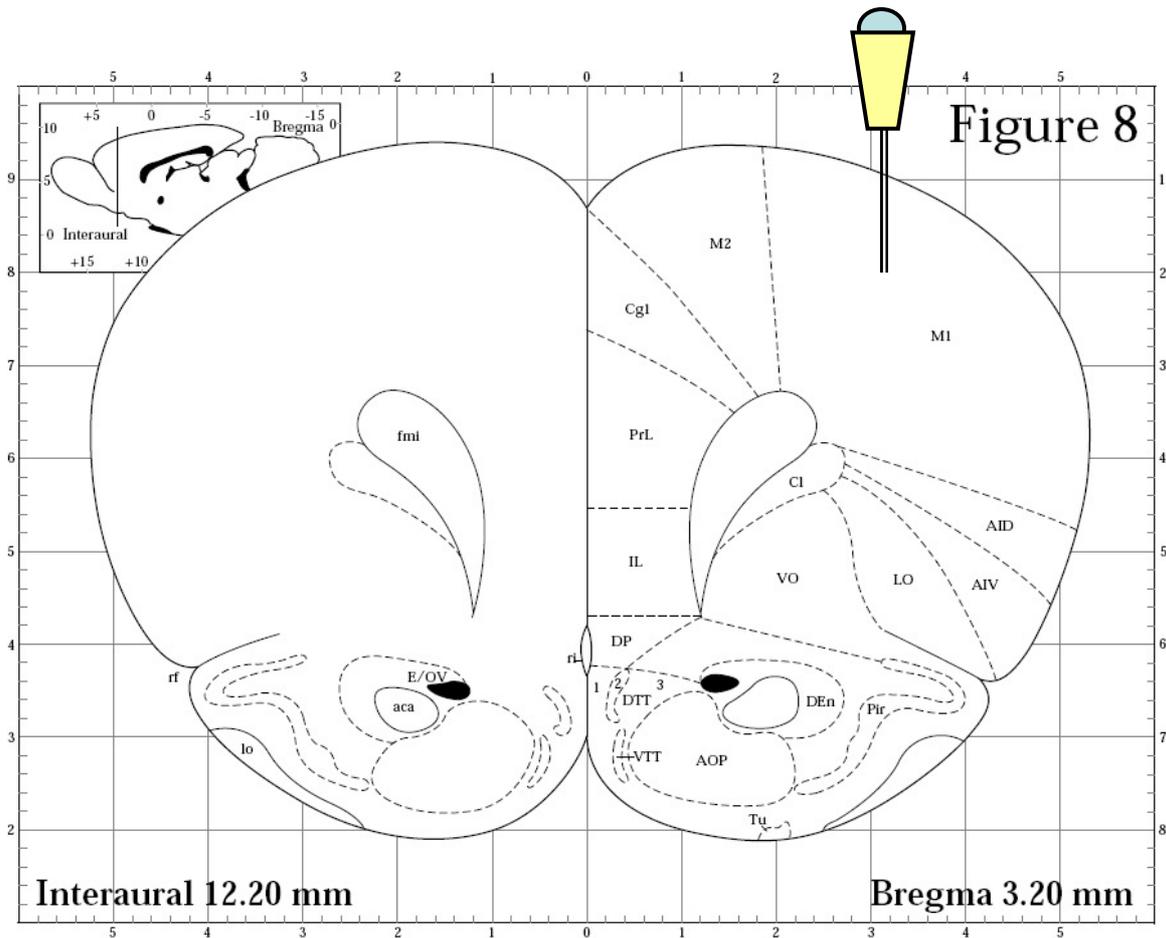


Abbildung 4.3: Lokalisation der Mikrodialyseführungskanüle. Coronalschnitt, mod. nach Paxinos und Watson (1998).

Koordinaten zur Positionierung der Führungskanüle im rechten frontalen Cortex sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Lateral und beidseits caudal der Position der Führungskanüle wurden Markierungen für die Bohrlöcher für drei Fixationsschrauben gesetzt. Diese waren im Os frontale sinister sowie im Os parietale dexter und sinister lokalisiert. Die Trepanation der Schädeldecke erfolgte an den vier beschriebenen Stellen mittels eines 0,9 mm starken Dentalbohrers unter Schonung der Dura mater, um eine Verletzung des darunter liegenden Gehirns zu vermeiden. Anschließend wurde die Dura mater vorsichtig unter Verwendung einer feinen gebogenen Pinzette durchstoßen. Hierdurch konnte verhindert werden, dass eine Zerstörung der Dura mater beim

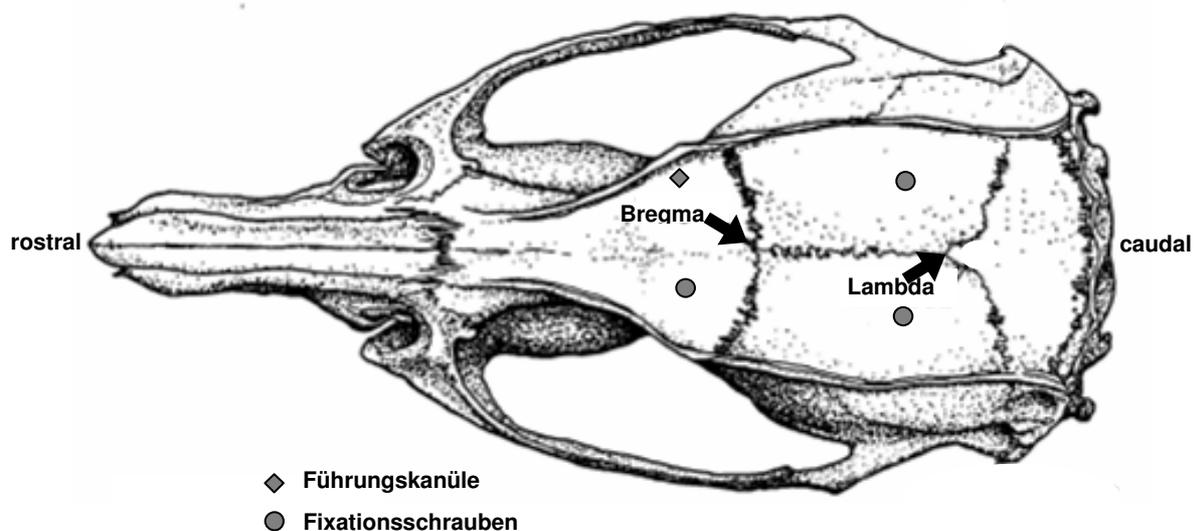


Abbildung 4.4: Aufsicht auf einen Rattenschädel mit Darstellung der Lokalisationen der Mikrodialyse-Führungskanüle und der Fixationsschrauben. Mod. nach Paxinos und Watson, (1998).

Eindrehen der Fixationsschrauben zu Blutungen in die Schädelhöhle führte. Anschließend wurde die jeweilige Führungskanüle in die dafür vorgesehene Halterung des Stereotakten eingespannt. Nach Aufsuchen von Bregma wurde die Führungskanüle gemäß der in Tabelle 4.2 genannten Koordinaten vorsichtig abgesenkt. Die implantierte Führungskanüle wurde mit Hilfe eines Kunststoff-Kaltpolymerisates (Dental-Zement) unter Einbeziehung der Fixationsschrauben in ihrer Position fixiert. Hierzu wurde eine erste Schicht Dental-Zement direkt auf den Schädelknochen sowie außen auf die Führungskanüle und die Halteschrauben aufgetragen. Um einer bakteriellen Wundinfektion vorzubeugen, war dem Polymerisat zuvor 2,1% Gentamicin-Sulfat beigemischt worden. Unter Schonung der angrenzenden Gewebe wurde aus dem Kunststoff ein mehrschichtiger Aufbau um die Führungskanüle geformt. Ein in den Aufbau integriertes Aluminiumblech sorgte für zusätzliche Stabilität und Schutz der Führungskanüle (insbesondere vor den Metallstäben der Käfigdeckel). Die rostral und caudal der Implantationsstelle befindlichen Hautränder wurden durch Einzelhefte unter Verwendung von resorbierbarem Nahtmaterial adaptiert. Nach der Operation wurden die Tiere jeweils in saubere und mit Zellstoff ausgelegte Einzelkäfige verbracht. Außerdem erhielten

sie Gentamicin (20 mg/kg KGW, i.m.), um einer Wundinfektion vorzubeugen. Die postoperative Antibiose bestand an den beiden Folgetagen aus Gentamicin (20 mg/kg KGW, einmal täglich, s.c.), sowie an fünf weiteren Tagen aus Chloramphenicol-Succinat (100 mg/kg KGW zweimal täglich, i.m.).

4.1.3.3 VERSUCHSAUFBAU

Als Perfusionslösung diente sterifiltrierter MOCK-CSF Mikrodialyse-Puffer nach Benveniste et al. (1984), die in Mikroinjektionsspritzen (Type 1, 1 ml oder 2,5 ml) aufgezogen und von Mikroinjektionspumpen (CMA/100) befördert wurde.

Jede Ratte befand sich während der Untersuchungen in einem sogenannten „Raturn“, mit dessen beweglichem Arm sie über ein Plastikhalsband (Plastic Collar) verbunden war (s. Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6). Dabei handelt es sich um ein System, das die Drehbewegungen eines Tieres, welches sich in dem zugehörigen Kunststoffbehälter (Bowl) bewegt, erkennt. Dieser Kunststoffbehälter ist durchsichtig und nach oben geöffnet. Das Gerät wirkt dem Bewegungseffekt des Tieres entgegen, indem es den Plastikbehälter in die entgegen gesetzte Richtung dreht. So können sich die Tiere während des Versuches frei in dem Plastikbehälter bewegen und ein Verdrehen der Schläuche (FEP-Tubing) wird verhindert. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn an das Raturn gewöhnt, um Stress bedingte Einflüsse zu reduzieren.

Für die Untersuchungen wurden Sonden mit einer 3 mm langen Membran verwendet (CMA/12/3 mm). Um Dialysatproben zu sammeln, wurde die mit Perfusionslösung gefüllte Mikroinjektionsspritze (Volumen 1 ml) mit Hilfe zweier Adapter über einen ca. 40 cm langen Plastikschlauch (FEP-Tubing) mit dem Inlet der Mikrodialysesonde verbunden. Über einen weiteren Adapter wurde das Outlet der Sonde ebenfalls mit einem Schlauch versehen, dessen Ende in ein Probensammelgefäß (250 µl) reichte (s. Abbildung 4.5).

4.1.3.4 VERSUCHSABLAUF UND PROBENGEWINNUNG

4.1.3.4.1 Allgemeiner Ablauf der Mikrodialyse-Untersuchungen

Der Versuch wurde frühestens zwei Wochen nach der Implantation der Mikrodialyse-Führungskanüle durchgeführt. Hierzu wurde dem Versuchstier am Tag vor der Versuchsdurchführung (14.30 - 16.30 Uhr) nach Entfernen des Mandrins die Mikrodialysesonde in die Führungskanüle eingesetzt. Die Tiere wurden dabei durch eine Hilfsperson fixiert, um einer Beschädigung der empfindlichen Sondenmembran vorzubeugen. Über Nacht wurden die Ratten in hochwandige, runde Plastikzylinder gesetzt und mit Wasser und Futter ad libitum versorgt. Die Ratten konnten bei aufgerichtetem Körper nicht an die abdeckende Gitterplatte reichen. Damit konnte gewährleistet werden, dass die eingesetzten Sonden nicht zwischen den Stäben der Gitterplatte stecken bleiben und dadurch beschädigt oder ihre Position verändert werden konnte. Um eine Verlegung der Sondenöffnungen (Inlet und Outlet, siehe Abbildung 4.7) durch Einstreu- oder Staubpartikel zu verhindern, wurden diese mittels zweier Adapter und einem ca. 5 cm langen Schlauchstück miteinander verbunden und auf diese Weise auch vor dem Austrocknen geschützt.

Die Versuche begannen am nächsten Tag zwischen 7.00 und 8.00 Uhr, das heißt, etwa 15 h nach Einsetzen der Sonden. Diese Zeitspanne gewährleistet eine Wiederherstellung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke, die nach etwa 30 min wieder erreicht ist (Benveniste et al., 1984) sowie eine Normalisierung des Stoffwechsels im Sondenbereich, der 3 h nach Implantation noch Veränderungen aufweist (Benveniste & Diemer, 1987). Die Experimente wurden immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt, um circadiane Einflüsse möglichst gering zu halten.

Die Ratten wurden für die Versuchsdurchführung in das Rattern gesetzt und über das Halsband mit dem beweglichen Arm verbunden. Die Mikroinjektionsspritze wurde wie beschrieben mit der Sonde verbunden. Bei einer konstanten Flussrate der Perfusionslösung von 2 µl/min wurden zunächst zwei Dialysat-Proben über einen je 30 minütigen Zeitraum aus dem rechten frontalen Cortex in Probensammelgefäßen gesammelt. Die Messwerte dieser beiden Proben galten als Leerwerte.

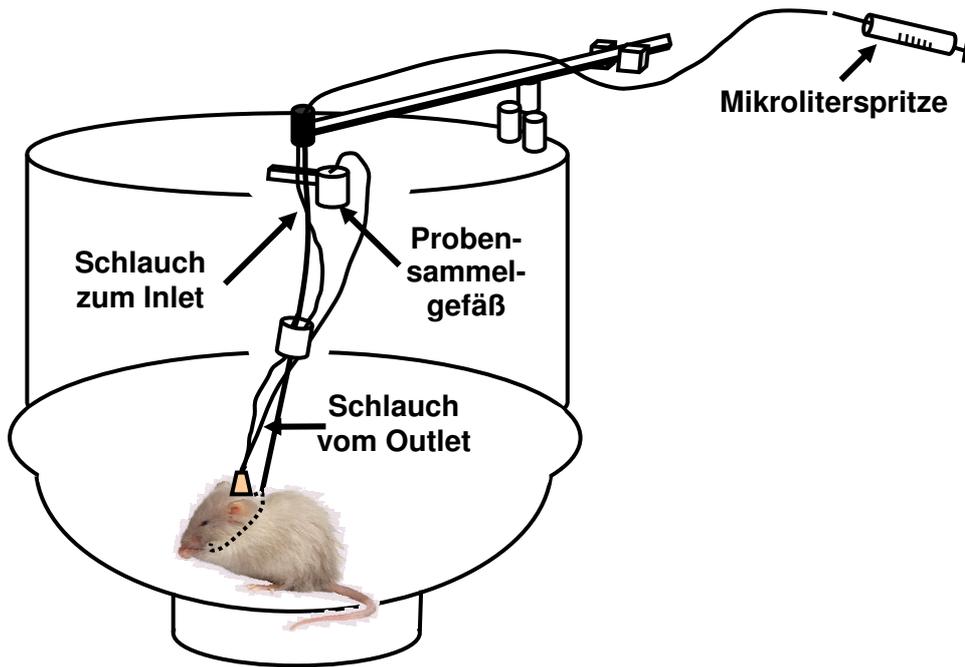


Abbildung 4.5: Schematischer Aufbau einer Mikrodialyse-Untersuchungseinheit.

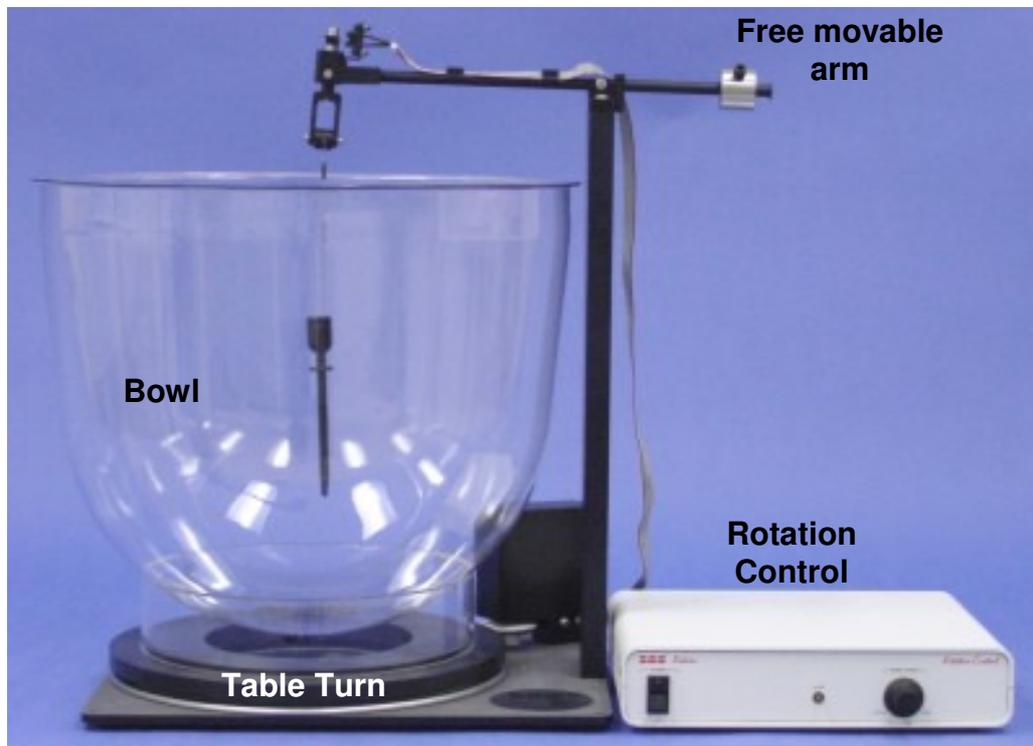


Abbildung 4.6: Ratur: Mikrodialysis-Bowl-Kit (www.bas.com).

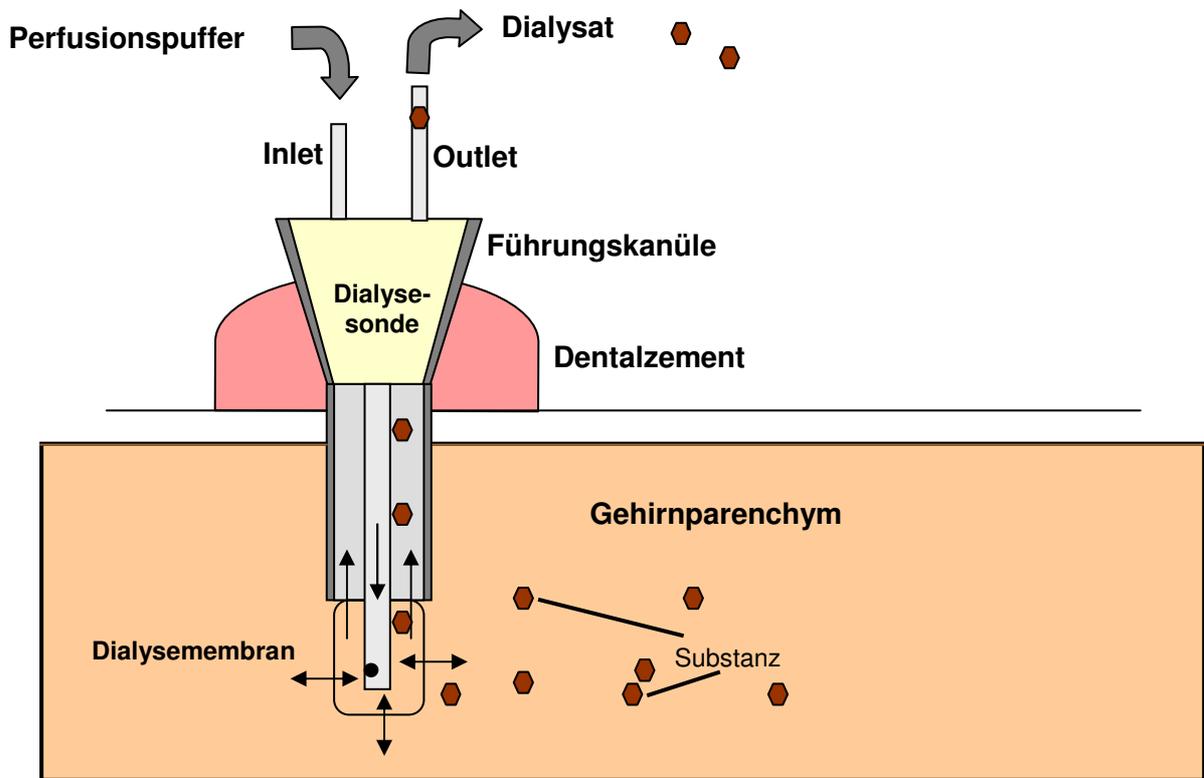


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung eines Substanzaustausches zwischen dem Extrazellulärraum im Gehirn und einer Sondenmembran (mod. nach Löscher und Potschka (2005a)).

Bei den ersten Untersuchungen erfolgte die i.n.- oder i.v.-Substanzapplikation am wachen, durch eine Hilfsperson fixierten Tier. Später wurden die Tiere in eine etwa 5-10 minütige Propofol-Narkose gelegt, um die i.n.-Applikation ohne größere Beschädigung der empfindlichen Nasenschleimhaut vornehmen zu können und ein sofortiges reflexartiges Ausniesen der Substanz weitestgehend zu verhindern (siehe Kapitel 4.1.2.2).

Nach Substanzapplikation erstreckte sich die Probenentnahme über einen Zeitraum von zunächst 120 min, in dem alle 30 min die Probensammelgefäße für das Dialysat ausgetauscht wurden. Parallel dazu erfolgte jeweils eine Blutentnahme (siehe Kapitel 4.1.3.4.2). In weiteren Untersuchungen wurden die Dialysate zu Beginn zweimal nur über 15 min gesammelt, um dann wieder in den 30 min-Rhythmus überzugehen. Schließlich wurden weitere Untersuchungen durchgeführt,

bei denen die Probengewinnung über insgesamt 240 min stattfand. Jedem Tier wurde dabei pro Versuchstag höchstens sechsmal Blut abgenommen, um eine gesundheitliche Beeinträchtigung durch zu hohen Blutverlust zu vermeiden. In Tabelle 4.3 sind die durchgeführten Untersuchungen zu den jeweiligen Substanzen aufgeführt. Zwischen zwei Mikrodialyse-Untersuchungen lag bei jedem Einzeltier eine Erholungsphase von mindestens sechs Wochen.

Die gewonnenen Dialysat-Proben wurden entweder direkt der HPLC-Messung zugeführt oder bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Das entnommene Blut wurde bei 12000 U/min in einer Eppendorf-Zentrifuge für 2,5 min zentrifugiert und das EDTA-Plasma anschließend in saubere Eppendorf-Tubes (1,5 ml) überführt. Die HPLC-Messung erfolgte auch hier entweder direkt oder das Plasma wurde bis zur Messung bei -20°C gelagert. Aus früheren Kontroll-Untersuchungen der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass eine Tiefkühlung der Proben die Wiederfindung nicht beeinflusst. Alle tiefgekühlten Proben wurden spätestens 10 Tage nach Gewinnung der HPLC-Messung zugeführt.

Nach Abschluss der Versuche wurden die Ratten erneut fixiert, um die Sonden vorsichtig zu entnehmen und gereinigte Mandrins in die Führungskanülen einzusetzen. Die Ratten erhielten zum Volumenausgleich eine subkutane Injektion von 4 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung und wurden zurück in ihre Makrolonkäfige gesetzt.

Die Mikrodialysesonden wurden zur äußerlichen Reinigung für 15 min in ein mit 60%igem Ethanol gefülltes Becherglas verbracht und zusammen mit den Schläuchen mit *Aqua bidest.* gespült. Danach wurde das Ethanol durch *Aqua bidest.* ersetzt und das ganze Sonden-Schlauch-System mit mindestens 8 ml *Aqua bidest.* bei einer Flussrate von 9 µl/min gespült.

4.1.3.4.2 Blutentnahme

Vor der Substanzapplikation wurde den Versuchstieren unter Lokalanästhesie Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Hierzu wurde ein Auge der Ratten durch 1-2 Tropfen einer 2%igen Tetracainlösung lokal betäubt. Nach einminütiger Einwirkzeit wurde unter sicherer Fixierung der Tiere der retrobulbäre Venenplexus mittels der stumpfen Seite einer in der Mitte durchgebrochenen

heparinisierten Hämatokritkapillare punktiert. Durch die Kapillare wurden ca. 500 µl Blut in einem Eppendorf-Tube (1,5 ml) aufgefangen in das 20 µl EDTA-Lösung (5 mmol/ml) zur Gerinnungshemmung vorgelegt waren. Retrobulbäre Nachblutungen wurden durch eine kühlende Augenkompression vermieden.

4.1.3.4.3 Bestimmung der Wiederfindungsrate (*In vitro recovery*) der Mikrodialyse-sonden

Vor dem ersten Gebrauch und fortlaufend jeweils nach zwei aufeinander folgenden Einsätzen wurden die „*in vitro recoveries*“ der Mikrodialysesonden bestimmt. Die Bestimmung der „*in vitro recoveries*“ diente dem Nachweis der einwandfreien Funktionsweise der verwendeten Sonden sowie der Bestimmung des Korrekturfaktors. Bei Verdacht auf Beschädigung wurden die Sondenmembranen unter dem Mikroskop betrachtet, um bestehende Defekte zu erkennen. Beschädigte Sonden wurden von der weiteren Verwendung ausgeschlossen. Zwischen den Experimenten wurden die Sonden in einem mit *Aqua bidest.* gefüllten Becherglas im Kühlschrank bei +8°C gelagert. Neue Sonden wurden vor der ersten „*in vitro recovery*“-Bestimmung in 60%iges Ethanol gehängt und 15 min mit *Aqua bidest.* gespült, um herstellungsbedingt vorhandenes Glycerin zu entfernen, das zudem die Sonden vor dem Austrocknen schützt.

Zur Bestimmung der „*in vitro recoveries*“ wurden die Mikrodialysesonden in einer Lösung mit bekannter Konzentration (= Stammlösung, Lamotrigin: 1 µg/ml, Phenobarbital: 3 µg/ml, Carbamazepin: 2 µg/ml) in einem Becherglas platziert. Bei konstanter Flussrate (2 µl/min) wurden die Sonden mit Ringerlösung gespült und drei Dialysatproben über einen Zeitraum von jeweils 30 min gesammelt. Die Stammlösung wurde hierbei auf einem Magnetrührer ständig gerührt. Sowohl die gewonnenen Dialysatproben als auch zeitgleich genommene Proben der Stammlösung aus dem Becherglas wurden mittels HPLC direkt nach Gewinnung analysiert (siehe Kapitel 4.1.3.5) und die sich ergebenden Peakflächen zueinander in Relation gesetzt.

Die „*recovery*“ wurde nach folgender Formel berechnet:

Recovery [%] = Peakfläche (AUC) Dialysat/ Peakfläche Standardlösung

Die *recovery*-Werte der verwendeten Sonden lagen zwischen 17% und 52%. Sonden, deren „*in vitro recovery*“ unter 12% betrug, oder die Membrandefekte aufwiesen, kamen nicht mehr zum Einsatz.

Die „*in vitro recoveries*“ der eingesetzten Mikrodialysesonden sind in Tabelle 4.4 aufgezeigt.

4.1.3.5 PROBENANALYSE MITTELS HPLC

Die HPLC-Untersuchungen wurden von Martina Gramer und Maria Hausknecht (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) durchgeführt.

4.1.3.5.1 Für die HPLC-Analysen verwendetes Material

Zur Detektion der Antiepileptika im Dialysat, Plasma und Gehirnhomogenat diente eine HPLC-Anlage mit UV-Detektion (UV-Detektor, Shimadzu SPD-6A). Die Trennung der Substanzen erfolgte in einem Reversed-Phase-System. Die mobile Phase wurde aus dem Lösungsmittelvorratsgefäß durch einen Entgaser (Degaser ERC-3512) von Gasblasen befreit und von einer Pumpe (Shimadzu LC-6A) in das Säulensystem befördert. Die Pumpe wurde von einem Pumpencontroller (Shimadzu C-R4A) gesteuert. Die mit einer Hamilton HPLC Probenaufgabespritze (50 µl) aufgezogenen Proben wurden über ein Probenaufgabeventil (Rheodyne) in die Probenschleife injiziert. Über einen Säulenofen (Oven Control Unit 20537) wurde die Temperatur im HPLC-System konstant bei 35 °C gehalten.

Die Anlage wurde morgens und abends jeweils 15 min lang mit einem Acetonitril-Wasser-Gemisch (Verhältnis 80:20) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min gespült. Als Vorsäule diente eine Nucleosil-Säule von 6 cm Länge und 4 mm Durchmesser (Nucleosil 120-5 C18). Als Hauptsäule kam ein Fabrikat von 25 cm Länge und 4,6 mm Durchmesser zum Einsatz (Refill Nucleosil 120-5 C18).

Tierzahl	Applikationsform	Substanz	Dosierung [mg/kg]	Volumen i.n. [µl/kg]	Volumen i.v. [ml/kg]	Bei i.n.: Applikationsort	Formulierung	Narkose ja/nein	Propofol 10%ig [ml/kg]	Probennahme [min] Dialysat	Probennahme [min] Blut
n = 2	i.n.	CBZ	0,2	197	-	einseitig rechts 2 cm tief	Gel	ja	1	15, 30, 60, 90, 120	15, 30, 60, 90, 120
n = 4	i.n.	PB	5,4	36	-	beidseits vorne	wässrige Lösung	nein	1	30, 60, 90, 120	30, 60, 90, 120
n = 4	i.n.	PB	5,4	36	-	beidseits 2 cm tief	Gel	ja	1	15, 30, 60, 90, 120	15, 30, 60, 90, 120
n = 4	i.n.	PB	5,4	36	-	beidseits 2 cm tief	Gel	ja	1	15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240	15, 30, 120, 180, 240
n = 6	i.v.	PB	5,4	-	1	-	-	ja	1	15, 30, 60, 90, 120	15, 30, 60, 90, 120
n = 4	i.v.	PB	5,4	-	1	-	-	ja	1	15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240	15, 30, 120, 180, 240
n = 2	i.n.	LTG	4	200	-	einseitig rechts 2 cm tief	<i>Aqua bidest-</i> Lösung	ja	1	15, 30, 60, 90, 120	15, 30, 60, 90, 120
n = 4	i.n.	LTG	4	200	-	einseitig rechts 2 cm tief	Gel-Emulsion	ja	1	15, 30, 60, 90, 120	15, 30, 60, 90, 120
n = 2	i.v.	LTG	4	-	1	-	<i>Aqua bidest-</i> Lösung	ja	1	15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240	15, 30, 120, 180, 240
n = 2	i.v.	LTG	4	-	0,78	-	<i>Aqua bidest-</i> Lösung	ja	1	15, 30, 60, 90, 120	15, 30, 60, 90, 120

Tabelle 4.3: Übersicht über die Mikrodialyse-Untersuchungen

Um eine quantitative Auswertung der Daten zu ermöglichen, wurden vom UV-Detektor empfangene Signale an einen computergestützten Integrator (Shimadzu C-R4A) übermittelt. Die Chromatogramme konnten auf einem Bildschirm sichtbar gemacht und von einem angeschlossenen Thermodrucker ausgedruckt werden.

Vor jeder Messung wurde das Untergrundrauschen der Anlage mittels S-Test überprüft. Daraus ergaben sich Werte von 1100-1300 $\mu\text{V}/\text{min}$. Die Peakauswertung wurde erst ab einer Höhe von 3000 $\mu\text{V}/\text{min}$ vorgenommen, um Messfehlern vorzubeugen.

Die Konzentrationsberechnung in den Proben erfolgte bezogen auf die Analyse von Standardlösungen, die eine bekannte Konzentration der Antiepileptika enthielten (s. Kapitel 4.1.3.5.2).

4.1.3.5.2 Bestimmung der Antiepileptika-Konzentrationen im Dialysat

Herstellung der Standardlösungen

Einwaage und Lösungsmittel für die Stammlösungen:

Carbamazepin	10 mg	10 ml Methanol
Lamotrigin	10 mg	10 ml Acetonitril
Phenobarbital	10,9 mg	10 ml Ringerlösung

Die Standardlösung für die HPLC wurde an den Analysetagen frisch aus eingefrorenen Stammlösungen der Antiepileptika hergestellt.

Die eingewogenen Substanzen wurden in 10 ml des angegebenen Lösungsmittels gelöst (100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$). Einhundert Mikroliter dieser Lösungen wurden dann wiederum mit 10 ml des jeweiligen Lösungsmittels aufgefüllt und die entstandenen Stammlösungen (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) in Portionen à 200 μl in Eppendorf-Tubes bei -20°C eingefroren. In dieser Form waren die Lösungen für einen Zeitraum von 3 Monaten haltbar.

Zur Herstellung der Standardlösung (= Tagesstandard) wurde ein Aliquot der Stammlösung aufgetaut und im Verhältnis 1:10 mit Lösungsmittel verdünnt (z. B. 100 μl Pb-Na-Stammlösung plus 900 μl Ringerlösung), so dass im Tagesstandard eine Konzentration von 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ vorlag.

Sonde	PB			CBZ			LTG		
	Anzahl der Einsätze	Anzahl der Recoveries	M ± SEM [%]	Anzahl der Einsätze	Anzahl der Recoveries	M ± SEM [%]	Anzahl der Einsätze	Anzahl der Recoveries	M ± SEM [%]
2	4	2	28±1						
4	1	1	31±0						
5	4	3	14±4						
6	2	1	35±0	1	1	44±0			
7	4	3	22±2						
8	3	3	33±3	1	1	52±0			
9	2	4	16±6						
10	2	1	18±0						
11	2	2	24±5						
13	2	1	17±0						
14	4	1	24±0				2	1	35±0
15	1	1	27±0				2	1	32±0
16	1	0					1	1	31±0
C	2	1	32±0		1	53±0	1	1	36±0
D	2	1	17±0		1	36±0	2	2	36±0
93	1	1	33±0						
96	2	1	24±0				2	2	36±2
Durchschnitt	24			46			35		

Tabelle 4.4: „In vitro recoveries“ der verwendeten Mikrodialysesonden in [%]. Angegeben sind Mittelwert (M) und Standardfehler (SEM).

Bestimmung der Lamotrigin-Konzentration im Dialysat

Als mobile Phase zur Lamotrigin (LTG)-Bestimmung diente ein Phosphatpuffer-Acetonitril-Gemisch im Verhältnis 60:40. 20 µl der Dialysat-Proben wurden für die Analyse in die Anlage injiziert. Um später die LTG-Konzentration im Dialysat berechnen zu können, wurden 20 µl des Tagesstandards (1 ng/µl LTG) injiziert und als Bezugswert gemessen. Die Retentionszeit für Lamotrigin betrug 4,8 min. Jede Probe wurde über eine Analysendauer von 10 min gemessen.

Die LTG-Konzentration im Dialysat wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Dialysat-Konzentration [ng/ml]} = \frac{\text{AUC}_{\text{PR}} \times \text{Konz}_{\text{STD}} \times 1000}{\text{AUC}_{\text{STD}}}$$

AUC_{PR} = Area Under the Curve der Dialysatprobe

AUC_{STD} = Area Under the Curve der Standardlösung

Konz_{STD} = Konzentration der Standardlösung [ng/μl]

Bestimmung der Phenobarbital-Konzentration im Dialysat

Die mobile Phase für die Phenobarbital (PB)-Analyse bestand aus einem Phosphatpuffer-Acetonitril-Gemisch im Verhältnis 65:35. Es wurden jeweils 20 μl Tagesstandard (1 ng/μl PB) bzw. Probe injiziert. Die Retentionszeit für PB betrug 6,5 min. Die Analysendauer pro Probe belief sich auch hier auf 10 min.

Die PB-Konzentration im Dialysat in ng/μl wurde nach der für Lamotrigin angegebenen Formel berechnet.

Bestimmung der Carbamazepin-Konzentration im Dialysat

Die mobile Phase für die Carbamazepin (CBZ)-Analyse bestand aus einem Phosphatpuffer-Acetonitril-Gemisch im Verhältnis 60:40. Auch hier wurden jeweils 20 μl Tagesstandard (1 ng/μl PB) bzw. Dialysatprobe für die Analyse eingespritzt. Die Retentionszeit für CBZ betrug 7,9 min. Die Analysendauer pro Probe belief sich auf 10 min. Die CBZ-Konzentration im Dialysat in ng/μl wurde nach der für Lamotrigin angegebenen Formel berechnet.

Bestimmung der Lamotrigin-Konzentration im Plasma

Das nach der in Kapitel 4.1.3.4.1 beschriebenen Methode gewonnene EDTA-Plasma wurde für die HPLC-Analyse folgendermaßen aufgearbeitet: 50 μl Plasma wurden mit 150 μl Acetonitril versetzt, das Gemisch 1 min in einem Eppendorf-Schüttler geschüttelt und anschließend für 5 min bei 14000 U/min in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Messung

wieder bei -20°C eingefroren. So aufgearbeitete Plasmaproben wurden am Tag der Aufarbeitung analysiert, um Verfälschungen der Messwerte zu verhindern. 10 min vor der Analyse wurde die zu messende aufgearbeitete Probe aufgetaut und 20 µl davon in die HPLC-Säule injiziert.

Die Plasma-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Plasma-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \frac{\text{Konz}_{\text{STD}} \times \text{AUC}_{\text{PR}} \times 4}{\text{AUC}_{\text{STD}}}$$

Konz_{STD} = Konzentration der Standardlösung [$\mu\text{g/ml}$]

AUC_{PR} = Area Under the Curve der Plasmaprobe

AUC_{STD} = Area Under the Curve der Standardlösung

Bestimmung der Phenobarbital-Konzentration im Plasma

Es wurde genauso vorgegangen, wie oben für LTG beschrieben, mit dem einzigen Unterschied, dass das Plasma für die Aufarbeitung nicht mit Acetonitril sondern mit Methanol versetzt wurde.

Bestimmung der Carbamazepin-Konzentration im Plasma

Es wurde genauso vorgegangen, wie oben für LTG beschrieben.

4.1.3.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4 für Windows durchgeführt. Im Allgemeinen werden die Daten als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. Zu Beginn wurde bei ausreichender Gruppengröße anhand der Tests von Kolmogorov-Smirnov oder D'Agostino und Pearson geprüft, ob sich die Daten entsprechend einer Gauss'schen Normalverteilung verhalten. Anschließend wurde beim Vorliegen parametrischer Daten eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way-ANOVA) durchgeführt. Bei nicht-parametrischen Daten wurde die Kruskal-Wallis-Varianzanalyse eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Bei signifikantem Ergebnis wurde als *post hoc*-Test für den Vergleich

parametrischer Daten der Student's t-Test angewendet. Bei nicht-parametrischen Daten wurde ein Mann Whitney *U*-Test durchgeführt. Grundsätzlich erfolgten alle statistischen Tests zweiseitig.

4.1.4 GEHIRNPRÄPARATIONEN

4.1.4.1 VERSUCHSTIERE

Für die Versuche zur Gehirnpräparation nach i.n.-Applikation wurden weibliche Ratten (Wistar Unilever) eingesetzt. Bei ihrer Ankunft hatten die Tiere ein Körpergewicht von 200-220 g. Bis zum Versuch wurden die Ratten in Makrolonkäfigen (Typ IV) in Gruppen von 5-7 Tieren untergebracht. Die weiteren Haltungsbedingungen sind in Kapitel 4.1.3.1 beschrieben. Nach ihrer Ankunft erhielten die Tiere eine Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche, in der sie durch mehrfaches Handling (Fixierung, Wiegen) an die späteren Versuchsbedingungen gewöhnt wurden, um die Versuchsdurchführung für sie möglichst stressarm zu gestalten.

4.1.4.2 VERSUCHSAUFBAU UND –DURCHFÜHRUNG

4.1.4.2.1 Allgemeiner Ablauf des Versuchs

Für die vergleichenden pharmakokinetischen Untersuchungen zur i.n.- und i.v.-Applikation von PB wurden die Ratten mit zwei Dosierungen behandelt (5,4 mg/kg KGW und 30 mg/kg KGW) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation dekapitiert (2, 5, 10, 20, 30, 60, 240 min) (siehe Tabelle 4.5). Wie in Kapitel 4.1.2.2 beschrieben wurden die Ratten hierfür durch eine i.v.-Propofol-Applikation kurzzeitig anästhesiert. Für die i.n.-Applikation wurde das PB in einem HPMC-CBP-Gel gelöst (s. Kapitel 4.1.1.1.2), für die i.v.-Applikation in 0,9%iger NaCl-Lösung (s Kapitel 4.1.1.1.1). Bei der Dosierung von 5,4 mg/kg KGW wurde den in Rückenlage befindlichen Ratten 36 µl/kg KGW mittels Mikroliterspritze (10 µl) mit Schlauchaufsatz nacheinander 2 cm tief in beide Hälften der Nasenhöhle appliziert. Bei der Dosierung von 30 mg/kg erfolgte eine einseitige Applikation (Mikroliterspritze

Substanz	Dosierung [mg/kg]	Tierzahl	Applikationsform	Applikationsort	Applikationsvolumen pro kg KGW	Dekapitationszeitpunkt [min] nach Applikation
PB	5,4	3	i.n.	beidseitig 2 cm tief	36 µl	2
		3	i.v.	Schwanzvene	1 ml	
		3	i.n.	beidseitig 2 cm tief	36 µl	5
		3	i.v.	Schwanzvene	1 ml	
		4	i.n.	beidseitig 2 cm tief	36 µl	10
		4	i.v.	Schwanzvene	1 ml	
		3	i.n.	beidseitig 2 cm tief	36 µl	20
		3	i.v.	Schwanzvene	1 ml	
		3	i.n.	beidseitig 2 cm tief	36 µl	30
		3	i.v.	Schwanzvene	1 ml	
		3	i.n.	beidseitig 2 cm tief	36 µl	60
		3	i.v.	Schwanzvene	1 ml	
		3	i.n.	beidseitig 2 cm tief	36 µl	240
		3	i.v.	Schwanzvene	1 ml	
	30	2	i.n.	einseitig rechts 2 cm tief	197 µl	5
			i.v.	Schwanzvene	1 ml	
		2	i.n.	einseitig rechts 2 cm tief	197 µl	10
			i.v.	Schwanzvene	1 ml	
CBZ	0,2	2	i.n.	einseitig rechts 2 cm tief	197 µl	10
	8	2	i.v.	Schwanzvene	0,8 ml	10

Tabelle 4.5: Darstellung von Versuchsparametern zur Gehirnpräparation.

250 µl) von 197 µl/kg KGW 2 cm tief in die rechte Hälfte der Nasenhöhle (s. Kapitel 4.1.2.2). Die Applikation von CBZ erfolgte in gleicher Weise. Hier wurden 0,2 mg/kg KGW im HPMC-CBP-Gel i.n. und 8 mg/kg KGW i.v. verabreicht (s. Kapitel 4.1.1.3.1 und Kapitel 4.1.1.3.2).

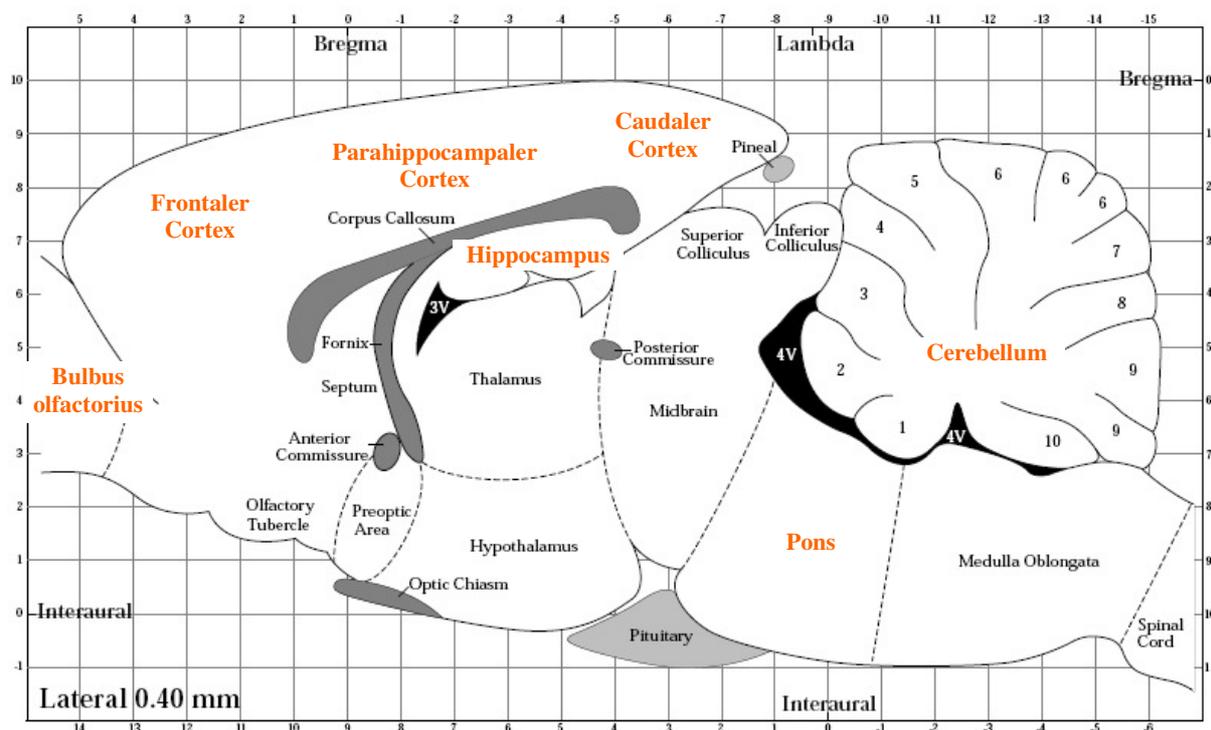


Abbildung 4.8: Darstellung der präparierten Gehirnregionen (rot) in Anlehnung an Paxinos und Watson (1998).

Um ein sofortiges Abschlucken der Substanz zu verhindern, verblieben die Tiere nach der Applikation über einen Zeitraum von 4 min in Rückenlage. Die Tiere, die bereits 2 min nach der Applikation dekapitiert wurden, bildeten diesbezüglich eine Ausnahme. Für die Präparation einzelner Gehirnregionen zum Vergleich der PB-Verteilung in den verschiedenen Gehirnregionen nach i.n.- und i.v.-Applikation wurde an jeweils 4 Ratten 5,4 mg/kg KGW PB i.n. und i.v. unter Kurznarkose in oben beschriebener Weise verabreicht. Diese Tiere wurden alle zum Zeitpunkt 10 min nach Applikation dekapitiert.

4.1.4.2.2 Dekapitation und Probengewinnung

Die Ratten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation (siehe Tabelle 4.5) mittels einer Guillotine dekapitiert. Dabei wurde etwa 1 ml Blut aus der Aorta der getöteten Tiere in einem mit 20 µl EDTA-Lösung (5 mmol/ml) bestückten Eppendorfgefäß (2 ml) aufgefangen. Nach Entfernung der Kopfhaut und Nackenmuskulatur wurde der Schädel der Tiere mittels gebogener Schere und

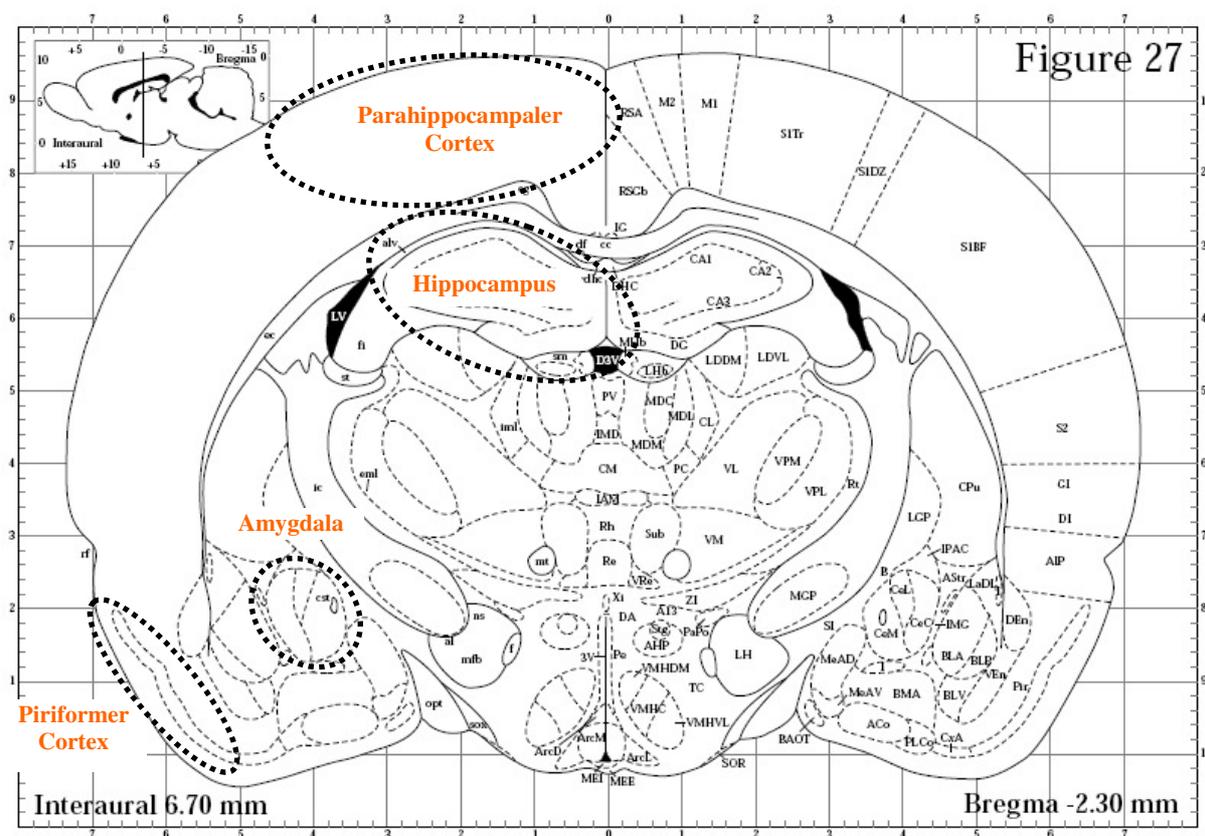


Abbildung 4.9: Darstellung der präparierten Gehirnregionen (rot). Coronalschnitt -2,3 mm relativ zu Bregma (nach Paxinos und Watson (1998)).

Knochenzange unter Schonung des unfixierten Gehirngewebes eröffnet. Nach Durchtrennung der Gehirnnerven wurde das Gehirn unter zu Hilfenahme einer feinen gebogenen Pinzette zusammen mit den Bulbi olfactorii vorsichtig aus der Schädelkalotte in eine Petrischale überführt. Das Gehirn wurde mit einer geringen Menge 0,9%iger NaCl-Lösung abgespült, um Blutreste zu entfernen und anschließend vorsichtig mit Filterpapier abgetupft. Nach Abtrennung des Kleinhirns wurden die Gehirne auf einer Analysenwaage (Satorius) gewogen, um dann in eisgekühlte Plastikreagenzgläser (12 ml) überführt zu werden. Die Gehirne wurden entsprechend ihres Gewichtes mit 1 ml *Aqua bidest.* pro 50 mg Gehirn versetzt und mittels eines Ultra-Turrax (T 25) homogenisiert. Die Homogenate wurden direkt der HPLC-Analyse zugeführt oder bis zur Messung für wenige Tage bei -20 °C gelagert.

Zur Präparation der Einzelregionen wurde das entnommene Gehirn auf einen Gefrierblock aufgefroren und unter Zuhilfenahme einer feinen, gebogenen Pinzette und einer Skalpellklinge vorsichtig von rostral nach caudal folgende Regionen präpariert: Bulbus olfactorius, Piriformer Cortex, Amygdala, Frontaler Cortex, Hippocampus, Parahippocampaler Cortex, Caudaler Cortex, Cerebellum und Pons (siehe Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9). Die präparierten Gehirnregionen wurden gewogen, in eisgekühlte Plastikreagenzgläser (12 ml) verbracht, nach *Aqua bidest.*-Zugabe homogenisiert und der HPLC-Messung zugeführt.

4.1.4.3 HPLC-BESTIMMUNG DER PB-KONZENTRATION IM GEHIRNHOMOGENAT

Herstellung des internen Standards:

Zur Erstellung des internen Standards für die Bestimmung von PB im Gehirnhomogenat wurden 10 mg PB mit 10 ml Methanol versetzt. Von dieser Lösung wurde 1 ml entnommen und nochmals mit 10 ml Methanol versetzt. Die entstandene Stammlösung der Konzentration 10 µg/100 µl wurde portionsweise bei -20 °C eingefroren.

Am Tag der Analyse wurde ein Aliquot aufgetaut und 100 µl davon mit 4,9 ml Methanol versetzt, so dass eine Lösung der Konzentration 200 ng/100 µl entstand. Diese Lösung wurde als interner Standard (IS) bezeichnet.

Herstellung der „Tages-Eichreihe“:

10,9 mg PB wurden in 10 ml Methanol gelöst. 1 ml dieser Lösung wurde wiederum mit 10 ml Methanol versetzt und die entstandene Lösung der Konzentration 10 mg/100 µl bei -20 °C eingefroren. Zur Erstellung einer „Tages-Eichreihe“ wurde ein 400 µl Aliquot der eingefrorenen Stammlösung aufgetaut und folgende drei Lösungen angesetzt:

1. 50 µl Stamm-Lösung [5 µg/50 µl] + 10 ml Methanol
Ergibt: 5 µg/10 ml oder 50 ng/100 µl
2. 50 µl Stamm-Lösung [5 µg/50 µl] + 5 ml Methanol
Ergibt: 5 µg/5 ml oder 100 ng/100 µl

3. 100 µl Stamm-Lösung [10 µg/100 µl] + 5 ml Methanol
 Ergibt: 10 µg/5 ml oder 200 ng/100 µl

Die Konzentrationen wurden entsprechend der erfahrungsgemäß zu erwartenden PB-Konzentration in den zu analysierenden Proben gewählt.

Bestimmung der PB-Konzentration im Gehirnhomogenat

Am Tag der Analyse wurden die Gehirnhomogenate aufgetaut und jeweils 200 µl Homogenat in einem Eppendorfgefäß mit 100 µl IS und 100 µl Methanol versetzt. Als Bezugsgröße wurden 3 weitere Ansätze aus 200 µl substanzfreiem Gehirnhomogenat (Null-Homogenat) mit 100 µl IS und dazu jeweils 100 µl eines der drei PB-Lösungen bekannter Konzentration (s.o.) zugegeben. Daraus ergaben sich dann folgende drei Konzentrationen: 2 ng/20 µl, 5 ng/20 µl und 10 ng/20 µl.

Die Ansätze wurden vermischt, 5 min geschüttelt und in einer Kühlzentrifuge (Multifuge 1 S-R) für 15 min bei 15000 U/min zentrifugiert. 200 µl der entstandenen Überstände wurden in Zentrifugen-Filtereinheiten (Mini, Ø 0,2 µm) pipettiert und nochmals für 30 min bei 6000 U/min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. 20 µl des Filtrats wurden dann in die HPLC-Anlage eingespritzt. Die mobile Phase setzte sich dabei aus 65% Phosphatpuffer und 35% Acetonitril zusammen.

Zur Berechnung der PB-Konzentration in den Proben wurden folgende Formeln herangezogen:

1.

$$Q = \frac{AUC_{PR}}{AUC_{IS}}$$

AUC_{PR} = Area Under the Curve der Probe

AUC_{IS} = Area Under the Curve des Internen Standards

2.

$$\text{Tagesfaktor (F)} = \frac{ng_{STD}}{Q_{STD}}$$

3.

$$\text{Gehirnkonzentration } [\mu\text{g/g}] = \frac{\left[\frac{\text{Gehirnmasse [g]} + 1 \text{ ml } A. \text{ bidest.}}{0,2 \text{ ml}} \right] \times Q \times F \times 20}{1000 \times \text{Einwaage [g]}}$$

Die im Rahmen der Methodenetablierung ermittelte Wiederfindungsrate für Phenobarbital betrug 101,7%. Die Nachweisgrenze für Phenobarbital in den Gehirnhomogenaten lag bei 0,60 µg pro Gramm Gehirn für PB.

4.1.5 INTRANASALE APPLIKATION IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL

4.1.5.1 VERSUCHSTIERE

Für die Kindling-Versuche wurden weibliche Ratten (Wistar Unilever) verwendet. Die Tiere hatten bei ihrer Ankunft ein Körpergewicht von 200-220 g. Sie wurden in einem Tierraum mit ausschließlich weiblichen Ratten einzeln in Makrolonkäfigen (Typ III) unter den in Kapitel 4.1.3.1 beschriebenen Bedingungen gehalten. Vor und nach der Elektrodenimplantation wurden die Tiere durch Handling an die Versuchsbedingungen gewöhnt.

Es wurde darauf geachtet, dass das Umsetzen der Tiere in ausreichend zeitlichem Abstand (mindestens ein Tag vorher) zu den Versuchen stattfand, um eine Beeinflussung der Ratten vor dem Experiment zu vermeiden.

4.1.5.2 IMPLANTATION DER STIMULATIONS- UND ABLEITELEKTRODEN

Für die Operationen wurden die Ratten durch i.p.-Applikation von Chloralhydrat (360 mg/kg KGW in 10 ml/kg KGW 0,9%iger NaCl-Lösung) narkotisiert. Die Ratten wurden wie in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben in einen Stereotakten eingespannt, um eine genaue Positionierung der Ableit- und Stimulationselektrode (bipolare Elektroden aus rostfreiem Stahl mit einer Teflummantelung) sicherzustellen. Zur Orientierung für die richtige Implantation diente der stereotaktische Atlas nach Paxinos und Watson (1998). Die Einstellung der Oberkieferhalterung (incisor bar)

und die Koordinaten, die für die Positionierung der Elektrode gewählt werden mussten, hängen vom Rattenstamm, Geschlecht und Alter der Tiere ab. Für 200-250 g schwere weibliche Wistar-Ratten ergeben sich für eine Implantation in die rechte basolaterale Amygdala (BLA) die in Tabelle 4.6 dargestellten Koordinaten relativ zu Bregma.

Die Operation wurde wie in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben durchgeführt. Es ergaben sich jedoch folgende Änderungen: Die Bohrlöcher für die Halteschrauben wurden rostral der Elektrodenposition im Os frontale dexter, lateral der Elektrode im Os parietale sinister und caudal der Elektrode im Os parietale dexter gesetzt (s. Abbildung 4.10). Nach dem Eindrehen der Halteschrauben konnte die im Os parietale sinister befindliche Schraube durch das Anbringen eines Drahtes als indifferente Erdungselektrode genutzt werden. Die Ableit- und Stimulationselektrode wurde in die dafür vorgesehene Halterung des Stereotakten eingespannt, die Elektrode entsprechend der zu erreichenden Koordinaten abgesenkt und mit Dental-Zement an der Schädeldecke befestigt. Nach Erstellung des Zement-Sockels wurde die Wunde wie beschrieben mit Einzelheften verschlossen und die Ratte zur Wundinfektionsprophylaxe mit einer postoperativen Antibiose versorgt (s. Kapitel 4.1.3.2). Vor Beginn des Kindling-Prozesses wurde den Tieren eine zweiwöchige Erholungsphase gewährt.

4.1.5.3 KINDLING-PROZESS

4.1.5.3.1 Beurteilung der Anfallsschwere

Die Anfallsschwere (seizure severity, SS) wird nach einer von Racine (1972) beschriebenen und nach Löscher und Schmidt (1988) modifizierten Rangskala in die in Tabelle 4.7 dargestellten Stadien eingeteilt. Während dieser Stadien ist die Reaktionsbereitschaft der Tiere gegenüber sensorischen Reizen mehr oder weniger herabgesetzt (Stadium I-III) oder nicht mehr vorhanden (Stadium IV und V). Die Merkmale der Stadien I und II ähneln denen komplex-fokaler Anfälle des Menschen, die ihren Ursprung häufig im limbischen System haben. Stadium III-Anfälle zählen ebenfalls noch zu den fokalen Anfällen, während Krämpfe der Stadien IV und V als

	rostrocaudal	lateral	ventral
Wistar, ♀	-2,2	-4,8	-8,5

Tabelle 4.6: Koordinaten in mm relativ zu Bregma für die Implantation der Elektroden in die rechte BLA (nach Paxinos und Watson (1998)).

sekundär generalisierte motorische Anfälle zu betrachten sind (Löscher & Ebert, 1996; Sato et al., 1990).

4.1.5.3.2 Allgemeines Stimulationsprotokoll und Bestimmung der initialen Nachentladungsschwelle (ADT)

Nach einer postoperativen Erholungsphase von zwei Wochen wurde mit dem Kindling-Protokoll begonnen. Die Ratten wurden hierzu in den klimatisierten Versuchsraum gebracht, aus ihren Käfigen genommen und in einer Gruppe von 10 bis 12 Tieren in ein so genanntes „Open field“ gesetzt. In diesem schwarzen Plastikzylinder von 78 cm Durchmesser und 30 cm Höhe konnten sich die Tiere frei bewegen. Jedes Tier wurde dann einzeln in ein nach oben offenes, mit Zellstoff ausgelegtes Glasterrarium von 40 cm x 60 cm x 40 cm Größe verbracht und über seinen Steckeraufsatz mittels eines dreipoligen, abgeschirmten, ummantelten Kabels mit einer Stimulatoreinheit verbunden (Typ 215/II). Dies ermöglichte eine Stimulation der BLA über die implantierte Elektrode. Gleichzeitig konnte durch Zwischenschaltung einer „Switchbox“ kontinuierlich ein EEG abgeleitet und durch einen Thermoschreiber (Schwarzer-Uniskript UD 12) aufgezeichnet werden. Als Stimulationsstrom diente ein monophasischer Rechteckimpuls von der Dauer einer Millisekunde und einer Frequenz von 50 Hz für die Gesamtdauer von einer Sekunde. Der erste Versuchstag diente der Bestimmung der initialen Nachentladungsschwelle (afterdischarge treshold, ADT) der Tiere. Die Nachentladungsschwelle bezeichnet die minimale Reizstromstärke in μA , die benötigt wird, um mit dem vorgenannten Stimulationsstrom im EEG ein Nachentladungsmuster von mindestens drei Sekunden und einer mindestens doppelt so hohen Amplitude im Vergleich zur Grundlinie im Ruhe-EEG hervorzurufen. Dieses Nachentladungsmuster konnte ohne motorisch auffälliges Verhalten der Ratten einhergehen oder aber mit dem Auftreten

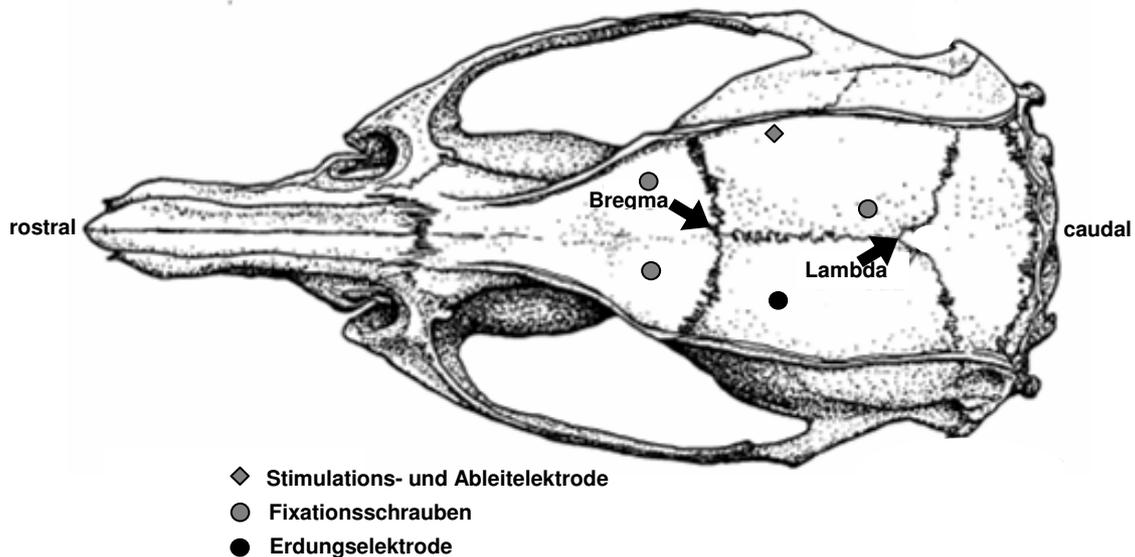


Abbildung 4.10: Aufsicht auf einen Rattenschädel mit Darstellung der Lokalisationen der Stimulations- und Ableitelektrode, der Erdungselektrode und der Fixationsschrauben (nach Paxinos und Watson (1998)).

motorischer Krampfaktivität verbunden sein. Zur Bestimmung der initialen ADT wurde mit einer Stromstärke von 15 μA begonnen. In Anlehnung an Freeman und Jarvis (1981), wurde diese Stimulationsstromstärke im Minutentakt um 20% im Vergleich zur vorherigen Stromstärke erhöht, so dass sich folgende Stimulationsstufen ergaben: 15, 18, 21, 25, 30, 36, 42, 50, 60, 75, 90, 110, 130, 160, 200, 240, 280, 330, 400, 480, 590, 700, 840 und 1000 μA . Traten bei einer Stromstärke von 1 mA keine Nachentladungen im EEG auf, so wurden diese Tiere am jeweiligen Versuchstag keiner weiteren Stimulation ausgesetzt. Als initiale ADT wurde die Stromstärke vermerkt, bei der das erste Mal Nachentladungen auftraten.

Mit dem zweiten Versuchstag wurde der eigentliche Kindling-Prozess begonnen. Von nun an wurden die Ratten wochentags einmal täglich zur gleichen Tageszeit mit einer Stromstärke von 330 μA stimuliert. Die Stromstärke von 330 μA lag deutlich über den am vorausgegangenen Tag bestimmten individuellen ADTs.

Während des Kindling-Prozesses wurden folgende Parameter erfasst:

- Die **Anfallsschwere** (seizure severity, SS)
Die **Anfallsdauer 1 und 2** (seizure duration, SD1 und SD2)
Die **Nachentladungsdauer 1 und 2** (afterdischarge duration, ADD1 und ADD2)

Die **Anfallsschwere** wird in Tabelle 4.7 beschrieben.

Die **Anfallsdauer** bezeichnet die Zeit der Krampfaktivität vom Beginn der Stimulation bis zum Ende der für den Beobachter sichtbaren Verhaltensänderungen. Man unterteilt in die Anfallsdauer 1 (SD1), welche die Zeitspanne vom Beginn der Stimulation bis zum Ende des fokalen bzw. generalisierten Anfalls beinhaltet, und die Anfallsdauer 2 (SD2). Diese beginnt ebenfalls mit dem Zeitpunkt der Stimulation, umfasst neben der motorischen Krampfaktivität aber auch die sich daran anschließende postiktale Depressionsphase bis zur Normalisierung des Verhaltens der Ratte. Nach generalisierten Anfällen auftretende fokale Krampfaktivität wird in der Dauer der SD1 nicht berücksichtigt, sondern zur SD2 gerechnet. Zu Beginn des Kindling-Prozesses treten in der Regel nur fokale Anfallsaktivitäten auf, an die sich keine postiktale Depression anschließt; SD2 entspricht dann SD1.

Die **Nachentladungsdauer** beschreibt die Zeitspanne, in der nach der Stimulation Spikes im EEG auftreten, welche eine mindestens doppelt so hohe Amplitude wie die der Grundlinie und eine Frequenz von mindestens 1 Hz aufweisen.

Kurzzeitige Unterbrechungen im Spikemuster bis maximal drei Sekunden werden vernachlässigt. Gelegentlich kommt es im Verlauf der Nachentladung zu einer Veränderung des Spikemusters, was im Allgemeinen durch eine verringerte Amplitude gekennzeichnet ist. Die Dauer von der Stimulation bis zum Ende der ersten Spikephase wird dann als Nachentladungsdauer 1 (ADD1) notiert, wohingegen die Nachentladungsdauer 2 (ADD2) zusätzlich die zweite Phase mit dem veränderten Spikemuster umfasst. In der Regel entspricht die ADD1 jedoch der ADD2.

Im Laufe des Kindling-Prozesses wird gelegentlich das Auftreten sekundärer Nachentladungen (secondary afterdischarges) beobachtet. Diese folgen auf die erste Spikeperiode nach einer Ruhephase (von über drei Sekunden) als zweite

Anfallsschwere	Anfallscharakteristika	
Stadium 0	Nachentladungen ohne sichtbare motorische Krampfaktivität (Als Nachentladungen werden die als Folge der elektrischen Stimulation auftretenden Spikes im EEG bezeichnet.)	
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus (Stereotypes Schnüffeln, Zittern der Tasthaare, Schließen eines oder beider Augen)	
Stadium II	Starker Fazialklonus (Kopfnicken, Kaubewegungen)	Fokale Anfallsaktivität
Stadium III	Unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium IV	Aufrichten des Rumpfes und bilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium (IV)	Bilateraler Vorderextremitätenklonus ohne Aufrichten des Rumpfes	
Stadium V	Aufrichten des Rumpfes mit anschließendem Verlust der Stellreflexe, generalisierte tonisch-klonische Krämpfe	Generalisierte Anfallsaktivität
Stadium (V)	Wie Stadium V, aber ohne Verlust der Stellreflexe	

Tabelle 4.7: Rangskala der Anfallsstadien (Racine, 1972), modifiziert von Löscher und Schmidt (1988).

Spikeperiode und beginnen mit einer geringen, im Folgenden aber ansteigenden Amplitude. Lediglich das Auftreten dieser sekundären Nachentladungen wird vermerkt; die Dauer wird nicht gemessen.

Mit der Anzahl der Stimulationen nahmen die Krampfanfälle der Ratten sowohl an Schwere als auch an Dauer zu. Die überschwellige Stimulation bei 330 μA wurde fortgesetzt, bis jedes Tier zehn generalisierte tonisch-klonische Anfälle des Stadiums V gezeigt hatte. Die Tiere wurden dann als „voll gekindelt“ bezeichnet.

Drei Tage nach dem zehnten Stadium V-Anfall wurde analog zur Bestimmung der initialen ADT die „post-kindling“-ADT bestimmt. Außerdem wurde die Schwelle zum Erreichen eines generalisierten Anfalls (GST) des Stadiums IV oder V bestimmt. Um die Stabilität dieser Schwellen zu überprüfen, wurden diese im Abstand von drei bis vier Versuchstagen wiederholt bestimmt. Hierbei begannen die Stimulationen jedoch nicht zwingend bei 15 μA , sondern jeweils drei Stufen unterhalb der zuletzt bestimmten „post-kindling“-ADT. Sobald diese Schwellen für die einzelnen Tiere reproduzierbar waren, (das heißt, an drei aufeinander folgenden Stimulationstagen die gleiche Nachentladungsschwelle (+/- eine Stufe) konnte mit den Untersuchungen zur i.n.-Applikation begonnen werden.

4.1.5.4 VERSUCHSABLAUF

Vor jedem Versuch wurde anhand der Stabilität der „post-Kindling“-ADT festgelegt, welche Tiere am Versuch teilnehmen sollten. Ein Versuch setzte sich aus zwei Versuchstagen im Abstand von zwei bis drei Tagen zusammen, bei der am ersten Tag die i.n.- oder i.v.-Applikation des Vehikels (0,9%ige NaCl-Lösung bzw. HPMC-CBP-Gel) erfolgte und nach 60 oder 120 min die individuelle ADT und GST bestimmt wurde. Am zweiten Versuchstag wurde dann PB appliziert und die Schwellen (ADT und GST) unter den gleichen Bedingungen ermittelt. Die Höhen dieser Schwellen wurden dann als Parameter für die Wirksamkeit von PB verglichen.

Mit den Untersuchungen wurde morgens zwischen 07:00 und 09:00 Uhr begonnen. Die jeweils ausgewählten Ratten wurden in den gleichen Versuchsraum verbracht, der auch für den Kindling-Vorgang genutzt worden war und in dem die gleichen Umgebungsbedingungen wie im Tierstall bestanden. Die Tiere wurden für

die Dauer des Versuchs aus ihren Käfigen genommen und in das „Open field“ gesetzt. Nach Bestimmung des Körpergewichts auf einer Laborwaage („Universal“, Sartorius) wurde den Ratten im Abstand von 15-30 min die Vehikellösung oder PB entsprechend der Beschreibung in Kapitel 4.1.2 i.n. oder i.v. verabreicht.

Um Dosis-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen, wurde PB in den Dosierungen 5,4 mg/kg KGW, 9 mg/kg KGW, 10 mg/kg KGW und 30 mg/kg KGW appliziert. Um Einflüsse durch die pharmazeutische Formulierung der Substanz sowie durch den Ort der Substanzabgabe zu beurteilen, erfolgte die i.n.-Applikation von PB in wässriger Lösung oder Gel-Formulierung entweder im vorderen oder hinteren Nasenbereich (2 cm tief in der Nasenhöhle), einmalig oder fraktioniert (s. Kapitel 4.1.2 und Abbildung 4.1).

60 oder 120 Minuten nach der Applikation wurden ADT und GST der Ratten bestimmt. Zur Bestimmung der ADT wurde drei Stufen à 20% unter der bekannten, individuellen ADT jeder Ratte mit den Stimulationen im Minutentakt begonnen. Die Parameter der so hervorgerufenen Krämpfe wurden parallel erfasst. Zeigten die Tiere bei der ersten aufgetretenen ADT keine generalisierte Anfallsaktivität, wurde die Stimulation fortgeführt, bis die Tiere einen Stadium-IV oder –V Anfall zeigten. Wurde dies durch Stimulation mit einer Stromstärke bis max. 840 μ A nicht erreicht, wurde die Stimulation des jeweiligen Tieres beendet.

Zur Überprüfung der Plasma-Konzentrationen von PB wurden im Anschluss an die postiktale Depressionsphase ca. 0,5 ml Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen, zentrifugiert und analysiert wie in Kapitel 4.1.3.4.1 beschrieben. Die Blutentnahme erfolgte in einem Nachbarraum, um die noch im Versuch befindlichen Ratten nicht zu beeinflussen. Die Dosierungen und weiteren Details des jeweiligen Versuches sind Tabelle 4.8 zu entnehmen.

4.1.5.5 KONTROLLE DER ELEKTRODENLOKALISATION

4.1.5.5.1 Gewinnung des Gehirngewebes

Zur Gewinnung des Gehirngewebes wurden die Ratten unter tiefer Chloralhydrat-Narkose (ca. 500 mg/kg KGW) transkardial perfundiert. Der Perfusionsvorgang und die anschließende Gehirnentnahme fanden auf einer

Werkbank unter einem Abzug statt. Bei der Perfusionsfixierung wird das Gefäßsystem des Körpers zur schnellen Fixierung der Gewebe genutzt. Hierfür wurden die Ratten nach Eintreten der Narkose mittels Kanülen auf eine Korkplatte gespannt, Abdomen, Thorax und Perikard eröffnet und eine Knopfkanüle vom linken Herzventrikel in die Aorta geschoben. Um eine Abflussmöglichkeit für das Blut und die Spül- bzw. Perfusionsflüssigkeit zu schaffen, wurde das rechte Herzhorn aufgeschnitten und damit die rechte Vorkammer eröffnet. Die Kanüle war über einen Schlauch und einen Dreiweghahn an zwei Behälter mit Spül- und Fixierlösung angeschlossen, die in einer Höhe von etwa 1 m über dem Tierkörper an einer Halterung befestigt waren. Durch diese Positionierung konnte ein gleich bleibender Perfusionsdruck erzielt werden, welcher in etwa dem Blutdruck der Tiere entsprach. Vor der eigentlichen Fixierung wurde das Blutgefäßsystem der Ratten mit 0,01 M phosphatgepufferter 0,9%iger Kochsalzlösung (PBS, pH-Wert=7,6) gespült und damit weitestgehend von Blut befreit. Nach etwa zwei Minuten wurde der Dreiweghahn umgeschaltet, um die Fixierlösung in den Körperkreislauf der Ratte zu spülen. Zur Fixierung wurden ca. 250 ml einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung pro Ratte eingesetzt. Diese Fixierlösung wurde am Tag der Perfusion hergestellt, um die Bildung von Kristallen zu vermeiden, welche durch das Verschließen kleinerer Gefäße den Perfusionsvorgang hätten behindern können

Nachdem die gesamte Perfusionslösung durch den Blutkreislauf geflossen war, waren das Gehirn und der restliche Rattenkörper für die histologische Aufarbeitung fixiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Elektrodenaufbaus wurde der Rattenschädel mit Hilfe einer gebogenen Schere und einer Knochenzange unter Schonung des Gehirns eröffnet und dieses daraufhin vorsichtig entnommen. Die fixierten Gehirne wurden anschließend in eine 30%ige Saccharose-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH-Wert=7,6) überführt. In dieser Saccharose-Lösung wurden die Gehirne für mindestens drei Tage bei 5°C belassen, um eine ausreichende Cryoprotektion für das Anfertigen der Gefrierschnitte zu erreichen.

4.1.5.5.2 Anfertigung der Gehirnschnitte und Thioninfärbung

Um den Sitz der implantierten Elektroden nach Probeoperationen zu überprüfen, wurden histologische Schnitte der entsprechenden Gehirnregion angefertigt. Hierzu wurden die perfusionsfixierten Rattengehirne mittels eines Schlittengefrieremikrotoms (Frigomobil Modell 1205) im Bereich der Implantationsstelle geschnitten. Die Schnittdicke betrug 52 µm. Die Gehirnschnitte wurden in 0,1 M Phosphatpuffer aufgefangen und danach in anterior-posteriorer Reihenfolge mit Hilfe flüssiger Gelatine-Chromalaun-Lösung auf entfettete Objektträger aufgezogen. Nach dem Abtrocknen wurde eine Nissl-Färbung durchgeführt (Protokoll s. Anhang). Diese Färbung diente als Übersichtsfärbemethode zur Verifikation des Implantationsortes der Stimulationselektroden. Die Schnitte wurden mit einem Eindeckmedium (Entellan) und Deckgläschen direkt auf den Objektträgern eingedeckt und über Nacht unter dem Abzug trocknen gelassen.

Zur Lokalisationsbestimmung der Stimulationselektroden wurden die einzelnen Schnitte unter einem Mikroskop (Leica, Wetzlar) bei 40- und 100-facher Vergrößerung untersucht. Die Koordinaten der Elektrodenspitze wurden anhand eindeutiger anatomischer Strukturen im Bereich der rechten ventralen Gehirnhälfte unter Zuhilfenahme des neuroanatomischen Atlas von Paxinos und Watson (1998) ermittelt.

4.1.5.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER VERSUCHE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 4.0 durchgeführt. Alle Tests erfolgten zweiseitig mit einer Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$. Alle Parameter wurden als nicht-parametrische Daten mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test für gepaarte Stichproben auf signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe getestet.

Tierzahl	Form der Applikation: IP/IN/IV	Dosierung [mg/kg]	Volumen i.n. [µl/kg]	Volumen i.v. [ml]	Vehikel	Bei i.n.: Applikationsort	Narkose ja/nein	Propofol [ml/kg]	Stimulationszeitpunkt [min] nach Applikation	Blutentnahme ja/nein
9	IN	-	36	-	NaCl (0,9%)	beidseits vorne	nein	-	60	nein
9	IN	9	36	-	NaCl (0,9%)	beidseits vorne	nein	-	60	nein
9	IN	-	36	-	HPMC-CBP-Gel	beidseits vorne	nein	-	60	nein
9	IN	5,4	36	-	HPMC-CBP-Gel	beidseits vorne	nein	-	60	nein
10	IN	-	197	-	HPMC-CBP-Gel	einseitig 2 cm tief	ja	1	60	nein
10	IN	5,4	197	-	HPMC-CBP-Gel	einseitig 2 cm tief	ja	1	60	ja
10	IN	30	197	-	HPMC-CBP-Gel	einseitig 2 cm tief	ja	1	60	ja
10	IN	30	197	-	HPMC-CBP-Gel	einseitig 2 cm tief	ja	1	120	ja
5	IN	30	197	-	HPMC-CBP-Gel	einseitig 2 cm tief	nein	-	120	nein
10	IV	-	-	1	NaCl (0,9%)	-	ja	1	60	nein
11	IV	30	-	1	NaCl (0,9%)	-	ja	1	60	ja
11	IN	-	197	-	HPMC-CBP-Gel	beidseits fraktioniert 2 cm tief	ja	3 fraktioniert	60	nein

Tabelle 4.8: Übersicht über die Untersuchungen im Amygdala-Kindling-Modell.

Tierzahl	Form der Applikation: IP/IN/IV	Dosierung [mg/kg]	Volumen i.n. [µl/kg]	Volumen i.v. [ml]	Vehikel	Bei i.n.: Applikationsort	Narkose ja/nein	Propofol [ml/kg]	Stimulationszeitpunkt [min] nach Applikation	Blutentnahme ja/nein
4	IN	30	197	-	HPMC-CBP-Gel	beidseits fraktioniert 2 cm tief	ja	3 fraktioniert	Versuch wegen starker Atemdepression abgebrochen	nein
10	IN	-	67	-	HPMC-CBP-Gel	beidseits fraktioniert 2 cm tief	ja	1,5 fraktioniert	60	nein
10	IN	10	67	-	HPMC-CBP-Gel	beidseits fraktioniert 2 cm tief	ja	1,5 fraktioniert	60	ja
11	IV	-	-	1	NaCl (0,9%)	-	ja	1,5 fraktioniert	60	nein
11	IV	10	-	1	NaCl (0,9%)	-	ja	1,5 fraktioniert	60	nein
11	IN	-	36	-	HPMC-CBP-Gel	beidseits fraktioniert 2 cm tief	ja	1	60	nein
11	IN	5,4	36	-	HPMC-CBP-Gel	beidseits fraktioniert 2 cm tief	ja	1	60	ja
12	IV	-	-	1	NaCl (0,9%)	-	ja	1	60	nein
11	IV	5,4	-	1	NaCl (0,9%)	-	ja	1	60	ja

Tabelle 4.8: Übersicht über die Untersuchungen im Amygdala-Kindling-Modell

4.2 siRNA-Untersuchungen

4.2.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR EXPRESSIONSREGULATION VON P-GLYCOPROTEIN

4.2.1.1 siRNA-SEQUENZ UND KOPPLUNG MIT FLUOROPHOREN

Die für die Untersuchungen verwendete siRNA wurde kommerziell erworben (IBA). Die Sequenz der gegen die mRNA des humanen ABCB1-Transporters (P-glycoprotein, Gen bank accession number NM_000927) gerichteten siRNA wurde durch Modifikation an die mRNA des ABCB1-Transporters der Ratte angepasst (NCBI accession number NM_012623, Position 2641, persönliche Kommunikation mit Dr. Mark Helm, Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg). Diese ABCB1-spezifische siRNA bestand aus 21 Nucleotiden und wurde vom Hersteller zum Teil mit den Fluoreszenz-Farbstoffen Fluorescein (FL) und Tetramethylrhodamin (TMR) gekoppelt. In den nachstehenden Übersichten (Tabelle 4.9 und Abbildung 4.11) wird aufgezeigt, in welcher Form die siRNAs zum Einsatz gekommen sind. Bei *in vitro*-Untersuchungen einer kooperierenden Gruppe aus Heidelberg zeichnete sich ein Unterschied in der Regulationseffizienz bei unterschiedlich fluoreszenz-markierten siRNAs ab. Es wurden deshalb verschieden markierte und nicht markierte siRNAs eingesetzt, um einen Einfluss der Fluoreszenz-Farbstoffe auf die Regulationseffizienz bezüglich P-gp auch *in vivo* beurteilen zu können.

4.2.1.2 VERPACKUNG DER siRNA IN LIPOSOMEN

4.2.1.2.1 Herstellung der Liposomen

Die Herstellung der Liposomen erfolgte durch Vittorio Ziroli (KTB Tumorforschungsgesellschaft mbH, Arbeitsgruppe Massing, Freiburg). Für einen Verpackungsansatz wurden 18 mg einer Mischung aus MPEG-DSPE (N-(carbonyl-methoxypolyethylenglycol 2000)-1,2 distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), EPC-3 (hydrogenated egg PC) und Cholesterol (Sigma)

<u>RNA 21</u> (sense-Strang)	5´ AAACUGUUGUCUGGUCAAGCCdTdT 3´
<u>RNA 22</u> (antisense-Strang)	5´ GGCUUGACCAGACAACAGUUUdTdT 3´
<u>RNA 24</u>	5´ - TMR - GGCUUGACCAGACAACAGUUUdTdT 3´
<u>RNA 25</u>	5´ AAACUGUUGUCUGGUCAAGCCdTDc – FL - 3´
<u>RNA 23</u>	5´ - FL - AAACUGUUGUCUGGUCAAGCCdTdT 3´
<u>RNA 32</u>	5´ GGCUUGACCAGACAACAGUUUdTdT – TMR - 3´

Tabelle 4.9: Anti-P-gp-siRNA mit unterschiedlicher Kopplung der Fluorophore FL und TMR.

(65/32/3 mol%) in 500 µl Ethanol gelöst und in eine 10 ml Glasphiole verbracht. Das organische Lösungsmittel wurde unter einem konstanten Stickstoffstrom entfernt. Der verbleibende Lipidfilm wurde über Nacht bei Raumtemperatur vakuumgetrocknet. 50 µl einer siRNA-PBS-Lösung wurden hinzu gegeben und die Phiolen verschlossen. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 min, in der die Phospholipide bei Raumtemperatur rehydrieren und quellen konnten. Die Lipid-siRNA-Mischung wurde dann mittels einer dualen asymmetrischen Zentrifuge (DAC 150) sechsmal für 5 min bei 3500 Umdrehungen/min homogenisiert. Um die Phospholipide der entstandenen cremigen Formulierung (Vesikuläres Phospholipid-Gel) zu redispergieren und die Liposomen mit dem Peptid Apo E4 zu versehen, wurden 272 µl Boratpuffer (pH 8,5; 0,15 M Natriumtetraborat; 0,1 M EDTA) sowie 135 µl Peptidlösung (1,8 mg/ml) hinzugefügt und die Glasphiole für 5 min auf einem horizontalen Schwenktisch (Mikrodismembrator) geschwenkt. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nicht eingeschlossene siRNA und ungebundenes Peptid wurden durch Filtrieren der Dispersion über eine Sephadex-haltige Säule abgetrennt. Das Volumen wurde bestimmt und die Mischung auf eine Lipid-Konzentration von 5,6 mmol/ml eingestellt.

Für die Ansätze ohne Peptid wurde genauso verfahren, mit dem Unterschied, dass auf den Redispergierschritt (ohne Peptidzugabe) sofort die Gelfiltration folgte.

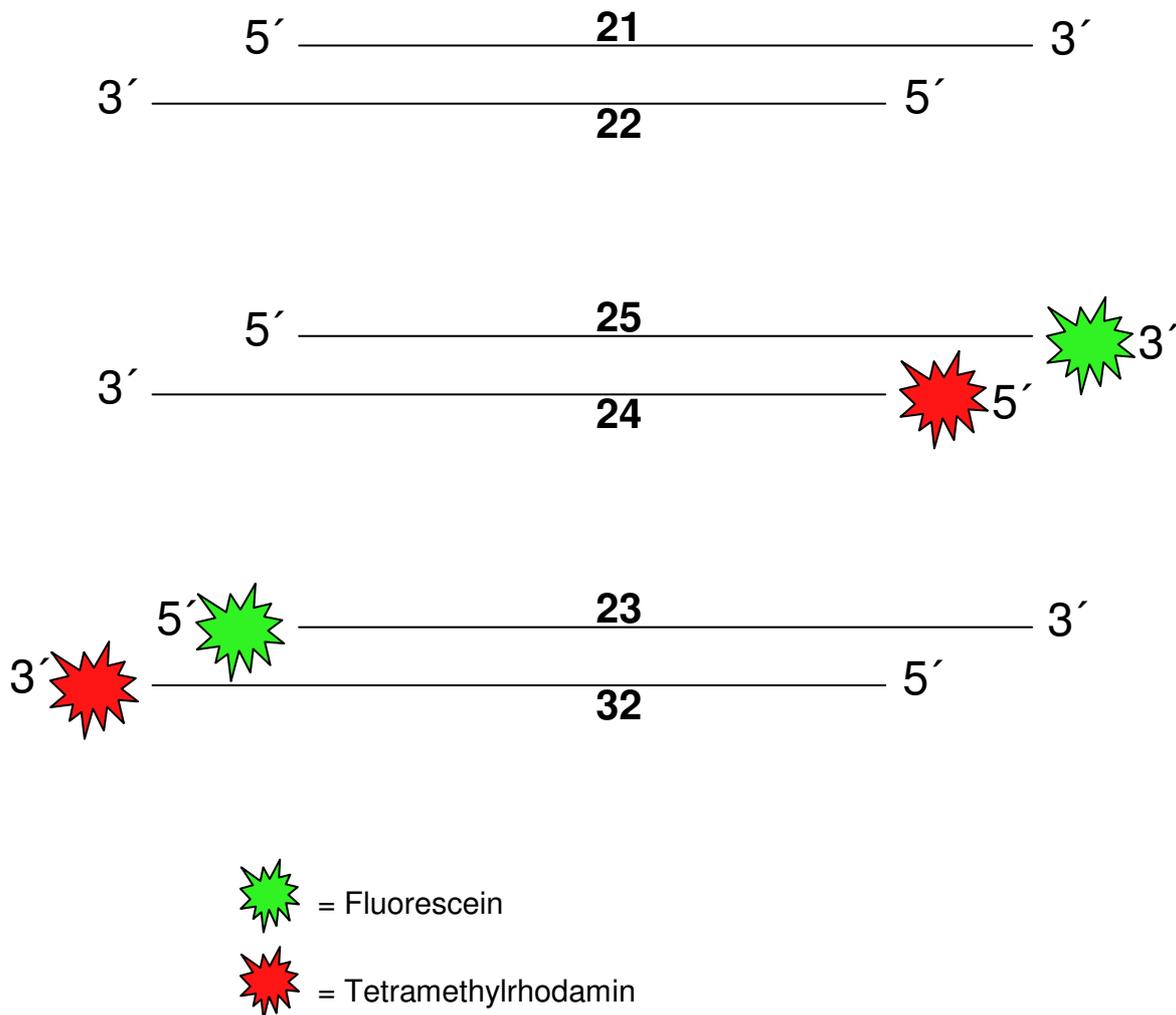


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der eingesetzten siRNAs mit unterschiedlicher Kopplung der Fluorophore.

4.2.1.2.2 Bestimmung der siRNA-Konzentration in den Liposomen

Um die ungefähre Konzentration der in den Liposomen eingeschlossenen siRNA zu bestimmen, wurde die Fluoreszenz-Emission von in PBS verdünnten Liposomen (1:5) mit der Fluoreszenz-Emission von fluoreszenz-markierter siRNA bekannter Konzentration bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm verglichen. Die Konzentration der in Liposomen eingeschlossenen siRNA wurde im Vergleich zu diesen Messungen auf ungefähr 2 μM geschätzt.

4.2.1.3 VERSUCHSTIERE

Für die Versuche zur Expressionsregulation von P-gp nach siRNA-Applikation wurden weibliche Ratten (Wistar Unilever) eingesetzt. Bei ihrer Ankunft hatten die Tiere ein Körpergewicht von 200-220 g. Bis zum Versuch wurden die Ratten in Makrolonkäfigen (Typ IV) in Gruppen von 5-7 Tieren untergebracht. Die weiteren Haltungsbedingungen sind in Kapitel 4.1.3.1 beschrieben. Nach ihrer Ankunft wurden die Tiere mehrfach gehandelt (Fixierung, Wiegen), um die Versuchsdurchführung möglichst stressarm für sie zu gestalten.

4.2.1.4 VERSUCHSABLAUF

4.2.1.4.1 Gruppen und Dosierungen

In einem ersten Versuchsdurchgang wurden die Ratten in drei Gruppen zu drei und vier Tieren aufgeteilt (Tabelle 4.10). Die Ratten der Gruppe 1 (n=3) wurden mit 37 ng siRNA pro Ratte in 1 ml Applikationsvolumen pro Ratte behandelt. Die siRNA war nicht fluoreszenz-markiert und in Liposomen verpackt, die auf der Oberfläche das Peptid ApoE4 gekoppelt hatten. Die Applikation erfolgte als i.v.-Bolusinjektion. Dazu wurde auf die in Kapitel 4.1.2.2 beschriebene Weise ein Venenkatheter in eine Schwanzvene eingeführt. Gespült wurde in diesem Fall mit DEPC-behandeltem und autoklaviertem PBS. Gruppe 2 (n=4) erhielt markierte siRNA, die in Liposomen mit einem Nonsens-Peptid auf der Oberfläche in gleicher Dosierung verabreicht wurde. Gruppe 3 (n=3) erhielt nur DEPC-behandeltes, autoklaviertes PBS. Die Ratten wurden 24 h nach der Applikation dekapitiert.

Für den zweiten Versuchsdurchgang wurden die Ratten in vier Gruppen (Gruppen 4-7) zu je sechs bis acht Tieren aufgeteilt (Tabelle 4.10). Gruppe 4 erhielt eine i.v.-Bolusinjektion von 15 µg fluoreszenz-markierter und in Liposomen verpackter siRNA. An die Oberfläche der Liposomen war das Peptid ApoE4 gebunden. Die Tiere der Gruppe 5 wurden mit der gleichen siRNA behandelt, mit dem Unterschied, dass die Fluoreszenzfarbstoffe an den entgegen gesetzten Enden gebunden waren (s. Abbildung 4.11). An Gruppe 6 wurde nicht fluoreszenz-markierte siRNA (15 µg pro Ratte), in Liposomen, an deren Oberfläche das Peptid

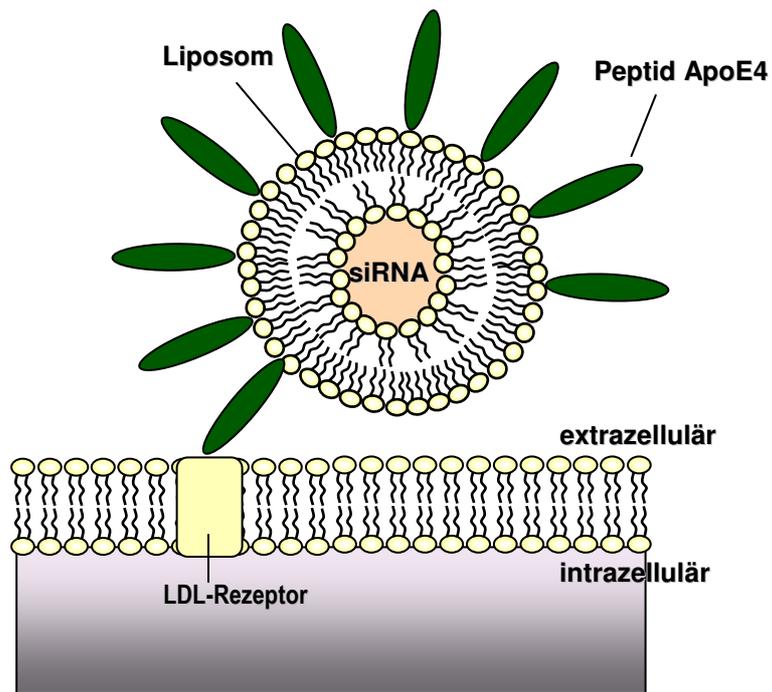


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Bindung von „siRNA-geladenen“ Liposomen über das Peptid ApoE4 an LDL-Rezeptoren, die auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert werden.

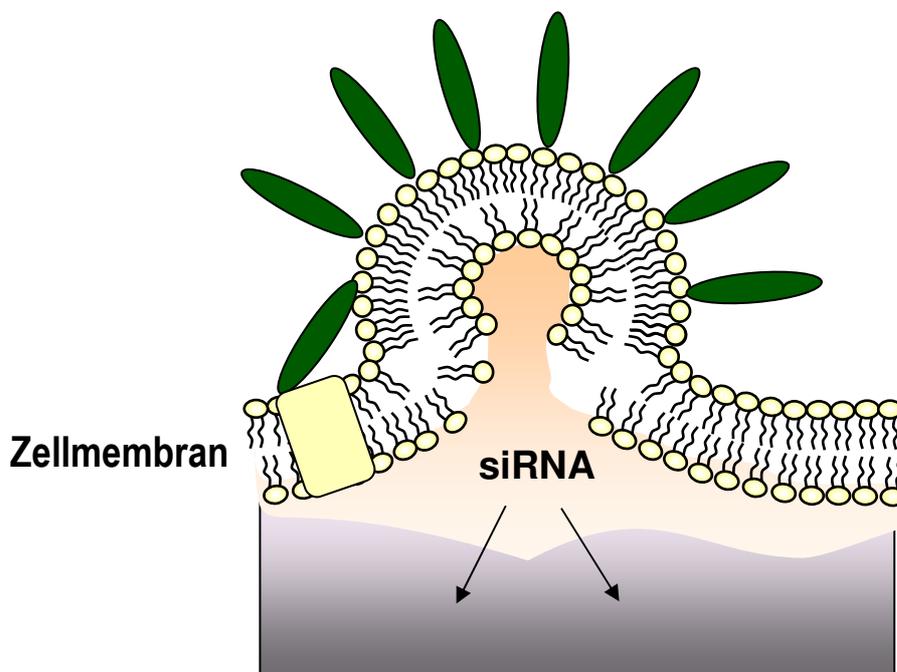


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung der siRNA-Freisetzung aus einem Liposom durch LDL-Rezeptor-vermittelte Endocytose. Die Beteiligung von Heparan-Sulfat-Proteoglykanen an der Endocytose-Vermittlung wird ebenfalls diskutiert (Sauer et al., 2005; Winkler et al., 1999).

ApoE4 gebunden war, verabreicht. Gruppe 7 schließlich diente als Vergleichsgruppe und erhielt 1 ml Liposomen ohne siRNA (Leerliposomen) pro Ratte. Die Ratten aller Gruppen wurden 24 h nach Applikation dekapitiert.

4.2.1.4.2 Gewinnung des Gehirngewebes

Die Gehirne wurden wie in Kapitel 4.1.4.2 beschrieben vorsichtig entnommen, in einen mit Einbettmedium (Tissue Freezing Medium) gefüllten Zylinder aus Aluminiumfolie verbracht und vollständig mit Einbettmedium bedeckt. Zum Tiefgefrieren wurde der Aluminiumzylinder für einige Minuten in mittels flüssigem Stickstoff auf ca. -80 °C gekühltes 2-Methyl-butan gestellt. Das eingefrorene Gewebe wurde dann bis zur Weiterverarbeitung mit dem Cryostaten bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.1.4.3 Anfertigung der Cryostatschnitte

Ein Cryostat (HM560M) diente zur Erstellung von 14 µm dicken coronalen Gehirnschnitten. Geschnitten wurde bei einer Objekttemperatur von -20 °C und einer Messertemperatur von -22 °C. Die angefertigten Gehirnschnitte wurden auf Objektträger (Histobond) aufgezogen. Die aufgezogenen Schnitte wurden sofort eingefroren. Alle Schnitte wurden dann bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80 °C gelagert.

4.2.1.5 QUANTIFIZIERUNG DER P-GLYCOPROTEIN EXPRESSION

4.2.1.5.1 Immunhistochemischer Nachweis von P-Glycoprotein im Rattengehirn

Der Expressionsnachweis von P-gp in den 14 µm dicken Cryostatschnitten erfolgte mittels des monoklonalen Maus-Antikörpers C219 (1:100), der gegen humanes P-gp gerichtet ist. Der Antikörper erkennt auch Epitope von Expressionsprodukten der Gene *mdr1a* und *mdr1b* der Ratte (Zhang et al., 1999). Dabei wurde auf ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll zum Nachweis von P-gp zurückgegriffen (Volk et al., 2005). Schnitte der Ebenen – 2,3 und – 3,8 mm relativ zu Bregma (Paxinos & Watson, 1998) wurden immunhistochemisch gefärbt.

Gruppe	Tierzahl	Dosierung pro Ratte	Applikationsvolumen [ml]	Peptid: Apo E4/ Nonsense	Fluoreszenzfarbstoffkopplung	Dekapitationszeitpunkt [h]
Gruppe 1	n = 3	37ng	1	Apo E4	23/32	24
Gruppe 2	n = 4	37ng	1	Nonsense	23/32	24
Gruppe 3	n = 3	PBS	1	-	-	24
Gruppe 4	n = 8	15 µg	1	Apo E4	24/25	24
Gruppe 5	n = 6	15 µg	1	Apo E4	23/32	24
Gruppe 6	n = 8	15 µg	1	Apo E4	keine	24
Gruppe 7	n = 8	Leerliposomen	1	Apo E4	-	24

Tabelle 4.10 : Versuchsprotokoll der siRNA-Applikation an die verschiedenen Gruppen.

Um methodisch bedingte Abweichungen in der Färbeintensität möglichst gering zu halten, wurden die Gehirnschnitte einer Schnittebene der immunhistochemischen Färbung zeitgleich und mit denselben Lösungen unterzogen. Dadurch konnten die Färbungsintensitäten innerhalb einer Schnittebene später verglichen werden. Zunächst wurden die Schnitte für 5 min in 0,05 M Tris-gepufferter Natriumchloridlösung gewaschen (TBS; pH 7,6). Um die einzelnen Gehirnstrukturen zu konservieren, erfolgte dann eine 10 minütige Fixierung der Schnitte in frisch angesetzter 4%iger Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte anschließend für 2 min in einem Essigsäure:Ethanol-Gemisch (33%:66%) bei -20°C inkubiert und dann bei Raumtemperatur drei mal 5 min lang in TBS gewaschen. Um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu hemmen, wurden die Schnitte für 30 min einer 0,5%igen H₂O₂-Lösung ausgesetzt, wiederum drei mal in TBS gespült und dann mittels „Cover Plates“ in eine Immunhistoapparatur (Shandon Sequenza) eingespannt. Die eingespannten Schnitte

wurden mit TBS und für 60 min in einer Blocklösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation im primären Antiserum (Antikörper C219 1:100 in Carrier solution) wurde über Nacht für etwa 12 Stunden bei 4 °C durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach TBS-Spülung für 90 min in Biotin-gekoppeltem sekundärem Antiserum inkubiert (Esel-anti-Maus, präadsorbiert gegen Ratte, 1:500 in Carrier solution). Ungebundener sekundärer Antikörper wurde durch mehrmaliges Spülen mit TBS entfernt. Abschließend wurden die Schnitte zur Verstärkung der Farbreaktion für 90 min mit einem Streptavidin-Meerettich-Peroxidase-Komplex (Streptavidin-HRP, 1:375 in TBS) behandelt. Durch erneutes Spülen mit TBS konnte überschüssige Streptavidin-HRP beseitigt werden. Die Schnitte wurden für den eigentlichen Färbeschritt vorsichtig aus den „Cover Plates“ entnommen, in eine Gondel verbracht und in einer Glas-Küvette noch mal mit TBS gespült.

Für die Sichtbarmachung der Antikörper-Konjugate mit einer Nickel-verstärkten 3,3'-Diaminobenzidin-Reaktion wurden die Schnitte für 15 min in eine Diaminobenzidin-Reaktionslösung gebracht. Nach exakt 15 min wurde die Reaktion durch Spülen mit TBS gestoppt. Nach Spülen in *Aqua bidest.* konnten die Schnitte über Nacht an der Luft trocknen. Am nächsten Tag wurden sie mit dem Eindeckmedium (Entellan) eingedeckt.

Zur Kontrolle wurden immer Negativkontrollen mitgeführt, bei denen der primäre Antikörper weggelassen wurde. Die Protokolle zur Herstellung der Lösungen für die Immunhistochemie sind im Anhang aufgeführt.

4.2.1.5.2 Messung der Fläche und der optischen Dichte

Die Auswertungen der immunhistologischen Präparate wurden verblindet durchgeführt. Die Schnittebenen, die für die Auswertung der Gehirnregionen herangezogen wurden, wurden nach Paxinos und Watson (1998) definiert.

Für die quantitative Erfassung der P-gp-Expression wurde im Rahmen einer früheren Ph.D.-Arbeit in der Arbeitsgruppe ein computer-gestütztes Auswertesystem etabliert (Volk et al., 2005). Dieses computer-gestützte Bildanalyseesystem wurde in

den vorliegenden Untersuchungen für die Analyse der immunhistologisch-markierten Fläche und der optischen Dichte (OD) verwendet. Es setzte sich aus einem Mikroskop mit einer Plan-Neofluar Linse (Axioskop), einer digitalen Farbkamera (CCD, Axiocam) und einem Computer mit einem Pentium III-Rechenprozessor zusammen. Die Gehirnschnitte wurden bei einer 400fachen Vergrößerung ausgewertet. Die eingelesenen Bilder wurden mit einer Auflösung von 1300 x 1030 Pixel eingelesen und mit der Bildanalysesoftware KS400 (Windows Release 3.0) ausgewertet.

Die Kalibration der Längenmessung wurde mit einem geeichten Mikrometer durchgeführt. Im Gegensatz zu dem von Rieux et al. (2002) beschriebenen System, in dem Grauwerte erfasst und in OD umgerechnet wurden, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen die OD direkt gemessen. Dies wurde ermöglicht durch eine Kalibration des Systems mit einem OD-Standard (Calibration of Step Tablet No. 507ST101). Die Beleuchtungsstärke des Mikroskops konnte mittels des OD-Standards überprüft und dadurch konstant gehalten werden. Die eingelesenen Bilder wurden auf optische Distorsion korrigiert („Shading correction“), um Helligkeitsungleichheiten bei den Aufnahmen auszugleichen. Hierzu wurde ein Bild des freien Bereiches des Objektträgers (Hellfeld-Hintergrund) eingelesen und (die gemessene Färbung als Hintergrundfärbung) von den für die Messung eingelesenen Bildern abgezogen.

Zur klaren Unterscheidung des positiven P-gp-Signals vom Hintergrundsignal musste ein Schwellenwert für die Messung definiert werden, um zu vermeiden, dass lokale Hintergrundsignalabweichungen als positives P-gp-Signal gewertet wurden. Bildanalyseysteme mit fester Schwelle zeigten, dass sie objektiv sind und die Ermittlung vergleichbarer Ergebnisse ermöglichen, wenn das Hintergrundsignal nicht stärker als $\pm 3\%$ variiert (Rieux et al., 2002). Die Schwelle wurde im Bereich der zu messenden Region an drei Schnitten von durchschnittlicher Färbungsintensität und von verschiedenen Tieren derart festgelegt (Rieux et al., 2002), dass sie eindeutig über dem Hintergrundsignal lag.

Die Schwelle wurde für jede Messreihe einer bestimmten Region neu bestimmt und während der Messungen aller Schnitte für diese Region konstant beibehalten.

Gehirnregion		Anzahl der gemessenen Felder
Hippocampus	Gyrus dentatus	10
	Hilus	3
	Cornu ammonis 1	5
	Cornu ammonis 3	5
Cortex	Cortex	10
	Piriformer Cortex	10

Tabelle 4.11: Gehirnregionen und jeweilige Felderanzahl zur computer-basierenden Messung der OD nach immunhistochemischer Färbung der Cryostatschnitte

Nur Pixel mit einer optischen Dichte über dem jeweils festgesetzten Schwellenwert wurden in die Auswertung miteinbezogen. Zur Hintergrundkorrektur der OD Messung wurde der Bereich als Hintergrund definiert, der unterhalb des Schwellenwertes lag. Die mittlere OD des Hintergrundsignals wurde dann von der mittleren OD des P-gp-positiven Signals abgezogen, um eine Hintergrund korrigierte OD des P-gp-positiven Signals zu erlangen.

Die P-gp-Expression wurde bei jeder zu messenden Gehirnregion unilateral (rechts) erfasst. In jeder Region wurden mehrere 43,434 μm^2 große Messfelder gemessen. Je nach Größe der Region waren dies drei bis zehn Messfelder (siehe Tabelle 4.11). Die OD der Gehirnregionen wurde jeweils in den Schnittebenen -2,3 mm und -3,8 mm relativ zu Bregma gemessen. Die gemessene Fläche des positiven P-gp-Signals wurde relativ zur Gesamtgröße des Messfeldes angegeben.

4.2.1.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle Berechnungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4 für Windows durchgeführt. Im Allgemeinen werden die Daten als Mittelwert \pm SEM angegeben. Anhand der Tests von Kolmogorov-Smirnov oder D'Agostino und Pearson wurde geprüft, ob sich die Daten entsprechend einer Gaussschen Normalverteilung verhalten. Im Falle einer Normalverteilung wurde eine one-way-ANOVA durchgeführt. Für den Vergleich der siRNA-behandelten Gruppen mit der

Vergleichsgruppe (Leer-Liposomen) wurde als *post hoc*-Test der Dunnetts-Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Die statistischen Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

4.2.2 UNTERSUCHUNG DER VERTEILUNG UND INTEGRITÄT DER siRNA

4.2.2.1 VERSUCHSTIERE

Für die Versuche zur Verteilung und Integrität der siRNA nach i.v.-Applikation wurden weibliche Wistar-Ratten (Wistar Unilever) eingesetzt. Bei ihrer Ankunft hatten die Tiere ein Körpergewicht von 200-220 g. Bis zum Versuch wurden die Ratten in Makrolonkäfigen (Typ IV) in Gruppen von 5-7 Tieren untergebracht. Die weiteren Haltungsbedingungen sind in Kap. 4.1.3.1 beschrieben. Nach ihrer Ankunft wurden die Tiere mehrfach gehandelt (Fixierung, Wiegen), um die Versuchsdurchführung möglichst stressarm für sie zu gestalten.

4.2.2.2 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

4.2.2.2.1 Intravenöse Applikation der siRNA

Den Ratten wurde die siRNA für die Untersuchungen zur Verteilung intravenös appliziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation wurden die Tiere perfundiert (Tabelle 4.12). Für die siRNA-Applikation wurden die Tiere durch eine Hilfsperson fixiert. Der Rattenschwanz wurde vor dem Applikationsvorgang für etwa 30 sek in warmes (ca. 42 °C) Leitungswasser gehalten, um eine lokale Gefäßweitung zu erzeugen. Nach Abtrocknen des Schwanzes wurde eine der Schwanzvenen durch die Hilfsperson mit dem Daumen gestaut und ein Venenkatheter eingeführt. Durch vorsichtiges Spülen mit DEPC-behandeltem, autoklavierten PBS. wurde der korrekte Sitz des Katheters überprüft. Dann erfolgte die Bolusinjektion der Liposomen mit siRNA bzw. der Leerliposomen.

Gruppe	Tierzahl	Perfusionszeitpunkt [h]	Apo E4/ Nons.- Peptid	Dosierung pro Ratte	Applikationsvolumen [ml]	Applikationsform
Gruppe 1	n = 1	4	Apo E4	37 ng	1	i.v.
	n = 1	10				
	n = 1	24				
Gruppe 2	n = 2	2	Apo E4	1,8 µg	1	i.v.
	n = 2	4				
	n = 1	10				
	n = 2	24				
Gruppe 3	n = 2	2	Nonsens- Peptid	1,8 µg	1	i.v.
	n = 2	4				
	n = 1	10				
	n = 2	24				
Gruppe 4	n = 2	2	nackte siRNA (ohne Liposomen)	1,8 µg	1	i.v.
	n = 2	4				
	n = 2	10				
	n = 2	24				
	n = 1	24		PBS		

Tabelle 4.12: Übersicht über die Versuche zur Verteilung der siRNA.

4.2.2.2.2 Perfusion und Organgewinnung

Die Perfusion der Ratten wurde wie in Kapitel 4.1.5.5.1 beschrieben durchgeführt. Gehirn, Leber und Milz jeder Ratte wurden vorsichtig entnommen, in einen mit Einbettmedium (Tissue Freezing Medium) gefüllten Zylinder aus Aluminiumfolie verbracht und vollständig mit Einbettmedium bedeckt. Zum Tiefgefrieren wurde der Aluminiumzylinder für einige Minuten in ca. -80°C kaltes 2-Methyl-butan gestellt, welches durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff bei dieser Temperatur gehalten wurde. Das eingefrorene Gewebe wurde dann bis zur Weiterverarbeitung mit dem Cryostaten bei -80°C aufbewahrt.

4.2.2.2.3 Cryostatschnitte

Die Cryostatschnitte wurden angefertigt, wie in Kapitel 4.2.1.4.3 erläutert. Die Schnittdicke für die Fluoreszenzmikroskopie betrug 20 µm. Für die FRET-Analyse im Laser-Scanning-Mikroskop wurden 5 µm und 20 µm dicke Schnitte der Schnittebenen +1,8 mm, +0,8, mm, -1,3 mm, -2,3 mm und -3,8 mm relativ zu Bregma angefertigt.

4.2.2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die angefertigten Cryostatschnitte wurden zunächst in einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) bei 400facher Vergrößerung und Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm auf das Vorhandensein von Fluoreszenz untersucht.

4.2.2.2.5 FRET-Effekt

Für die vorliegenden Untersuchungen sollte die Überprüfung des FRET-Effektes zur Beurteilung der siRNA-Integrität herangezogen werden. Als Donor-Fluorophor diente Fluorescein (FL) mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsspektrum von 510-540 nm. FL emittiert demzufolge grün. Der Akzeptor-Fluorophor Tetramethylrhodamin (TMR) kann mit einer Wellenlänge von 510-540 nm angeregt werden und emittiert rot bei 570-600 nm (siehe Abbildung 2.8). Für unsere Untersuchungen galt, dass FRET stattfindet, solange die siRNA-Stränge ausreichend nah beieinander liegen, die siRNA also intakt war.

4.2.2.2.6 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die Untersuchungen zur siRNA-Integrität mittels FRET-Effekt wurden an einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica) durchgeführt. Angeregt wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm. Die Emissionen wurden zeitgleich mit einem Filter für FL (grüner Kanal) und einem zweiten Filter für TMR (roter Kanal) abgegriffen. Fluoreszenz in dem grünen Kanal stammte demzufolge von FL, während Fluoreszenz auf dem roten Kanal auf TMR zurückzuführen war, das mittels FRET angeregt worden war (siehe Abbildung 2.8).

4.2.2.2.7 Auswertung

Die Auswertung der Organschnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop sowie die FRET-Analyse mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop erfolgten rein visuell.

5 ERGEBNISSE

5.1 Intrasale Applikation

5.1.1 MIKRODIALYSE

Die Dialysat-Konzentration in ng/ml wurden nach der in Kapitel 4.1.3.5 genannten Formel aus der AUC des spezifischen Peaks mit der gleichen Retentionszeit wie die Positivkontrolle berechnet. Dabei wurden nur Messwerte mit einer AUC > 3000 $\mu\text{V}/\text{min}$ in Konzentrationen umgerechnet. Messungen mit einer AUC < 3000 $\mu\text{V}/\text{min}$ wurden als Null-Wert (0,00 ng/ml) eingestuft. Nach der Quantifizierung erfolgte eine Korrektur der Konzentrationen mittels des Korrekturfaktors ($100/\textit{in vitro recovery} [\%]$). Dadurch wurde die individuelle Wiederfindungsrate der verwendeten Mikrodialysesonden berücksichtigt.

5.1.1.1 CARBAMAZEPIN

5.1.1.1.1 I.n.-Applikation von CBZ (0,2 mg/kg KGW) im HPMC-CBP-Gel

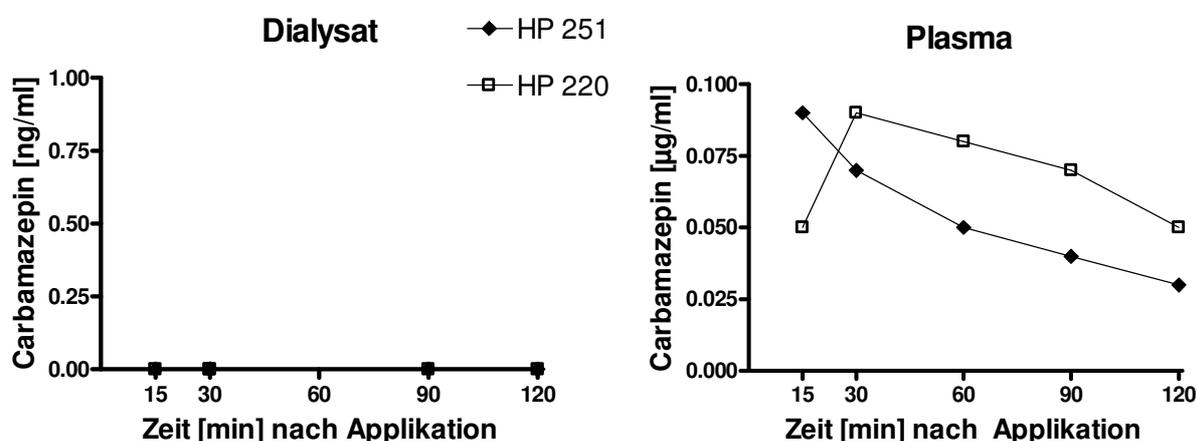


Abbildung 5.1: CBZ-Konzentration im Dialysat und Plasma nach i.n.-Applikation von 0,2 mg/kg KGW CBZ. Dargestellt sind Einzelwerte von zwei Tieren.

Um viel versprechende Ergebnisse einer Veröffentlichung zur i.n.-Applikation von CBZ zu reproduzieren (Barakat et al., 2006), wurden in einem Vorversuch Mikrodialyse-Untersuchungen durchgeführt. Für die Durchführung wurden die in der

Veröffentlichung angegebene mukoadhäsive Formulierung (HPMC-CBP-Gel) und Dosierung von CBZ eingesetzt. Im Dialysat des rechten frontalen Cortex der beiden Ratten konnte mittels HPLC-Messung kein CBZ nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.1). Im Plasma waren CBZ-Konzentrationen von bis zu 0,09 µg/ml zu detektieren. Aufgrund der wenig Erfolg versprechenden Ergebnisse wurde die Anzahl der Tiere in diesem Vorversuch nicht erhöht.

5.1.1.2 LAMOTRIGIN

5.1.1.2.1 i.n.-Applikation von LTG (4 mg/kg KGW)

Im Folgenden sind Ergebnisse der Mikrodialyse-Untersuchungen nach i.n.-Applikation von 4 mg/kg KGW LTG in einer Cremophor-EL-*Aqua bidest.*-Lösung (*Aqua bidest.*-Lösung) sowie einer 10%igen Cremophor-EL-Gel-Emulsion (Gel-Emulsion) aufgeführt. Diese Vorversuche wurden an jeweils zwei Ratten durchgeführt. Anhand der Ergebnisse sollte entschieden werden, welche der beiden Formulierungen geeigneter für die weiterführenden Untersuchungen zur i.n.-Applikation von LTG sein würde.

Die Dialysat-Konzentrationen nach i.n.-Applikation in *Aqua bidest.*-Lösung erreichten mittlere Werte von 16,10 ng/ml (15 min nach Applikation) bis 131,72 ng/ml (120 min nach Applikation). Bei i.n.-Applikation in Gel-Emulsion wurden eine minimale mittlere Konzentration von 87,68 ng/ml (30 min nach Applikation) und eine maximale mittlere Konzentration von 217,83 ng/ml (120 min nach Applikation) gemessen. Dabei stieg die LTG-Konzentration bis 60 min nach Applikation für beide Formulierungen kontinuierlich an und nahm dann nur noch wenig zu.

Die mittleren Plasma-Konzentrationen lagen bei i.n.-Applikation in *Aqua bidest.*-Lösung zwischen 6,0 µg/ml (15 min nach Applikation) und 1,6 µg/ml (120 min nach Applikation). Im Zeitraum 15 bis 30 min nach Applikation fiel die mittlere LTG-Konzentration von 6,0 µg/ml auf 2,14 µg/ml ab. Bei i.n.-Applikation in Gel-Emulsion wurde die höchste mittlere Konzentration mit 2,8 µg/ml 15 min nach Applikation gemessen. Der niedrigste mittlere Wert lag bei 1,9 µg/ml und wurde 120 min nach Applikation bestimmt.

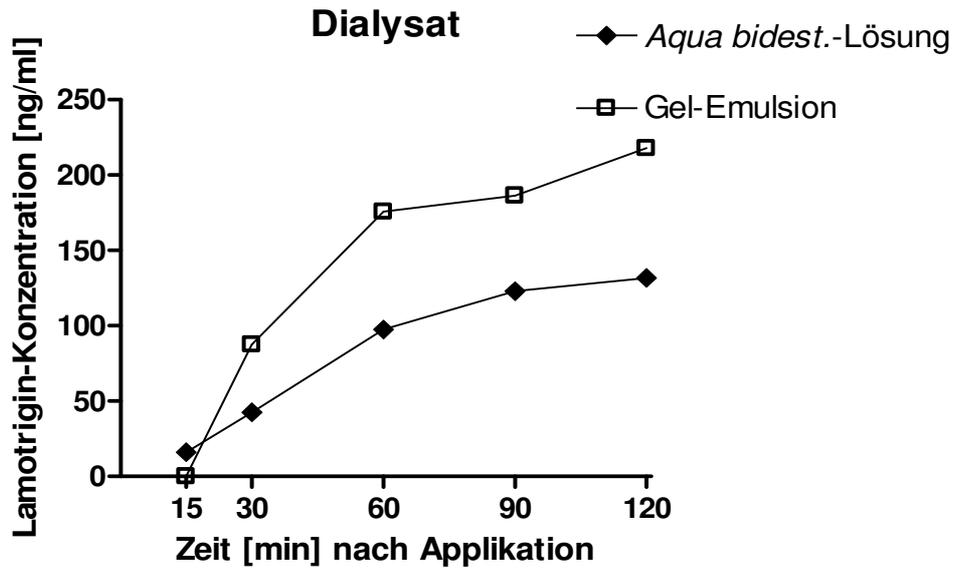


Abbildung 5.2: LTG-Konzentration im Dialysat des rechten frontalen Cortex in ng/ml nach i.n.-Applikation von 4 mg/kg KGW LTG. „Aqua bidest.-Lösung“ bezeichnet die LTG-Applikation in Cremophor-EL-Aqua bidest.-Lösung, „Gel-Emulsion“ die Applikation in Cremophor-EL-Gel-Emulsion. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von jeweils zwei Ratten.

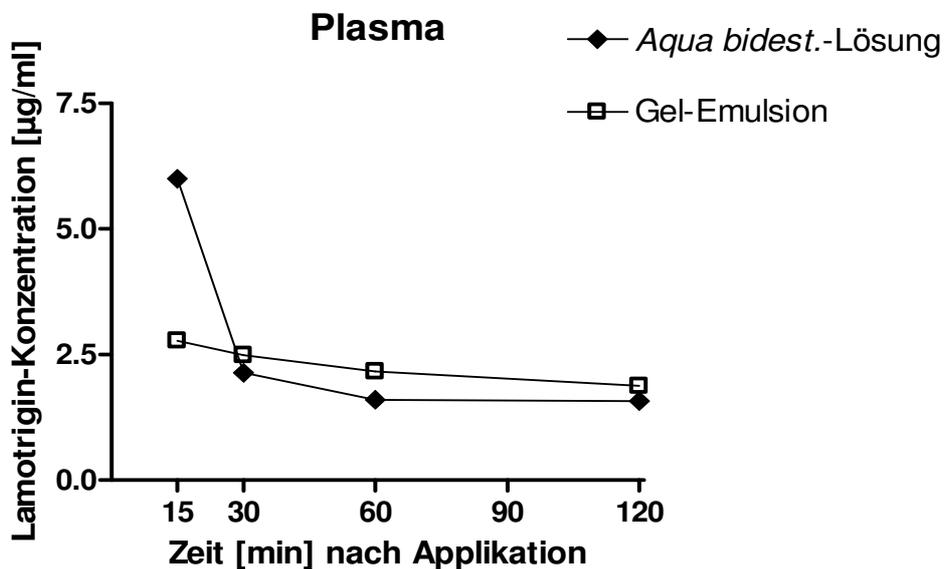


Abbildung 5.3: LTG-Konzentration im Plasma in µg/ml. LTG wurde in einer Dosis von 4 mg/kg KGW i.n. verabreicht. „Aqua bidest.-Lösung“ bezeichnet die LTG-Applikation in Cremophor-EL-Aqua bidest.-Lösung, „Gel-Emulsion“ die Applikation in Cremophor-EL-Gel-Emulsion. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von jeweils zwei Ratten.

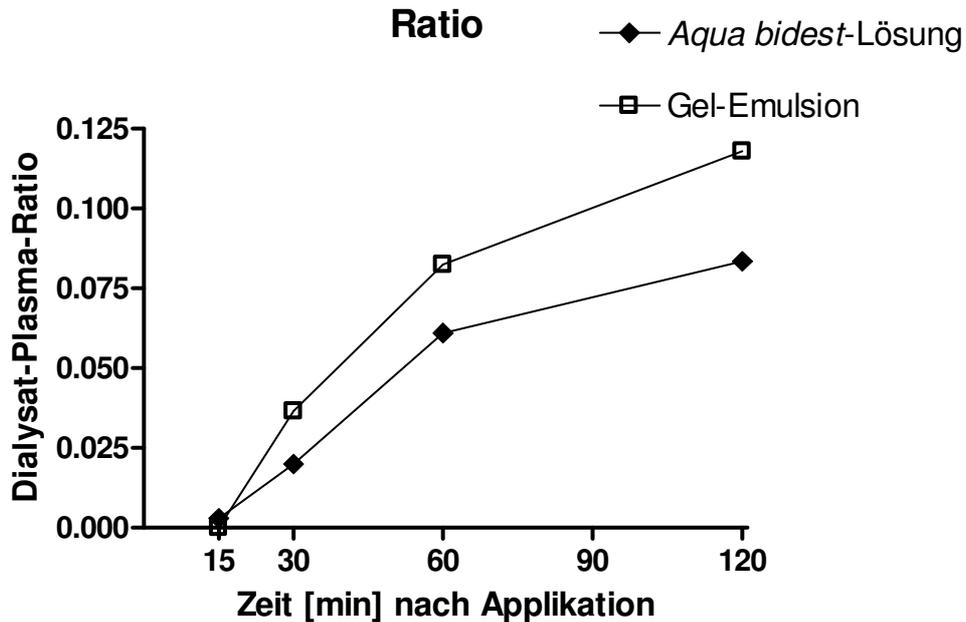


Abbildung 5.4: Verhältnis von Dialysat- zu Plasma-Konzentration (Dialysat-Plasma-Ratio) nach i.n.-Applikation von 4 mg/kg LTG. „Aqua bidest-Lösung“ bezeichnet die LTG-Applikation in Cremophor-EL-Aqua bidest.-Lösung, „Gel-Emulsion“ die Applikation in Cremophor-EL-Gel-Emulsion. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von jeweils zwei Ratten.

Die Werte der Dialysat-Plasma-Ratio lagen für die i.n.-Applikation in Aqua bidest.-Lösung zwischen 0,003 (15 min) und 0,083 (120 min) und bei der i.n.-Applikation in Gel-Emulsion zwischen < 0,001 (15 min) und 0,118 (120 min).

Diese Ergebnisse gaben den Hinweis darauf, dass eine i.n.-Applikation von LTG in Gel-Emulsion im Vergleich zur Aqua bidest-Lösung abgesehen vom Zeitpunkt 15 min nach Applikation zu höheren mittleren LTG-Konzentrationen sowohl im Dialysat als auch im Plasma führte. Betrachtet man die gemessenen Dialysat-Konzentrationen im Verhältnis zu den Plasma-Konzentrationen (Dialysat-Plasma-Ratio), ergaben sich mit Ausnahme des Zeitpunktes 15 min nach Applikation für den gesamten Zeitverlauf Hinweise auf eine höhere mittlere Ratio für die i.n.-Applikation in der Gel-Emulsion. Die höchste mittlere LTG-Konzentration im Dialysat (217,83 ng/ml) sowie der höchste Wert für die Ratio (0,083) ergeben sich zum Zeitpunkt 120 min nach Applikation. Die Daten dieser Vorversuche wurden nicht statistisch ausgewertet, da nur jeweils zwei Tiere untersucht wurden. Die Ergebnisse

dienten vielmehr als Entscheidungshilfe zum weiteren Einsatz einer der beiden LTG-Formulierungen in den fortführenden Untersuchungen. Die i.n.-Applikation von LTG in den weiteren Mikrodialyse-Untersuchungen erfolgte in Form der Gel-Emulsion.

5.1.1.2.2 I.n.- und i.v.-Applikation von LTG (4 mg/kg KGW)

Im Folgenden sind die nach i.n.- und i.v.-Applikation von 4 mg/kg KGW LTG erreichten Konzentrationen im rechten frontalen Cortex und Plasma sowie die Dialysat-Plasma-Ratios dargestellt. Die Mikrodialyse-Untersuchungen wurden an jeweils vier Ratten durchgeführt.

Die Dialysat-Konzentrationen nach i.n.-Applikation nahmen von 15 bis 120 min nach Applikation durchgehend zu. Die maximal erreichte Konzentration lag bei $194,10 \pm 28,10$ ng/ml. Im Zeitraum 120 min bis 150 min nach Applikation fiel die LTG-Konzentration im Dialysat ab; danach stieg sie von 180 min bis 240 min nach Applikation wieder leicht an.

Nach i.v.-Applikation zeigte sich ein Konzentrations-Anstieg bis 90 min nach Applikation. Zu diesem Zeitpunkt wurden $228,06 \pm 29,28$ ng/ml im Dialysat gemessen. Dann nahm die Konzentration ab und zum Ende der Untersuchung (180-240 min nach Applikation) wieder leicht zu.

Die höchsten Plasma-Konzentrationen wurden sowohl nach i.n.- als auch nach i.v.-Applikation 15 min nach Applikation erreicht ($3,12 \pm 0,56$ µg/ml bzw. $2,49 \pm 0,13$ µg/ml). Danach war ein langsamer Konzentrations-Abfall zu vermerken. Insgesamt zeigt sich ein weitgehend paralleler Kurvenverlauf nach i.n.- und i.v.-Applikation.

Der Wert der Dialysat-Plasma-Ratio nach i.n.-Applikation war 15 min nach Applikation mit $< 0,001$ am niedrigsten und 120 min nach Applikation mit $0,107 \pm 0,016$ am höchsten. Nach i.v.-Applikation erreichte die Dialysat-Plasma-Ratio Werte zwischen $0,028 \pm 0,010$ (15 min nach Applikation) und $0,130$ (240 min nach Applikation).

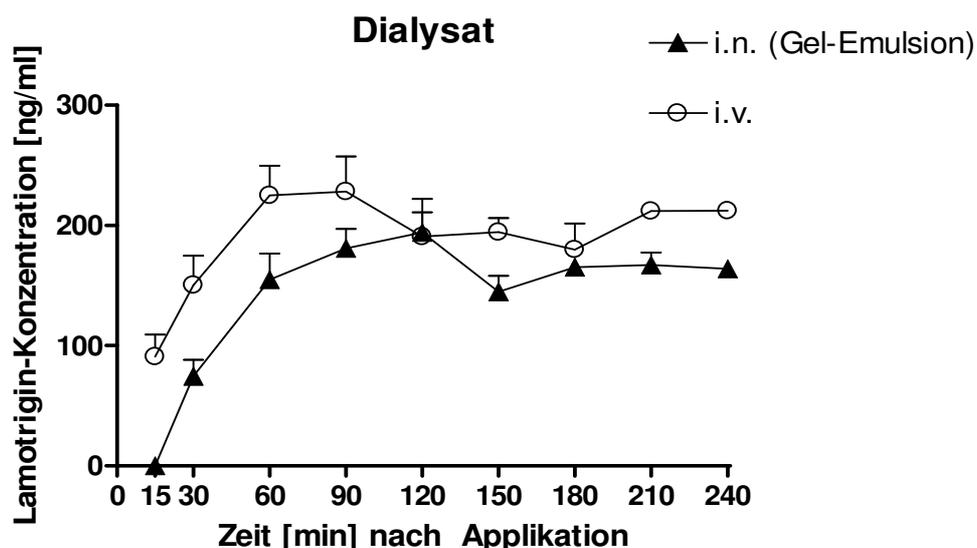


Abbildung 5.5: Dialysat-Konzentrationen von LTG aus dem rechten frontalen Cortex in ng/ml. LTG wurde in einer Dosis von 4 mg/kg KGW i.n. und i.v. verabreicht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Für den Zeitpunkt 15 min sind die Werte für 4 (i.n.) bzw. 3 Tiere (i.v.) abgebildet, für die Zeitpunkte 30 bis 120 min für jeweils 4 Tiere (i.n., i.v.) und für 150 bis 240 min für jeweils 2 Tiere (i.n., i.v.) Die Mikrodialyse-Untersuchungen für die Zeitpunkte von 120 bis 240 min nach Applikation wurden durchgeführt, um Informationen über einen möglichen weiteren Anstieg der Dialysat-Konzentrationen ab 120 min nach Applikation zu erhalten. Da die Konzentrationen nicht weiter anstiegen, wurden die Versuche für die späteren Zeitpunkte nur an jeweils 2 Tieren durchgeführt. Die Daten wurden entsprechend der „*in vitro recoveries*“ korrigiert.

5.1.1.2.3 Statistische Auswertung der Mikrodialyse-Untersuchungen zu LTG

Aufgrund der geringen Tierzahlen wurden die Daten nicht auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft. Für die statistische Auswertung wurde von nicht-parametrischen Daten ausgegangen.

Als einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit dem Faktor „Behandlung“, wurde eine one-way ANOVA nach Kruskal Wallis für nicht-parametrische Daten durchgeführt. Sie ergab für alle Datensätze ein signifikantes Ergebnis ($p\text{-Wert} \leq 0,05$). Als *post hoc*-Test für den Vergleich der beiden Applikationsformen zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde der Mann Whitney *U*-Test eingesetzt. Es wurden nur die Zeitpunkte verglichen, für die Daten von mindestens drei Tieren vorlagen (Dialysat: 30, 60, 90, 120 min

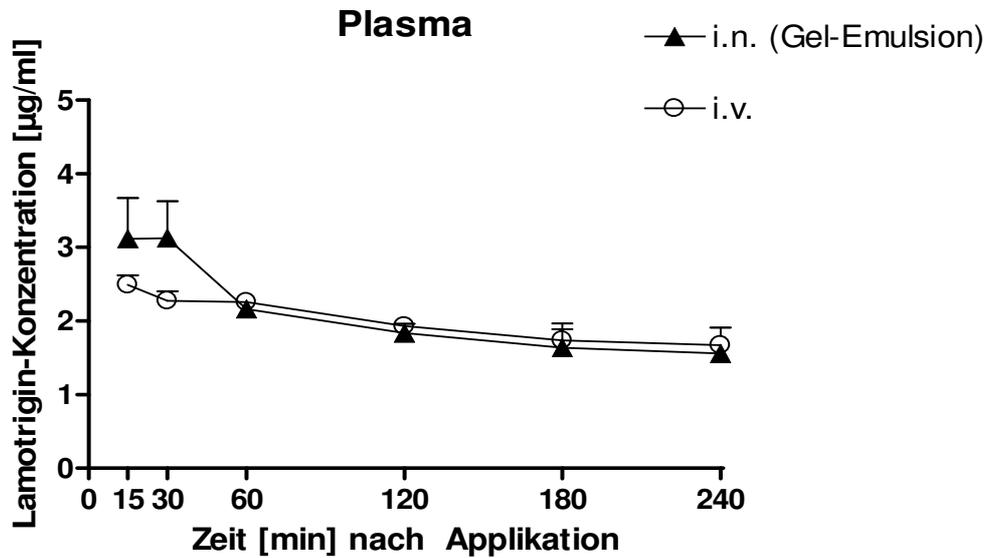


Abbildung 5.6: LTG-Konzentration im Plasma in $\mu\text{g/ml}$ nach i.n.- und i.v.-Applikation von 4 mg/kg KGW. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Für die Zeitpunkte 15, 30 und 120 min sind die Werte für 4 Tiere (i.n., i.v.) dargestellt, für die Zeitpunkte 60, 180 und 240 min für jeweils 2 Tiere (i.n., i.v.).

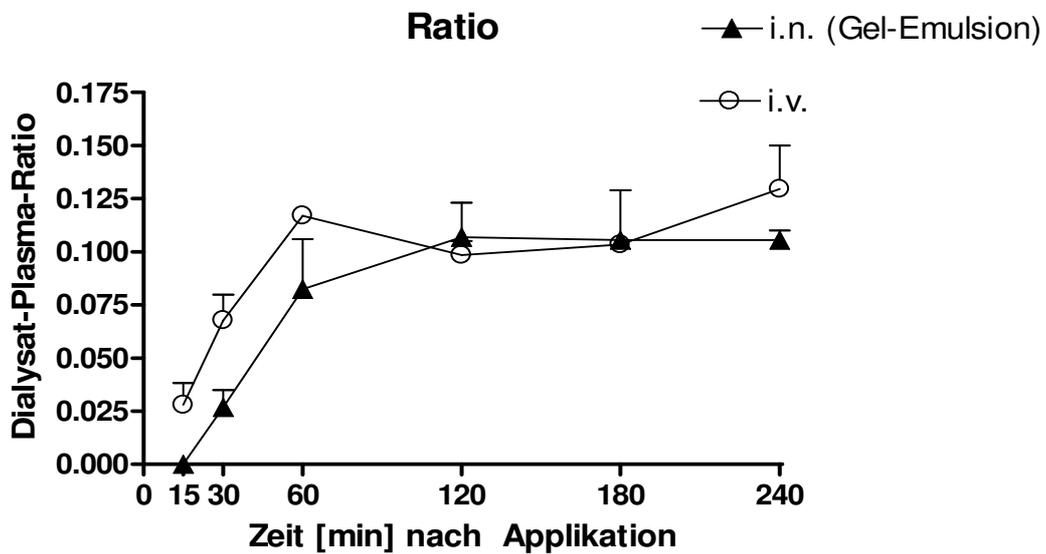


Abbildung 5.7: Dialysat-Plasma-Ratio nach i.n.- und i.v.-Applikation von 4 mg/kg KGW LTG. Die dargestellten Werte sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Für die Zeitpunkte 15, 30 und 120 min sind die Werte für 4 Tiere (i.n., i.v.) dargestellt, für die Zeitpunkte 60, 180 und 240 min für jeweils 2 Tiere (i.n., i.v.).

nach Applikation; Plasma: 15, 30, 120 min nach Applikation; Ratio: 30 und 120 min nach Applikation). Der Mann Whitney *U*-Test konnte für die berechneten Zeitpunkte weder im Dialysat, Plasma noch in der Dialysat-Plasma-Ratio statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Applikationsformen aufzeigen ($p \leq 0,05$). Zu beachten ist im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen die niedrige Tierzahl von drei bis vier Tieren. Diese ist dadurch begründet, dass die Mikrodialyse-Untersuchungen von LTG im Rahmen von Vorversuchen stattfanden, die Informationen über die Effektivität der i.n.-Applikation von LTG erbringen sollten. Anhand der vorläufigen Daten sollte ein Antiepileptikum ausgewählt werden, für das das weitere Vorgehen besonders Erfolg versprechend erschien.

5.1.1.3 PHENOBARBITAL

5.1.1.3.1 i.n.- und i.v.-Applikation von PB (5,4 mg/kg KGW)

Im Folgenden sind die nach i.n.- und i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW PB erreichten Konzentrationen im rechten frontalen Cortex und Plasma sowie die Dialysat-Plasma-Ratio dargestellt. Die Mikrodialyse-Untersuchungen wurden an jeweils vier bis neun Ratten (siehe Tabelle 5.1) durchgeführt. PB wurde i.n. in einer mukoadhäsiven Formulierung (HPMC-CBP-Gel) oder einer wässrigen Lösung appliziert und mit der i.v.-Applikation verglichen.

Fünfzehn min nach i.n.-Applikation von PB im HPMC-CBP-Gel wurde eine Dialysat-Konzentration von $384,7 \pm 66,2$ ng/ml gemessen. Die Konzentration stieg bis 120 min nach Applikation weiter an und erlangte einen Maximal-Wert von 1868,4 ng/ml. Danach fiel die Konzentration auf $1582,9 \pm 195,2$ ng/ml ab und zeigte bis 240 min nach Applikation geringfügige Schwankungen.

Die 15 min nach i.v.-Applikation erreichte Konzentration im Dialysat lag bei $330,8 \pm 64,7$ ng/ml. Bis 150 min nach Applikation stieg sie auf einen Maximal-Wert von $993,7 \pm 442$ ng/ml an. Danach blieb die Konzentration bis 240 min nach Applikation auf etwa diesem Niveau. Nach i.n.-Applikation in wässriger Lösung stieg die Dialysat-Konzentration von $199,3 \pm 28,7$ ng/ml (30 min nach Applikation) bis auf $471,1 \pm 26,7$ ng/ml (120 min nach Applikation) kontinuierlich an, wies aber für alle gemessenen Zeitpunkte die vergleichsweise niedrigsten Werte auf.

Zeit [min] nach Applikation	i.n.-Applikation in wässriger Lösung	i.n.-Applikation in Gel-Formulierung	i.v.-Applikation
15	-	8	9
30	4	8	9
60	4	8	9
90	4	8	9
120	4	8	9
150	-	4	4
180	-	4	4
210	-	4	4
240	-	4	4

Tabelle 5.1: Probenahmezeitpunkte und Anzahl der untersuchten Tiere in den Mikrodialyse-Untersuchungen zur i.n.- und i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW PB.

Nach statistischer Analyse (siehe Kapitel 5.1.1.3.2) ergaben sich für alle ausgewerteten Zeitpunkte (30, 60, 90, 120 min) signifikant höhere Dialysat-Konzentrationen nach i.n.-Applikation im Gel verglichen mit der i.n.-Applikation in wässriger Lösung. Im Vergleich zur i.v.-Applikation ergaben sich signifikant höhere Konzentrationen 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min nach Applikation. Ein Vergleich der i.n.-Applikation in wässriger Lösung mit der i.v.-Applikation ergab zu keiner Zeit einen statistisch signifikanten Unterschied.

Nach i.n.-Applikation im Gel wurden die höchsten Plasma-Konzentrationen mit $15,8 \pm 1,5 \mu\text{g/ml}$ 15 min nach Applikation gemessen. Im Laufe des Versuches fiel die Plasma-Konzentration kontinuierlich bis auf $7,5 \mu\text{g/ml}$ 240 min nach Applikation ab. Nach i.n.-Applikation in wässriger Lösung lag die Plasma-Konzentration sowohl bei der ersten (30 min nach Applikation) als auch bei der letzten Messung (120 min nach Applikation) bei $3,1 \mu\text{g/ml}$. Dazwischen stieg sie nur minimal um $0,3 \mu\text{g/ml}$ oder $0,2 \mu\text{g/ml}$ an (60 und 90 min nach Applikation). Die i.v.-Applikation resultierte ebenfalls zum Zeitpunkt 15 min nach Applikation mit $6,8 \mu\text{g/ml}$ in der höchsten

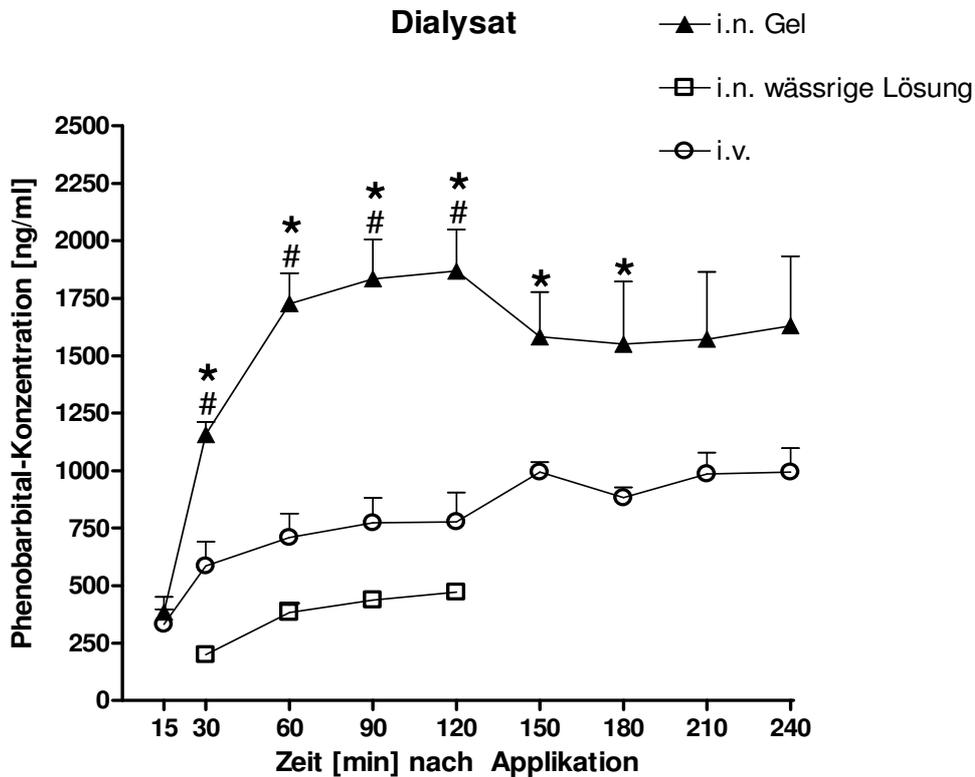


Abbildung 5.8: Dialysat-Konzentrationen im rechten frontalen Cortex in ng/ml nach i.n.- und i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW PB. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Die Daten wurden entsprechend der „*in vitro recoveries*“ korrigiert. Die Anzahl der pro Zeitpunkt und Applikationsform untersuchten Tiere ist Tabelle 5.1 zu entnehmen.

= $p \leq 0,05$ i.n.-Applikation im Gel verglichen mit i.n.-Applikation in wässriger Lösung

* = $p \leq 0,05$ i.n.-Applikation im Gel verglichen mit i.v.-Applikation

Konzentration. Unter leichten Schwankungen war bis 240 min nach Applikation ein Abfall auf 5,5 $\mu\text{g/ml}$ zu verzeichnen.

Die statistische Auswertung ergab für die i.n.-Applikation im Gel im Vergleich zur i.n.-Applikation in wässriger Lösung zu den Zeitpunkten 30, 60 und 90 min nach Applikation signifikant höhere Werte. Ebenfalls signifikant höhere Werte ergaben sich im Vergleich mit der i.v.-Applikation für die Zeitpunkte 15, 30, 60 und 120 min. Die Plasma-Konzentrationen nach i.n.-Applikation in wässriger Lösung sind hingegen für die Zeitpunkte 30, 60 und 90 min nach Applikation signifikant niedriger als nach i.v.-Applikation.

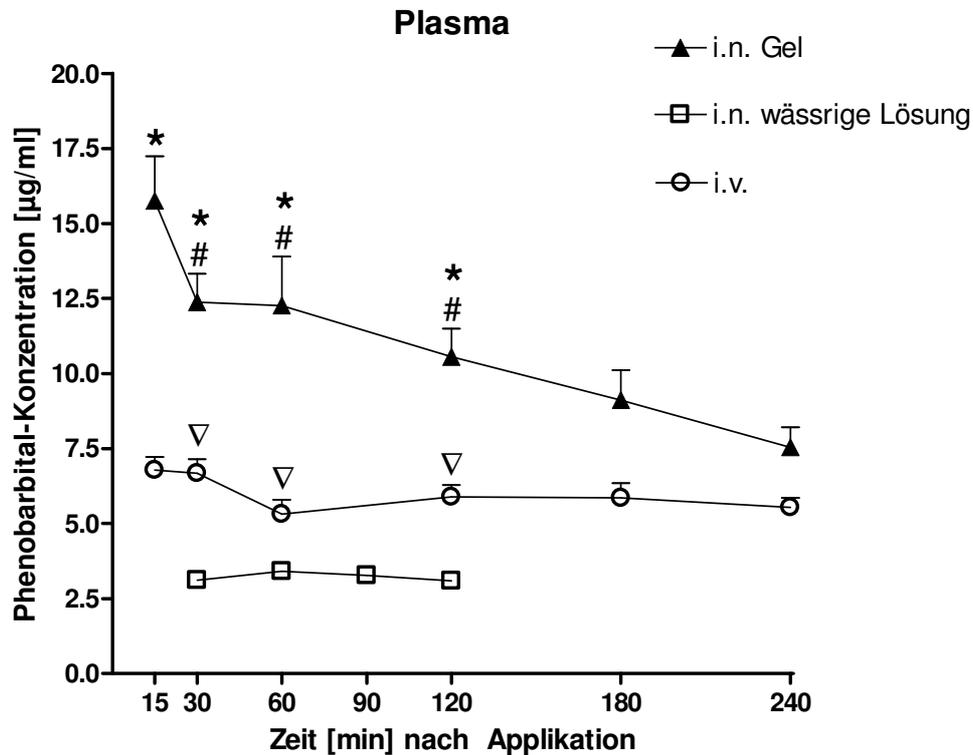


Abbildung 5.9: PB-Konzentration im Plasma in µg/ml nach i.n.- und i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Die Anzahl der Tiere, die pro Zeitpunkt und Applikationsform untersucht wurden, sind Tabelle 5.1 zu entnehmen.

= $p \leq 0,05$ i.n.-Applikation im Gel verglichen mit i.n.-Applikation in wässriger Lösung

* = $p \leq 0,05$ i.n.-Applikation im Gel verglichen mit i.v.-Applikation

∇ = $p \leq 0,05$ i.n.-Applikation in wässriger Lösung verglichen mit i.v.-Applikation

Die Dialysat-Plasma-Ratio wies 15 min nach i.n.-Applikation im Gel mit $0,028 \pm 0,006$ ihren niedrigsten Wert auf. Bis 240 min nach Applikation stiegen die Werte an und erreichten ein Maximum von $0,219 \pm 0,037$. Nach i.n.-Applikation in wässriger Lösung verhielt es sich ähnlich: 15 min nach Applikation betrug die Ratio $0,065 \pm 0,008$; 120 min nach Applikation lag der Wert bei $0,153 \pm 0,010$. Die Ratio nach i.v.-Applikation stieg ebenfalls von $0,048 \pm 0,009$ 15 min nach Applikation bis auf $0,182 \pm 0,022$ 240 min nach PB-Verabreichung an.

Die statistische Analyse der Dialysat-Plasma-Ratio ergab für den Zeitpunkt 30 min einen signifikant höheren Wert für die i.n.-Applikation im Gel verglichen mit

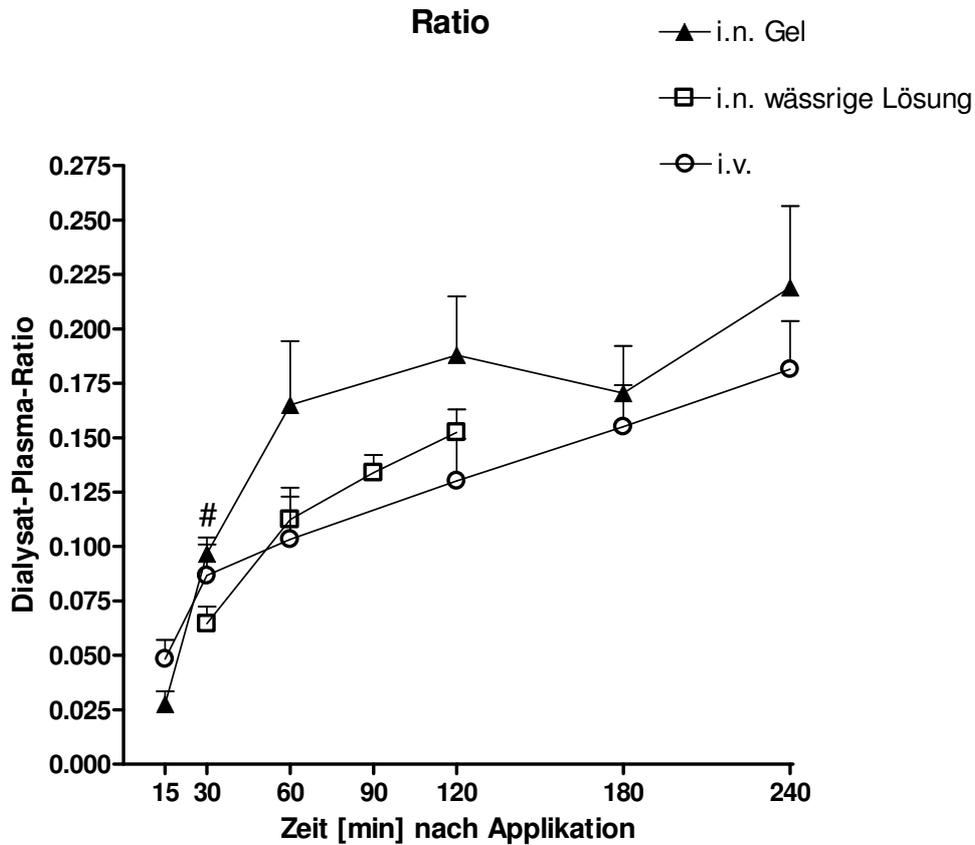


Abbildung 5.10: Dialysat-Plasma-Ratio nach i.n.- und i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW PB. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. Die Anzahl der Tiere, die pro Zeitpunkt und Applikationsform untersucht wurden, sind Tabelle 5.1 zu entnehmen.

= $p \leq 0,05$ i.n.-Applikation im Gel verglichen mit i.n.-Applikation in wässriger Lösung

der i.n.-Applikation in wässriger Lösung. Für alle anderen Zeitpunkte ergab sie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Applikationsformen oder -formulierungen.

5.1.1.3.2 Statistische Auswertung der Mikrodialyse-Untersuchungen mit PB

Zur einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) für nicht-parametrische Daten wurde eine one-way ANOVA nach Kruskal Wallis herangezogen, die signifikante Unterschiede ergab (p -Wert $< 0,05$). Als *post hoc*-Test für den Vergleich der Applikationsformen (i.n. im Gel mit i.v. (= ★) ; i.n. im Gel mit i.n. in wässriger Lösung (= #); i.n. in wässriger Lösung mit i.v. (= ▽)) zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde der Mann Whitney *U*-Test eingesetzt.

Zum Vergleich der beiden i.n.-Applikationen wurden folgende Zeitpunkte analysiert (jeweils Daten von mindestens 4 Tieren):

- Dialysat: 30, 60, 90 und 120 min nach Applikation;
- Plasma und Dialysat-Plasma-Ratio: 30, 60 und 120 min nach Applikation.

Für den Vergleich der i.n.-Applikation im Gel mit der i.v.-Applikation wurden folgende Zeitpunkte untersucht (Daten von jeweils mindestens 4 Tieren):

- Dialysat: 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 und 240 min nach Applikation;
- Plasma und Dialysat-Plasma-Ratio: 15, 30, 60, 120, 180 und 240 min nach Applikation.

5.1.2 GEHIRNPRÄPARATIONEN

5.1.2.1 CARBAMAZEPIN

Um viel versprechende Daten aus einer Veröffentlichung (Barakat et al., 2006) zu reproduzieren und fortführende Untersuchungen daran anzuschließen, wurde an jeweils zwei Ratten CBZ in einer Dosierung von 0,2 mg/kg KGW 2 cm tief in eine Hälfte der Nasenhöhle oder 8 mg/kg KGW i.v. in die Schwanzvene verabreicht. Die Durchführung entsprach der in der Veröffentlichung beschriebenen Applikationsform und den dort angegebenen Dosierungen und Formulierungen von CBZ. Bei den durchgeführten Mikrodialyse-Untersuchungen zur i.n.-Applikation von CBZ konnten keine mit der eingesetzten HPLC-Methode quantifizierbaren Konzentrationen im Dialysat des rechten frontalen Cortex nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.1.1.1). Daher wurde der Versuch unternommen, durch Bestimmung von CBZ im Gesamtgehirn die Ergebnisse der Veröffentlichung zu reproduzieren.

Der Nachweis von CBZ war 10 min nach i.n.-Applikation von 0,2 mg/kg KGW nur im Plasma möglich. Die Plasma-Konzentrationen lagen bei beiden Tieren bei 0,1 µg/ml. Im Gehirnhomogenat konnte kein CBZ detektiert werden.

Zehn min nach i.v.-Applikation von 8 mg/kg KGW konnte CBZ im Gehirn in Konzentrationen von 8,19 und 8,89 µg/g gemessen werden. Die Plasma-

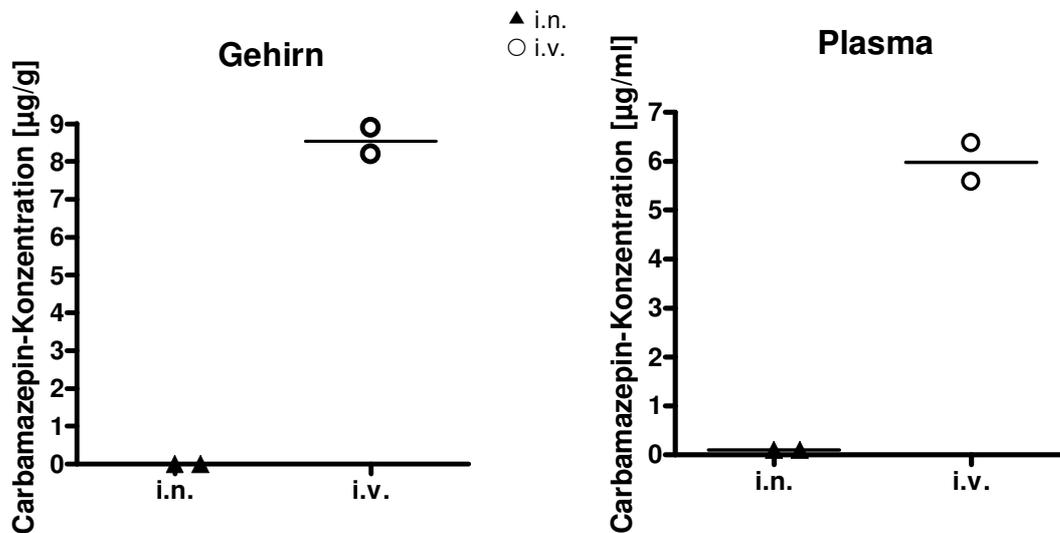


Abbildung 5.11: CBZ-Konzentration im Gesamtgehirn-Homogenat in µg/g und Plasma in µg/ml zum Zeitpunkt 10 min nach Applikation. Appliziert wurden 0,2 mg/kg KGW i.n. im HPMC-CBP-Gel und 8 mg/kg KGW i.v. in einer Propylenglycol-Aqua bidest.-Ethanol-Lösung (5:3:2; v/v/v). Es wurden jeweils zwei Ratten behandelt. Dargestellt sind die Einzelwerte und der Mittelwert.

Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt betragen 5,58 und 6,37 µg/ml. Da eine weitere Verfolgung anhand dieser vorläufigen Ergebnisse nicht viel versprechend war, wurde die Anzahl der Tiere nicht erhöht.

5.1.2.2 PHENOBARBITAL IM GESAMTGEHIRN

Um Informationen über den zeitlichen Verlauf der PB-Konzentration im Rattengehirn nach i.n.- und i.v.-Applikation zu erhalten, wurde die PB-Konzentration im Gesamtgehirn bestimmt. In einem Vorversuch wurde den Tieren zunächst eine Dosis von 30 mg/kg KGW PB 2 cm tief in eine Hälfte der Nasenhöhle oder i.v. in die Schwanzvene appliziert.

Fünf min nach i.n.-Applikation von 30 mg/kg PB im HPMC-CBP-Gel in die rechte Hälfte der Nasenhöhle wurde im Gehirnhomogenat eine Konzentration von 2,98 µg/g gemessen. Nach 10 min lag die Konzentration bei 7,20 µg/g. Nach

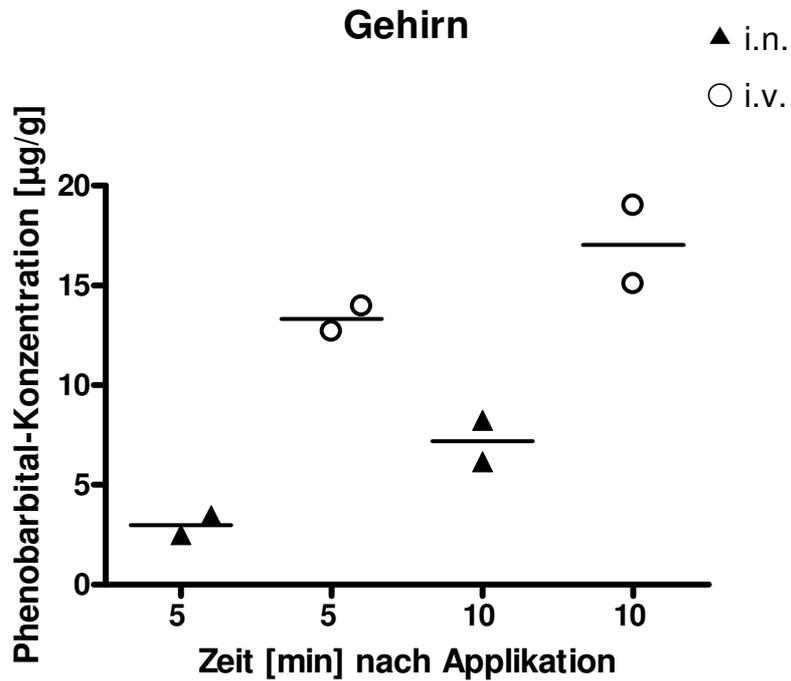


Abbildung 5.12: PB-Konzentration im Gesamtgehirn-Homogenat in $\mu\text{g/g}$ 5 min und 10 min nach i.n.- und i.v.-Applikation von 30 mg/kg KGW PB. Dargestellt sind Einzelwerte von jeweils 2 Tieren und der jeweilige Gruppen-Mittelwert.

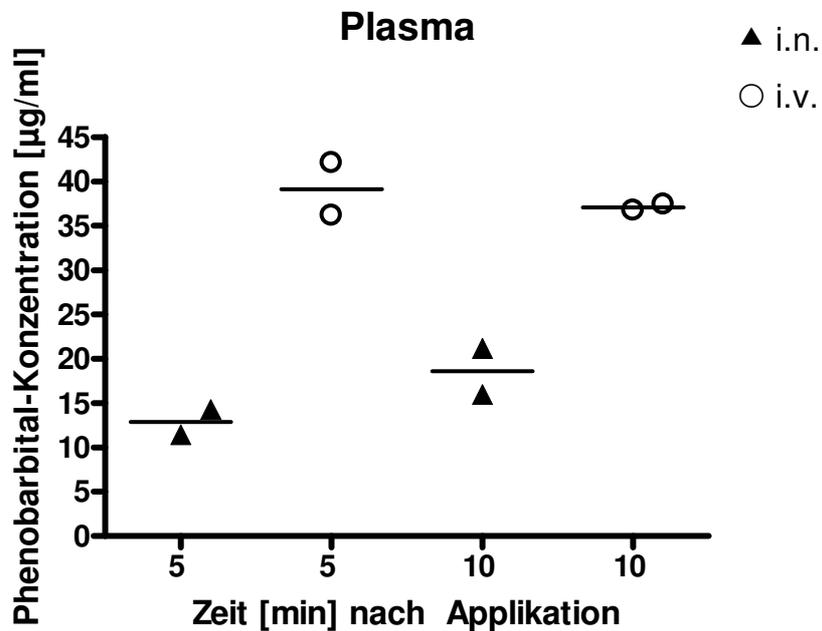


Abbildung 5.13: PB-Konzentration im Plasma in $\mu\text{g/ml}$ 5 min und 10 min nach i.n.- und i.v.-Applikation von 30 mg/kg KGW PB. Dargestellt sind Einzelwerte von jeweils 2 Tieren und der jeweilige Gruppen-Mittelwert.

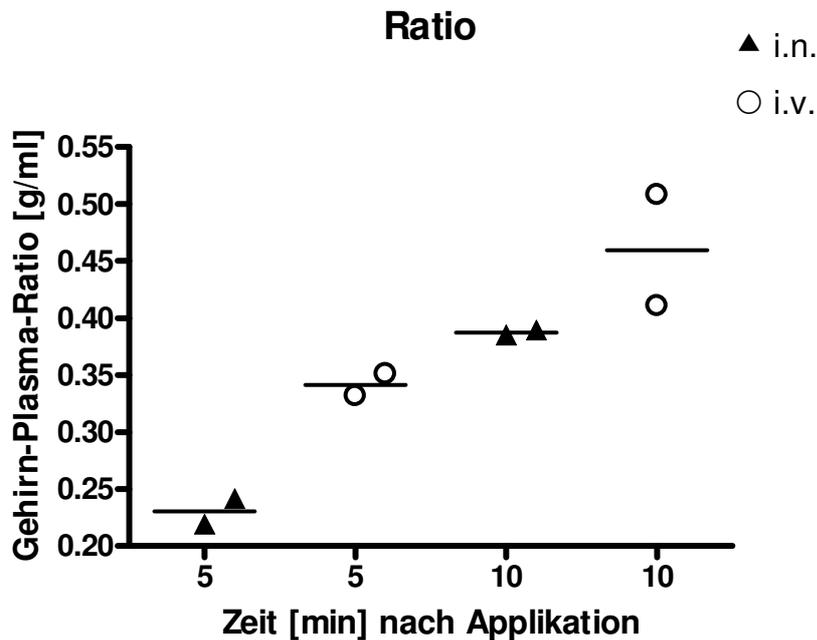


Abbildung 5.14: Gehirn-Plasma-Ratio 5 min und 10 min nach i.n.- und i.v.-Applikation von 30 mg/kg KGW PB. Dargestellt sind Einzelwerte von jeweils 2 Tieren und der jeweilige Gruppen-Mittelwert.

i.v.-Applikation lag die Gehirn-Konzentration zum Zeitpunkt 5 min bei 13,33 $\mu\text{g/g}$ und nach 10 min bei 17,04 $\mu\text{g/g}$. Die Plasma-Konzentrationen erreichten nach i.n.-Applikation im Gel 12,85 $\mu\text{g/ml}$ (5 min nach Applikation) und 18,57 $\mu\text{g/ml}$ (10 min nach Applikation). Nach i.v.-Applikation lagen die Plasma-Konzentrationen im Mittel bei 39,13 $\mu\text{g/ml}$ und 37,07 $\mu\text{g/ml}$.

Weil sich die i.n.-Applikation im Vergleich zur i.v.-Applikation als nicht viel versprechend erwiesen hatte, wurden die Tierzahlen nicht erhöht. Eine statistische Auswertung dieser vorläufigen Daten wurde aufgrund der niedrigen Tierzahlen nicht durchgeführt. Tendenziell sind auf die beschriebene Art und Weise der Applikation durch i.v.-Applikation von 30 mg/kg PB höhere Gehirn- und Plasma-Konzentrationen zu erzielen als durch i.n.-Applikation.

Um die Ergebnisse der Mikrodialyse-Untersuchungen zur i.n.-Applikation von 5,4 mg/kg PB zu ergänzen und vor allem auch Informationen über die erreichbaren Konzentrationen in den ersten 15 min nach Applikation zu erhalten, wurde die PB-

Konzentration im Gesamtgehirn zu den Zeitpunkten 2, 5, 10, 20, 30, 60 und 240 min nach Applikation bestimmt und in das Verhältnis zur Plasma-Konzentration gesetzt. Gleiches erfolgte für die i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg PB.

Die maximale Gehirnkonzentration nach i.n.-Applikation wurde 30 min nach Applikation erreicht ($4,08 \pm 0,11 \mu\text{g/g}$; $M \pm \text{SEM}$); nach i.v.-Applikation ergab sich die maximale PB-Konzentration nach 60 min ($3,38 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$; $M \pm \text{SEM}$) und lag damit niedriger als nach i.n.-Applikation. Im Plasma war die maximale Konzentration nach i.n.-Applikation nach 30 min ($9,06 \pm 0,65 \mu\text{g/ml}$; $M \pm \text{SEM}$) erreicht, nach i.v.-Applikation lag sie nach 2 min am höchsten ($7,87 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$; $M \pm \text{SEM}$).

Die Ergebnisse zur Bestimmung der PB-Konzentration im Gesamtgehirn, im Plasma und die Gehirn-Plasma-Ratio sind in den nachfolgenden drei Abbildungen im zeitlichen Verlauf dargestellt.

5.1.2.2.1 Statistische Auswertung

Zunächst wurde mit den nicht-parametrischen Daten der Gehirnkonzentrationen eine one-way ANOVA nach Kruskal Wallis durchgeführt, die ein signifikantes Ergebnis ($p \leq 0,05$) ergab. Als *post hoc*-Test wurde mit dem Mann Whitney *U*-Test auf Unterschiede zwischen der i.n.- und i.v.-Applikation zu jedem der untersuchten Zeitpunkte getestet. Bei den erreichten Gehirnkonzentrationen konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Applikationsformen gefunden werden.

Die one-way ANOVA nach Kruskal Wallis ergab für den Vergleich der Plasma-Konzentrationen ein signifikantes Ergebnis, so dass ein *post hoc*-Test (Mann Whitney *U*-Test) durchgeführt werden konnte. Dieser ergab für den Zeitpunkt 10 min nach i.n.-Applikation eine signifikant höhere Konzentration im Plasma als nach i.v.-Applikation. Alle anderen Vergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Die one-way ANOVA nach Kruskal Wallis wurde auch für die Analyse der Gehirn-Plasma-Ratio durchgeführt und resultierte in einem signifikanten Ergebnis. Der Mann Whitney *U*-Test ergab keine signifikanten Unterschiede in den Gehirn-Plasma-Ratios von i.n.- und i.v.-Applikation.

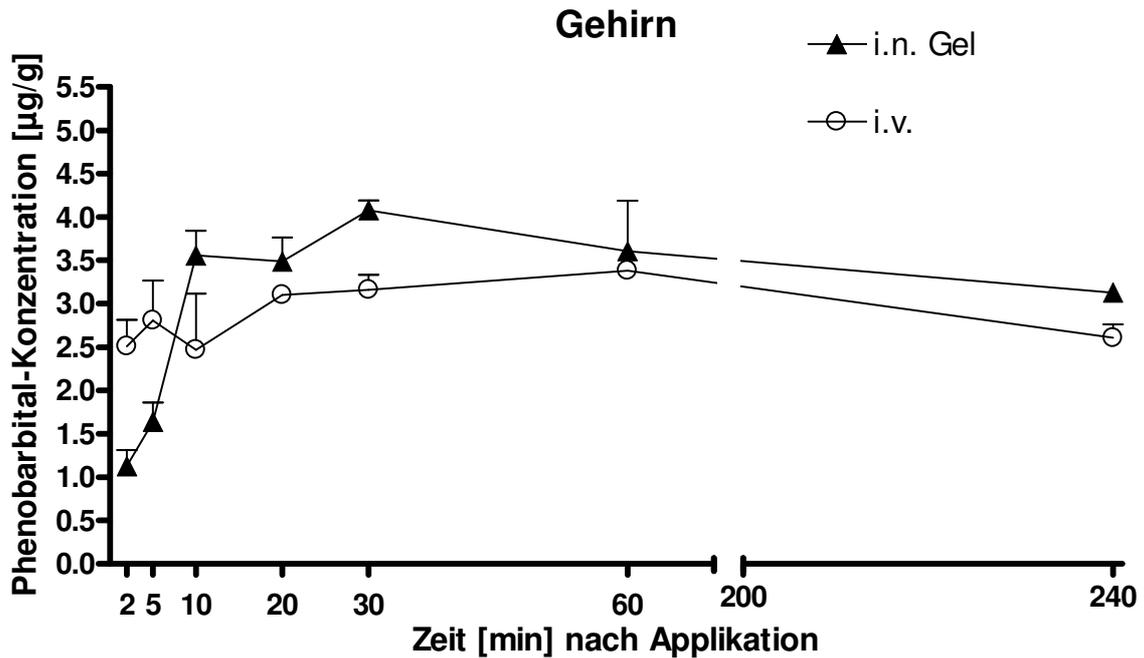


Abbildung 5.15: Gehirn-Konzentrationen nach i.n.- und i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW PB im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler für 3 Tiere (2, 5, 20, 30, 60, 240 min nach Applikation) oder 4 Tiere (10 min nach Applikation).

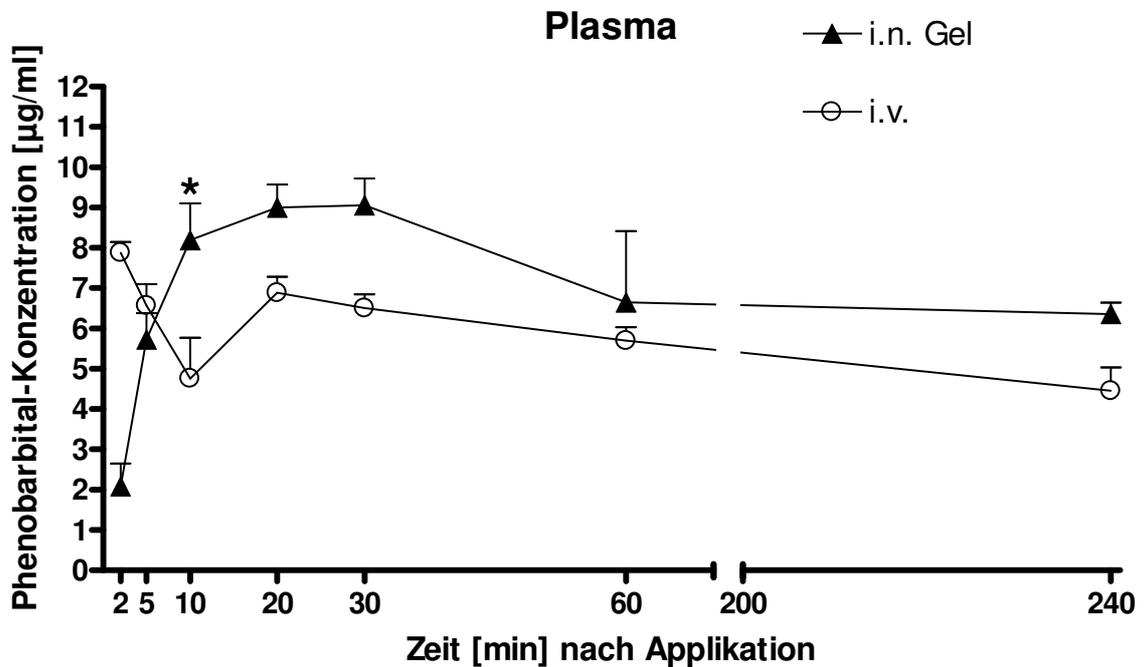


Abbildung 5.16: Plasma-Konzentrationen nach i.n.- und i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW PB im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler für 3 Tiere (2, 5, 20, 30, 60, 240 min nach Applikation) und 4 Tiere (10 min nach Applikation).

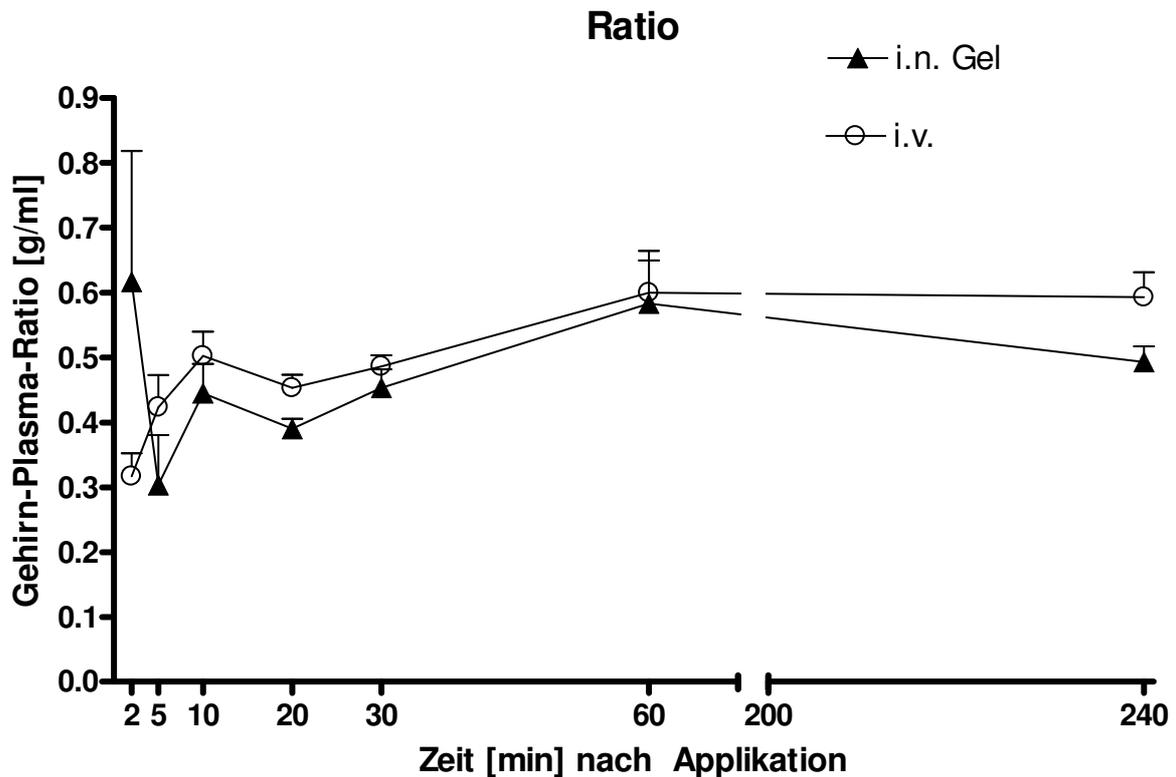


Abbildung 5.17: Gehirn-Plasma-Ratio nach i.n.- und i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW PB im zeitlichen Verlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler für 3 Tiere (2, 5, 20, 30, 60, 240 min nach Applikation) und 4 Tiere (10 min nach Applikation).

5.1.2.3 PHENOBARBITAL IN PRÄPARIERTEN GEHIRNREGIONEN

Um Aufschluss über die rostro-caudale Verteilung im Gehirn nach i.n.-Applikation von PB zu gewinnen, wurden neun Gehirnregionen präpariert und die PB-Konzentrationen mit den nach i.v.-Applikation erreichten Konzentrationen verglichen.

Die höchste PB-Konzentration nach i.n.-Applikation wurde im Bulbus olfactorius erreicht ($9,72 \pm 3,07 \mu\text{g/g}$; $M \pm \text{SEM}$); nach i.v.-Applikation konnte die maximale Konzentration ($7,52 \pm 1,68 \mu\text{g/g}$; $M \pm \text{SEM}$) im Piriformen Cortex bestimmt werden.

Die nach Masseanteil gewichtete PB-Gesamtkonzentration, die sich aus der Summe der Einzelregionen ergab, unterschied sich nicht von der gemessenen PB-Konzentration im Gesamtgehirn (siehe Kapitel 5.1.2.2.).

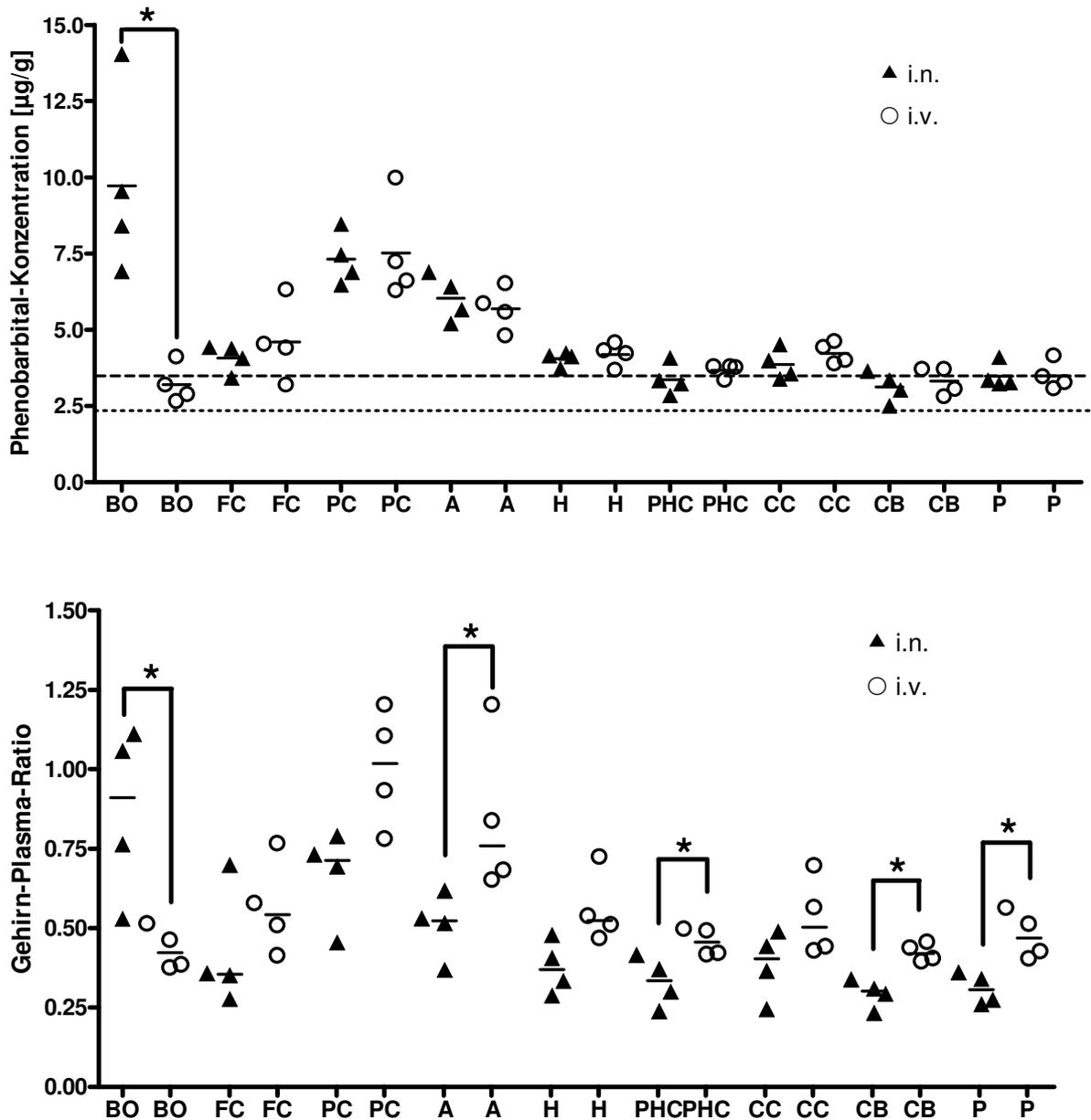


Abbildung 5.18: PB-Konzentration in µg/g (oben) und Gehirn-Plasma-Ratio in g/ml (unten) in einzelnen Gehirnregionen 10 min nach i.n.- und i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW. Die Gehirnregionen sind von links nach rechts entsprechend ihrer anatomischen Lage im Gehirn in rostro-caudaler Ausrichtung aufgeführt. Dargestellt sind Einzelwerte und Mediane von jeweils 4 Tieren. BO = Bulbus olfactorius; FC = Frontaler Cortex; PC = Piriformer Cortex; A = Amygdala; H = Hippocampus; PHC = Parahippocampaler Cortex; CC = Caudaler Cortex; CB = Cerebellum, P = Pons.

----- = PB-Konzentration im Gesamtgehirn nach i.n.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW
 = PB-Konzentration im Gesamtgehirn nach i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW

5.1.2.3.1 Statistische Auswertung

Da pro Gruppe nur Daten von vier Tieren vorlagen, wurde nicht auf Normalverteilung getestet, sondern von nicht-parametrischen Daten ausgegangen.

Die one-way ANOVA nach Kruskal Wallis ergab für die Werte der Gehirn-Konzentrationen ein signifikantes Ergebnis ($p \leq 0,05$). Der Vergleich der Applikationsformen mit dem Mann Whitney *U*-Test ergab für den Bulbus olfactorius nach i.n.-Applikation eine signifikant höhere Konzentration als nach i.v.-Applikation. Die Auswertungen für alle weiteren Zeitpunkte resultierten in keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Applikationsformen.

Für den Vergleich der Gehirn-Plasma-Ratios ergibt die one-way ANOVA nach Kruskal-Wallis ebenfalls ein signifikantes Ergebnis. Für den Bulbus olfactorius ergab der Mann Whitney *U*-Test eine signifikant höhere Ratio nach i.n.-Applikation als nach i.v.-Applikation. Umgekehrt resultierte der Test in einer jeweils signifikant höheren Ratio nach i.v.-Applikation für die Amygdala, den parahippocampalen Cortex, das Cerebellum und die Pons als nach i.n.-Applikation.

5.1.3 AMYGDALA-KINDLING-MODELL

5.1.3.1 INTRANASALE APPLIKATION VON PHENOBARBITAL IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL

Während des Kindling-Vorganges waren durchschnittlich $7,4 \pm 2,2$ ($M \pm SEM$) Stimulationen notwendig, bis die Tiere einen generalisierten Anfall des Stadiums V zeigten. Die initiale ADT lag bei $145,4 \mu A \pm 66 \mu A$ ($M \pm SEM$). Nachdem die Tiere „voll gekindelt“ waren, wurden im Abstand von drei Tagen die Nachentladungsschwellen bestimmt. Die „post-kindling“-ADT lag bei $68,9 \mu A \pm 26,9 \mu A$ ($M \pm SEM$). Als die Tiere reproduzierbare Nachentladungsschwellen aufwiesen, wurde mit den Versuchen zur i.n.-Applikation begonnen.

5.1.3.1.1 Effekte auf die Anfallsparameter

Um Aufschluss über eine antikonvulsive Wirkung von PB nach i.n.-Applikation zu erhalten, wurden Versuche mit drei unterschiedlichen Dosierungen (5,4 mg/kg, 10 mg/kg und 30 mg/kg KGW) durchgeführt. Ergaben sich signifikant verschiedene Werte für die Kindling-Parameter nach i.n.-Applikation von PB im Vergleich zur i.n.-Applikation von Vehikel wurde von einer Wirksamkeit ausgegangen. Vergleichende Untersuchungen wurden für die i.v.-Applikation durchgeführt. Für die i.n.- und i.v.-Applikation von PB oder Vehikel wurden alle Tiere mit Propofol narkotisiert. Die Narkosedauer betrug 5-10 min für die Applikation von 5,4 und 10 mg/kg KGW. Für die Applikation von 30 mg/kg KGW wurde die Narkose auf 15-20 min ausgedehnt (siehe Kapitel 4.1.2.2).

Bei der i.n.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW in einem Volumen von 197 µl/kg KGW wurden nach der Stimulation (ca. 65-80 min nach Applikation) PB-Konzentrationen im Plasma von 3,65 µg/ml bis 6,14 µg/ml (M = 5,34 µg/ml) gemessen. Bei der i.n.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW in einem Volumen von 36 µl/kg KGW wurden PB-Konzentrationen im Plasma von 5,62 µg/ml bis 9,09 µg/ml (M = 8,02 µg/ml) gemessen. Nach i.v.-Applikation wurden bei gleicher Dosierung Plasma-Konzentrationen von 5,18 µg/ml bis 6,92 µg/ml (M = 5,91 µg/ml) gemessen. Bei der i.n.-Applikation von 10 mg/kg KGW ergaben sich PB-Konzentrationen im Plasma von 12,92 µg/ml bis 17,98 µg/ml (M = 15,45 µg/ml). Nach i.v.-Applikation von 30mg/kg KGW wurden PB-Konzentrationen von 13,51 µg/ml bis 24,53 µg/ml (M = 15,83 µg/ml) gemessen.

Bei der fraktionierten i.n.-Applikation von 30 mg/kg KGW abwechselnd in beide Nasenlöcher wurde der Versuch vorzeitig (nach dem vierten Tier) abgebrochen. Die Ratten zeigten bereits während des Applikationsvorgangs Symptome einer schweren Atemdepression oder Apnoe. Eine Ratte verstarb während des Applikationsvorgangs.

Im Folgenden werden nur die Ergebnisse der Versuche graphisch dargestellt, bei denen signifikante Unterschiede zwischen Daten aus dem Vehikelkontrollversuch

und dem zugehörigen Substanzversuch auftraten. Die Gruppengrößen variieren, da die Nachentladungsschwellen bei einigen Tieren zeitweise nicht konstant waren. Tiere, die dies betraf, wurden von der Teilnahme an dem jeweiligen Versuch ausgeschlossen.

5.1.3.1.2 Statistische Auswertung der Versuche im Amygdala-Kindling-Modell

Die statistische Auswertung der Kindling-Parameter erfolgte mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test für nicht-parametrische und verbundene Daten.

Die i.n.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW PB im Gel führte zu einer signifikanten Senkung der Anfallsstärke im Vergleich zur i.n.-Applikation von HPMC-CBP-Gel als Vehikel. Die i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg KGW führte zu einer signifikanten Erhöhung der Nachentladungsschwellen sowie der generalisierten Anfallsschwellen im Vergleich zur i.v.-Applikation von NaCl als Vehikel.

Die i.n.-Applikation von 10 mg/kg KGW PB resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Nachentladungsschwellen sowie der generalisierten Anfallsschwellen im Vergleich zur Vehikel-Applikation. Die statistische Auswertung der i.v.-Applikation von 10 mg/kg KGW ergab das gleiche Ergebnis.

Nach einer i.v.-Applikation von 30 mg/kg KGW unterschieden sich sämtliche Kindling-Parameter außer der Anfallsschwere bei der ADT signifikant von den Ergebnissen des Vehikelkontrollversuches.

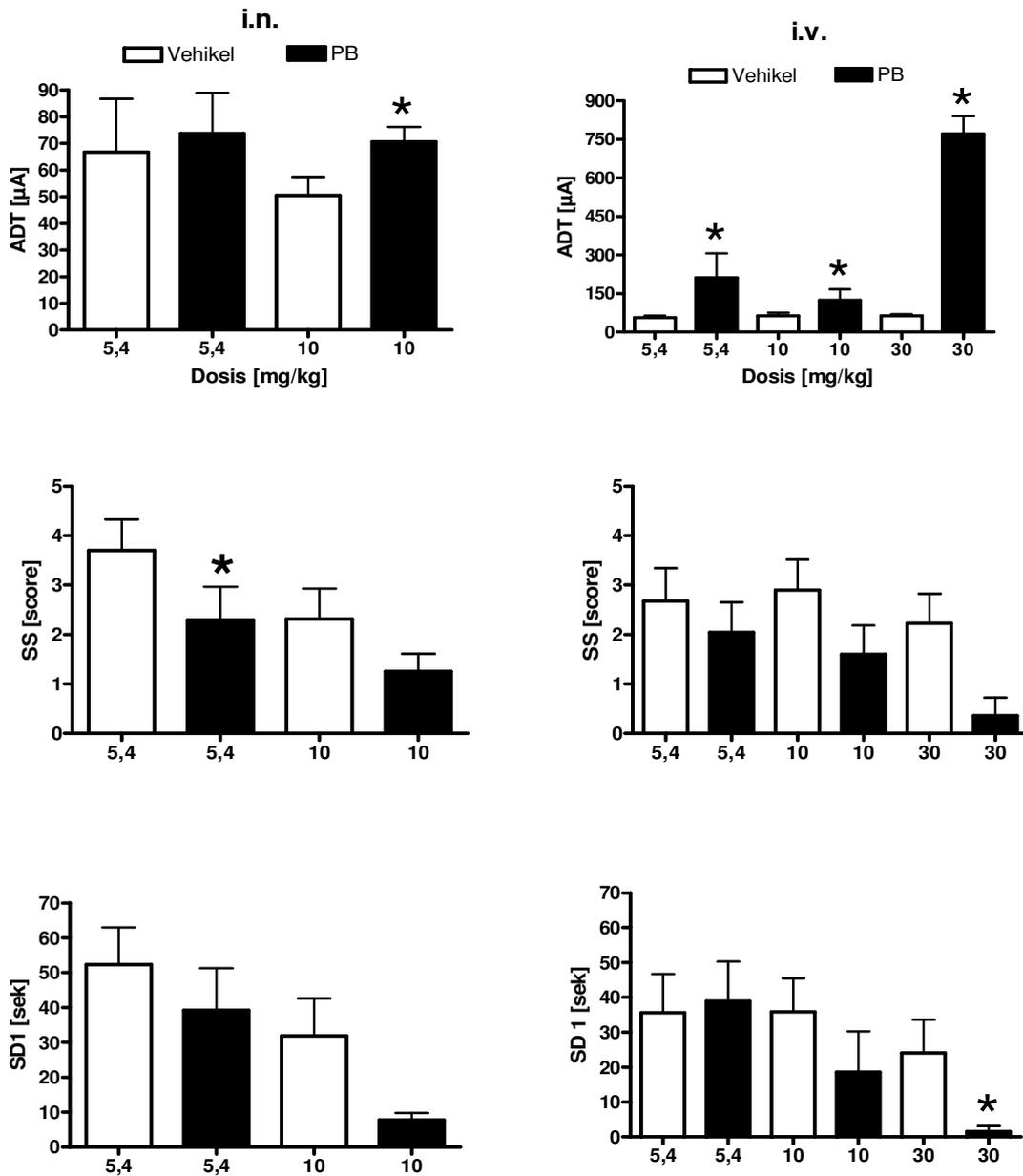


Abbildung 5.19: Nachentladungsschwelle (ADT), Anfallsschwere (SS) und Anfallsdauer 1 (SD 1) (alle Parameter bezogen auf die ADT) nach der i.n.- oder i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg, 10 mg/kg und 30 mg/kg KGW PB im Gel (i.n., 36 μ l/kg oder 67 μ l/kg KGW) oder in wässriger Lösung (i.v., 1 ml/kg KGW). Die Stimulation erfolgte 60 min nach Applikation. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Signifikante Unterschiede der Kindling-Parameter nach PB-Applikation im Vergleich zur Vehikelapplikation sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Gruppengrößen bei i.n.-Applikation: 5,4 mg/kg: 10 Tiere; 10 mg/kg: 8 Tiere; Gruppengröße bei i.v.-Applikation: 5,4 mg/kg: 11 Tiere; 10 mg/kg: 10 Tiere; 30 mg/kg: 10 Tiere.

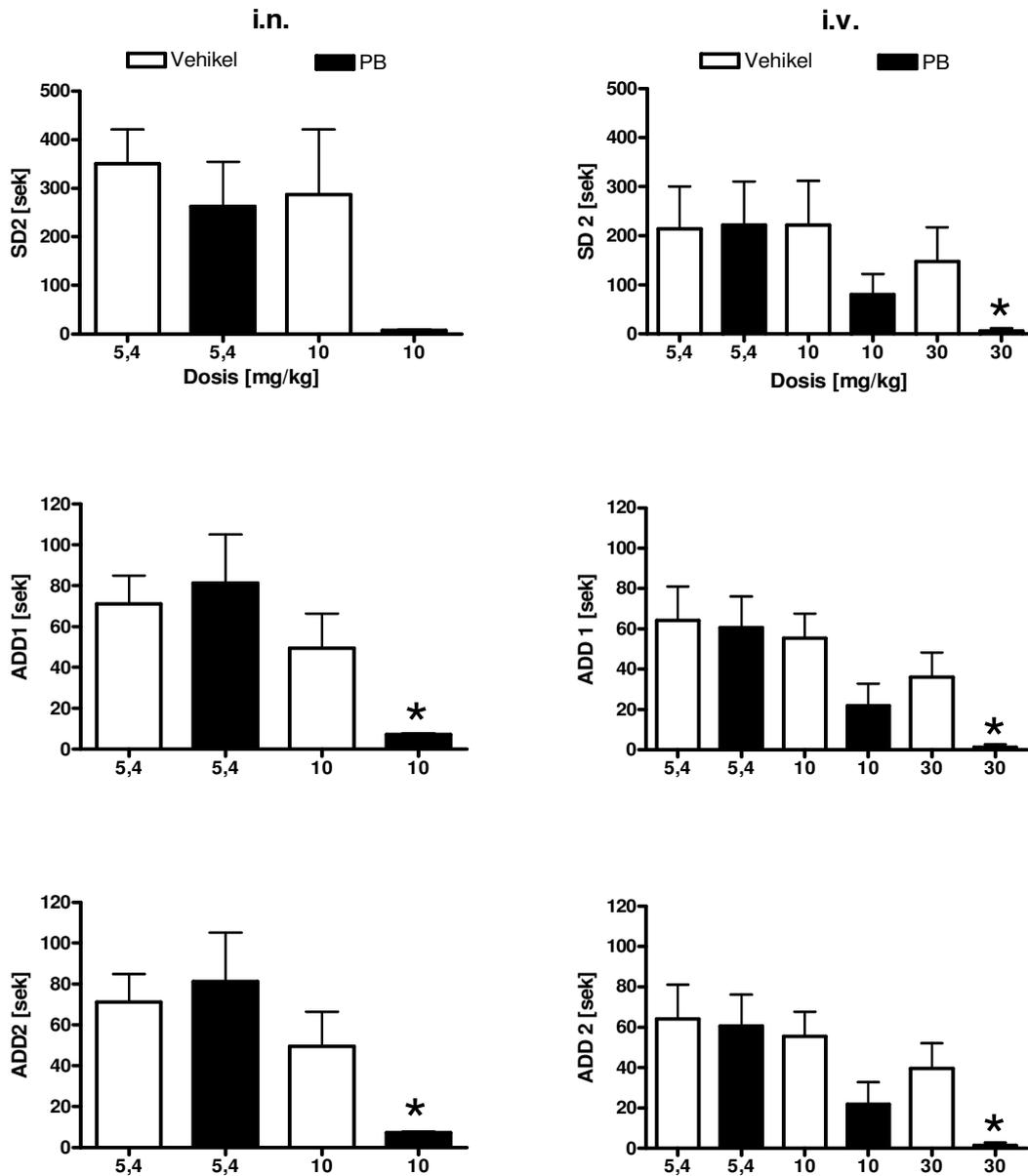


Abbildung 5.20: Anfallsdauer 2 (SD1 2) und Nachentladungsdauer 1 und 2 (ADD1 und 2) (alle Parameter bezogen auf die ADT) nach der i.n.- oder i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg, 10 mg/kg und 30 mg/kg KGW PB im Gel (i.n., 36 µl/kg oder 67 µl/kg KGW) oder in wässriger Lösung (i.v., 1 ml/kg KGW). Die Stimulation erfolgte 60 min nach Applikation. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Signifikante Unterschiede der Kindling-Parameter nach PB-Applikation im Vergleich zur Vehikelapplikation sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Gruppengrößen bei i.n.-Applikation: 5,4 mg/kg: 10 Tiere; 10 mg/kg: 8 Tiere; Gruppengröße bei i.v.-Applikation: 5,4 mg/kg: 11 Tiere; 10 mg/kg: 10 Tiere; 30 mg/kg: 10 Tiere.

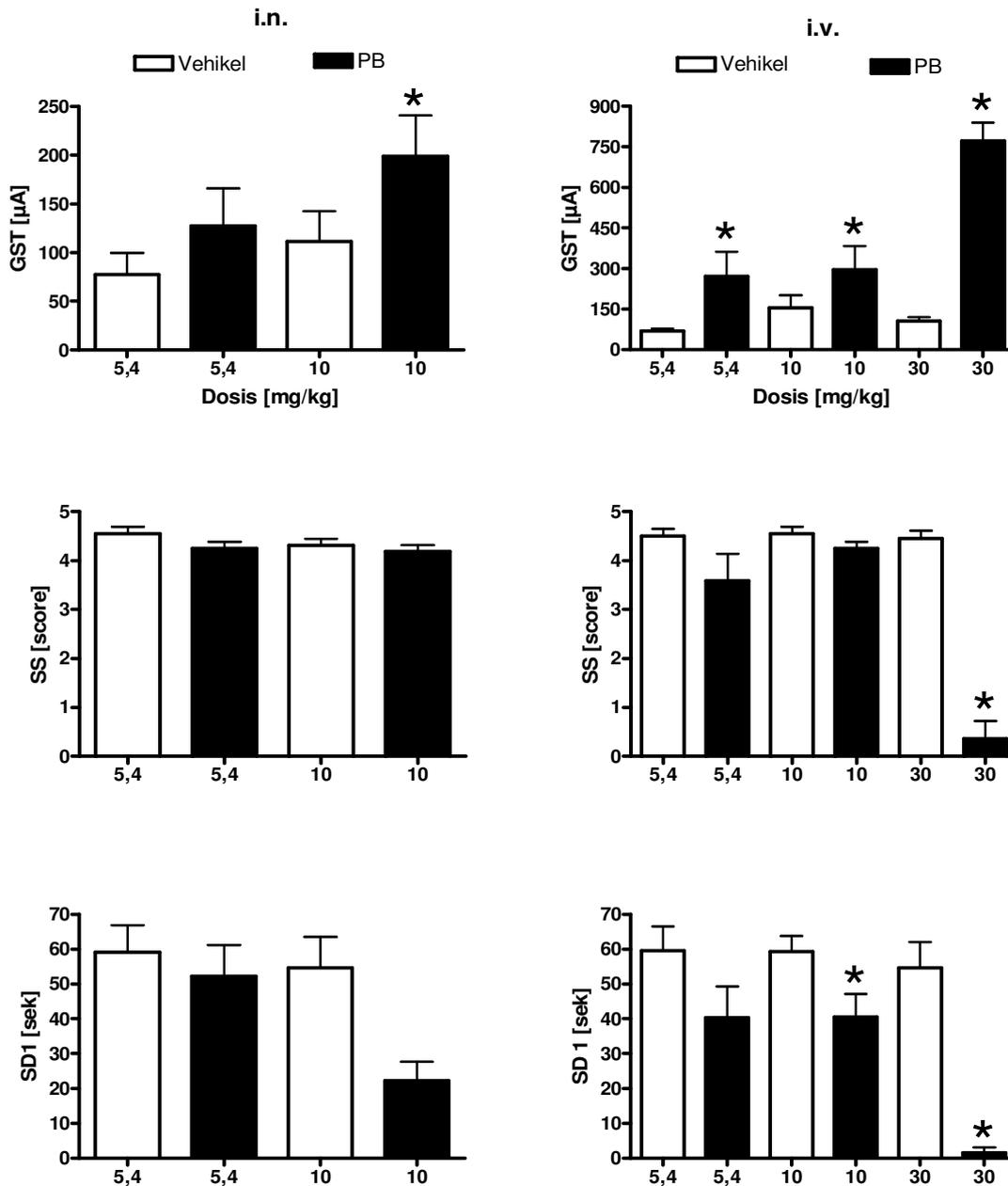


Abbildung 5.21: Generalisierte Anfallsschwelle (GST), Anfallsschwere (SS) und Anfallsdauer 1 (SD 1) (alle Parameter bezogen auf die GST) nach der i.n.- oder i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg, 10 mg/kg und 30 mg/kg KGW PB im Gel (i.n., 36 µl/kg oder 67 µl/kg KGW) oder in wässriger Lösung (i.v., 1 ml/kg KGW). Die Stimulation erfolgte 60 min nach Applikation. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Signifikante Unterschiede der Kindling-Parameter nach PB-Applikation im Vergleich zur Vehikelapplikation sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Gruppengrößen bei i.n.-Applikation: 5,4 mg/kg: 10 Tiere; 10 mg/kg: 8 Tiere; Gruppengröße bei i.v.-Applikation: 5,4 mg/kg: 11 Tiere; 10 mg/kg: 10 Tiere; 30 mg/kg: 10 Tiere.

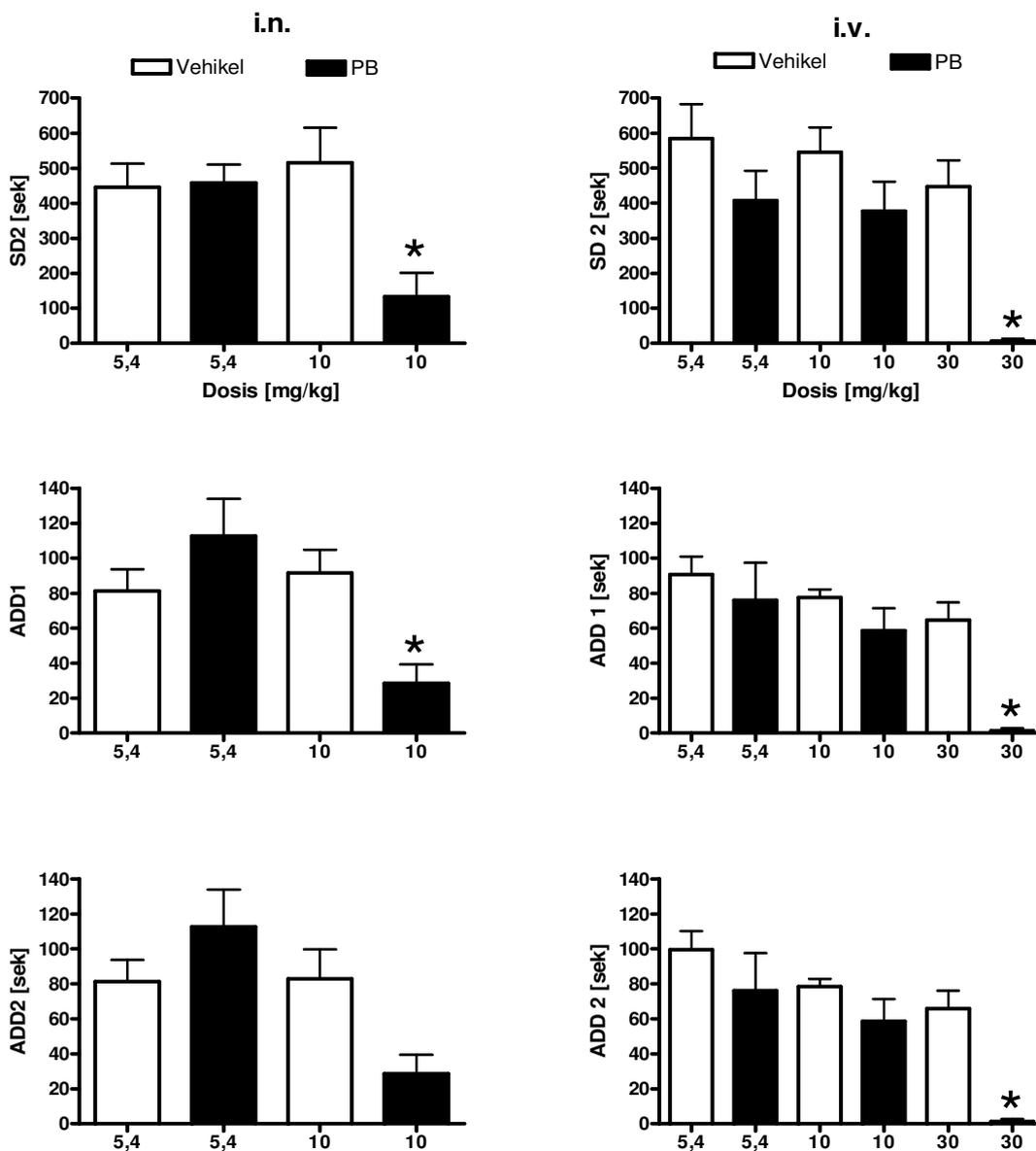


Abbildung 5.22: Anfallsdauer 2 (SD1 2) und Nachentladungsdauer 1 und 2 (ADD1 und 2) (alle Parameter bezogen auf die ADT) nach der i.n.- oder i.v.-Applikation von 5,4 mg/kg, 10 mg/kg und 30 mg/kg KGW PB im Gel (i.n., 36 µl/kg oder 67 µl/kg KGW) oder in wässriger Lösung (i.v., 1 ml/kg KGW). Die Stimulation erfolgte 60 min nach Applikation. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Signifikante Unterschiede der Kindling-Parameter nach PB-Applikation im Vergleich zur Vehikelapplikation sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Gruppengrößen bei i.n.-Applikation: 5,4 mg/kg: 10 Tiere; 10 mg/kg: 8 Tiere; Gruppengröße bei i.v.-Applikation: 5,4 mg/kg: 11 Tiere; 10 mg/kg: 10 Tiere; 30 mg/kg: 10 Tiere.

5.2 siRNA-Untersuchungen

5.2.1 EXPRESSIONSREGULATION VON P-GLYCOPROTEIN

In den nachfolgenden Tabellen und Abbildungen sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Expressions-Inhibition von P-gp dargestellt. In einem Vorversuch erhielten jeweils drei bis vier Ratten liposomal verpackte siRNA in einer Dosierung von 37 ng pro Ratte. An die Oberfläche der Liposomen war das Peptid ApoE4 oder ein Nonsens-Peptid gebunden. An eine dritte Gruppe wurde nur DEPC-behandeltes, autoklaviertes PBS verabreicht. Die Expression von P-gp wurde für den Zeitpunkt 24 h nach siRNA-Applikation durch computer-gestützte Auswertung der immunhistochemischen Färbung von P-gp quantifiziert.

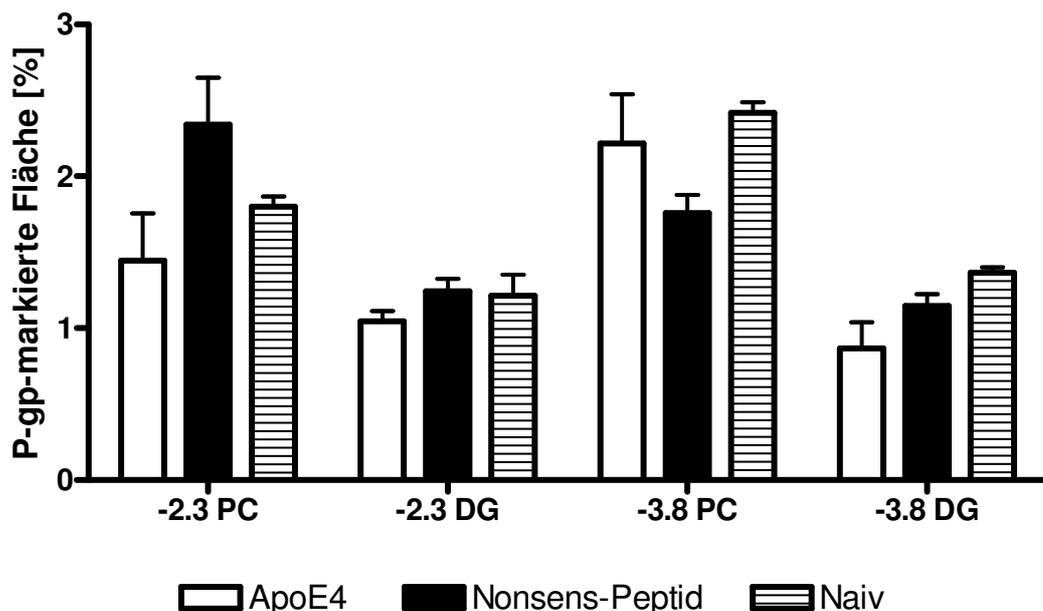


Abbildung 5.23: P-gp-markierte Fläche (oberhalb des Schwellenwertes) in % der Gesamtfläche 24 h nach Applikation. Die siRNA-behandelten Ratten erhielten eine Dosis von 37 ng pro Tier. Die P-gp-markierte Fläche wurde in coronalen Gehirnschnitten im Bereich des piriformen Cortex (PC) und des Gyrus dentatus (GD) -2,3 mm und -3,8 mm relativ zu Bregma gemessen und in Relation zum gesamten Messfeld gesetzt. Pro Tier wurden drei bis zehn Messfelder in die zu messenden Gehirnregionen der linken Gehirnhemisphäre gelegt. Der Durchschnitt der gemessenen Werte ging in den Gruppenmittelwert ein. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler.

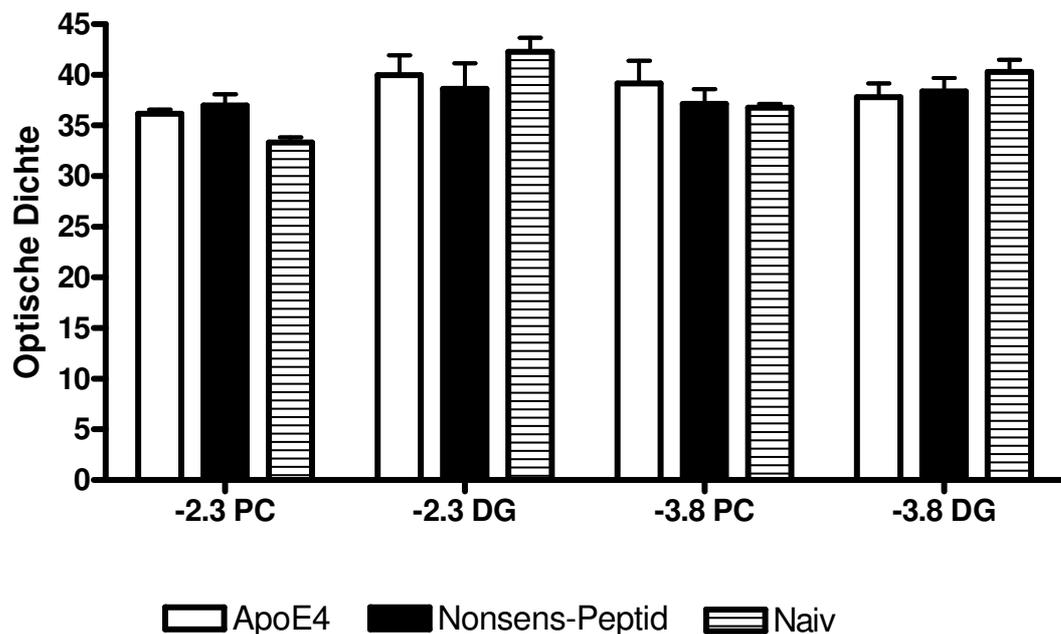


Abbildung 5.24: Optische Dichte (=durchschnittliche Graustufe der P-gp-markierten Fläche oberhalb des Schwellenwertes) 24 h nach Applikation. Die siRNA-behandelten Ratten erhielten eine Dosis von 37 ng pro Tier. Pro Tier wurden drei bis zehn Messfelder in die zu messenden Gehirnregionen der linken Gehirnhemisphäre gelegt. Der Durchschnitt der gemessenen Werte ging in den Gruppenmittelwert ein. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für die Gehirnregionen Piriformer Cortex (PC) und Gyrus dentatus (DG) jeweils -2,3 mm und -3,8 mm relativ zu Bregma.

Die Ergebnisse dieser Vorversuche wurden nicht statistisch ausgewertet, da zum Teil nur Messwerte von zwei Tieren zur Verfügung standen. Da die Ergebnisse keine Hinweise auf eine Inhibition der P-gp-Expression zeigten, wurde die Dosis der siRNA in den anschließenden Untersuchungen auf 15 µg pro Tier erhöht. Um den Einfluss der siRNA-Markierung mit dem FRET-Fluorophor-Paar auf die Effizienz der Expressions-Inhibition von P-gp beurteilen zu können, wurde die liposomal verpackte siRNA sowohl mit als auch ohne Fluoreszenz-Markierung an die Tiere verabreicht. Weiterhin interessierte uns, ob sich die Position der Fluorophore an den siRNA-Strängen auf die Expressions-Inhibition auswirkt. Um dies beurteilen zu können, war die verabreichte siRNA an zwei verschiedenen Positionen mit den Fluorophoren gekoppelt. Die Kontrollgruppe erhielt Liposomen ohne siRNA (Leerliposomen). Alle Liposomen trugen auf der Oberfläche das Peptid ApoE4.

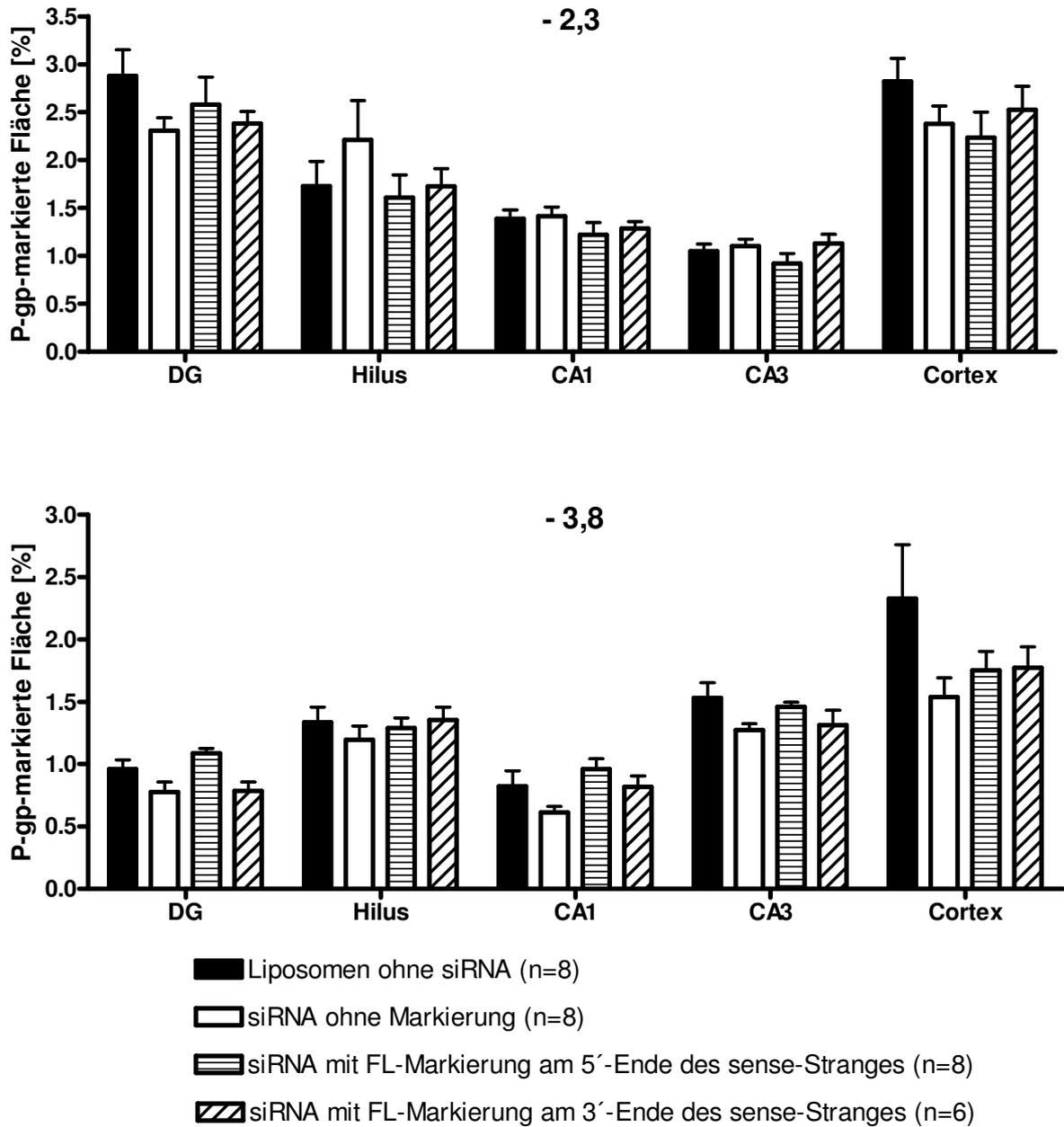


Abbildung 5.25: P-gp-markierte Fläche (oberhalb des Schwellenwertes) in % der Gesamtfläche 24 h nach Applikation von 15 µg siRNA. Die P-gp-markierte Fläche wurde in coronalen Gehirnschnitten -2,3 mm (oben) und -3,8 (unten) relativ zu Bregma gemessen und in Relation zum gesamten Messfeld gesetzt. Pro Tier wurden drei bis zehn Messfelder in die zu messenden Gehirnregionen der linken Gehirnhälfte gelegt. Der Durchschnitt der gemessenen Werte ging in den Gruppenmittelwert ein. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für folgende Gehirnregionen jeweils -2,3 mm relativ zu Bregma: Cortex, Piriformer Cortex (PC), Gyrus dentatus (DG), Hilus, Cornu ammonis 1 (CA1) und Cornu ammonis 3 (CA3).

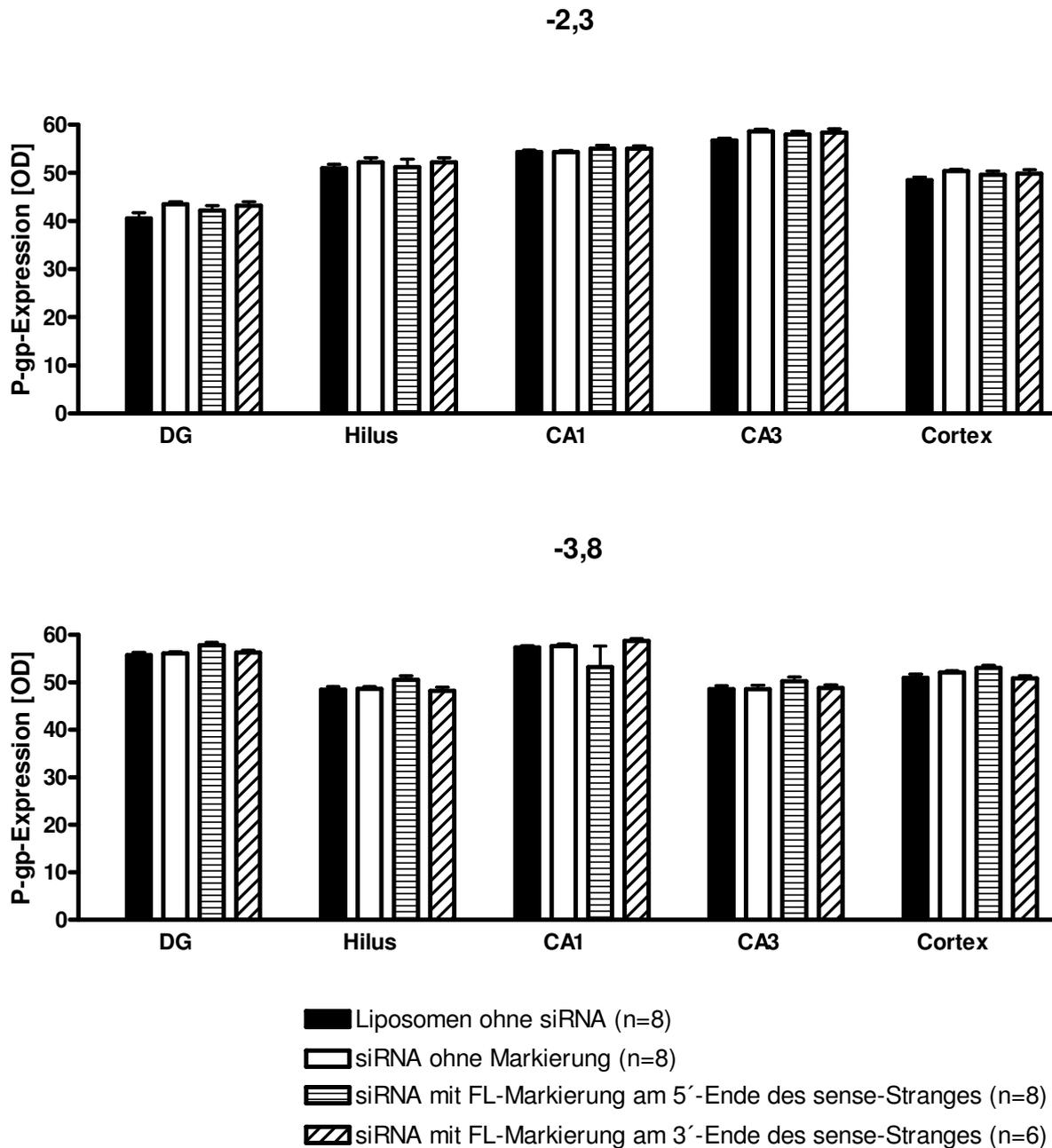


Abbildung 5.26: Optische Dichte (=durchschnittliche Graustufe der P-gp-markierten Fläche oberhalb des Schwellenwertes) 24 h nach Applikation von 15 µg siRNA. Pro Tier wurden drei bis zehn Messfelder in die zu messenden Gehirnregionen der linken Gehirnhemisphäre gelegt. Der Durchschnitt der gemessenen Werte ging in den Gruppenmittelwert ein. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler für folgende Gehirnregionen jeweils -3,8 mm relativ zu Bregma: Cortex, Piriformer Cortex (PC), Gyrus dentatus (DG), Hilus, Cornu ammonis 1 (CA1) und Cornu ammonis 3 (CA3).

5.2.1.1 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER UNTERSUCHUNGEN DER P-GP-EXPRESSION

Die P-gp-markierte Fläche in % der Gesamtfläche sowie die optische Dichte galten als Maß für die Höhe der P-gp-Expression. Die Durchführung des Tests von Kolmogorow-Smirnow ergab das Vorliegen einer Normalverteilung für die Daten. Es wurde eine one-way ANOVA durchgeführt, die ein signifikantes Ergebnis ergab ($p \leq 0,05$). Der als *post hoc*-Test eingesetzte Dunnetts-Test ergab beim Vergleich der siRNA-behandelten Gruppen mit der Vergleichsgruppe (Leerliposomen) keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der P-gp-Expression.

5.2.2 siRNA-VERTEILUNG UND –INTEGRITÄT

Die angefertigten Gehirnschnitte wurden zunächst durch visuelle Betrachtung mit einem Fluoreszenzmikroskop auf das Vorhandensein von Fluoreszenz überprüft. Bei Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm war eine geringe Fluoreszenz in den Endothelzellen der Gehirn-Kapillaren sichtbar, wenn das Emissionsspektrum von Fluorescein (510-540 nm, grüner Kanal) betrachtet wurde. Bei Betrachtung des Emissionsspektrums von Tetramethylrhodamin (570-600 nm, roter Kanal) war eine stärkere Fluoreszenz zu sehen, was auf das Stattfinden des FRET-Effektes hindeutete und somit auf das Vorhandensein intakter siRNA in den Endothelzellen schließen ließ (siehe Kapitel 4.2.2.2.5 und Abbildung 2.8). Die Fluoreszenz in den Endothelzellen war in allen untersuchten Schnittebenen der siRNA-behandelten Ratten von rostral nach caudal sichtbar. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der Gehirnschnitte nicht siRNA-behandelter Ratten wurde jedoch die gleiche Fluoreszenz festgestellt. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Fluoreszenz in den Endothelzellen nicht auf die Anwesenheit fluoreszenz-markierten siRNA zurückzuführen war, sondern möglicherweise durch die Perfusion der Ratten mit Paraformaldehyd erzeugt wurde. Um dies zu überprüfen, wurden naive Ratten zum Vergleich entweder mit Paraformaldehyd perfundiert oder dekapitiert, die Gehirne entnommen und Cryostatschnitte angefertigt. Bei Betrachtung dieser Schnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop unter Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm war bei den perfundierten Tieren eine Fluoreszenz in den Endothelzellen

sichtbar, die der der siRNA-behandelten Ratten entsprach. Bei den dekapitierten Tieren war keine Fluoreszenz festzustellen.

Die Untersuchung der siRNA-Integrität mittels FRET-Effekt am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ergab keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse. Das Stattfinden von FRET konnte sowohl in den Gehirn- als auch Organschnitten festgestellt werden. Allerdings blieb unklar, ob dieser FRET-Effekt durch in geringen Mengen vorhandene siRNA oder die Hintergrundfluoreszenz des mit Paraformaldehyd perfundierten Rattengewebes ausgelöst wurde.

6 DISKUSSION

Epilepsien gehören bei den kleinen Haustieren und beim Menschen zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Bei etwa einem Drittel der Veterinär- und Humanpatienten mit Epilepsien kann kein Behandlungserfolg durch eine Pharmakotherapie erzielt werden, obwohl in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl neuer Antiepileptika entwickelt wurde (Kwan & Brodie, 2006b; Schwartz-Porsche & Jurgens, 1991; Löscher, 2003). Neben Veränderungen in der Pharmakosensitivität von Zielstrukturen der Antiepileptika (Target-Hypothese) ist die Überexpression von Multidrug-Transportern eine der wahrscheinlichsten Ursachen für diese Pharmakoresistenz (Potschka et al., 2004; Rizzi et al., 2002; Volk & Löscher, 2005). Bei einer gesteigerten Expression dieser Transporter an der Blut-Hirn-Schranke im Bereich des epileptischen Fokus kommt es in diesem Bereich zu einem verminderten Eintritt von Antiepileptika, so dass kein therapeutischer Wirkstoffspiegel erreicht wird (Transporter-Hypothese) (Löscher & Potschka, 2005b; Löscher & Potschka, 2005a; Sisodiya & Thom, 2003).

Um die transporter-bedingte Pharmakoresistenz von Epilepsien zu überwinden, werden derzeit mehrere Strategien verfolgt. Eine Strategie ist der kombinierte Einsatz von Antiepileptika mit Hemmstoffen zur Inhibition der Transporter-Funktion, was in Untersuchungen im Tiermodell und in Fallbeispielen aus der Humanmedizin zu einer verbesserten Therapierbarkeit pharmakoresistenter Patienten führte (McAuley et al., 2004; Summers et al., 2004; Brandt et al., 2006; van Vliet et al., 2006). Erste klinische Studien sind in Kürze zu erwarten. Gegenwärtig kann jedoch nicht beurteilt werden, ob sich der Einsatz von Multidrug-Transporter-Hemmstoffen als ein probates Mittel zur Behandlung therapieresistenter Patienten bewähren wird. Die Untersuchung alternativer Strategien zur Überwindung der transporter-basierten Pharmakoresistenz ist daher ein aktuelles Ziel der Epilepsieforschung.

Die Umgehung der Multidrug-Transporter an der Blut-Hirn-Schranke wäre eine denkbare Behandlungsstrategie, die durch eine i.n.-Applikation mit anschließendem neuronalen Transport der Antiepileptika in das Gehirnparenchym pharmakoresistenter Patienten umgesetzt werden könnte. Die Untersuchung dieser Strategie war ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit.

Eine andere mögliche Strategie zur Überwindung transporter-basierter Pharmakoresistenz wäre die Reduktion der Transporter-Expression auf ein physiologisches Niveau. Der vor wenigen Jahren entdeckte Mechanismus der RNAi ermöglicht grundsätzlich eine spezifische Inhibition der Genexpression auf mRNA-Ebene (Fire et al., 1998). Bei pharmakoresistenten Epilepsiepatienten stellt der Multidrug-Transporter P-gp ein mögliches Angriffsziel für siRNA-Moleküle dar. Das zweite Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, die Umsetzbarkeit einer Reduktion der P-gp-Expression *in vivo* an Ratten zu untersuchen.

6.1 Intranasale Applikation

Viele Arbeiten der letzten Jahre untersuchten die Möglichkeit des Arzneimitteltransportes aus der Nasenhöhle in das Gehirn (Mathison et al., 1998). Studien in Tiermodellen und am Menschen konnten die Effektivität dieses Applikationsweges für Makromoleküle, wie Hormone und neuroprotektive Substanzen, und ebenso für kleine Moleküle, wie Antibiotika und ZNS-Therapeutika, nachweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Möglichkeit dieses Transportweges in einem Rattenmodell auch für Antiepileptika untersucht werden. Für Benzodiazepine, die in der Veterinär- und Humanmedizin zur Behandlung von Anfalls-Clustern oder eines Status epilepticus herangezogen werden, wurde nach i.n.-Applikation bereits eine schnelle Absorption in die Blutbahn und das Erreichen therapeutischer Gehirnkonzentrationen beschrieben (Kendall et al., 1997; Fisgin et al., 2002; Lindhardt et al., 2002; Vyas et al., 2005). Weiterhin wurde für das zur Langzeittherapie von chronischer Epilepsie eingesetzte Antiepileptikum CBZ kürzlich eine höhere Effektivität der i.n.-Applikation im Vergleich zur i.v.-Applikation in einem Rattenmodell gezeigt (Barakat et al., 2006). Für weitere Antiepileptika, die zur dauerhaften Epilepsie-Therapie bei kleinen Haustieren und dem Menschen eingesetzt werden, wurden bisher keine Untersuchungen zur i.n.-Applikation publiziert. Gegenwärtig liegen auch keine Untersuchungen zur antikonvulsiven Wirkung i.n. verabreichter Antiepileptika in einem Tiermodell für chronische Epilepsie vor.

6.1.1 ETABLIERUNG EINES RATTENMODELLS ZUR INTRANASALEN APPLIKATION

Die Fragestellungen zur i.n.-Applikation wurden in Form von Mikrodialyse-Untersuchungen und Gehirnpräparationen an nicht epileptischen Ratten sowie anhand von Dosis-Wirkungs-Versuchen im Amygdala-Kindling-Modell der TLE bearbeitet.

Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurde eine Reihe von Voruntersuchungen durchgeführt, um ein Modell zur i.n.-Applikation an Ratten zu etablieren. Bei diesen Vorversuchen wurde schnell deutlich, dass eine i.n.-Applikation an der wachen, fixierten Ratte wenig standardisierbar ist. Die Tiere zeigten starke Abwehrbewegungen, wodurch es während des Applikationsvorganges zu Läsionen der Nasenschleimhaut mit leichtem Nasenbluten kam. Weiterhin „schnieften“ sie teilweise erhebliche Mengen der applizierten Substanz wieder aus. Da eine längere Narkose aufgrund der geplanten Versuche im Amygdala-Kindling-Modell nicht in Frage kam (die Stimulation der Tiere zur Bestimmung der Kindling-Parameter musste im Wachzustand erfolgen), wurde eine durch i.v.-Applikation des Anästhetikums Propofol erzeugte Kurznarkose von 5 bis 10 minütiger Dauer eingesetzt. Die i.n.-Applikation war dadurch besser zu standardisieren.

In dem etablierten Rattenmodell zur i.n.-Applikation wurden zunächst Vorversuche mit verschiedenen Antiepileptika durchgeführt, um ein geeignetes Antiepileptikum auszuwählen, für das die geplanten Untersuchungen besonders vielversprechend erschienen. Im Rahmen der Vorversuche wurden auch verschiedene pharmazeutische Formulierungen getestet. Ziel war es, eine möglichst gute Wirkstoffabsorption und eine möglichst hohe Bioverfügbarkeit der Antiepileptika zu erreichen.

6.1.2 INTRANASALE APPLIKATION VON CARBAMAZEPIN

Zur i.n.-Applikation von CBZ wurden Mikrodialyse-Untersuchungen im Bereich des rechten frontalen Cortex an Ratten durchgeführt. Die i.n.-Applikation wurde in Anlehnung an eine von Barakat et al. (2006) veröffentlichte Studie vorgenommen, die

fünf bis zwanzig min nach i.n.-Applikation von 0,2 mg CBZ pro kg KGW signifikant höhere Gehirn-Konzentrationen im Vergleich zur i.v.-Applikation von 8 mg CBZ pro kg KGW ergeben hatte. Wie in der Studie war CBZ im HPMC-CBP-Gel in einer Dosierung von 0,2 mg/kg KGW an in Rückenlage befindliche Ratten 2 cm tief in das rechte Nasenloch verabreicht worden. Bei den vorliegenden Untersuchungen ergab die HPLC-Bestimmung nach i.n.-Applikation jedoch nur eine geringe CBZ-Konzentration im Plasma der untersuchten Ratten; im Dialysat als Abbild der Extrazellulärkonzentration war kein CBZ bestimmbar. Als mögliche Ursache für die Diskrepanz dieser Ergebnisse kam infrage, dass bei den von uns durchgeführten Mikrodialyse-Untersuchungen nur die Extrazellulärkonzentration von CBZ im rechten frontalen Cortex betrachtet wurde, bei den von Barakat et al. (2006) durchgeführten Gehirnpräparationen jedoch der Gehalt an CBZ im gesamten Extra- und Intrazellulärraum des ganzen Gehirns. Dieser Überlegung folgend, versuchten wir eine Reproduktion der Studie für den Zeitpunkt 10 min nach Applikation. Für diesen Zeitpunkt war die CBZ-Gehirnkonzentration in der Veröffentlichung mit 10,5 µg/g angegeben. Im Unterschied zu der veröffentlichten Studie wurden die Ratten von uns kurzzeitig narkotisiert und nach der Applikation für 4 min in Rückenlage fixiert. Die i.n.-Applikation war, wie bereits angesprochen, unserer Erfahrung nach an einer narkotisierten Ratte deutlich zielgenauer und verlustärmer durchführbar, als an einer wachen, nur fixierten Ratte. Durch die Fixierung der Ratten in Rückenlage sollte ein längerer Kontakt der applizierten Substanz-Formulierung mit dem nasalen Epithel erreicht werden. Zudem diente die Maßnahme dazu, ein sofortiges Abschlucken der Formulierung zu verhindern. Wir gingen von einer potentiell längeren Verweildauer des CBZ-haltigen Gels auf der Nasenschleimhaut aus und erwarteten als Ergebnis der vorliegenden Studie eine mindestens ebenso effektive Absorption von CBZ im Vergleich zu der veröffentlichten Studie. Die HPLC-Analyse ergab jedoch nach i.n.-Applikation keine nachweisbare CBZ-Konzentration im Gehirn; die Plasma-Konzentration lag nur knapp über der Nachweisgrenze. Die i.v.-Applikation resultierte in den vorliegenden Untersuchungen jedoch in einer etwa vierfach höheren Gehirn-Konzentration von CBZ als in der veröffentlichten Studie.

Anhand der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass ein Großteil des CBZ nach i.n.-Applikation schnell über die in der Submukosa befindlichen Kapillaren in die Blutbahn absorbiert wurde. Aufgrund der niedrigen verabreichten Dosis ist in Erwägung zu ziehen, dass eventuell im Gehirn vorhandenes CBZ mit der verwendeten HPLC-Analyse nicht nachweisbar war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Vorversuche unter den Bedingungen der Versuchsdurchführung keinen Hinweis auf einen intra- oder extraneuronalen Transport von CBZ aus der Nasenhöhle in das Gehirn ergaben. Nach derzeitigem Wissensstand lassen sich die großen Unterschiede zwischen den Resultaten der beiden Studien nicht erklären. Der Unterschied in der Applikationsweise spielt aber aller Wahrscheinlichkeit nach eine untergeordnete Rolle für die große Diskrepanz der Ergebnisse.

Da es nicht möglich war, CBZ in einer höheren Konzentration in dem HPMC-CBP-Gel zu lösen, und eine Erhöhung des applizierten Volumens eine Überschreitung der Aufnahmekapazität der Rattennasenhöhle bedeutet hätte, wurden keine weiteren Untersuchungen mit CBZ durchgeführt.

6.1.3 INTRANASALE APPLIKATION VON LAMOTRIGIN

Zunächst sollte anhand von Mikrodialyse-Untersuchungen im rechten frontalen Cortex der Ratten ermittelt werden, mit welcher Formulierung höhere LTG-Konzentrationen im Dialysat nach i.n.-Applikation erlangt werden konnten.

Die Ergebnisse aus diesem Vorversuch ergaben Anhaltspunkte dafür, dass eine i.n.-Applikation von LTG in Gel-Emulsion im Vergleich zur *Aqua bidest.*-Lösung zu tendenziell höheren Konzentrationen sowohl im Extrazellulärraum des Gehirns als auch im Plasma führte. Betrachtete man die gemessenen Dialysat-Konzentrationen im Verhältnis zu den Plasma-Konzentrationen (Dialysat-Plasma-Ratio), ergaben sich Hinweise auf eine höhere mittlere Ratio nach i.n.-Applikation in der Gel-Emulsion. Dies kann auch als Anhaltspunkt dafür dienen, dass mukoadhäsive Formulierungen in einer vergleichsweise stärkeren Absorption resultieren. Die Daten wurden nicht statistisch ausgewertet, da im Rahmen dieses Vorversuchs nur jeweils zwei Tiere

untersucht wurden. Sie dienten vielmehr als Entscheidungshilfe für eine LTG-Formulierung, die in den weiteren Untersuchungen eingesetzt werden sollte.

Für die weiteren Mikrodialyse-Untersuchungen wurde die i.n.-Applikation von LTG als Gel-Emulsion vorgenommen. Dabei führten die i.n.- und i.v.-Applikationen zu vergleichbaren LTG-Konzentrationen im Plasma und im Dialysat des rechten frontalen Cortex, so dass wie nach i.n.-Applikation von CBZ eine schnelle Aufnahme in die Blutbahn am plausibelsten erscheint. In Studien zur Pharmakokinetik und Wirksamkeit von LTG (Castel-Branco et al., 2003) ergab sich die höchste LTG-Konzentration im Plasma 15 min nach Applikation, was mit den Ergebnissen der vorgenommenen Untersuchungen übereinstimmt. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben sich 90 min nach i.p.-Applikation von 10 mg/kg LTG maximale Dialysat-Konzentrationen von 429 ng/ml (Potschka et al., 2002). Diese therapeutischen Konzentrationen wurden nach i.n.- und i.v.-Applikation von LTG (4 mg/kg KGW) etwa zur Hälfte erreicht, was vermuten lässt, dass die Gehirnaufnahme von LTG nach i.p.-, i.v.- und i.n.-Applikation vergleichbar ist.

Die statistische Auswertung der Dialysat-, Plasma- und Ratiowerte nach i.n.- und i.v.-Applikation ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Applikationsformen. Ein Vergleich der Ratios nach i.v.- und i.n.-Applikation kann Hinweise darauf geben, ob neben einer direkten Absorption vom Blut in das Gehirngewebe weitere Transportwege eine Rolle spielen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen geben folglich keinen Hinweis darauf, dass eine i.n.-Applikation von LTG im Vergleich zur i.v.-Applikation zu einem effektiveren Transport von LTG in das Gehirn führt. Eine denkbare Erklärung dafür ist, dass nach der i.n.-Applikation der überwiegende Teil des LTG über das stark vaskularisierte respiratorische Epithel umgehend in die Blutbahn absorbiert wurde und von dort in das Gehirn gelangte.

Für eine detailliertere Erläuterung der vorliegenden Ergebnisse ist eine genauere Betrachtung der Physiologie der Nasenhöhle und der Substanzeigenschaften von LTG erforderlich. Die Eigenschaften von LTG, CBZ und PB sind sehr ähnlich, so dass nachfolgend Beschriebenes auch für CBZ und PB gilt. Bei der i.n.-Applikation von LTG in Gel-Emulsion 2 cm tief in die Nasenhöhle einer in

Rückenlage positionierten Ratte ist davon auszugehen, dass sowohl das olfaktorische als auch das respiratorische Epithel, die bei der Ratte etwa die Hälfte der Nasenhöhle auskleiden (Gizurason, 1990; Merkus et al., 2006), von der Gel-Emulsion erreicht werden. Dann ergeben sich für lipophile Moleküle wie LTG die Möglichkeiten eines intra-, peri- sowie extraneuronalen Transportes in das Gehirnparenchym oder die CSF und die einer Absorption in die Blutbahn. Bevor eine Substanz den intra- oder extraneuronalen Transport antritt, muss sie zunächst durch die olfaktorischen oder respiratorischen Epithelzellen transportiert werden. In diesem Zusammenhang wird die Diffusion als ein Hauptmechanismus für den Transport kleiner und lipophiler Moleküle wie LTG (MW = 257 g/mol) beschrieben (Mathison et al., 1998; Sakane et al., 1994; Sakane et al., 1995). Es ist daher als wahrscheinlich anzusehen, dass das LTG sowohl im Bereich der olfaktorischen als auch respiratorischen Region mittels Diffusion durch die nasale Mukosa bis in den sich anschließenden subarachnoidalen Raum gelangte und aus der sich dort befindlichen CSF in das von der CSF umspülte Gehirnparenchym diffundiert ist. Bei dem Transport durch die Mukosa diffundierte ein großer Teil des LTG sehr wahrscheinlich auch in die Kapillaren der nasalen Submukosa und wurde dann durch die Blutbahn das Gehirn transportiert.

Als weitere potentielle Eintrittsstellen für LTG in das Gehirn kommen die freien Nervenendigungen des N. olfactorius im olfaktorischen und die des N. trigeminus im respiratorischen Epithel in Frage. Ein sich anschließender passiver intraneuronaler Transport würde Stunden bis Tage benötigen, um bestimmte Gehirnregionen zu erreichen. Da die im zeitlichen Verlauf betrachtete Konzentration von LTG im Extrazellulärraum des Gehirns (Dialysat-Konzentration) sowie die Dialysat-Plasma-Ratio keine Hinweise auf einen langsamen Transportweg ergaben, ist ein intraneuronaler Transportweg für LTG als eher unbedeutend einzustufen.

Das nasale Epithel weist verschiedene Barrieren für die Substanzaufnahme aus der Nasenhöhle in das Gehirn auf, die die Bioverfügbarkeit einschränken können (Kandimalla & Donovan, 2005). In diesem Zusammenhang wurde für Mäuse und den Menschen eine P-gp-Expression in den Epi- und Endothelzellen des nasalen Epithels beschrieben (Graff & Pollack, 2005a; Wioland et al., 2000). Kandimalla und

Donovan (2005) stellten bei Untersuchungen der Nasenhöhle von Rindern fest, dass P-gp an der apikalen Oberfläche des olfaktorischen und respiratorischen Epithels, den in der Submukosa gelegenen Endothelzellen sowie den lokalen Lymphgefäßen exprimiert wird. Da Antiepileptika nur schwache P-gp-Substrate sind, ist nicht klar, ob die physiologische P-gp-Expression an dieser Lokalisation einen Einfluss auf den Transport von Antiepileptika aus der Nase in das Gehirn hat. Eine Überexpression von P-gp wurde bisher nur für Gehirnbereiche beschrieben, in denen epileptische Anfälle entstehen oder sich ausbreiten (Löscher & Potschka, 2005b; Sisodiya & Thom, 2003), so dass eine Überexpression an der Barriere zwischen Nase und Gehirn bei pharmakoresistenten Patienten eher nicht zu erwarten ist.

Sind Moleküle aus der Nase in die CSF gelangt, kann zudem der Transport von dort in das Gehirn behindert werden. Zum einen ist die Flussrichtung der CSF gegen die Diffusionsrichtung niedermolekularer Moleküle gerichtet, was den Übertritt in das Gehirnparenchym erschwert. Hinzu kommt ein hoher „Turnover“ der CSF im Vergleich zur Diffusionsrate (Pardridge, 1991). Bezogen auf den Transportweg von LTG nach i.n.-Applikation ist daher davon auszugehen, dass aktive und passive Mechanismen die Absorption aus der CSF in das Gehirn einschränken können.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass nach i.n.-Applikation von LTG eine Diffusion in die Kapillaren der Submukosa mit anschließender Aufnahme in das Gehirn aus der Blutbahn stattfindet. Parallel dazu könnte ein extraneuronaler Transport in die CSF und von dort in das Gehirnparenchym stattfinden. Da die i.n.-Applikation bei vergleichbarer Plasma-Konzentration in keiner signifikanten Erhöhung der Gehirnkonzentration im Vergleich zur i.v.-Applikation resultierte, gibt es keine Hinweise darauf, dass der Transport von LTG in das Gehirnparenchym aus der Nasenhöhle effektiver ist als nach i.v.-Applikation.

6.1.4 INTRANASALE APPLIKATION VON PHENOBARBITAL

Zur i.n.-Applikation von PB wurden Mikrodialyse-Untersuchungen, Konzentrationsbestimmungen im Gesamtgehirn sowie in präparierten Einzelregionen des Gehirns und Dosis-Wirkungs-Versuche im Amygdala-Kindling-Modell der TLE durchgeführt.

6.1.4.1 MIKRODIALYSE

PB ist wie LTG ein niedermolekulares (MW = 232 g/mol) und lipophiles Molekül. Daher ist nach i.n.-Applikation wie bereits erläutert von einer parallelen Aufnahme von PB in die Blutbahn und in die CSF auszugehen. Die Mikrodialyse-Untersuchungen ergaben zu den Zeitpunkten 30, 60, 90 und 120 min nach Applikation signifikant höhere Dialysat- und Plasma-Konzentrationen für die i.n.-Applikation von PB im Gel verglichen mit der i.n.-Applikation in wässriger Lösung und der i.v.-Applikation. Diese Ergebnisse lassen einen direkten Transport von PB aus der Nasenhöhle in das Gehirn nicht sehr wahrscheinlich, aber möglich erscheinen. Da sich für die Dialysat-Plasma-Ratio jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Applikationsformen ergaben, ist die Aufnahme von PB in das Gehirn über den potentiellen intra- oder extraneuronalen Transportweg keinesfalls effektiver als die Absorption nach i.v.-Applikation.

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurde die i.n.-Applikation von PB in einer mukoadhäsiven Gel-Formulierung mit der in einer wässrigen Formulierung verglichen. Die Ratio lag 30 min nach i.n.-Applikation von PB im Gel signifikant höher als nach i.n.-Applikation in wässriger Lösung. Dies weist darauf hin, dass eine effektivere Absorption aus der Nasenschleimhaut stattfindet, wenn eine i.n.-Applikation in mukoadhäsiver Formulierung durchgeführt wird. Zurückzuführen ist die effektivere Absorption im vorliegenden Fall auf den Retard-Effekt der eingesetzten Gel-Formulierung. Die Ergebnisse decken sich mit den Resultaten publizierter Untersuchungen. Bei i.n.-Applikation des Benzodiazepins Clonazepam an Ratten konnte eine höhere Effektivität durch Verwendung einer mukoadhäsiven Formulierung erzielt werden, die Vyas et al. (2006) durch eine längere Verweildauer auf der nasalen Schleimhaut zurückführt. Ebenso ergab eine Studie kürzlich, dass die Verwendung mukoadhäsiver Zusätze auch beim Menschen zu verlängerten Retentionszeiten auf der nasalen Mukosa im Vergleich zu nicht mukoadhäsiven Formulierungen führt (Charlton et al., 2007).

Im Gegensatz zu den Applikationen von CBZ und LTG wurde PB abwechselnd in beide Nasenlöcher im Abstand von etwa 2 min und aufgrund besserer Löslichkeit in einem deutlich kleineren Volumen (36 µl/kg im Vergleich zu 197 µl/kg) appliziert.

Das Erreichen der vergleichsweise hohen Dialysat- und Plasma-Konzentrationen von PB ist möglicherweise auf diese fraktionierte Applikation zurückzuführen. Durch die mukoadhäsive Formulierung stand das PB über einen längeren Zeitraum für die Absorption zur Verfügung. Zusätzlich war durch die Applikation in beide Hälften der Nasenhöhle eine größere Kontaktfläche für die Formulierung vorhanden. Es ist davon auszugehen, dass diese Faktoren eine allmähliche Absorption von PB in die Blutbahn, Nervenzellen und CSF und herbeigeführt haben. Durch diese schrittweise Absorption wären auch die 30 min nach i.n.-Applikation weiterhin ansteigende Dialysat-Konzentration und die nur langsam abfallende Plasma-Konzentration erklärbar.

6.1.4.2 GEHIRNPRÄPARATIONEN

Bei den Mikrodialyse-Untersuchungen war es nicht möglich, Dialysat-Proben vor Ablauf von 15 min nach Applikation der HPLC-Messung zuzuführen, da für diese eine Dialysat-Menge von mindestens 30 µl benötigt wurden. Um das Zeitprofil zu ergänzen und Informationen über den Gehalt an PB im gesamten Gehirn zu erhalten, wurde die PB-Konzentration nach Entnahme des gesamten Gehirns auch zu früheren Zeitpunkten nach Applikation bestimmt.

Die PB-Bestimmung 5 und 10 min nach i.n.- bzw. i.v.-Applikation von 30 mg/kg KGW ergab tendenziell höhere Konzentrationen im Gehirn und Plasma nach der i.v.-Applikation als nach i.n.-Applikation. Der Versuch war zur Orientierung durchgeführt worden und wurde nicht statistisch ausgewertet, da nur zwei Tiere pro Zeitpunkt und Applikationsart untersucht wurden. Gizurason (1990) nennt als Richtwert für die Aufnahmekapazität einer Rattennasenhöhle ein Volumen von insgesamt 400 µl. Ein mögliche Erklärung für die niedrigen Werte nach i.n.-Applikation, die in diesem Fall in Anlehnung an Barakat et al. (2006) einseitig und mit einem Volumen von 197 µl/kg KGW stattgefunden hatte, könnte sein, dass das nasale Aufnahmevermögen nach Applikation überschritten war und zu einem teilweisen Abschlucken der Substanz führte. Weiterhin stand nur das Epithel einer Nasenhöhlenhälfte mit dem Gel in sofortigem Kontakt, was eine kleinere Aufnahmefläche bedeutete. Die Applikation von 30 mg/kg KGW in einem kleineren

Volumen war aufgrund der Löslichkeit von PB jedoch nicht möglich. Eine zusätzliche Erklärungsmöglichkeit für die Ergebnisse könnte sein, dass ein stattfindender PB-Transport aus der Nasenhöhle in das Gehirn verglichen mit der Aufnahme nach i.v.-Applikation längere Zeit in Anspruch nahm und zu den Untersuchungszeitpunkten (5 und 10 min nach Applikation) erst eine geringe Menge das Gehirngewebe erreicht hatte.

Die i.n.-Applikation von 5,4 g/kg KGW PB für die Bestimmung der PB-Konzentration im Gesamtgehirn war fraktioniert in beide Nasenhöhlenhälften vorgenommen worden. Die Konzentrationen im Gesamtgehirn lagen zu den Zeitpunkten 10 und 30 min tendenziell höher als nach i.v.-Applikation; die Plasma-Konzentration 10 min nach i.n.-Applikation war signifikant höher als nach i.v.-Applikation. Diese niedrigeren Konzentrationen nach i.v.-Applikation könnten durch eine schnelle Umverteilung von PB in Organe und Gewebe nach i.v.-Applikation begründet sein, während das PB nach i.n.-Applikation nur allmählich über das nasale Epithel in die Blutbahn aufgenommen werden konnte. Die Gehirn-Plasma-Ratio der beiden Applikationsformen lag mit kleinen Abweichungen auf gleicher Höhe und spricht ebenso wie die Ergebnisse der Mikrodialyse-Untersuchungen für eine effektive Absorption von PB in die Blutbahn, lässt einen parallelen Ablauf eines direkten Transportweges aber auch möglich erscheinen. Eine Aussage darüber, wie groß ein auf direktem Wege in das Gehirngewebe transportierter Anteil von PB sein kann, kann anhand der Ergebnisse nicht getroffen werden.

Um Informationen darüber zu erhalten, ob und wie sich PB nach i.n.-Applikation in rostro-caudaler Richtung im Gehirngewebe verteilt, wurden 10 min nach i.n.- und i.v.-Applikation Präparationen von Gehirnregionen vorgenommen. Die HPLC-Analyse resultierte in einer signifikant höheren PB-Konzentration im Bulbus olfactorius nach i.n.-Applikation im Vergleich zur i.v.-Applikation. In den anderen Regionen lagen die Konzentrationen bei beiden Applikationsformen auf vergleichbarer Höhe. Die Gehirn-Plasma-Ratio ergab nach i.n.-Applikation im Bulbus olfactorius ebenfalls einen signifikant höheren Wert. Im Bereich der Amygdala, des parahippocampalen Cortex, dem Cerebellum und der Pons war jedoch die Konzentration nach i.v.-Applikation

signifikant höher als nach i.n.-Applikation. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass ein direkter Transport von PB aus der Nasenhöhle in den Bulbus olfactorius sehr wahrscheinlich ist, und der mindestens bis zum Zeitpunkt 10 min effektiver ist als die Absorption nach i.v.-Applikation. Als ein potentieller direkter Aufnahmeweg für PB kommt die Aufnahme in die Neuronenendigungen des N. olfactorius mit anschließendem axonalen Transport bis in den Bulbus olfactorius in Frage (intraneuronaler Weg). Ein weiterer potentieller Transportweg für PB als kleines und lipophiles Molekül ist die Diffusion durch die Mukosa in den subarachnoidalen Raum mit der dort befindlichen CSF, wodurch die CSF, die den Bereich des Bulbus olfactorius umspült, eine hohe PB-Konzentration enthalten kann. Aus der CSF kann das PB weitgehend ungehindert in das Gehirnparenchym diffundieren. Limitierenden Einfluss nehmen hier allerdings der hohe „Turnover“ sowie die Flussrichtung der CSF, die entgegen der Diffusion verläuft (Pardridge, 1991). Auch durch diesen Transportweg würden sich also die signifikant höheren Werte im Bereich des Bulbus olfactorius nach i.n.-Applikation erklären lassen (extraneuronaler Weg). Vermutlich erfolgt der Weitertransport innerhalb des Gehirns (nach Ankunft auf dem intra- oder extraneuronalen Transportweg) jedoch so langsam, dass in den weiter caudal gelegenen Gehirnregionen die Absorption nach i.v.-Applikation überlegen ist. Der Auswärtstransport von PB aus dem Gehirnparenchym entlang eines Konzentrationsgefälles in die Endothelzellen und von dort über die Efflux-Transporter in das kapilläre Lumen reduziert zusätzlich die für die Verteilung in weiter caudal gelegene Gehirnregionen zur Verfügung stehende Menge an PB. Als dritte Erklärungsmöglichkeit für die höheren Konzentrationen im Bulbus olfactorius nach i.n.-Applikation kommt die Diffusion von PB in die Kapillaren der nasalen Submukosa und die anschließende PB-Aufnahme in das Gehirnparenchym aus der lokalen Gefäßversorgung über die Blut-Hirn-Schranke in Frage (systemischer Weg).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen mittels Mikrodialyse und Präparation von einzelnen Gehirnregionen stimmen mit den Ergebnissen veröffentlichter Studien zur i.n.-Applikation lipophiler Moleküle überein. In diesen Studien wurden ebenfalls vergleichbare Ratios von Gehirn- und Plasma-

Konzentrationen nach i.n.- und i.v.-Applikation festgestellt (van den Berg et al., 2004b; Shi et al., 2005; Yang et al., 2005). Dahlin et al. (2000) beschreiben 30 min nach i.n.-Applikation signifikant höhere Dopamin-Konzentrationen im Bulbus olfactorius im Vergleich zur i.v.-Applikation.

Anhand der Ergebnisse ist der parallele Ablauf der drei beschriebenen Wege am wahrscheinlichsten. Die Absorption von PB in die Kapillaren der Submukosa mit anschließender Absorption in den Bulbus olfactorius ist wahrscheinlich, kann die Entstehung der hohen und lokal begrenzten PB-Konzentrationen alleine jedoch nicht erklären. Ein intraneuronalen Transportweg als Ursache für die hohen lokalen Konzentrationen ist weniger wahrscheinlich, weil dieser oft Stunden bis Tage in Anspruch nimmt und sich damit die gezeigte höhere Effektivität zu einem frühen Zeitpunkt nicht plausibel erklären lässt. Der Transportweg über die CSF und von dort in das Gehirn ist ebenfalls wahrscheinlich und geeignet, die hohen lokalen Konzentrationen zu erklären. Dieser extraneuronale Weg wird aber von einigen Autoren aufgrund des hohen „Turnovers“ der CSF grundsätzlich infrage gestellt (Graff & Pollack, 2005b).

6.1.4.3 VERSUCHE IM AMYGDALA-KINDLING-MODELL

Ziel der Untersuchungen im Amygdala-Kindling-Modell der TLE war es, die i.n.-Applikation von PB auf ihre antikonvulsive Wirkung und eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit zu überprüfen. In einem Vorversuch wurde ermittelt, ob die Propofol-Narkose einen Einfluss auf die Kindling-Parameter hatte, was nicht der Fall war. Die antikonvulsive Wirkung wurde anhand signifikanter Unterschiede zwischen den Kindling-Parametern bestimmt.

Bei Versuchen, in denen die Applikation von 5,4 mg/kg und 30 mg/kg in einem Volumen von 197 µl/kg in nur eine Nasenhälfte erfolgte, konnte keine antikonvulsive Wirkung festgestellt werden. Dies lässt sich, wie bereits angeführt, durch ein Abschlucken des Gels aufgrund limitierter Aufnahmekapazität der Rattennasenhöhle und zu kleiner Kontaktfläche mit dem nasalen Epithel, erklären. Die Bestimmung der Gesamtgehirn-Konzentration nach i.n.-Applikation von PB in dem gleichen Volumen führte zu konformen Ergebnissen.

Durch die Aufnahmekapazität der Nasenhöhle ergibt sich eine Begrenzung der i.n.-applizierbaren Dosis. In diesem Zusammenhang sind Studien interessant, die Mehrfachapplikationen in die Nase als effektive Methode zur Erzielung therapeutischer Effekte beschreiben. Ross et al. (2004) erzielten durch die tropfenweise Applikation von Interferon- β abwechselnd im Abstand von 2-3 min in beide Nasenlöcher an narkotisierten Ratten (Gesamtvolumen 80 bis 120 μ l) eine signifikant höhere Konzentration in der CSF als nach i.v.-Applikation. Li et al. (2000) berichten, dass sie durch zwei aufeinander folgende i.n.-Applikationen von Benzodiazepinen im Abstand von 5 min an Kaninchen therapeutische Konzentrationen erzielen konnten. Eine häufigere Verwendung des nasalen Applikationsweges birgt allerdings das Risiko von Schädigungen der Nasenschleimhaut (Talegaonkar & Mishra, 2004). Erkrankungen des oberen Respirationstraktes können phasenweise die Effektivität der Substanzaufnahme ebenfalls beeinflussen (Talegaonkar & Mishra, 2004).

Die i.n.-Applikation von 5,4 mg/kg PB in einem Volumen von 36 μ l/kg KGW im Gel führte jedoch zu einer signifikanten Senkung der Anfallsstärke, die vergleichbare i.v.-Applikation resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Nachentladungsschwellen sowie der generalisierten Anfallsschwellen. 10 mg/kg bewirkten nach i.n.- sowie nach i.v.-Applikation eine signifikante Erhöhung der Nachentladungsschwellen und generalisierten Anfallsschwellen. Diese Ergebnisse zeigen im Amygdala-Kindling-Modell eine antikonvulsive Wirkung nach i.n.-Applikation von PB bei einer Dosis von 5,4 bzw. 10 mg/kg KGW, die sich in der Erhöhung der Nachentladungsschwellen und Senkung der Anfallsstärke äußerte. Die antikonvulsive Wirkung ist nach Verabreichung von 10 mg/kg KGW stärker, als nach Applikation von 5,4 mg/kg KGW; das heißt, es besteht eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit nach i.n.-Applikation.

Eine fraktionierte i.n.-Applikation von 30 mg/kg PB führte zu Apnoe oder schwerer Atemdepression der Tiere, so dass der Versuch abgebrochen wurde und keine Daten zur Verfügung stehen. Die Symptome wurden auf die gleichzeitige Verabreichung einer höheren Propofol-Dosis (für die fraktionierte Applikation in dieser hohen PB-Dosierung wurde eine längere Narkose benötigt) in Kombination mit

30 mg/kg PB zurückgeführt. Die schwere Atemdepression der Tiere lässt darauf schließen, dass nach fraktionierter i.n.-Applikation von 30 mg/kg PB Gehirnkonzentrationen in einer Höhe erreicht wurden, die gemeinsam mit Propofol die schwere Atemdepression auslösen konnten. Nach einer i.v.-Applikation von 30 mg/kg unterschieden sich bis auf die Anfallsschwelle bei der Nachentladungsschwelle sämtliche Kindling-Parameter signifikant von den Ergebnissen des Vehikelkontrollversuches. Diese Applikation in Verbindung mit der gleichen erhöhten Propofol-Dosis verlief komplikationslos. Es ist daher davon auszugehen, dass bereits wenige Minuten nach i.n.-Applikation hohe PB-Konzentrationen im Bereich des Atemzentrums vorlagen, so dass die aufgetretenen Symptome ausgelöst werden konnten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nach i.n.-Applikation von 5,4 und 10 mg/kg PB eine antikonvulsive Wirkung im Amygdala-Kindling-Modell der TLE festgestellt werden konnte. Die Wirkung entsprach der nach i.v.-Applikation gleicher Dosis und war dieser somit an Effektivität gleichgestellt. Zudem konnte eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit festgestellt werden. Die höchste erreichte Effektivität ergab sich bei i.v.-Applikation von 30 mg/kg KGW. Aufgrund der lebensbedrohlichen Wirkung nach fraktionierter i.n.-Applikation von 30 mg/kg KGW PB erfolgte keine Bestimmung der Kindling-Parameter für diese Dosis. Die Symptomatik der schweren Atemdepression lässt sich jedoch durch das Erreichen sehr hoher PB-Konzentrationen im Gehirn erklären.

6.1.5 EXTRAPOLATION

Die Extrapolation von Tierversuchsergebnissen zur i.n.-Applikation auf andere Spezies, wie Hund und Mensch, setzt die Wahl eines geeigneten Tiermodells voraus (Gizurarson, 1990). Das am weitesten verbreitete Tiermodell für die i.n.-Applikation ist das Ratten-Modell. Allerdings wurden nur wenige Substanzen in gleicher Formulierung an Mensch, Hund und Ratte verabreicht, so dass kaum Daten zum Ergebnisvergleich zur Verfügung stehen (Gizurarson, 1990; Lindhardt et al., 2002). Unterschiede in den Absorptionsraten sind durch die speziestypische Anatomie der Nasenhöhle zu begründen. Während bei der Ratte respiratorisches und

olfaktorisches Epithel zu gleichen Anteilen vertreten sind, überwiegt beim Hund das olfaktorische Epithel (Gizurason, 1990). Beim Menschen wiederum kleidet das olfaktorische Epithel nur etwa 8% der Nasenhöhle aus (van den Berg et al., 2004a). Unterschiede in der Absorption sind daher vor allem für Substanzen zu erwarten, die über das olfaktorische Epithel in das Gehirn transportiert werden. Allerdings ist wiederum der „Turnover“ der CSF beim Menschen geringer als bei der Ratte, wodurch Substanzen, die auf extraneuronalem Weg transportiert werden, höhere Gehirn-Konzentrationen erreichen können (Wang et al., 2003). Die Ratte wurde für die vorliegenden Untersuchungen deshalb gewählt, weil sie in Zusammenhang mit Epilepsie das am besten charakterisierte und am häufigsten verwendete Versuchstier darstellt und weiterführende Untersuchungen in Tiermodellen für Epilepsie erlaubt.

Illum (1996) sieht Schaf-Modelle im Hinblick auf die Vergleichbarkeit zum Menschen als viel versprechend an. Jedoch ist die Zahl der bisher veröffentlichten Untersuchungen an Schafen gering, was Lindhardt et al. (2002) auf die erforderlichen Haltungsbedingungen zurückführen. Eine i.n.-Applikation von Diazepam in Form eines Sprays an Schafe, Kaninchen und Menschen resultierte 30 min nach Verabreichung in einer Bioverfügbarkeit von 34% (Mensch), 54% (Kaninchen) und 15% (Schaf) (Lindhardt et al., 2001; 2002). Lindhardt et al. (2002) schlussfolgern daraus, dass die Ähnlichkeit zwischen Mensch und Kaninchen bezogen auf die Bioverfügbarkeit nach i.n.-Applikation größer ist, als zwischen Mensch und Schaf, so dass das Kaninchen im Hinblick auf die Prädiktivität ein zu bevorzugendes Modell sei.

Vergleichbare Untersuchungen an Primaten und Labornagern gibt es für Insulin, Propranolol, Dopamin und Melatonin. In einer Studie an Affen konnte [³H]-Dopamin fünfzehn min nach i.n.-Applikation in der CSF nachgewiesen werden (Mathison et al., 1998); Dahlin et al. (2000) beschreiben für Ratten und Mäuse einen Transport von Dopamin in den gleichseitigen Bulbus olfactorius nach einseitiger i.n.-Applikation. Die Absorption von Melatonin nach i.n.-Applikation in gleicher Formulierung an Ratte und Mensch resultierte in konformen Ergebnissen. Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass der intra- und extraneuronale Transport in das

Gehirn oder die CSF bei Versuchstieren und Menschen für gleiche Substanzen prinzipiell gleichermaßen möglich ist. Mit Blick auf Effektivität und Bioverfügbarkeit sind mehr oder weniger große Unterschiede zu erwarten.

6.1.6 AUSBLICK

Insgesamt geben die Untersuchungsergebnisse keine Hinweise darauf, dass ein direkter Transport von Antiepileptika aus der Nasenhöhle in das Gehirn in größerem Maße stattfindet. Die nach i.n.-Applikation erreichten Plasmaspiegel sprechen vielmehr für eine schnelle Absorption in die Kapillaren der nasalen Mukosa und den anschließenden Übertritt in das Gehirngewebe aus der Blutbahn. Ein direkter Transport aus der Nase in das Gehirnparenchym unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke findet sehr wahrscheinlich nur für einen kleinen Anteil eines i.n. applizierten Antiepileptikums statt. Von einer besonderen Eignung der i.n.-Applikation als Therapiestrategie für pharmakoresistente Patienten ist daher nicht auszugehen. Eine endgültige Beurteilung der Strategie kann jedoch erst durch Untersuchungen in einem Tiermodell für pharmakoresistente Epilepsie erfolgen. Die Selektion pharmakosensibler und pharmakoresistenter Tiere im Amygdala-Kindling-Modell stellt ein geeignetes Modell hierfür dar (siehe Kapitel 2.1.4).

Die nach i.n.-Applikation erreichten Plasma-Konzentrationen in Kombination mit der gezeigten antikonvulsiven Wirksamkeit lassen den Einsatz einer i.n.-Applikation von PB zur nicht-invasiven Behandlung eines Status epilepticus oder von Anfalls-Clustern in Notfallsituationen durchaus Erfolg versprechend erscheinen. Neben der rektalen Applikation könnte die i.n.-Applikation von Antiepileptika eine alternative Möglichkeit zur nicht-invasiven Therapie epileptischer Anfälle auch für den Kleintierbesitzer darstellen. Untersuchungen konnten zeigen, dass die rektale Applikation von Diazepam bei Hunden im Vergleich zur i.v.-Applikation zu deutlich geringeren Plasma-Konzentrationen führt (Papich & Alcorn, 1995). Die i.n.-Applikation von Diazepam an Hunden resultierte in einer Bioverfügbarkeit von 80-90% (Platt et al., 2000). Die Autoren schlussfolgern, dass die i.n.-Applikation eine sinnvolle Möglichkeit zur Behandlung epileptischer Anfälle sein kann, wenn diese vom Tierbesitzer selbst durchgeführt werden muss oder ein venöser Zugang nicht

ausreichend schnell erreicht werden kann (Platt et al., 2000). Eine Dauertherapie epileptischer Hunde und Katzen mittels i.n.-Applikation von Antiepileptika erscheint jedoch wenig realisierbar, da in vielen Fällen nicht von einer Kooperationsbereitschaft seitens der Kleintierpatienten zur Durchführung der Applikation durch den Besitzer auszugehen ist.

In der Pädiatrie konnte die i.n.-Applikation bereits erfolgreich zur Behandlung epileptischer Anfälle eingesetzt werden. Sie wird als effektive, sichere und auch von Eltern durchführbare Applikationsmethode beschrieben (Wolfe & Macfarlane, 2006). Besonders in Situationen, in denen kein sofortiger venöser Zugang möglich ist, ist sie als wertvolle Alternative zur i.v.-Applikation anzusehen (Wolfe & Macfarlane, 2006). Eine Studie zur Notfallbehandlung ergab eine kürzere Zeitspanne bis zur vollständigen Beendigung der Anfälle nach i.n.-Applikation von Midazolam als nach i.v.-Applikation von Diazepam (Lahat et al., 2000). Fisgin et al. (2002) konnten eine höhere Effektivität von i.n. appliziertem Midazolam verglichen mit rektal verabreichtem Diazepam bei der Behandlung epileptischer Anfälle von Kindern beobachten. In Europa und den USA sind bereits Tropf- und Spray-Präparate für die i.n. Therapie epileptischer Anfälle auf dem Markt (Fisgin et al., 2002). Präparate für die i.n.-Applikation von Midazolam und Lorazepam befinden sich in klinischen Phase-I-Studien (www.intranasal.com).

6.2 RNA-Interferenz

Zahlreiche Untersuchungen geben Hinweise auf eine Überexpression von P-gp im epileptischen Fokus pharmakoresistenter Patienten. Eine Reduktion der P-gp-Expression bei gleichzeitiger Gabe eines Antiepileptikums könnte die Überwindung transporter-basierter Pharmakoresistenz ermöglichen.

6.2.1 EXPRESSIONSREGULATION VON P-GLYCOPROTEIN

In den Vorversuchen zur Inhibition der P-gp-Expression in den Endothelzellen von Ratten-Gehirnkapillaren wurden die immunhistochemisch angefärbten Gehirnschnitte computer-unterstützt ausgewertet. Den Tieren war entweder eine

Vehikellösung oder in liposomal eingeschlossene siRNA verabreicht worden. Die Liposomen für eine der Versuchsgruppen trugen an ihrer Oberfläche das Peptid ApoE4, während an die Oberfläche von Liposomen für eine weitere Tiergruppe ein Nonsens-Peptid gebunden war. Diese Gruppeneinteilung wurde so gewählt, um die physiologische P-gp-Expression (Vehikelgruppe) mit den siRNA-behandelten Tieren vergleichen zu können und um den Einfluss der ApoE4-vermittelten Zielsteuerung zu den Endothelzellen beurteilen zu können. In der Tiergruppe, die siRNA in Liposomen mit ApoE4 erhalten hatte, war im Vergleich zur Kontrollgruppe und den Tieren, die siRNA-Liposomen mit Nonsens-Peptid erhalten hatten, eine Tendenz zur Hemmung der P-gp-Expression in mehreren Gehirnregionen sichtbar. Da in diesem Vorversuch pro Gruppe nur 3-4 Tiere behandelt worden waren und zum Teil nur Schnitte von zwei Tieren pro Region ausgewertet werden konnten, wurde keine statistische Analyse vorgenommen.

In einem zweiten Versuchsdurchgang sollten neben der Untersuchung zur Hemmung der P-gp-Expression ein möglicher Einfluss der Fluorophore als solche und der ihrer Lokalisation an den siRNA-Strängen auf die Effektivität der Expressionshemmung beurteilt werden. Dazu wurden vier Gruppen miteinander verglichen: Den Tieren wurden Leerliposomen, nicht-fluoreszenzmarkierte siRNA in Liposomen oder verschiedenen fluoreszenzmarkierte siRNA in Liposomen, an deren Oberfläche jeweils das Peptid ApoE4 gekoppelt war, verabreicht. In Zellkultur-Untersuchungen einer kooperierenden Gruppe hatten sich Anhaltspunkte dafür ergeben, dass die Fluoreszenzkopplung einen Einfluss auf die Inhibition der P-gp-Expression ausüben könnte. Es wäre denkbar, dass die Fluoreszenz-Kopplung der siRNA die Inkorporation in den RISC erschwert.

Die Quantifizierung der P-gp-Expression ergab keine Unterschiede in der P-gp-Expression der siRNA-behandelten Tiere im Vergleich zur Behandlung mit den Leerliposomen. Daher konnte auch nicht beurteilt werden, ob die Kopplung der siRNA mit Fluorophoren Einfluss auf die RNAi-Effizienz nimmt.

Zu dem diesem Ergebnis können mehrere Faktoren geführt haben. Zunächst stellt sich die Frage, ob ausreichend intakte siRNA in die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke aufgenommen wurde. Dies wird in Kapitel 6.2.2 diskutiert.

Eine wahrscheinliche Ursache für die fehlende P-gp-Reduktion ist eine zu geringe Dosierung der siRNA. Bei *in vivo*-Untersuchungen wurde „nackte“ (=ungeschützte) siRNA bisher in einem Dosispektrum von einigen Nanogramm bis in den Milligramm-Bereich verabreicht. Bereits bei Dosierungen von „nackter“ siRNA im Mikrogramm-Bereich konnte *in vivo* eine signifikante Inhibition der Genexpression erreicht werden (de Fougerolles et al., 2005). Die in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzte Dosierung lag mit 15 µg pro Tier eher im unteren Bereich, jedoch war die applizierte siRNA durch die Liposomen vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Bei der Verabreichung „nackter“ siRNA müssen höhere Dosen appliziert werden, damit ein Teil davon in intakter Form das Zielgewebe erreicht. Eine niedrige Dosierung ist jedoch als vorteilhaft anzusehen, da die Gefahr unspezifischer Nebenwirkungen sinkt und intrazelluläre Immunreaktionen in geringerem Ausmaß oder gar nicht auftreten. Hohe Dosen siRNA können zudem den zellulären RNAi-Apparat übersättigen und ihn dadurch hemmen (Uprichard, 2005).

Einen erheblichen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt hat das Design der siRNA. Durch Homologien der siRNA-Sequenz mit zelleigener mRNA steigt die Gefahr von „Off-Target-Effekten“ (Leung & Whittaker, 2005). Hierunter versteht man die Bindung der siRNA an nicht vollständig homologe mRNA-Sequenzen und deren unerwünschten Abbau durch RISC. Durch Überprüfung der siRNA auf das Vorhandensein solcher Homologien kann die Wahrscheinlichkeit für „Off-Target-Effekte“ deutlich verringert werden (Leung & Whittaker, 2005). Weiterhin sollte siRNA keine Loop-(Schleifen-)Strukturen besitzen, aber eine bestimmte Länge haben, damit „Dicer“ Nukleotide abspaltet; diese Abspaltung begünstigt dann den Einbau der siRNA in RISC (Dykxhoorn & Lieberman, 2006). Weitere Faktoren, wie der thermodynamische Wert und der Gehalt an bestimmten Basen nehmen Einfluss (Elbashir et al., 2001b). Ein gutes siRNA-Design ist daher Voraussetzung für RNAi. Beim Design der siRNA für die vorliegenden Versuche hat die kooperierende Gruppe diese Anforderungen berücksichtigt und konnte in Zellkultur-Untersuchungen an Endothelzellen aus Ratten-Gehirnkapillaren eine 65-75%ige Reduktion der P-gp-mRNA zeigen. Eine Prädiktivität von Zellkultur-Untersuchungen für *in vivo*-

Versuche kann jedoch nicht uneingeschränkt angenommen werden. Die Notwendigkeit einer Sequenzoptimierung ist daher nicht auszuschließen.

Als weitere mögliche Ursache für die ausgebliebene P-gp-Reduktion kommt die Wahl des Untersuchungszeitpunktes in Frage. Die Inhibition der Genexpression ist abhängig von der Anzahl der siRNAs, die in einer Zelle vorhanden sind. Mit zunehmender Teilung von Zielzellen sinkt die Konzentration der siRNA, so dass die Persistenz der siRNA in Säugerzellen vom Proliferationsstatus abhängt (Leung & Whittaker, 2005). In Neuronen, die nicht weiter ausdifferenzieren, kann die siRNA-Aktivität bis zu drei Wochen andauern. Bei proliferierenden Zellen, zu denen Endothelzellen zählen, wurde RNAi über drei bis sieben Tage beobachtet (Omi et al., 2004). Zu berücksichtigen ist, dass mittels RNAi nur die Expression von P-gp inhibiert werden kann, dass noch zur Synthese ansteht. Auf bereits exprimiertes oder in Vesikeln gelagertes P-gp nehmen die siRNA-Moleküle keinen Einfluss. Der genaue „Turnover“ von P-gp ist nicht bekannt. Es wäre also möglich, dass 24 h nach Applikation bereits eine Inhibition vorlag, diese jedoch nicht detektiert werden konnte, weil noch „vorrätiges“ P-gp exprimiert wurde.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse keine Anhaltspunkte dafür geben, dass RNAi in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke stattfand und als wahrscheinlichste Ursache hierfür eine nicht ausreichende Dosis an siRNA anzunehmen ist. Um die Ursache abzuklären, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

6.2.2 VERTEILUNG UND INTEGRITÄT DER siRNA

Die Grundvoraussetzung für den Ablauf des RNAi-Mechanismus ist ausreichend intakte siRNA am Ort der gewünschten Inhibition. Verpackung und Zielsteuerung von siRNA können wesentlich dazu beitragen, dies zu erreichen. Eine Verpackung von siRNA in Liposomen, wie sie hier verwendet wurde, wird von vielen Arbeitsgruppen erfolgreich eingesetzt. Huwyler et al. (1997) schlossen Daunomycin in Liposomen ein, an deren Oberfläche ein monoklonaler Antikörper gebunden war, um eine Zielsteuerung zu erreichen (= Immunoliposomen). Dieser Antikörper (Ox26) bindet selektiv an Transferrin-Rezeptoren von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke

und führte in den Untersuchungen zu einer Aufnahme des liposomal geschützten Daunomycins in diese Zellen. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das Peptid ApoE4 an die Oberfläche von Liposomen gebunden. Für ApoE4 wird die Vermittlung einer Endozytose über die Bindung an LDL-Rezeptoren sowie über Heparan-Sulfat-Proteoglykane beschrieben (Winkler et al., 1999; Sauer et al., 2005). LDL-Rezeptoren und Heparan-Sulfat-Proteoglykane als Angriffspunkte für ApoE4 werden *in vivo* allerdings auf den Endothelzellen diverser Gewebe exprimiert (Sauer et al., 2005), so dass nicht von einer selektiven Ansteuerung der Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke auszugehen war. Daher ist nicht unwahrscheinlich, dass ein Großteil der applizierten siRNA-Liposomen von Endothelzellen anderer Gewebe „abgefangen“ und aufgenommen wurde. Weiterhin ist wahrscheinlich, dass über die Bindung von ApoE4 an Albumine (Dykxhoorn & Lieberman, 2006) weniger Liposomen zur Ankunft an der Blut-Hirn-Schranke und damit für die Aufnahme in die Endothelzellen zur Verfügung standen, so dass nicht ausreichend siRNA-Moleküle in die Zellen aufgenommen wurden, um den Mechanismus der RNAi auszulösen.

Weiterhin lässt sich in Kombination mit den Ergebnissen zur Reduktion der P-gp-Expression schlussfolgern, dass die applizierte Dosis von 1,8 µg pro Ratte zu gering war, um siRNA in nachweisbarer Menge in die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke zu transportieren. Für die Untersuchungen zur Expressions-Reduktion wurden 15 µg pro Ratte appliziert. Da eine Reduktion der P-gp-Expression ausblieb, war diese Dosis vermutlich ebenfalls zu gering.

Eine weitere mögliche Ursache für die nicht erfolgreiche Aufnahme der siRNA in die Zielzellen kann die Zerstörung der siRNA vor Erreichen der Blut-Hirn-Schranke sein. Bei dem für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Verfahren für die Herstellung von Liposomen handelt es sich um eine speziell entwickelte Methode, die einen besonderen Schutz der siRNA vor Nukleasen gewährleisten soll. Durch die Kopplung der siRNA mit Fluorophoren bestand die Möglichkeit, mittels Fluoreszenzmikroskopie den FRET-Effekt zu überprüfen. Bei mikroskopischer Betrachtung von Gehirn- sowie Organschnitten siRNA-behandelter Tiere war jedoch zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein FRET-Effekt nachweisbar. Die Untersuchungsergebnisse geben also keinen Hinweis darauf, dass die siRNA in den

Liposomen ihren Zielort erreicht hat. Möglicherweise war, wie bereits erwähnt, die Konzentration der von den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke aufgenommenen siRNA aber auch zu niedrig, um ihre Anwesenheit mittels Fluoreszenz nachweisen zu können.

Ein weiterer limitierender Faktor für den Transport der siRNA in das Zielgewebe stellt der Applikationsweg dar. Eine i.v.-Applikation, wie sie für die vorliegenden Untersuchungen angewendet wurde, ist einfach und sicher durchführbar und daher ein bevorzugter Applikationsweg. Bei Bedarf bietet sie auch den Vorteil, eine Genexpression parallel in mehreren Geweben inhibieren zu können (Dykxhoorn & Lieberman, 2006), was zur Behandlung metastasierter Tumoren notwendig sein kann. Verbleibt allerdings ein nicht unerheblicher Teil der siRNA vor Erreichen der Zielzellen bereits in anderen Geweben, muss die zu verabreichende Dosis erhöht werden, was in einer größeren Gefahr von Nebenwirkungen resultiert. Kobayashi et al. (2001) verglichen die normale i.v.-Applikation mit einer so genannten hydrodynamischen i.v.-Injektion, bei der binnen weniger Sekunden „nackte“ siRNA in einer dem körpereigenen Blutvolumen entsprechenden Flüssigkeitsmenge i.v. verabreicht wird. Sie konnten zeigen, dass beide Verfahren zu einer vergleichbaren siRNA-Menge in der Leber führten, die hydrodynamische Injektion jedoch in einer besseren Aufnahme der siRNA in die Zellen resultierte. Matsui et al. (2005) bedienten sich zur Applikation von „nackter“ siRNA ebenfalls der hydrodynamischen i.v.-Injektion und erreichten eine Reduktion von P-gp-mRNA im Lebergewebe. In den aufgeführten Studien wurde eine Aufnahme von siRNA in das Gehirn oder in die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke nicht untersucht. Obwohl das hydrodynamische Applikationsverfahren den Vorteil einer besseren zellulären Aufnahme gegenüber der konventionellen i.v.-Applikation zu bieten scheint, muss noch überprüft werden, ob auf diesem Weg auch ein besserer Transport zu den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke erreicht werden kann.

Neben einer systemischen Applikation ist auch die lokale Applikation von siRNA in das ZNS möglich. Hommel et al. (2003) gelang ein „Knockdown“ der Tyrosinhydroxylase in Neuronen adulter Mäuse nach stereotaktischer siRNA-Injektion in die Substantia nigra. Eine aktuelle Publikation beschreibt einen

effizienten Transport von Plasmid-DNA in das Gehirn nach i.n.-Applikation (Han et al., 2007). Demnach könnte die i.n.-Applikation von liposomal geschützter siRNA ebenfalls eine Möglichkeit darstellen, das Gehirn auf direktem Weg zu erreichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der verwendete liposomale Verpackungsansatz den *in vivo*-Anforderungen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht gerecht wurde. Die Ergebnisse erlauben allerdings keinen Rückschluss darüber, ob die siRNA in den Liposomen nicht ausreichend geschützt war, ob die applizierte Dosis zu gering war oder die Zielsteuerung über das Peptid ApoE4 nicht gelungen ist. Eine Alternative für die Zielsteuerung könnte durch die Kopplung der Liposomen mit dem monoklonalen Antikörper Ox26 erreicht werden.

6.2.3 AUSBLICK

Um die Eignung der RNAi als Behandlungsstrategie beurteilen zu können, sind weitere Untersuchungen nötig. Zunächst wäre zu überprüfen, ob mit einer höheren Dosis liposomal eingeschlossener siRNA eine Aufnahme in die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke erreicht werden kann. In diesem Zusammenhang wäre interessant, ob die Zielsteuerung über die Bindung von Antikörpern an die Liposomen optimiert werden kann. Eine Fluoreszenzkopplung, wie sie bereits für die vorliegenden Untersuchungen eingesetzt wurde, kann mittels FRET-Untersuchung die Überprüfung der Aufnahme intakter siRNA in die Zellen ermöglichen.

Um eine optimale siRNA-Sequenz für den *in vivo*-Einsatz zu identifizieren, wäre die Durchführung von *in vitro*-Untersuchungen zur Überprüfung der Inhibitions-Effizienz weiterer siRNA-Sequenzen zweckdienlich. Ergänzend zur immunhistochemischen Untersuchung könnte die Inhibitions-Effizienz *in vivo* mittels Real-Time-PCR auf mRNA-Ebene untersucht werden. Ergebnisse zur Reduktion von P-gp auf mRNA- und Protein-Ebene könnten wertvolle Informationen über den Grad und die Dauer der Reduktion ergeben. Einige Studien konnten eine mRNA-Reduktion, nicht jedoch eine Senkung auf Protein-Ebene erzielen, was durch die Wahl des Untersuchungszeitpunktes begründet sein kann. Im Hinblick auf den „Turnover“ von P-gp könnte die Wahl eines späteren Untersuchungszeitpunktes für

die Expressions-Reduktion sinnvoll sein. Wenn eine P-gp-Reduktion nachgewiesen werden kann, wäre der nächste Schritt die Überprüfung der Strategie in einem Tiermodell für pharmakoresistente Epilepsie.

Obwohl die Untersuchungen nicht die erwarteten Ergebnisse erbrachten, birgt die Strategie zur Überwindung pharmakoresistenter Epilepsie ein großes Potenzial. Über eine Zielsteuerung liposomal eingeschlossener siRNA wäre eine auf den Bereich der Blut-Hirn-Schranke beschränkte P-gp-Reduktion möglich. Verschiedene Publikationen diskutieren, dass die P-gp-Überexpression im epileptischen Fokus durch das Auftreten von Anfällen "getriggert" wird (Löscher & Potschka, 2005b). Eine transiente P-gp-Reduktion durch siRNA-Applikation über begrenzte Zeiträume könnte bei zeitgleicher Behandlung der pharmakoresistenten Patienten mit Antiepileptika bereits ausreichend sein, um die durch weitere Anfälle begünstigte Überexpression von P-gp zu unterbrechen. Die mit einer dauerhaften Reduktion vergesellschaftete Blockade der physiologischen Schutzfunktion von P-gp würde vermieden. Durch die reduzierte P-gp-Expression während der siRNA-Behandlung könnte eine Anfallsfreiheit durch die Antiepileptika erreicht werden. Eine erneute P-gp-Überexpression würde dann ausbleiben. Die Effektivität einer siRNA-Behandlung im Sinne einer „Kur“ wird in weiterführenden Untersuchungen zu überprüfen sein.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Marion Czapp

Entwicklung neuer Strategien zur Überwindung transporter-basierter Pharmakoresistenz bei Epilepsien

Epilepsien zählen zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen bei Hund, Katze und Mensch. Sie sind mit einer fortschreitenden Schädigung des zentralen Nervensystems und mit erheblichen Einschränkungen im täglichen Leben verbunden. Trotz Entwicklung zahlreicher neuer Antiepileptika über die letzten Jahrzehnte spricht etwa ein Drittel der Veterinär- und Humanpatienten nicht auf eine Pharmakotherapie an. Diese Pharmakoresistenz von Epilepsien stellt ein schwerwiegendes und bisher ungelöstes Problem für die betroffenen Patienten dar und macht neue Therapiestrategien dringend erforderlich.

Eine Ursache der Pharmakoresistenz bei Epilepsien stellt die Überexpression von Multidrug-Transportern in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke dar. Die physiologische Funktion dieser Efflux-Transporter besteht darin, den Eintritt von Xenobiotika in das Gewebe bestimmter Körperregionen zu verhindern. Eine Überexpression bei pharmakoresistenten Patienten führt zu einem vermehrten Efflux-Transport von Antiepileptika in die Blutbahn, so dass trotz therapeutischer Plasma-Konzentrationen keine ausreichenden Wirkstoffspiegel im Bereich des epileptischen Fokus erreicht werden können. Auf der Basis der Multidrug-Transporter-Hypothese wurden im Rahmen dieser Dissertation zwei mögliche neue Behandlungsstrategien zur Überwindung der Pharmakoresistenz von Epilepsien im Tiermodell untersucht.

In den letzten Jahrzehnten wurde ein direkter intra- oder extraneuronaler Transport von Substanzen nach intranasaler (i.n.) Applikation aus der Nasenhöhle in das Gehirn wiederholt beschrieben. Diese Möglichkeit zur Umgehung der Blut-Hirn-Schranke und der dort lokalisierten Efflux-Transporter wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Untersuchungen zur Gehirngängigkeit von Antiepileptika nach i.n.-Applikation im Rattenmodell näher überprüft. Mikrodialyse-Untersuchungen zur Bestimmung der Extrazellulär-Konzentration von Phenobarbital, Lamotrigin und

Carbamazepin im Bereich des frontalen Cortex ergaben keine Hinweise auf einen effektiveren Substanztransport nach i.n.-Applikation im Vergleich zur intravenösen (i.v.) Applikationsform. Die Bestimmung der Phenobarbital-Konzentration im Gesamtgehirngewebe nach i.n.- und i.v.-Verabreichung resultierte ebenfalls in gleichwertigen Konzentrationen. Die Untersuchung einzelner Gehirnregionen 10 min nach i.n.-Applikation ergab für den Bulbus olfactorius eine signifikant höhere Gehirn-Plasma-Ratio im Vergleich zur i.v.-Applikation. Im Amygdala-Kindling-Modell der Temporallappen-Epilepsie konnte eine dosisabhängige antikonvulsive Wirkung nach i.n.-Applikation von Phenobarbital beobachtet werden, die in vergleichbarem Maße auch nach i.v.-Applikation zu beobachten war. Insgesamt geben die Untersuchungsergebnisse keinen Hinweis darauf, dass ein direkter Transport von Antiepileptika aus der Nasenhöhle in das Gehirn in therapeutisch relevantem Ausmaß stattfindet und eine Umgehung der Blut-Hirn-Schranke auf diese Weise möglich ist. Eine besondere Eignung der i.n.-Applikation zur Therapie pharmakoresistenter Patienten erscheint daher unwahrscheinlich, kann jedoch endgültig erst durch Untersuchungen in einem Tiermodell für pharmakoresistente Epilepsie beurteilt werden. Die nach i.n.-Applikation von Phenobarbital erreichten Plasma-Konzentrationen in Kombination mit der gezeigten antikonvulsiven Wirksamkeit lassen diesen Applikationsweg jedoch zur nicht-invasiven Behandlung eines Status epilepticus oder von Anfalls-Clustern Erfolg versprechend erscheinen.

Dem Multidrug-Transporter P-Glycoprotein (P-gp) wird in Zusammenhang mit transporter-basierter Pharmakoresistenz bei Epilepsie besondere Bedeutung beigemessen. Durch pharmakologische Inhibition der P-gp-Funktion gelang im Tiermodell bereits die Überwindung von Pharmakoresistenz. Die Anwendung von Hemmstoffen bringt jedoch den Nachteil einer P-gp-Inhibition in allen Körperregionen mit sich. Eine auf die Blut-Hirn-Schranke begrenzte Reduktion der P-gp-Expression wäre durch den Mechanismus der RNA-Interferenz zu erreichen. Für *in vivo*-Untersuchungen an Ratten wurde gegen P-gp-mRNA gerichtete „small interfering-RNA“ (siRNA) zum Schutz vor endogenen Nukleasen in Liposomen eingeschlossen. Zudem wurde für ein Targeting das Peptid ApoE4 an die Oberfläche der Liposomen gebunden, welches eine Endozytose an Endothelzellen der Blut-Hirn-

Schranke vermittelt. Das Ziel einer P-gp-Reduktion auf Protein-Ebene nach i.v.-Applikation derart geschützter und zielgesteuerter siRNA konnte jedoch nicht erreicht werden. Die Quantifizierung der P-gp-Expression in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke anhand immunhistochemisch gefärbter Gehirnschnitte ergab 24 h nach Applikation keine Verminderung der P-gp-Expression. Die Ursachen für die ausgebliebene P-gp-Reduktion sind in weiterführenden Untersuchungen zu klären.

SUMMARY

Marion Czapp

Development of new strategies to overcome transporter based pharmacoresistance in epilepsy

Epilepsy is the most common chronic disease of the central nervous system in small animals as well as in humans. It is associated with progressive brain damage and leads to limitations in every day life. Despite the launch of several new antiepileptic drugs in the last decades about one third of veterinary and human patients does not respond to the available pharmacotherapeutics. Pharmacoresistance remains a major and unsolved problem and new therapeutic strategies are urgently needed.

One major reason for pharmacoresistance in epilepsy is overexpression of multidrug transporters in brain capillary endothelial cells. The physiological function of these transporters is impeding xenobiotica from penetration into tissues. Overexpression in pharmacoresistant patients causes increased efflux transport of antiepileptic drugs resulting in insufficient concentration in the epileptogenic tissue. The multidrug-transporter hypothesis offers a basis for the development of new strategies to overcome pharmacoresistance two of which were investigated in this doctoral thesis.

Numerous publications describe the existence of a direct intra- or extraneuronal pathway from the nasal cavity to the brain parenchyma. The possibility to bypass the blood-brain barrier with overexpressed efflux transporters was examined by investigating the brain uptake of antiepileptic drugs after intranasal (i.n.) administration. Microdialysis experiments were performed to determine the extracellular concentration in the frontal cortex after i.n. administration of phenobarbitone, lamotrigine and carbamazepine. No evidence for a more effective transport of these commonly used antiepileptic drugs could be found after i.n. administration in comparison with intravenous (i.v.) administration. Whole brain concentration of phenobarbitone did not show any significant differences between administration modes. Preparation of brain regions resulted in a significantly higher

brain-plasma-ratio in the olfactory bulb after i.n. administration. This indicates a direct nose to brain transport of at least a part of intranasally administered phenobarbitone. In the amygdala-kindling model for temporal-lobe epilepsy a dose dependent anticonvulsant effect after i.n. administration was observed. Intravenous administration of the same dosages was effective as well. Taken together, we got no hints that i.n. administration of antiepileptic drugs may offer advantages for the therapy of pharmacoresistant patients. For final evaluation the strategy has to be tested in an animal model of pharmacoresistant epilepsy. Regarding the high plasma levels after i.n. administration of phenobarbitone in combination with the anticonvulsant effects in the kindling model i.n. administration should be appropriate for non-invasive therapy of status epilepticus or seizure-clusters.

The multidrug transporter P-glycoprotein (P-gp) plays a major role in conjunction with pharmacoresistance in epilepsy. Via administration of P-gp inhibitors pharmacoresistance recently could be overcome in animal models but use of P-gp inhibitors implicates the disadvantage of unspecific P-gp inhibition in many tissues. Specific reduction of P-gp expression at the blood-brain barrier could be achieved by administration of anti-P-gp siRNA targeting the brain capillary endothelial cells. For targeting and protection of siRNA from endonucleatic degradation siRNA was enclosed in liposomes carrying the peptide ApoE4 on the surface. This peptide mediates endocytosis in brain capillary endothelial cells. The aim of a P-gp knockdown 24 h after i.v. administration of suchlike protected siRNA could not be reached. Computer based P-gp quantification in brain capillary endothelial cells of immunohistochemically stained brain sections did not result in any reduction of P-gp expression in siRNA treated animals. Reasons for the lack of P-gp-knockdown have to be investigated in further studies.

8 LITERATUR

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 7:41-53.

Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350-355.

Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, van Veelen CW, van Rijen PC, Leenstra S, Ramkema M, Scheffer GL, Scheper RJ, Troost D (2003) Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneuronal tumors. *Neuroscience* 118:417-429.

Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, Redeker S, Ozbas-Gercerer F, van Vliet EA, Scheffer GL, Scheper RJ, van der Valk P, Baayen JC, Troost D (2004) Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45:441-451.

Avanzini G, et al. (1996) ILAE classification of epilepsies: Its applicability and practical value of different diagnostic categories. *Epilepsia* 37:1051-1059.

Baltes S, Gastens AM, Fedrowitz M, Potschka H, Kaefer V, Löscher W (2007) Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacology* 52:333-346.

Barakat NS, Omar SA, Ahmed AA (2006) Carbamazepine uptake into rat brain following intra-olfactory transport. *J Pharm Pharmacol* 58:63-72.

Beal J (2005) Silence is golden: Can RNA interference therapeutics deliver? *Drug Discovery Today* 10:169-172.

Beck H, Steffens R, Heinemann U, Elger CE (1997) Properties of voltage-activated Ca²⁺ currents in acutely isolated human hippocampal granule cells. *J Neurophysiol* 77:1526-1537.

Ben-Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R (1981) Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 6:1361-1391.

Benbadis SR (2001) Epileptic seizures and syndromes. *Neurologic Clinics* 19:251-270.

Benveniste H, Diemer NH (1987) Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)* 74:234-238.

Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1369-1374.

Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S (2005) Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Medicine* 11:50-55.

Boado RJ (2005) RNA interference and nonviral targeted gene therapy of experimental brain cancer. *NeuroRx* 2:139-150.

- Brandt C, Bethmann K, Gastens AM, Löscher W (2006) The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: Proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 24:202-211.
- Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Coulter DA (1998) Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 4:1166-1172.
- Browne TR, Holmes GL (2001) Primary care: Epilepsy. *New England Journal of Medicine* 344:1145-1151.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R (2002) Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2:243-247.
- Buckmaster PS, Smith MO, Buckmaster CL, LeCouteur RA, Dudek FE (2002) Absence of temporal lobe epilepsy pathology in dogs with medically intractable epilepsy. *J Vet Intern Med* 16:95-99.
- Castel-Branco M, Lebre V, Falcao A, Figueiredo I, Caramona M (2003) Relationship between plasma and brain levels and the anticonvulsant effect of lamotrigine in rats. *European Journal of Pharmacology* 482:163-168.
- Chang BS, Lowenstein DH (2003) Mechanisms of disease - Epilepsy. *New England Journal of Medicine* 349:1257-1266.
- Charlton S, Jones NS, Davis SS, Illum L (2007) Distribution and clearance of bioadhesive formulations from the olfactory region in man: Effect of polymer type and nasal delivery device. *Eur J Pharm Sci* 30:295-302.
- Check E (2005) A crucial test. *Nature Medicine* 11:243-244.
- Chiu YL, Rana TM (2003) siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 9:1034-1048.
- Clark WE, Le Gros (1929) Anatomical investigation into the routes by which infections may pass from the nasal cavities into the brain. Ministry of Health Report on Public Health and Medical Subjects (H M Stationary Office London).
- Clinckers R, Smolders I, Meurs A, Ebinger G, Michotte Y (2005) Quantitative in vivo microdialysis study on the influence of multidrug transporters on the blood-brain barrier passage of oxcarbazepine: Concomitant use of hippocampal monoamines as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314:725-731.
- Coulter DA, McIntyre DC, Löscher W (2002) Animal models of limbic epilepsies: What can they tell us? *Brain Pathology* 12:240-256.
- Cutler L, Howes C, Deeks NJ, Buck TL, Jeffrey P (2006) Development of a P-glycoprotein knockout model in rodents to define species differences in its functional effect at the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95:1944-1953.
- Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygun H, Klippel A, Pronk GJ, Giese K, Kaufmann J (2003) Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Research* 31:2705-2716.
- Czerniawska A (1970) Experimental Investigations on Penetration of Au-198 from Nasal Mucous Membrane Into Cerebrospinal Fluid. *Acta Oto-Laryngologica* 70:58-&.

- Dahlin M, Bergman U, Jansson B, Bjork E, Brittebo E (2000) Transfer of dopamine in the olfactory pathway following nasal administration in mice. *Pharm Res* 17:737-742.
- de Boer AG, van dS, I, Gaillard PJ (2003) The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:629-656.
- de Fougères A, Manoharan M, Meyers R, Vornlocher HP (2005) RNA interference in vivo: toward synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics. *Methods Enzymol* 392:278-296.
- Demeule M, Regina A, Jodoin J, Laplante A, Dagenais C, Berthelet F, Moghrabi A, Beliveau R (2002) Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* 38:339-348.
- Dewey CW, Guiliano R, Boothe DM, Berg JM, Kortz GD, Joseph RJ, Budsberg SC (2004) Zonisamide therapy for refractory idiopathic epilepsy in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 40:285-291.
- Ding H, Schwarz DS, Keene A, Affar B, Fenton L, Xia X, Shi Y, Zamore PD, Xu Z (2003) Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis. *Aging cell* 2:209-217.
- Ding SW, Li H, Lu R, Li F, Li WX (2004) RNA silencing: A conserved antiviral immunity of plants and animals. *Virus Research* 102:109-115.
- Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W, Mayberg MR, Bengez L, Janigro D (2001) Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 42:1501-1506.
- Dorn G, Patel S, Wotherspoon G, Hemmings-Mieszczak M, Barclay J, Natt FJ, Martin P, Bevan S, Fox A, Ganju P, Wishart W, Hall J (2004) siRNA relieves chronic neuropathic pain. *Nucleic Acids Research* 32.
- Dykxhoorn DM, Lieberman J (2006) Running interference: Prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs in: *Annual Review of Biomedical Engineering*.8. pp 377-402.
- Eggert C, Fischer U (2003) RNA-Interferenz: Ein neues Werkzeug zur Analyse der Genfunktion. *Biospektrum* 9:372-374.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes and Development* 15:188-200.
- Elger CE (2003) Pharmacoresistance: modern concept and basic data derived from human brain tissue. *Epilepsia* 44 Suppl 5:9-15.
- Evans J, Hastings L (1992) Accumulation of Cd(II) in the Cns Depending on the Route of Administration - Intraperitoneal, Intratracheal, Or Intranasal. *Fundamental and Applied Toxicology* 19:275-278.
- Faber WM (1937) The nasal mucosa and the subarachnoid space. *American Journal of Anatomy* 62:121-148.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.

- Fisgin T, Gurer Y, Tezic T, Senbil N, Zorlu P, Okuyaz C, Akgun D (2002) Effects of intranasal midazolam and rectal diazepam on acute convulsions in children: prospective randomized study. *J Child Neurol* 17:123-126.
- Fisher RS, Boas WV, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J (2005) Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46:470-472.
- Foldvary N, Bingaman WE, Wyllie E (2001) Surgical treatment of epilepsy. *Neurologic Clinics* 19:491.
- Fougerolles AD, Manoharan M, Meyers R, Vornlocher HP (2005) RNA interference in vivo: Toward synthetic small inhibitory RNA-based therapeutics. *Methods in Enzymology* 392:278-296.
- Freeman FG, Jarvis MF (1981) The effect of interstimulation interval on the assessment and stability of kindled seizure thresholds. *Brain Res Bull* 7:629-633.
- Frey II WH (2002) Intranasal delivery: Bypassing the blood-brain barrier to deliver therapeutic agents to the brain and spinal cord. *Drug Delivery Technology* 2:46-49.
- Fromm MF (2000) P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 38:69-74.
- Fromm MF (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences* 25:423-429.
- Geyer J, Doring B, Godoy JR, Leidolf R, Moritz A, Petzinger E (2005) Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J Vet Pharmacol Ther* 28:545-551.
- Gizurarson S (1990) Animal models for intranasal drug delivery studies. A review article. *Acta Pharm Nord* 2:105-122.
- Gizurarson S, Bechgaard E, Hjortkjær RK (2006) Two intranasal administration techniques give two different pharmacokinetic results. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 33:35-38.
- Gizurarson S, Gudbrandsson FK, nsson H, Bechgaard E (1999) Intranasal administration of diazepam aiming at the treatment of acute seizures: Clinical trials in healthy volunteers. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 22:425-427.
- Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK (1969) A Permanent Change in Brain Function Resulting from Daily Electrical Stimulation. *Experimental Neurology* 25:295.
- Gonzalez-Alegre P, Bode N, Davidson BL, Paulson HL (2005) Silencing primary dystonia: Lentiviral-mediated RNA interference therapy for DYT1 dystonia. *Journal of Neuroscience* 25:10502-10509.
- Gonzalez-Alegre P, Miller VM, Davidson BL, Paulson HL (2003) Toward therapy for DYT1 dystonia: Allele-specific silencing of mutant TorsinA. *Annals of Neurology* 53:781-787.
- Graff CL, Pollack GM (2005a) Functional evidence for P-glycoprotein at the nose-brain barrier. *Pharm Res* 22:86-93.
- Graff CL, Pollack GM (2005b) Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery. *J Pharm Sci* 94:1187-1195.

Han IK, Kim MY, Byun HM, Hwang TS, Kim JM, Hwang KW, Park TG, Jung WW, Chun T, Jeong GJ, Oh YK (2007) Enhanced brain targeting efficiency of intranasally administered plasmid DNA: an alternative route for brain gene therapy. *J Mol Med* 85:75-83.

Hass JA, Fenner WR (1989) Epilepsy resistant to anticonvulsant therapy. *Probl Vet Med* 1:596-605.

Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT (1993) Incidence of Epilepsy and Unprovoked Seizures in Rochester, Minnesota - 1935-1984. *Epilepsia* 34:453-468.

Holl A (1980) Selective Staining by Procion Dyes of Olfactory Sensory Neurons in the Catfish *Ictalurus-Nebulosus*. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* 35:526-528.

Hommel JD, Sears RM, Georgescu D, Simmons DL, DiLeone RJ (2003) Local gene knockdown in the brain using viral-mediated RNA interference. *Nat Med* 9:1539-1544.

Honchar MP, Olney JW, Sherman WR (1983) Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 220:323-325.

Huwyler J, Yang J, Pardridge WM (1997) Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: pharmacokinetics and tissue distribution in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1541-1546.

Illum L (1996) Nasal delivery. The use of animal models to predict performance in man. *J Drug Target* 3:427-442.

Illum L (2004) Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56:3-17.

Illum L (2003) Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 87:187-198.

Illum L, Watts P, Fisher AN, Hinchcliffe M, Norbury H, Jabbal-Gill I, Nankervis R, Davis SS (2002) Intranasal delivery of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 301:391-400.

Järve A (2006) Master Thesis: Surveillance of siRNA integrity by FRET. Faculty of Biosciences of Ruprecht-Karls-University of Heidelberg.

Jefts LB, Palmer LR, Ambegia EG, Giesbrecht C, Ewanick S, MacLachlan I (2005) A scalable, extrusion-free method for efficient liposomal encapsulation of plasmid DNA. *Pharm Res* 22:362-372.

Jette L, Murphy GF, Leclerc JM, Beliveau R (1995) Interaction of Drugs with P-Glycoprotein in Brain Capillaries. *Biochemical Pharmacology* 50:1701-1709.

Juliano RL, Ling V (1976) Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese-Hamster Ovary Cell Mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 455:152-162.

Kandimalla KK, Donovan MD (2005) Localization and differential activity of P-glycoprotein in the bovine olfactory and nasal respiratory mucosae. *Pharm Res* 22:1121-1128.

Kapur J, Macdonald RL (1997) Rapid seizure-induced reduction of benzodiazepine and Zn²⁺ sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABA_A receptors. *J Neurosci* 17:7532-7540.

Karikó K, Bhuyan P, Capodici J, Ni H, Lubinski J, Friedman H, Weissman D (2004) Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3. *Cells Tissues Organs* 177:132-138.

- Kendall JL, Reynolds M, Goldberg R (1997) Intranasal midazolam in patients with status epilepticus. *Ann Emerg Med* 29:415-417.
- Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y (2001) Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J Pharmacol Exp Ther* 297:853-860.
- Krieger j, Breer H (1994) Der Geruchssinn: Die Grundlagen der Duftwahrnehmung. *Biologie in unserer Zeit* 2:70-76.
- Kwan P, Brodie MJ (2002) Refractory epilepsy: a progressive, intractable but preventable condition? *Seizure-European Journal of Epilepsy* 11:77-84.
- Kwan P, Brodie MJ (2004) Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21st century: A critical review. *Epilepsia* 45:1141-1149.
- Kwan P, Brodie MJ (2006b) Refractory epilepsy: Mechanisms and solutions. *Expert Review of Neurotherapeutics* 6:397-406.
- Kwan P, Brodie MJ (2006a) Combination therapy in epilepsy: When and what to use. *Drugs* 66:1817-1829.
- Kwan P, Brodie MJ (2000) Early identification of refractory epilepsy. *New England Journal of Medicine* 342:314-319.
- Kwan P, Sills GJ, Butler E, Gant TW, Meldrum BS, Brodie MJ (2002) Regional expression of multidrug resistance genes in genetically epilepsy-prone rat brain after a single audiogenic seizure. *Epilepsia* 43:1318-1323.
- Lahat E, Goldman M, Barr J, Bistrizter T, Berkovitch M (2000) Comparison of intranasal midazolam with intravenous diazepam for treating febrile seizures in children: prospective randomised study. *BMJ* 321:83-86.
- Lee G, Bendayan M, Schlichter L, Bendayan R (2001) Functional expression of p-glycoprotein (Pgp) in a rat brain endothelial cell line. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 69.
- Leppik IE (1992) Intractable Epilepsy in Adults. *Epilepsy Research Supplements* 5:7-11.
- Leung RKM, Whittaker PA (2005) RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics* 107:222-239.
- Lewis DL, Wolff JA (2005) Delivery of siRNA and siRNA expression constructs to adult mammals by hydrodynamic intravascular injection. *Methods in Enzymology* 392:336-350.
- Lewis JL, Nikula KJ, Novak R, Dahl AR (1994) Comparative localization of carboxylesterase in F344 rat, beagle dog, and human nasal tissue. *Anat Rec* 239:55-64.
- Li IT, Pham E, Truong K (2006) Protein biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer for monitoring cellular dynamics. *Biotechnology Letters* 28:1971-1982.
- Li L, Gorukanti S, Choi YM, Kim KH (2000) Rapid-onset intranasal delivery of anticonvulsants: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation in rabbits. *Int J Pharm* 199:65-76.
- Lindhardt K, Bagger M, Andreassen KH, Bechgaard E (2001) Intranasal bioavailability of buprenorphine in rabbit correlated to sheep and man. *Int J Pharm* 217:121-126.

- Lindhardt K, Olafsson DR, Gizurason S, Bechgaard E (2002) Intranasal bioavailability of diazepam in sheep correlated to rabbit and man. *International Journal of Pharmaceutics* 231:67-72.
- Lombardo AJ, Kuzniecky R, Powers RE, Brown GB (1996) Altered brain sodium channel transcript levels in human epilepsy. *Brain Res Mol Brain Res* 35:84-90.
- Löscher W (2002) Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 50:105-123.
- Löscher W (1994) Neue Antiepileptika - ein Fortschritt für die Behandlung epileptischer Tiere? *Kleintierpraxis* 39:239-258.
- Löscher W (1997) Animal models of intractable epilepsy. *Prog Neurobiol* 53:239-258.
- Löscher W (2005) Mechanisms of drug resistance. *Epileptic Disorders* 7.
- Löscher W (2003) Pharmacological basis of the treatment of epilepsy in dogs and cats. *Praktische Tierarzt* 84:574-586.
- Löscher W (2006) Animal Models of Drug-Refractory Epilepsy. In: *Models of Seizure and Epilepsy* (Pitkanen A, ed), pp 551-567. London: Elsevier.
- Löscher W, Ebert U (1996) The role of the piriform cortex in kindling. *Progress in Neurobiology* 50:427-481.
- Löscher W, Potschka H (2002) Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301:7-14.
- Löscher W, Potschka H (2005b) Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 6:591-602.
- Löscher W, Potschka H (2005c) Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family. *NeuroRx* 2:86-98.
- Löscher W, Potschka H (2005a) Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 76:22-76.
- Löscher W, Rundfeldt C (1991) Kindling As A Model of Drug-Resistant Partial Epilepsy - Selection of Phenytoin-Resistant and Nonresistant Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 258:483-489.
- Löscher W, Schmidt D (2002) New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy Research* 50:3-16.
- Löscher W, Schmidt D (2006) Experimental and clinical evidence for loss of effect (tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs. *Epilepsia* 47:1253-1284.
- Löscher W, Schmidt D (1988) Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Res* 2:145-181.
- Lowenstein DH, Bleck T, Macdonald RL (1999) It's time to revise the definition of status epilepticus. *Epilepsia* 40:120-122.

- Makimura H, Mizuno TM, Mastaitis JW, Agami R, Mobbs CV (2002) Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC neuroscience* 3:18.
- Marchi N, Guiso G, Rizzi M, Pirker S, Novak K, Czech T, Baumgartner C, Janigro D, Caccia S, Vezzani A (2005) A Pilot Study on Brain-to-Plasma Partition of 10,11-Dihydro-10-hydroxy-5H-dibenzo(b,f)azepine-5-carboxamide and MDR1 Brain Expression in Epilepsy Patients Not Responding to Oxcarbazepine. *Epilepsia* 46:1613-1619.
- Mathison S, Nagilla R, Kompella UB (1998) Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: Fact or fiction? *Journal of Drug Targeting* 5:415-441.
- Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y (2005) Sequence-specific suppression of *mdr1a/1b* expression in mice via RNA interference. *Pharmaceutical Research* 22:2091-2098.
- McAuley JW, Summers MA, Moore JL, Long L, Shneker BF (2004) Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 45 Suppl. 7:124-125.
- McNamara JO (1999) Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature* 399:A15-A22.
- McNamara JO (1984) Kindling - An Animal-Model of Complex Partial Epilepsy. *Annals of Neurology* 16:72-76.
- McNamara JO (1994) Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 14:3413-3425.
- Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH (2001) Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11:727-733.
- Merkus P, Ebbens FA, Muller B, Fokkens WJ (2006) Influence of anatomy and head position on intranasal drug deposition. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 263:827-832.
- Merkus P, Romeijn SG, Verhoef JC, Merkus FWHM, Schouwenburg PF (2001) Classification of cilio-inhibiting effects of nasal drugs. *Laryngoscope* 111:595-602.
- Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, Paulson HL (2004) Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res* 32:661-668.
- Nakahara K, Carthew RW (2004) Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation. *Current Opinion in Cell Biology* 16:127-133.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1992) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band IV: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen*. Blackwell.
- Novina CD, Sharp PA (2004) The RNAi revolution. *Nature* 430:161-164.
- Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H (2004) Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett* 558:89-95.
- Papich MG, Alcorn J (1995) Absorption of diazepam after its rectal administration in dogs. *Am J Vet Res* 56:1629-1636.
- Pardridge WM (1991) Blood-brain barrier transport of glucose, free fatty acids, and ketone bodies. *Adv Exp Med Biol* 291:43-53.
- Pardridge WM (2005) The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2:3-14.

- Pardridge WM, Golden PL, Kang YS, Bickel U (1997) Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J Neurochem* 68:1278-1285.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.
- Pei Y, Tuschl T (2006) On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods* 3:670-676.
- Perl DP, Good PF (1987) Uptake of Aluminum Into Central-Nervous-System Along Nasal-Olfactory Pathways. *Lancet* 1:1028.
- Platt SR, Randell SC, Scott KC, Chrisman CL, Hill RC, Gronwall RR (2000) Comparison of plasma benzodiazepine concentrations following intranasal and intravenous administration of diazepam to dogs. *Am J Vet Res* 61:651-654.
- Podell M, Fenner WR, Powers JD (1995) Seizure classification in dogs from a nonreferral-based population. *J Am Vet Med Assoc* 206:1721-1728.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W (2001) P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein are involved in the regulation of extracellular levels of the major antiepileptic drug carbamazepine in the brain. *Neuroreport* 12:3557-3560.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W (2002) P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats. *Neurosci Lett* 327:173-176.
- Potschka H, Löscher W (2001) In Vivo Evidence for P-Glycoprotein-Mediated Transport of Phenytoin at the Blood-Brain Barrier of Rats. *Epilepsia* 42:1231-1240.
- Potschka H, Volk HA, Löscher W (2004) Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats. *Neuroreport* 15:1657-1661.
- Proctor DF (1983) The naso-oro-pharyngo-laryngeal airway. *Eur J Respir Dis Suppl* 128 (Pt 1):89-96.
- Racine RJ (1972) Modification of Seizure Activity by Electrical Stimulation .2. Motor Seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 32:281-&.
- Raub TJ (2006) P-glycoprotein recognition of substrates and circumvention through rational drug design. *Mol Pharm* 3:3-25.
- Reckziegel G, Beck H, Schramm J, Elger CE, Urban BW (1998) Electrophysiological characterization of Na⁺ currents in acutely isolated human hippocampal dentate granule cells. *J Physiol* 509.1:139-150.
- Regesta G, Tanganelli P (1999) Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Research* 34:109-122.
- Remy S, Beck H (2006) Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 129:18-35.
- Remy S, Urban BW, Elger CE, Beck H (2003) Anticonvulsant pharmacology of voltage-gated Na⁺ channels in hippocampal neurons of control and chronically epileptic rats. *Eur J Neurosci* 17:2648-2658.

- Rieux C, Carney R, Lupi D, Dkhissi-Benyahya O, Jansen K, Chounlamountri N, Foster RG, Cooper HM (2002) Analysis of immunohistochemical label of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus: comparison of different methods of quantification. *J Biol Rhythms* 17:121-136.
- Rizzi M, Caccia S, Guiso G, Richichi C, Gorter JA, Aronica E, Aliprandi M, Bagnati R, Fanelli R, D'Incalci M, Samanin R, Vezzani A (2002) Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: Functional implications for pharmacoresistance. *Journal of Neuroscience* 22:5833-5839.
- Ross TM, Martinez PM, Renner JC, Thorne RG, Hanson LR, Frey WH (2004) Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood-brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: a non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 151:66-77.
- Sakane T, Akizuki M, Taki Y, Yamashita S, Sezaki H, Nadai T (1995) Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the molecular weight of drugs. *J Pharm Pharmacol* 47:379-381.
- Sakane T, Akizuki M, Yamashita S, Nadai T, Hashida M, Sezaki H (1991) The transport of a drug to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity: The relation to the lipophilicity of the drug. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39:2456-2458.
- Sakane T, Akizuki M, Yamashita S, Sezaki H, Nadai T (1994) Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: The relation to the dissociation of the drug. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46:378-379.
- Salmenperä T, Inen R, Partanen K, Nen A (2001) Hippocampal and amygdaloid damage in partial epilepsy: A cross-sectional MRI study of 241 patients. *Epilepsy Research* 46:69-82.
- Sato M, Racine RJ, McIntyre DC (1990) Kindling: Basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 76:459-472.
- Sauer I, Dunay IR, Weisgraber K, Bienert M, Dathe M (2005) An apolipoprotein E-derived peptide mediates uptake of sterically stabilized liposomes into brain capillary endothelial cells. *Biochemistry* 44:2021-2029.
- Schinkel AH (1999) P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36:179-194.
- Schinkel AH, Smit JJ, van TO, Beijnen JH, Wagenaar E, van DL, Mol CA, van d, V, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, . (1994) Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77:491-502.
- Schinkel AH, Wagenaar E, van DL, Mol CA, Borst P (1995) Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest* 96:1698-1705.
- Schlachetzki F, Pardridge WM (2003) P-glycoprotein and caveolin-1 alpha in endothelium and astrocytes of primate brain. *Neuroreport* 14:2041-2046.
- Schwartz-Porsche D, Jurgens U (1991) [Effectiveness of bromide in therapy resistant epilepsy of dogs]. *Tierarztl Prax* 19:395-401.
- Schwartz-Porsche D, Löscher W, Frey HH (1985) Therapeutic efficacy of phenobarbital and primidone in canine epilepsy: a comparison. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 8:113-119.

- Seegers U, Potschka H, Löscher W (2002) Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research* 51:257-268.
- Seelig A, Landwojtowicz E (2000) Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *Eur J Pharm Sci* 12:31-40.
- Shi ZQ, Zhang QZ, Jiang XG (2005) Enhancement of systemic and CNS delivery of meptazinol hydrochloride by intranasal administration to rats. *Yao Xue Xue Bao* 40:754-757.
- Sills GJ, Kwan P, Butler E, de Lange EC, van den Berg DJ, Brodie MJ (2002) P-glycoprotein-mediated efflux of antiepileptic drugs: preliminary studies in *mdr1a* knockout mice. *Epilepsy Behav* 3:427-432.
- Sisodiya SM, Heffernan J, Squier MV (1999) Over-expression of P-glycoprotein in malformations of cortical development. *Neuroreport* 10:3437-3441.
- Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, Squier MV, Thom M (2002) Drug resistance in epilepsy: Expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain* 125:22-31.
- Sisodiya SM, Thom M (2003) Widespread upregulation of drug-resistance proteins in fatal human status epilepticus. *Epilepsia* 44:261-264.
- Soutschek J, et al. (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432:173-178.
- Spector S, Cull C, Goldstein LH (2000) Seizure precipitants and perceived self-control of seizures in adults with poorly-controlled epilepsy. *Epilepsy Res* 38:207-216.
- Summers MA, Moore JL, McAuley JW (2004) Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy. *Annals of Pharmacotherapy* 38:1631-1634.
- Talegaonkar S, Mishra PR (2004) Intranasal delivery: An approach to bypass the blood brain barrier. *Indian J Pharmacol* 36:140-147.
- Thorne RG, Frey II WH (2001) Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 40:907-946.
- Tishler DM, Weinberg KI, Hinton DR, Barbaro N, Annett GM, Raffel C (1995) *Mdr1* Gene-Expression in Brain of Patients with Medically Intractable Epilepsy. *Epilepsia* 36:1-6.
- Ugwoke MI, Verbeke N, Kinget R (2001) The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 53:3-21.
- Uprichard SL (2005) The therapeutic potential of RNA interference. *FEBS Letters* 579:5996-6007.
- van den Berg MP, Merkus P, Romeijn SG, Verhoef JC, Merkus FW (2004a) Uptake of melatonin into the cerebrospinal fluid after nasal and intravenous delivery: studies in rats and comparison with a human study. *Pharm Res* 21:799-802.
- van den Berg MP, Verhoef JC, Romeijn SG, Merkus FW (2004b) Uptake of estradiol or progesterone into the CSF following intranasal and intravenous delivery in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 58:131-135.
- van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, Marchi N, Rizzi M, Vezzani A, Gorter J (2004) Selective and persistent upregulation of *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein in the parahippocampal cortex of chronic epileptic rats. *Epilepsy Research* 60:203-213.

- van Vliet EA, van SR, Edelbroek PM, Redeker S, Aronica E, Wadman WJ, Marchi N, Vezzani A, Gorter JA (2006) Inhibition of the multidrug transporter P-glycoprotein improves seizure control in phenytoin-treated chronic epileptic rats. *Epilepsia* 47:672-680.
- Volk HA, Burkhardt K, Potschka H, Chen J, Becker A, Löscher W (2004a) Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. *Neuroscience* 123:751-759.
- Volk HA, Löscher W (2005) Multidrug resistance in epilepsy: rats with drug-resistant seizures exhibit enhanced brain expression of P-glycoprotein compared with rats with drug-responsive seizures. *Brain* 128:1358-1368.
- Volk HA, Potschka H, Löscher W (2004b) Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats. *Epilepsy Research* 58:67-79.
- Volk HA, Potschka H, Löscher W (2005) Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53:517-531.
- Vyas TK, Shahiwala A, Marathe S, Misra A (2005) Intranasal drug delivery for brain targeting. *Curr Drug Deliv* 2:165-175.
- Vyas TK, Tiwari SB, Amiji MM (2006) Formulation and Physiological Factors Influencing CNS Delivery upon Intranasal Administration. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 23:319-347.
- Wang F, Jiang X, Lu W (2003) Profiles of methotrexate in blood and CSF following intranasal and intravenous administration to rats. *Int J Pharm* 263:1-7.
- Westbrook GL (2000) Seizures and Epilepsy. In: *Principles of Neural Science* (Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, eds), pp 910-935. New York: McGraw-Hill.
- Wilda M, Fuchs U, Wissmann W, Borkhardt A (2002) Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 21:5716-5724.
- Winkler K, Scharnagl H, Tisljar U, Hoschutzky H, Friedrich I, Hoffmann MM, Huttinger M, Wieland H, Marz W (1999) Competition of A beta amyloid peptide and apolipoprotein E for receptor-mediated endocytosis. *Journal of Lipid Research* 40:447-455.
- Wioland MA, Fleury-Feith J, Corlieu P, Commo F, Monceaux G, Lacau-St-Guily J, Bernaudin JF (2000) CFTR, MDR1, and MRP1 immunolocalization in normal human nasal respiratory mucosa. *J Histochem Cytochem* 48:1215-1222.
- Wolf P (1994) *Epileptic seizures and syndromes*. London: John Libbey.
- Wolfe TR, Macfarlane TC (2006) Intranasal midazolam therapy for pediatric status epilepticus. *Am J Emerg Med* 24:343-346.
- Wong IC, Lhatoo SD (2000) Adverse reactions to new anticonvulsant drugs. *Drug Saf* 23:35-56.
- Xu P, Guo M, Hay BA (2004) MicroRNAs and the regulation of cell death. *Trends in Genetics* 20:617-624.
- Yague E, Higgins CF, Raguz S (2004) Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Therapy* 11:1170-1174.

Yang Z, Huang Y, Gan G, Sawchuk RJ (2005) Microdialysis evaluation of the brain distribution of stavudine following intranasal and intravenous administration to rats. *J Pharm Sci* 94:1577-1588.

Yilmazer-Hanke DM, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD, Blumcke I (2000) Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 59:907-920.

Zhang L, Ong WY, Lee T (1999) Induction of P-glycoprotein expression in astrocytes following intracerebroventricular kainate injections. *Experimental Brain Research* 126:509-516.

Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM (2004) Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clinical Cancer Research* 10:3667-3677.

Zimmermann TS, et al. (2006) RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441:111-114.

ANHANG

INHALT:

- Puffer und Lösungen
- Liste der verwendeten Substanzen
- Liste der verwendeten Geräte
- Publikationen

Puffer und Lösungen

0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung)

28,50 g Natriumphosphat dibasisch Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)

6,24 g Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)

in 800 ml *Aqua bidest.* lösen

mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

ad 1000 ml mit *Aqua bidest.*

0,01 M phosphatgepufferte 0,9%ige Kochsalzlösung (PBS)

9 g NaCl in 1000 ml 0,01 M PBS lösen

mit 1M HCl auf pH 7,6 einstellen

8%ige Paraformaldehyd-Stammlösung (500 ml)

800 ml *Aqua bidest.* auf 60-70 °C erhitzen

80 g Paraformaldehyd unter Rühren hinzufügen

1 M NaOH bis zur Klärung zusetzen

auf Raumtemperatur abkühlen lassen

Lösung filtrieren

ad 1000 ml mit *Aqua bidest.*

0,05 M Tris gepufferte Saline (TBS)

9 g NaCl
6,057 g Tris (C₄H₁₁NO₃)
in 800 ml *Aqua bidest.* lösen
mit 37%iger HCl auf pH 7,6 einstellen
ad 1000 ml mit *Aqua bidest.*

Färbelösung für Nissl (Thionin-) Färbung:

100 ml M Essigsäure
36 ml 1 M NaOH
ad 1000 ml mit *Aqua bidest.*
auf 60-70 °C erhitzen
darin 1,25 g Thionin lösen
1 h bei 60-70 °C rühren
heiß filtrieren

Gelatine-Chromalaun-Lösung

0,7 g Gelatine
0,07 g Chrom III
mit 100 ml *Aqua bidest.* vermischen
langsam auf 60 °C erwärmen, bis sich die Gelatine gelöst hat
langsam abkühlen lassen
eine Messerspitze Tymol unter Rühren hinzufügen
Lösung filtrieren

Zuckerlösung

12 g Saccharose in 40 ml 0,1 M PBS lösen

Nissl- (Thionin-) Färbung

3 min in 100% Alkohol inkubieren

3 min in 95% Alkohol inkubieren

3 min in 70% Alkohol inkubieren

3 min in 50% Alkohol inkubieren

3 min in *Aqua bidest.* inkubieren

75 bis 90 sek in Thionin-Färbelösung inkubieren

3 min in 50% Alkohol inkubieren

3 min in 70% Alkohol inkubieren

3 min in 95% Alkohol inkubieren

3 min in 100% Alkohol inkubieren

3 min in Terpeneol/Xylol-Ersatzmedium 1:1 inkubieren

3 min in Xylol-Ersatzmedium inkubieren

LÖSUNGEN FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON P-GP

Blocking-Solution

100 mg BSA (Bovines Serum Albumin)

0,5 ml Donkey-Serum

4,5 ml Carrier-Solution

Carrier-Solution

1 g BSA (Bovines Serum Albumin)

1 ml Donkey-Serum

1,5 ml 20%iges Triton X-100

100 ml TBS

2 M DAB-Stammlösung

500 mg 3,3`-DAB

in 7,5 ml *Aqua bidest.* lösen

DAB-Färbelösung

1125 µl Stammlösung (entspricht 123,75 mg 3,3'-DAB)

150 ml Tris-Nickel-Lösung

37,5 µl H₂O₂

Tris-Nickel-Lösung

0,3 g Nickelammoniumsulfat

in 50 ml TBS (0,05 M) lösen

LÖSUNGEN FÜR DIE MIKRODIALYSE UND DIE HPLC-MESSUNGEN

EDTA-Lösung zur Plasmagewinnung

1,86 g Tritriplex III in 15 ml *Aqua bidest.* unter Erwärmen lösen
mit 5 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

ad 20 ml mit *Aqua bidest.*

Lagerung bei 4°C

MOCK-CSF Mikrodialyse-Puffer nach Benveniste und Diemer, (1987)

2,1 g Natriumhydrogencarbonat

7,13 g NaCl

295,8 mg Magnesiumsulfat

223,7 mg Kaliumchlorid

191,1 mg Calciumchlorid

54,4 mg Kaliumdihydrogenphosphat

in 900 ml *Aqua bidest.* lösen

mit 2 M HCl auf pH 7,4 einstellen

ad 1000 ml mit *Aqua bidest.*

filtrieren über 0,22 µm Millipore-Filtereinheit

Tetracain-Augentropfen-Lösung (0,2%ig)

200 mg Tetracainhydrochlorid

in 10 ml *Aqua bidest.* lösen

filtrieren über 0,22 µm Millipore-Filtereinheit

Liste der verwendeten Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	E. Merck AG, Darmstadt
Ammonium Nickel Sulfat Hexahydrat	Fluka Chemie AG, Buchs
Antikörper C219 (monoklonaler Maus-Antikörper)	Calbiochem, Bad Soden
Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic [®])	Reckitt Benckiser Healthcare, Hull, Großbritannien
Calciumchlorid x 2 H ₂ O, p.a.	E. Merck AG, Darmstadt
Carbamazepin, micronisiert	Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg
Carbopol 974-P NF	Noveon, Inc., Cleveland
Chloralhydrat	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol-Succinat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Chrom III-Kaliumsulfat Dodecahydrat	E. Merck AG, Darmstadt
3,3 Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
EDTA (Titriplex,	E. Merck AG, Darmstadt
Einbettmedium (Tissue Freezing Medium)	Jung, Nussloch
Entellan-Eindeckmedium	E. Merck AG, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine, gepulvert	E. Merck AG, Darmstadt
Gentamicin (Frieso-Gent [®])	Essex Tierarznei, München
Gentamycinsulfat	Applichem, Darmstadt
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid, p.a.	E. Merck AG, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	E. Merck AG, Darmstadt

Kunststoff-Kaltpolymerisat, Dental-Zement (Paladur [®])	Heraeus Kulzer, Hanau
Magnesiumsulfat 7 x H ₂ O, p.a.	E. Merck AG, Darmstadt
Natrium-Chlorid-Lösung, isoton, [0,9%ig]	Braun, Melsungen
Natriumchlorid, p.a.	E. Merck AG, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	E. Merck AG, Darmstadt
Phenobarbital-Natrium (Natriumphenylethylbarbituricum 2460 DAB 7 III)	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Propofol (Rapinovel [®]), [10 mg/ml]	Essex Tierarzneimittel, München
Paraformaldehyd	Riedel de Häen, Hannover
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sekundärer Antikörper, biotinyliert, präadsorbiert gegen Ratte	Jackson Immuno Research Laboratories, INC, West Grove, Pennsylvania
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	Dako
Tetracainhydrochlorid	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Thionin (Acetate Salt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Toluol	E. Merck AG, Darmstadt
Tris	Applichem, Darmstadt
Triton [®] X – 100	Applichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid [35%]	Applichem, Darmstadt
Xylol-Ersatz-Medium (Rotihistol [®])	Roth, Karlsruhe

Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Bildanalysesoftware KS 400 (Windows Release 3.0, Carl Zeiss Vision)	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen
Cryostat (HM560M)	Microm, Walldorf

Digitale Farbkamera (single chip charge coupled device, CCD, Axiocam)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Eppendorf-Schüttler „Mixer 5432“	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Zentrifuge „Centrifuge 5415 D“	Eppendorf, Hamburg
Entgaser „ERC-3512“	ERC GmbH, Riemerling
Feinwaage „R 160 P“	Sartorius GmbH, Göttingen
Feinwaage „handy“	Sartorius GmbH, Göttingen
Filtereinheiten (OxyFil [®] , Centrifugal Filter, Mini)	Roth, Karlsruhe
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
FEP Tubing, Vol. [1,2 ml/10 cm]	CMA, Stockholm, Schweden
Gefrierblock (RKT)	Lauda, Königshofen
Hamilton HPLC Probenaufgabespritze (50 µl)	Hamilton Company, Nevada
Hauptsäule (Refill Nucleosil 120-5 C18, 250 x 4,6 mm)	Macherey & Nagel, Düren
Immunhistoapparatur (Shandon Sequenza)	Thermo-Electron Corporation, Dreieich
Integrator (Shimadzu C – R 4 A)	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
Kühlzentrifuge „Multifuge 1 S-R“	Heraeus, Hanau
Laborwaage „1219 MP“	Sartorius GmbH, Göttingen
Magnetrührer (MEA 11)	IDL GmbH, Niderrau
Mikrodialyseführungskanülen (CMA/12 Guide Cannula, silikonisiert)	CMA, Stockholm, Schweden
Mikrodialysepumpe (CMA/100 Microinjection pump)	CMA, Stockholm, Schweden
Mikroliterspritze (10 µl), 10F-5C 10 µl Syringe	SGE, Darmstadt
Mikroliterspritze (250 µl) Fixed needle syringe	Hamilton Company, Reno, Nevada, USA

Mikroinjektionsspritze (Typ 1; 1 ml)	Exmire, Japan
Mikroinjektionsspritze (Typ 1; 2,5 ml)	Exmire, Japan
Mikrohämatokritkapillaren, Na-heparinisiert	Brand GmbH, Wertheim
Mikroskop (Axioskop)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
pH-Meter (Digital pH-Meter)	Fa. Knick, Berlin
Plastikhalsband (Plastic Collar)	CMA, Stockholm, Schweden
Objektträger (Histobond®)	Paul Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauder-Königshofen
OD-Standard (Calibration of Step Tablet No.507ST101)	Eastman Kodak Company, USA
Probenaufgabeventil	Rheodyne, Kalifornien, USA
Probensammelgefäß (Micro Centrifuge Tubes, 250 µl with cap, Polyethylene, nonsterile)	Elkay Products Inc., Boston Turnpike, Shrewabury, MA,USA).
Pumpencontroller (Shimadzu C – R4A)	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
RATURN® (Bowl, Rotation Control)	BAS, West Lafayette, USA
Säulenofen (Oven Control Unit 20537)	Fa. Knauer, Berlin
Schlittengefriermikrotom (Frigomobil Modell 1205))	Fa. Jung, Heidelberg
Stereotakt	David Kopf, Tujunga, California, USA
Stereotakt	Stölting, Illionis, USA
Thermoschreiber (Schwarzer Uniskript, UD 12)	Picker International GmbH, München
Ultra-Turrax T 25	Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen
UV-Detektor (Shimadzu SPD – 6A)	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
Venenkatheter (Introcan®), 24 G ¾“, 0,7 x 19	Fa. Braun, Melsungen

Vorsäule (Nucleosil 120-5 C18, 60 x 4 mm) Fa. Knauer, Berlin

Waage „universal“ Sartorius GmbH, Göttingen

Publikationen

Vortrag

M. Czapp, M. Helm, U. Massing, G. Fricker, H. Potschka
„Entwicklung neuer Strategien zur Überwindung transporter-basierter
Pharmakoresistenz bei Epilepsie“
16. Vetpharm-Symposium, 28.-29.09.2006, Institut für Pharmakologie, Toxikologie
und Pharmazie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Posterpräsentationen

M. Czapp, J.P. Bankstahl, M.Helm, U. Massing, V. Zirolì, U. Huelsermann, G.
Fricker, H. Potschka
“A New Strategy to Overcome Pharmacoresistance in Epilepsy”
Epilepsia 2006, 47, Suppl. 4: 300

M. Czapp, H. Potschka
“Brain pharmacokinetics of antiepileptic drugs following intranasal administration”
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 375, Suppl. 1: 58