

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnung der verwendeten Abkürzungen

1. Einleitung	1
1.1 Arzneistoffabsorption	1
1.2 P-Glykoprotein	2
1.3 Bedeutung von Schilddrüsenhormone für die Pharmakokinetik von Arzneimitteln	6
2. Aufgabenstellung	9
3. Material und Methoden	10
3.1 Studienablauf	10
3.2 Probanden	11
3.2.1 Probandencharakteristik	11
3.2.2 Einschlussuntersuchung	12
3.2.3 Einschlusskriterien/ Ausschlusskriterien	13
3.2.4 Sicherheitsparameter	15
3.2.5 Abschlussuntersuchung	15
3.3 Ethische und gesetzliche Bedingungen	16
3.3.1 Rechtlich-ethische Aspekte	16
3.3.2 Probandenversicherung	16
3.3.3 Datenschutz/ Qualitätskontrollen/ Archivierung	17
3.4 Zusätzliche Untersuchungen	17
3.4.1 Ergometrie	17
3.4.2 Duodenalbiopsie	19
3.4.3 Ultraschalluntersuchung der Schilddrüse	19
3.5 Immunhistochemischer Nachweis von intestinalem P-gp	20
3.6 Bestimmung der MDR1 mRNA-Expression durch RT-PCR-Technik	20
3.7 Pharmakokinetische Methoden	22
3.7.1 Orale Applikation von Thyroxin	22
3.7.2 Standardbedingungen bei allen stationären pharmakokinetischen Untersuchungen	22
3.7.3 Pharmakokinetische Untersuchungen mit Talinolol nach intravenöser Gabe	24

3.7.4	Pharmakokinetische Untersuchungen mit Talinolol nach oraler Gabe	25
3.8	HPLC-Analytik	25
3.8.1	Bestimmung der Talinololserumkonzentration	25
3.8.2	Bestimmung von Talinolol und seiner Metabolite im Urin	28
3.9	Biometrische Methoden	28
4.	<i>Ergebnisse</i>	31
4.1	Compliance und Verträglichkeit	31
4.2	Bestimmung der Schilddrüsenparameter	31
4.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	33
4.4	Bestimmung der MDR1 mRNA-Expression durch RT-PCR-Technik	34
4.5	Pharmakokinetik von Talinolol nach intravenöser Applikation	35
4.6	Pharmakokinetik von Talinolol nach oraler Applikation	38
5.	<i>Diskussion</i>	41
6	<i>Zusammenfassung</i>	47
7.	<i>Literatur</i>	49

Anhang

Abkürzungen

ABC-Transporter	ATP-binding cassette Transporter
A_e	Amount excreted
A_{eTal}	Amount excreted von Talinolol
A_{eMetab}	Amount excreted des Metaboliten
AM	Arzneimittel
AMG	Arzneimittelgesetz
ALAT	Alanin-Amino-Transferase
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase
AUC	area under the curve = Fläche unter der Serum-Konzentrations-Zeit-Kurve
AV	atrioventrikulär
AWD	Arzneimittelwerk Dresden GmbH
BP_{dia}	diastolischer Blutdruck
BP_{sys}	systolischer Blutdruck
bpm	beats per minute = Schläge pro Minute
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C_{max}	maximale Serumkonzentration
Cl_{metab}	metabolische Clearance
Cl_{ren}	renale Clearance
$Cl_{residual}$	residuale Clearance
Cl_{tot}/F	totale Clearance (kalkuliert aus Dosis/AUC)
CYP 3A4	Cytochrom P450 3A4
d.h.	das heißt
EKG	Elektrokardiogramm
EMAU	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
ES	Extrasystole
F	Bioverfügbarkeit
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCP	Good Clinical Practice

GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GLP	Good Laboratory Practice
Hb	Haemoglobin
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HF	Herzfrequenz
HIV-AK	Human Immunodeficiency Virus-Antikörper
HPLC	High performance liquid chromatography
IQR	Interquartil Range
i.v.	intravenös
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
λ_z	kleinste/ langsamste Geschwindigkeitskonstante der Disposition
MDR	Multidrug Resistenz
mOD	mittlere optische Dichte
p.a.	post applicationem
P-gp	P-Glykoprotein
p.o.	per os
SD	Standardabweichung
SVES	supraventrikuläre Extrasystolen
$t_{1/2}$	Eliminationshalbwertzeit
T3	Trijodthyronin
fT4	freies Thyroxin
TSH	Thyroid stimulating hormone
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
V_z	Verteilungsvolumen während der terminalen (λ_z) Dispositionsphase
VES	ventrikuläre Extrasystolen

1. Einleitung

Bei gleichzeitiger Gabe mehrerer Arzneimittel kann es zum Auftreten von Arzneimittelinteraktionen kommen. Besondere Bedeutung haben zum einen die metabolischen Wechselwirkungen, die immer dann auftreten, wenn sich zwei gleichzeitig applizierte Arzneimittel in ihrem Stoffwechsel gegenseitig beeinflussen. Daneben ist seit jüngerer Zeit bekannt, dass Transportproteine die Resorption, Verteilung und Elimination von Arzneimitteln entscheidend modifizieren können.

Eine detaillierte Aufklärung derartiger Transportprozesse ist notwendig, um die Vorhersagbarkeit von Interaktionen zu verbessern und damit die Therapiesicherheit zu erhöhen.

1.1 Arzneistoffabsorption

Die orale Gabe von Arzneistoffen ist wegen der einfachen Applizierbarkeit für die Pharmakotherapie von besonderer Bedeutung. Über die Speiseröhre und den Magen gelangt ein oral verabreichtes Arzneimittel in den Dünndarm - für die meisten Arzneimittel der Ort ihrer Resorption. Allgemein ist bekannt, dass die Plasmakonzentration eines Arzneistoffes nach oraler Gabe durch das Ausmaß der Resorption aus dem Gastrointestinal-Trakt, der Verteilung im peripheren Gewebe, dem hepatischen und extrahepatischen Arzneimittelstoffwechsel und der renalen und biliären Elimination bestimmt wird. Für das Ausmaß der Resorption sind neben substanzspezifischen Eigenschaften wie Lipophilie, Molekülgröße und Ladung auch andere Einflussfaktoren wie der pH-Wert des Magen-Darm-Traktes und ein Abbau des Arzneimittels im Lumen des Gastrointestinaltraktes durch Verdauungsenzyme und Mikroorganismen entscheidend (Hunter and Hirst, 1997).

Lange Zeit galt die Mukosa des Gastrointestinaltraktes als passive Absorptionsbarriere für Arzneimittel. Untersuchungen der letzten Jahre deuten darauf hin, dass die Darmmukosa keineswegs nur eine passive Diffusionsbarriere darstellt, sondern auch durch aktive Mechanismen die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen

entscheidend beeinflusst. Zum einen konnte in den Enterozyten das Vorkommen von bislang hauptsächlich aus der Leber bekannten Cytochrom P450-Isoenzymen (CYP-Isoenzymen) gezeigt werden (z.B. CYP 3A4) (Kivisto et al., 1996 ; Kolars et al., 1992 ; Watkins et al., 1987), die den Arzneistoffmetabolismus im Sinne eines zum Teil ausgeprägten prähepatischen First-pass Metabolismus modifizieren (Fromm et al., 1998 ; Fromm et al., 1999 ; Holtbecker et al., 1996 ; Kolars et al., 1991). Ferner wurden eine Reihe von Transportproteinen gefunden, die in der Lage sind, Arzneistoffe aktiv aus der Zelle hinauszubefördern. Der bekannteste Vertreter ist der Efflux-Transporter P-Glykoprotein (P-gp), der an der apikalen (luminalen) Membran von Enterozyten lokalisiert ist (Spahn-Langguth et al., 1998).

1.2 P-Glykoprotein

Das Transportprotein P-Glykoprotein wurde zuerst in Tumorzellen entdeckt und 1976 erstmalig beschrieben (Juliano and Ling, 1976). Es ist das Produkt des MDR1-Gens und für einen Teil der bei der Chemotherapie von Tumoren beobachteten **Multidrug Resistenz (MDR)** verantwortlich. Zytostatika, für die das Phänomen der Multidrug-Resistenz eine Rolle spielt, sind beispielsweise Anthracycline, Vinca-Alkaloide, Etoposid und Paclitaxel (Schinkel, 1997). P-Glykoprotein gehört zu der **ATP-binding cassette** Transporter-Familie (ABC-Transporter-Familie). Diese Proteine haben die Funktion, einen Arzneistoff, der das Zellinnere erreicht hat, in einem gerichteten Transport wieder aus der Zelle herauszubefördern. Dabei handelt es sich um einen ATP-abhängigen aktiven Transportmechanismus. Aus den Untersuchungen der letzten Jahre geht hervor, dass P-Glykoprotein nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in gesunden Geweben von Leber, Niere, Darm und Gehirn exprimiert wird (Tab.1). In den meisten Fällen ist das Glykoprotein an der luminalen Oberfläche lokalisiert, wo es am aktiven Transport von Substanzen in die Galle (hepatisch), den Urin (renal) oder das Darmlumen (intestinal) beteiligt ist.

Tabelle 1: Vorkommen von P-Glykoprotein im menschlichen Körper (Bendayan, 1996 ; Cordon-Cardo et al., 1989 ; Evers et al., 1996 ; Lum and Gosland, 1995 ; Vallabhaneni, 1998)

Organ	Zelle	Funktion
Leber	Hepatozyt	Exkretion in Gallengang
Niere	Tubulusepithelzelle	Tubuläre Sekretion
Darm	Enterozyt	Exkretion in das Darmlumen
ZNS	Endothelzelle der Blut-Hirn-Schranke	Exkretion in das Blut

Neben seiner Funktion bei sekretorischen Vorgängen spielt das intestinale P-gp als Absorptionsbarriere für exogen zugeführte Stoffe eine Rolle (Gramatte and Oertel, 1999 ; Muller and Jansen, 1998). Im ZNS ist das Transportprotein integraler Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke (van Asperen, 1999) und führt dazu, dass Fremdstoffe kaum oder nur in geringen Mengen in das ZNS eindringen können. Im Darm trägt das Vorhandensein von P-gp dazu bei, dass Fremdstoffe entweder gar nicht oder nur im verminderten Ausmaß in den Organismus aufgenommen werden, bzw. schneller ausgeschieden werden (Dale, 1999). P-gp übt somit eine Art Schutzfunktion aus, indem es den Körper oder empfindliche Kompartimente, wie z.B. das ZNS, vor dem Eindringen von biologisch aktiven potentiell schädlichen Substanzen bewahrt (Gatmaitan and Arias, 1993).

Als Substrate des Transporters fungieren vor allem kationische, amphiphile und planare aromatische Moleküle (Zamora et al., 1988). Dazu gehören Produkte aus Pflanzen oder Mikroorganismen, deren halbsynthetische Analoga und synthetische organische Substanzen mit mittlerem Verteilungskoeffizient (Okta-nol/Wasser) von ungefähr 1 oder größer (Ford and Hait, 1990). Tabelle 2 zeigt eine Auswahl von therapeutisch relevanten P-gp-Substraten.

Tabelle 2: Substrate von P-Glykoprotein, Auswahl

Substrat	Literatur
<i>β-Blocker</i>	
Acebutolol	Neuhoff et al. 2000 (Neuhoff et al., 2000)
Celiprolol	Karlsson et al. 1993 (Karlsson et al., 1993)
Talinolol	Gramatte et al. 1996 (Gramatte et al., 1996)
<i>andere Herz-Kreislauf-Pharmaka</i>	
Digoxin	Tanigawara et al. 1992 (Tanigawara et al., 1992) Lannoy et al. 1992 (de Lannoy and Silverman, 1992)
Verapamil	Kerr et al. 1986 (Kerr et al., 1986)
<i>Zytostatika</i>	
Paclitaxel	Sparreboom et al. 1992 (Sparreboom et al., 1997)
Vincristin	Schinkel et al. 1996 (Schinkel et al., 1996)
Etoposid	Sikic et al. (Sikic et al., 1997)
<i>HIV-Proteaseinhibitoren</i>	
Saquinavir	Kim et al. 1998 (Kim et al., 1998)
Indinavir	Lee et al. 1998 (Lee et al., 1998)
<i>Hormone</i>	
Dexamethason	Schinkel et al. 1995 (Schinkel et al., 1995)
Estradiol	Wacher et al. 1995 (Wacher et al., 1995)

Die gleichzeitige Gabe von zwei Substanzen, die über dasselbe Protein transportiert werden, kann zu Arzneimittelinteraktionen führen. Theoretisch können sich somit alle in Tabelle 2 aufgelisteten Stoffe im Sinne einer Competition um P-gp beeinflussen. So konnte anhand einer Interaktionsstudie mit Verapamil und Digoxin gezeigt werden, dass gleichzeitig appliziertes Verapamil zu einer signifikanten Erhöhung des Digoxinspiegels führt (Hedman et al., 1991). Ferner ist es möglich, die Expression von P-Glykoprotein durch Induktion zu beeinflussen. Ähnlich wie im Fall der Cytochrom P450-Enzyme wird die Expression des Transportproteins durch Gabe von Rifampicin gefördert. In Fallbeschreibungen wiesen Patienten bei gleichzeitiger Gabe von Digoxin und Rifampicin verminderte Digoxinspiegel auf (Gault et al., 1984 ; Novi et al., 1980). Greiner und Mitarbeiter konnten in einer an gesunden Probanden durchgeführten Studie zeigen, dass unter dem Einfluss von Rifampicin die intestinale P-gp-Expression ansteigt. Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der Bioverfügbarkeit von oral appliziertem Digoxin (Greiner et al., 1999). Bei einer mit Rifampicin und Talinolol durchgeführten Studie fanden Westphal und Mitarbeiter neben Veränderungen der oralen Kinetik eine zusätzliche Abnahme der Bioverfügbarkeit nach intravenöser Talinololgabe (Westphal et al., 2000). Bei dieser Untersuchung fiel eine erhebliche interindividuelle Streuung der intestinalen P-gp-Expression auf, deren Ursache bislang nicht bekannt ist. Neben genetischen Faktoren könnten endogene Modulatoren für diese Variabilität eine Rolle spielen.

Während für einige Steroidhormone und Phospholipide gezeigt werden konnte, dass sie Substrat von P-gp sind (Borst et al., 1993 ; Borst et al., 2000), ist die Frage, ob es tatsächlich endogene Regulatoren für P-gp gibt, bislang wenig untersucht (Schinkel, 1997 ; Ling, 1997). Für Schilddrüsenhormone gibt es Anhaltspunkte, dass sie an einer derartigen Regulation des Transportproteins P-gp beteiligt sind. So konnten Zucker und Mitarbeiter eine Herunterregulation von P-gp bei mit Trijodthyronin vorbehandelten Kaulquappen von *Xenopus laevis* zeigen (Zucker et al., 1997). Desweiteren kann eine von der Norm abweichende Schilddrüsenfunktion die Pharmakokinetik von Arzneimitteln beeinflussen.

1.3 Bedeutung von Schilddrüsenhormone für die Pharmakokinetik von Arzneimitteln

Schilddrüsenhormone spielen eine entscheidende Rolle für viele Stoffwechsellvorgänge im menschlichen Organismus. Ihre Synthese und Sekretion aus der Schilddrüse erfolgt über einen hypothalamo-hypophysären Regelkreis (Abb.1). Ist dieser Regelkreis gestört, kann es zu einem Ungleichgewicht der in der Peripherie zirkulierenden Schilddrüsenhormonen Thyroxin (T₄) und Trijodthyronin (T₃) kommen.

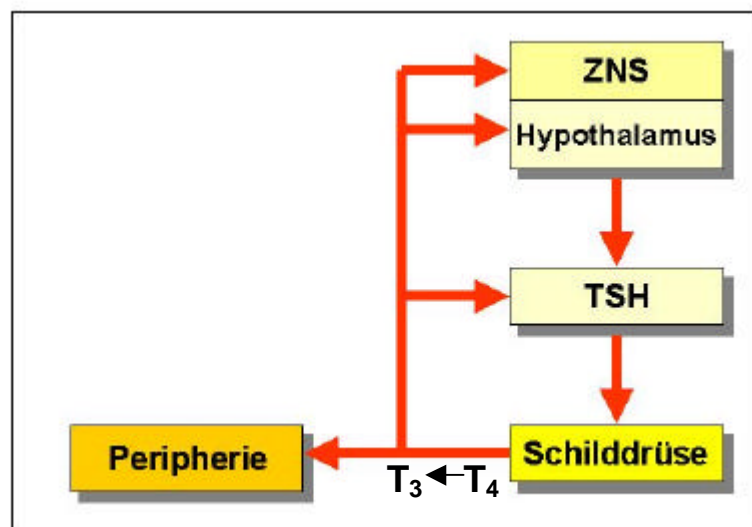


Abbildung 1: Hypothalamo-hypophysärer Regelkreis der Schilddrüsenhormonsekretion (modifiziert nach Wuttke (Wuttke, 2000))

Affektionen der Schilddrüse sind häufige Erkrankungen, die in jedem Lebensalter auftreten und zu Störungen im Stoffwechsel führen können. Seit längerer Zeit ist bekannt, dass Veränderungen der Schilddrüsenfunktion zu einer Änderung der Pharmakokinetik von Arzneimitteln führen können. Eine verminderte Empfindlichkeit für Herzglykoside bei Hyperthyreose wurde erstmals von Frye und Braunwald nachgewiesen (Frye and Braunwald, 1961). In der Folge konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass pathophysiologische Veränderungen wie sie bei der Hyperthyreose vorliegen, zu verminderten Digoxinspiegeln führen, während bei Hypothyreose die Digoxinspiegel erhöht waren (Doherty and Perkins,

1966 ; Gilfrich, 1976 ; Shenfield et al., 1977). Die Ursache für diese Phänomen wurde in der Literatur kontrovers diskutiert und ist bislang noch nicht endgültig geklärt. Da Digoxin vorwiegend in unveränderter Form renal ausgeschieden wird, kommt eine durch Hyperthyreose hervorgerufene Stimulation des metabolischen Abbaus als Ursache der Blutspiegelniedrigung wohl kaum in Frage (Schütz, 1996). Neben einer verringerten enteralen Resorption (Watters and Tomkin, 1975) wurden eine Erhöhung der biliären (Caldwell and Cline, 1976 ; Hartman et al., 1975), renalen (Bonelli et al., 1978 ; Croxson and Ibbertson, 1975 ; Doherty and Perkins, 1966) aber auch der nicht-renalen Elimination (Gilfrich, 1976 ; Lawrence et al., 1977) als Ursache für die Plasmaspiegelniedrigung bei Hyperthyreose diskutiert. Ferner ist seit einiger Zeit bekannt, dass Digoxin als Substrat von P-gp aktiv in das Darmlumen sezerniert und auf diese Weise zu der Blutspiegelverminderung des Arzneistoffes beitragen kann.

Auch für β -Blocker gibt es Hinweise, dass deren Bioverfügbarkeit im Rahmen einer hyperthyreoten Stoffwechsellage abnimmt. Dies gilt nicht nur für die lipophilen β -Blocker wie Metoprolol (Hallengren et al., 1982) und Propranolol (Feely and Peden, 1984), die einem ausgeprägten oxidativen Metabolismus unterliegen. Auch für hydrophile Substanzen wie Atenolol ist eine Abnahme der AUC beschrieben (Geffner et al., 1990). Sollten Schilddrüsenhormone wie unter 1.2 erwähnt in der Lage sein, die Aktivität von P-Glykoprotein zu beeinflussen, könnte dies die Ursache für die im Rahmen einer hyperthyreoten Stoffwechsellage beobachtete Blutspiegelniedrigung von P-gp-Substraten sein.

Für den hydrophilen β -Blocker Talinolol gibt es bislang keine pharmakokinetischen Daten bei gleichzeitiger Schilddrüsendysfunktion. Talinolol ist als Modellsubstanz für pharmakokinetische Untersuchungen besonders geeignet, weil es einerseits Substrat des Transportproteins P-gp ist, selbst kaum metabolisiert wird und im Vergleich zu Digoxin eine relativ kurze Plasmahalbwertszeit und große therapeutische Breite besitzt (Fachinformation, 1999 ; Gramatte and Oertel, 1999 ; Trausch et al., 1995 ; Wetterich et al., 1996). Die fehlende Biotransformation war für den Einsatz von Talinolol bei der vorliegenden Studie besonders relevant, da durch die

Gabe von Schilddrüsenhormonen eine allgemeine Steigerung der Stoffwechselvorgänge inklusive des CYP450- Metabolismus zu erwarten war.

2. Aufgabenstellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob Schilddrüsenhormone einen Einfluss auf die P-gp-Expression im menschlichen Dünndarm haben.

Im Detail sollte dabei auf folgende Fragestellung näher eingegangen werden:

1. Wird die Expression von intestinalem P-gp durch Schilddrüsenhormone reguliert ?
2. Hat diese Expressionsänderung funktionelle Bedeutung ?
3. Handelt es sich um eine Induktion oder Inhibition ?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende experimentelle Ansätze gewählt:

1. Charakterisierung der Expression von P-gp in Duodenalbiopsien:
 - auf Proteinebene mittels Immunhistochemie
 - auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR
2. Untersuchung der Aktivität von intestinalem P-gp
 - Pharmakokinetische Untersuchung der Interaktion von Talinolol und Thyroxin an gesunden Probanden

3. Material und Methoden

3.1 Studienablauf

Die klinische Untersuchung an 8 gesunden freiwilligen Probanden erfolgte nach den Regeln einer kontrollierten, offenen Studie entsprechend dem Design in Abb. 2.

Nach Einschluss in die Studie (Einschlussuntersuchung) wurde das Konzentrations-Zeit-Profil von Talinolol (Cordanum[®]) nach einmaliger intravenöser Infusion von 30 mg (30 min) und 3 Tage später nach oraler Gabe von 100 mg untersucht. Nach 3 weiteren Tagen wurden täglich 200 µg L-Thyroxin (2 Tabletten L-Thyroxin Henning 100[®], morgens) für insgesamt 17 Tage gegeben.

Zur Messung der Konzentrations-Zeit-Profile wurde am Tag 15 der Thyroxingabe 100 mg Talinolol oral und nach Abschluss der Thyroxingabe (Tag 18) 30 mg Talinolol intravenös appliziert.

Eine Duodenalbiopsie wurde im Rahmen der Einschlussuntersuchung und eine weitere am 24. Studientag (17. Tag der Thyroxingabe) vorgenommen.

Eine fahrradergometrische Untersuchung sowie eine Schilddrüsenultraschalluntersuchung wurden im Rahmen der Einschlussuntersuchung durchgeführt.

Die Abschlussuntersuchung erfolgte innerhalb von 2 Wochen nach dem individuellen Ende der Studie.

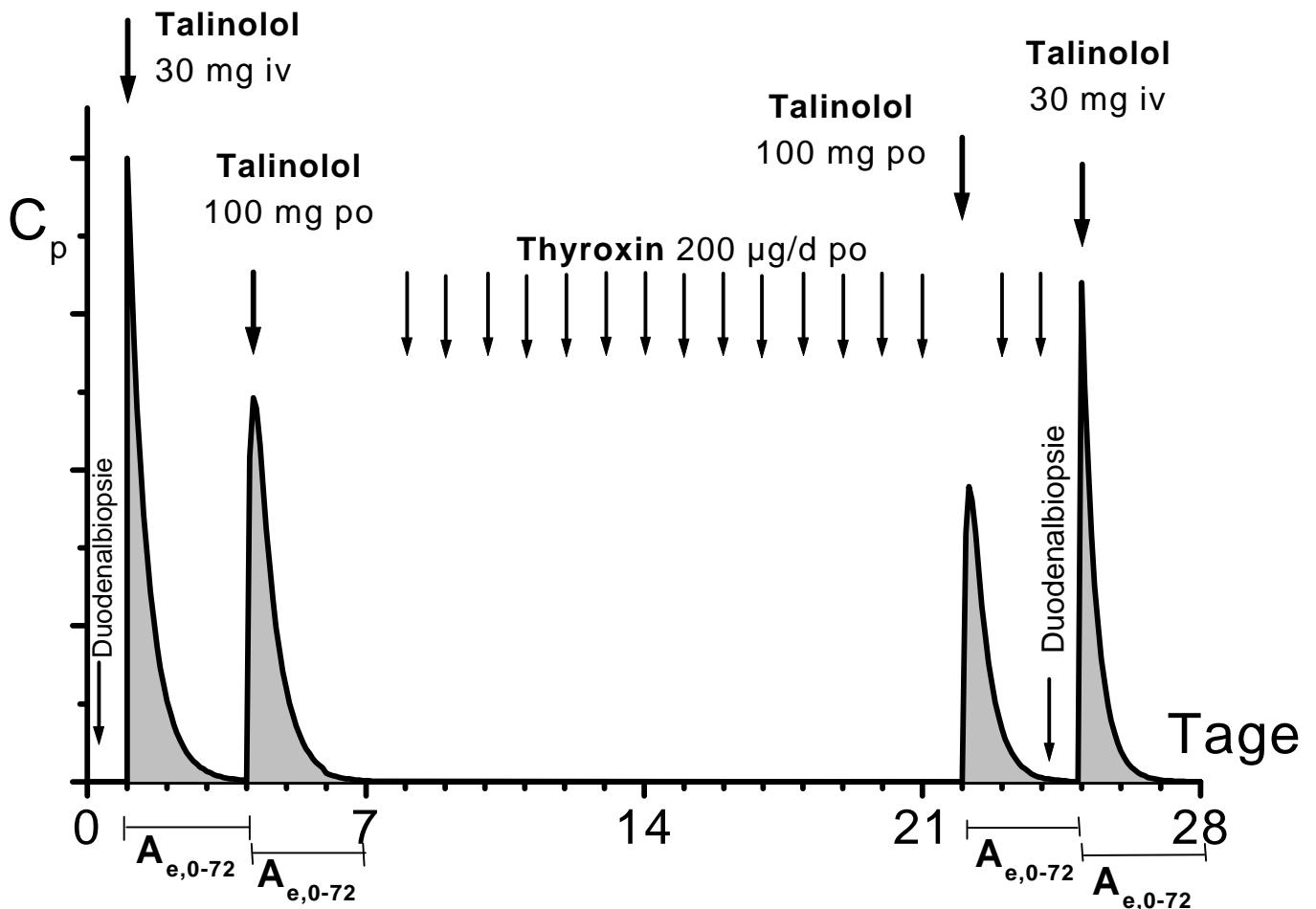


Abbildung 2 : Ablauf der Interaktionsstudie

3.2 Probanden

3.2.1 Probandencharakteristik

In die Studie wurden 8 gesunde freiwillige Probanden (4 weibliche, 4 männliche) im Alter von 22 – 29 Jahre (Körpergewicht 59 - 89 kg, Körpergröße 168 – 184 cm) einbezogen. Es handelte sich dabei um zuverlässige Probanden aus der Stammklientel des Instituts für Pharmakologie.

Alle Probanden waren klinisch gesund, der Test auf HBV, HIV und das Drogenscreening waren negativ. Die individuellen Laborparameter ergaben keine medizinisch relevanten Abweichungen von den Normalwerten und zeigten keine Hinweise auf eventuelle akute oder chronische Erkrankungen.

Alle Probanden wurden über genaue Zielstellung, Versuchsablauf, Umfang und Risiken der Studie sowie mögliche Wirkungen und Nebenwirkungen der applizierten Arzneimittel ausführlich in mündlicher und schriftlicher Form aufgeklärt. Ihre Fragen wurden vollständig im Gespräch beantwortet. Am Ende der Aufklärung bestanden keine weiteren Fragen. Die Probanden nahmen freiwillig an den Untersuchungen teil, was sie mit ihrer Unterschrift bestätigten. Die Probanden hatten jederzeit das Recht, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteil für ihre Person von der Studie zurückzutreten.

3.2.2 Einschlussuntersuchung

Alle Probanden wurden innerhalb von 2 Wochen vor Beginn der Studie hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes umfassend untersucht. Die Untersuchung erfolgte morgens in nüchternem Zustand und beinhaltete:

- Anamnese und klinischer Status
- Messung von Herzfrequenz, Blutdruck und EKG (Standardableitungen nach Einthoven, Extremitätenableitungen nach Goldberger, Brustwandableitungen V1 – V6)
- Fahrradergometrie (vgl. 3.5.1)
- Duodenalbiopsie (vgl. 3.5.2)
- Schilddrüsenultraschall (vgl. 3.5.3)
- Laborchemische Untersuchungen:

Allgemeine klinische Chemie

Elektrolyte (Na, K, Ca, Cl)	Alkalische Phosphatase
Kreatinin	Bilirubin
Albumin	Cholesterin
Harnstoff	Gerinnung
Amylase	T ₃
Glucose	fT ₄
ALAT	TSH
ASAT	GGT

Hämatologie/Hämatoserologie

Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten-, Leukozyten-, Thrombozytenzahl, Differentialblutbild

Urinanalyse

Leukozyten, Urobilinogen, Bilirubin, Ketonkörper, Nitrit, Protein, Glukose, Blut/Erythrozyten

Infektionsserologie und Drogenscreening

- Blutuntersuchung: HBV-, HCV- und HIV-Screening,
- Urin:
 1. Drogenscreening: Opiate, Cannabinoide, Barbiturate, Amphetamine, Kokain, Methadon, trizyklische Antidepressiva, Benzodiazepine
 2. Schwangerschaftstest (Frauen)

Die klinisch-chemischen Parameter und die Infektionsserologie (mittels ELISA-Technik) wurden am Institut für Klinische Chemie bzw. am Institut für Mikrobiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität entsprechend den Regeln der Laboratoriumsdiagnostik bestimmt. Das Drogenscreening mit immunologischem Schnelltest (Triage⁸ Merck, Darmstadt) erfolgte am Institut für Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität.

3.2.3 Einschlusskriterien/ Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien

- Alter: 18 – 45 Jahre
- Geschlecht: männlich oder weiblich
- Ethnische Herkunft: kaukasisch
- Körpergewicht: ± 20 % vom Normalgewicht nach Broca

- Probanden, die durch die Befunde der klinischen Untersuchung, Gastroskopie, EKG, Schilddrüse und Bestimmung von Laborparametern nach ärztlichem Ermessen als gesund beurteilt werden konnten
- Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien

- Bekannte Überempfindlichkeit gegen die angewandten Arzneimittel oder Adjuvantien
- Herz- oder Lungenerkrankungen in der Anamnese
- Bradykardie (HF < 60/min)
- Ruhetachykardie (HF > 100/min)
- Jede Art von Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsstörungen des Herzens (Sinusknotensyndrom, SA- oder AV-Block jeden Grades)
- Ruheblutdruck systolisch >140 und <100 mmHg, diastolisch >90 und <65 mmHg
- Obstruktive Atemwegserkrankung (z.B. Asthma bronchiale)
- Bluterkrankungen und/ oder Blutungsneigung
- Einnahme von Hemmstoffen der Blutgerinnung
- Periphere arterielle Durchblutungsstörungen
- Vorliegen einer akuten allergischen Erkrankung
- Endokrine Erkrankungen und / oder Störungen des Stoffwechsels
- Gastrointestinale Erkrankungen (außer Appendektomie)
- Akute oder chronische Infektionskrankheiten
- Nieren- und / oder Lebererkrankungen
- Erkrankungen, die die Absorption, den Stoffwechsel oder die Exkretion der Prüfpräparate während der Untersuchung beeinflussen könnten
- Neigung zu orthostatischen Dysregulationen und / oder Ohnmachtsanfällen
- Alkoholkonsum von > 40 g/d
- Nikotingenuss > 10 Zigaretten/d (oder Äquivalent)
- Spezielle einseitige Diätgewohnheiten, z.B. Vegetarier, unterkalorische Ernährung
- Akute Erkrankung in den letzten 14 Tagen

- Einnahme systemisch oder örtlich wirkender Arzneimittel innerhalb der letzten 14 Tage vor Beginn der Studie (oder 10 x Halbwertszeit des betreffenden Medikamentes)
- Blutspende in den letzten 8 Wochen
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie in den letzten 4 Wochen bzw. vor Ablauf der dort festgesetzten Sperrfrist
- Mangelndes Interesse an der Studie und mangelnde Bereitschaft zur Kooperation mit dem Studienpersonal
- Drogen-, HCV-, HIV-, HBV-Screening positiv / nicht durchgeführt
- Genuss von Nikotin bzw. Alkohol an den Studientagen
- Jegliche Zusatzmedikation während der Studie
- Stillen, Schwangerschaftstest positiv bzw. nicht durchgeführt oder fehlende zuverlässige Kontrazeption

3.2.4 Sicherheitsparameter

Zur Kontrolle der Schilddrüsenfunktion wurden die Schilddrüsenparameter T3, fT4 und TSH vor Studienbeginn, am 15. und 22. Studientag (8. Tag der Thyroxingabe, bzw. nach Abschluss der Thyroxingabe) und im Rahmen der Abschlussuntersuchung im Serum bestimmt.

3.2.5 Abschlussuntersuchung

Frühestens eine Woche nach der letzten Talinololapplikation fand die klinische Untersuchung der Probanden und die Bestimmung der Laborparameter (wie bei der Aufnahmeuntersuchung, außer Drogen-, HBV-, HCV- und HIV-Screening) statt. Ausschlüsse von der Studie aufgrund der medizinischen Untersuchungsergebnisse sowie Studienabbrüche traten nicht auf.

3.3 Ethische und gesetzliche Bedingungen

3.3.1 Rechtlich-ethische Aspekte

Die vorliegende Studie erfüllte die an die Durchführung einer klinischen Studie gestellten Anforderungen der Deklaration von Helsinki (Somerset West 1996), des deutschen AMG §§ 40 und 41 sowie die „Grundsätze für die Durchführung der klinischen Prüfung von Arzneimitteln“ (Bundesanzeiger Nr. 243: 16617, 30.12.1987), die ICH-GCP-Note for Guidance (Brussel, 20.06.1996, E6GCPD12/01May96) und die Bestimmungen der Berufsordnung für die deutschen Ärzte (Dtsch Ärzteblatt 94, 2354 – 2363, 1997).

Vor Studienbeginn wurden der Prüfplan, die Probandeninformation, die Probandeneinwilligungserklärung sowie der Versicherungsnachweis der Ethikkommission der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern bei der Ernst-Moritz-Arndt-Universität vorgelegt. Diese befürwortete am 26.10.1999 die Studie ohne die Erhebung von Auflagen (Reg.-Nr.: III UV 25/99).

Die Studie wurde dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Registriernummer: 4015630) sowie der Landesbehörde in Mecklenburg-Vorpommern (Arzneimittelüberwachungs- und Arzneimittelprüfstelle Schwerin) entsprechend § 67 AMG angezeigt.

3.3.2 Probandenversicherung

Für die Probanden wurde eine Probanden-Haftpflichtversicherung gemäß dem AMG § 40 Abs. 3 Satz 2 mit einer Versicherungssumme von 1 Mio DM bei der Allianz Versicherungs-AG abgeschlossen (Versicherungsnummer IHA 90/445/8797139). Die Probanden waren damit gegen etwaige im Zusammenhang mit der Prüfung auftretende Gesundheitsschäden versichert. Die Probanden waren darüber informiert, eine Gesundheitsschädigung, die als Folge der klinischen Prüfung eingetreten sein könnte, dem Prüfarzt anzuzeigen und sich nicht ohne Einverständnis des Prüfarztes einer anderen medizinischen Behandlung während der Dauer der Studie zu unterziehen (außer im Notfall).

3.3.3 Datenschutz/ Qualitätskontrollen/ Archivierung

Für jeden Probanden wurde ein Studiencode (Probandennummer, Initialen, Alter) vergeben und ein *case report form* (CRF, Fallberichtbogen) angefertigt. Auf den Prüfdokumenten wurden ausschließlich die Studiencodes verwendet. Die Probandendaten wurden vom Personal streng vertraulich und unter Einhaltung der Datenschutzbestimmungen behandelt. Alle an der Studie beteiligten Mitarbeiter unterlagen der Schweigepflicht. Alle Probanden wurden sowohl mündlich als auch schriftlich über die Verwendung der verschlüsselten Daten zu Publikationszwecken informiert und erklärten sich damit in schriftlicher Form einverstanden.

Die korrekte Dokumentation aller Daten unterlag während der Prüfperiode einer internen Qualitätskontrolle. Geprüft wurden 100 % aller Rohdaten. Alle Unterlagen zur Studie werden im Archiv des Instituts für Pharmakologie für 15 Jahre verwahrt.

3.4 Zusätzliche Untersuchungen

3.4.1 Ergometrie

Die im Rahmen der Aufnahmeuntersuchung erfolgte fahrradergometrische Untersuchung (EKG 605 D, ERG 550, EBM 502, Bosch) wurden in der Abteilung Funktionsdiagnostik der Klinik für Innere Medizin B der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in sitzender Position durchgeführt.

Diese Methode bietet neben der Möglichkeit der EKG-Registrierung und Blutdruckmessung die Vorteile einer guten Dosierbarkeit der Belastung und Reproduzierbarkeit der erzeugten Tachykardie. Bei jeder Untersuchung wurde bei den Probanden ein 12-Kanal-Ruhe-EKG geschrieben, die Ruheherzfrequenz und der Ruheblutdruck bestimmt. Während der Belastungs- und der Erholungsphasen standen die Probanden unter ständiger EKG-Kontrolle. Der Blutdruck wurde in einminütigen Abständen gemessen.

Im Rahmen der Aufnahmeuntersuchung wurde die ergometrische Belastung mit einer Leistung von 50 Watt begonnen und nach jeweils zwei Minuten um 25 Watt bis maximal 100 Watt gesteigert. Daran schloss sich eine dreiminütige Erholungsphase (EKG, HF, BP) an.

Objektive Abbruchkriterien für die ergometrische Belastung

- Erreichen der altersentsprechenden submaximalen Grenzfrequenz (200 – Lebensalter + 5)
- Blutdruckanstieg >230 mmHg systolisch, >130 mmHg diastolisch
- Blutdruckabfall > 20 mmHg systolisch
- Ischämiezeichen im EKG (ST-Senkung 0,2 mV horizontal bzw. deszendierend, T-Negativierung)
- VES > 6/min, salvenförmige ES > 3/min, polytope ES
- Erregungsleitungs- bzw. Erregungsausbreitungsstörungen
- Herzfrequenzabfall bei steigender Belastung

Subjektive Abbruchkriterien für die ergometrische Belastung

- Angina pectoris
- Dyspnoe, Zyanose
- physische Erschöpfung der Arbeitsmuskulatur
- Claudicatio intermittens

Die Herzfrequenz wurde aus den EKG-Brustwandableitungen $V_1 - V_6$ ermittelt, welche auf Endlospapierstreifen aufgezeichnet wurden. Der Papiervorschub betrug 50 mm/sec. Der systolische und diastolische Blutdruck wurde nach der Methode von Riva-Rocci / Korotkoff am linken Oberarm Position des Probanden in sitzender gemessen.

3.4.2 Duodenalbiopsie

Die Biopsien wurden in der endoskopischen Abteilung der Klinik für Innere Medizin A durch einen Facharzt für Innere Medizin durchgeführt. Bei jedem Probanden wurden jeweils vier stechnadelkopfgroße Proben aus dem Duodenum entnommen. Eine Prämedikation erfolgte nicht. Die erste Biopsie erfolgte nach zwölfstündiger Nahrungskarenz im Rahmen der Aufnahmeuntersuchung, die zweite nach 17tägiger Thyroxingabe (vgl. Kapitel 3.1).

Jeder Proband wurde vor dem Eingriff über mögliche Risiken und Nebenwirkungen der Duodenoskopie und der Gewebeentnahme durch den Facharzt aufgeklärt. Alle Eingriffe verliefen ohne Komplikationen.

Die vier entnommenen Gewebeproben wurden sofort wie folgt behandelt:

Eine Probe wurde nach der Entnahme in gepuffertem Formalin (4 %) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Eine zweite Probe wurde nativ, zwei weitere mit 1 ml Sterofundin bzw. mit 300 µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit - Qiagen®) in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Eppendorfröhrchen). Die nicht fixierten Präparate wurden bei mindestens – 80°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

3.4.3 Ultraschalluntersuchung der Schilddrüse

Zum Ausschluss von morphologischen Schilddrüsenveränderungen erfolgte im Rahmen der Aufnahmeuntersuchung eine Ultraschalluntersuchung der Schilddrüse. Die Untersuchung wurde mit einem Realtime-Scanner mit einem Linear-schallkopf (7,5 MHz) von Herrn Professor Meng, Klinik für Innere Medizin B der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, durchgeführt. Neben Lage, Form und Größe des Organs wurde dabei vor allem die Echostruktur untersucht. Volumenvergrößerte Schilddrüsen (>25 ml) sollten dabei ebenso ausgeschlossen werden wie das Vorliegen knotiger Veränderungen .

3.5 Immunhistochemischer Nachweis von intestinalem P-gp

Der immunhistochemische Nachweis von P-gp in den Präparaten der Duodenalbiopsien wurde im Institut für Pathologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald vorgenommen.

Von jeder Duodenalprobe wurden 2,0 µm dicke Paraffinschnitte nach Standardmethoden hergestellt. Als Methode kam die Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase (APAAP) zur Anwendung (Cordell et al., 1984). Für die Bestimmung von P-gp wurde der monoclonaler Anti-P-gp-Antikörper F4 (1:200 Verdünnung, SIGMA, St. Louis, U.S.A.) benutzt (Chu et al., 1993). Die Positivkontrollen für die P-gp-Immunfärbung wurden aus Nierengewebe gewonnen. Als Zweitantikörper wurde ein Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1:100 Verdünnung, AEC Detection Kit, Ventana Medical Systems, Deutschland) eingesetzt.

Die quantitative Auswertung der Färbungen erfolgte mit einem Histoanalysator bestehend aus einer 3CCD Farbkamera (Hitachi HV-C20M, Hitachi Denshi Ltd., Japan) und einem Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Deutschland, 1 : 200fache Vergrößerung). Von jeder der 8 Biopsien wurden randomisiert 10 digitale Bilder aufgenommen. Die optische Dichte der braun-rot gefärbten apikalen Enterozytenmembran wurde mit der KSrun software (KSrun Version 3.0, Zeiss, Deutschland) bestimmt. Die Untersuchung erfolgte blind, d.h. in Unkenntnis der Untersuchungsgruppe.

3.6 Bestimmung der MDR1 mRNA-Expression durch RT-PCR-Technik

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den tiefgefrorenen Duodenalbiopsien erfolgte mittels RNAeasy[®] Mini Kit (Qiagen) nach der Vorschrift des Herstellers. Dazu wurden die Biopsien direkt nach der Entnahme in 300 µl Lysepuffer (RLT) überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Homogenisierung des Gewebes wurde in gefrorenem Zustand in einer Schwingmühle (Microdismembrator, Braun, Melsungen) durchgeführt. Das gefro-

rene Homogenat, bestehend aus RLT-Puffer und Gewebe wurde aufgetaut und nach Herstellervorschrift weiter verarbeitet. Die finale Elution erfolgte mit 2 x 30 µl Wasser. Die Konzentration der RNA wurde mittels UV-Absorption bei 260 und 280 nm in einem Eppendorf-Biophotometer gemessen.

200 ng der RNA wurde für die Reverse-Transkriptase-Reaktion eingesetzt. Das Reaktionsgemisch enthielt weiterhin 50 mM Tris, 8 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 µM (dT)₁₅, 1 mM dNTPs, 0,06 U RNAsin[®] und 7,5 U Avian myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase (Amersham/USB) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die Anlagerungstemperatur lag bei 23°C (10 min.). Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde bei 42°C über eine Stunde durchgeführt, wobei die Temperatur in den letzten fünf Minuten auf 95°C erhöht wurde.

Die PCR wurde in einem Reaktionsgemisch, das 10 mM Tris, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,05 mM dNTPs, 0,4 µM eines jeden Primers, 0,625 U DNA-Taq Polymerase (Gibco) und 2,5 µl Reverse Transkriptase Mixtur in 25 µl Gesamtvolumen enthielt, durchgeführt. Die Reaktion verlief 2 min bei 95°C (Denaturierung), 1 min bei 60°C (Primer-Anlagerung) und für 1 min bei 72°C (Primer-Verlängerung) im ersten Zyklus. Bei den folgenden 29 Zyklen lag die Denaturierungszeit bei 30 sek und die Primer-Anlagerungs- und Primer-Verlängerungszeit jeweils bei 1 min. Im letzten Zyklus war die Primer-Verlängerungszeit auf 5 min ausgedehnt. Die Amplifikation des 157 bp MDR1-Fragments erfolgte unter Verwendung der früher beschriebenen Primern. Als interne Kontrolle wurde eine Amplifikation eines 110 bp GAPDH-Fragments durchgeführt (Bordow et al., 1994).

Die Separation der PCR-Produkte erfolgte auf einem Polyacrylamidgel (8 %), die Färbung wurde mit Vistagreen[®] (Amersham) durchgeführt. Die Auswertung wurde an einem Storm 840 (Molecular Dynamics/ Amersham) vorgenommen.

3.7 Pharmakokinetische Methoden

3.7.1 Orale Applikation von Thyroxin

Die Probanden erschienen zu den oralen Thyroxinapplikationen (8. – 21. und 23.-24. Studientag) jeweils um 7.00 Uhr morgens nüchtern auf der Probandenstation des Instituts. Die nächste Mahlzeit war 30 Minuten später gestattet. Wegen der oralen Talinololkinetik erfolgte am 22. Studientag keine Thyroxinapplikation.

Die Prüfmedikamente wurden unzerkaut und unzerteilt mit jeweils 100 ml kohlenstoffsaurefreiem raumtemperierten Wasser eingenommen. Die Compliance wurde stets durch Inspektion der Mundhöhle und der sublingualen Region gesichert (mouth check).

Täglich wurden die Probanden hinsichtlich ihres Befindens befragt. An allen Applikationstagen war der Alkoholgenuss untersagt.

Während der gesamten Studie waren jede zusätzliche Medikamenteneinnahme sowie übermäßige physische Belastungen nicht erlaubt. Die sonst üblichen Lebensgewohnheiten sollten die Probanden aber beibehalten.

3.7.2 Standardbedingungen bei allen stationären pharmakokinetischen Untersuchungen

An den Kinetiktagen kamen die Probanden nach einer 12-stündigen Nüchternperiode morgens um 6.00 Uhr auf die Station. Im Anschluss an die körperliche Untersuchung und Befragung wurde ihnen eine Venenverweilkanüle (20 G) gelegt, über die zu den festgelegten Zeiten die Blutabnahmen (3.4.3, 3.4.4) erfolgten. Anschließend ruhten die Probanden 5 Stunden mit erhöhtem Oberkörper im Bett.

Die Überwachung von Blutdruck, Herzfrequenz und EKG (3-Kanal) erfolgte mit einem Patientenmonitor (Horizon 1100 SYS, Hörmann, Zwönitz, Deutschland).

Nach Beendigung der Monitorüberwachung wurde ein Mittagessen, um 15.00 h ein Standardkaffee und um 18.00 Uhr ein Standardabendessen (siehe unten) ge-

reicht. 16 Stunden nach Arzneimittelapplikation verließen die Probanden die Station. Die nächsten Blutentnahmen erfolgten ambulant. Es bestand an allen Kinetiktage Rauchverbot.

Probenasservierung

Die Blutentnahmen erfolgten über eine Venenverweilkanüle oder durch individuelle Punktion. Nach dem Gerinnen und anschließendem Zentrifugieren des Blutes (10 min bei 4500 U/min) wurde das Serum abpipettiert, in 2 Portionen in Plastikröhrchen (Nalgene cryovials, USA) aufgeteilt und bis zur Analytik bei mindestens – 20 °C eingefroren.

Jeweils 10 ml Urin einer Sammelperiode wurde bis zur Analytik bei mindestens – 20 °C eingefroren.

Standarddiät

Die Standardmahlzeiten für alle Kinetiktage beinhalteten:

Mittag (12.00 Uhr)	Hühnerfrikassee mit Reis und Mischgemüse, 150 g Fruchtojoghurt
Kaffee (15.00 Uhr)	2 Stücke Kuchen, 150 ml Kaffee
Abendessen (18.00 Uhr)	Brot, Butter, Käse, Wurst, Gemüse, Früchtetee

Prüfmedikamente

1.	Name:	Cordanum® 100
	Substanz:	Talinolol
	Darreichungsform:	Filmtablette
	Gehalt:	100 mg
	Applikation:	1 Tablette p.o. mit 100 ml Mineralwasser
	Hersteller:	Arzneimittelwerk Dresden GmbH

2. Name: Cordanum®
Substanz: Talinolol
Darreichungsform: Ampulle
Gehalt: 10 mg
Applikation: 3 Ampullen (30 mg, 250 ml NaCl 0,9 %, i.v.)
Hersteller: Arzneimittelwerk Dresden GmbH
3. Name: L-Thyroxin Henning 100®
Substanz: L-Thyroxin
Darreichungsform: Tablette
Gehalt: 100 µg
Applikation: 2 Tabletten p.o. mit 100 ml Mineralwasser
Hersteller: Henning Berlin GmbH

Die Prüfpräparate waren entsprechend § 7 des AMG deklariert. Die Lagerung erfolgte in einem verschließbaren Arzneimittelschrank auf der Probandenstation des Instituts für Pharmakologie. Alle angebrochenen und nicht verwendeten Prüfpräparate von Cordanum® wurden durch den Hersteller (Arzneimittelwerk Dresden GmbH) entsorgt.

3.7.3 Pharmakokinetische Untersuchungen mit Talinolol nach intravenöser Gabe

An den in Kapitel 3.1 angegebenen Tagen wurde nach der Durchführung der Standardprozeduren (siehe oben) mit der 30-minütigen Infusion von 30 mg Talinolol (1 mg/min) mit Hilfe des Infusomat® fm (B. Braun Melsungen AG, Deutschland) begonnen. Dazu wurden 30 mg Talinolol-Injektionslösung in 250 ml 0,9 %ige Kochsalzlösung als Trägerlösung eingebracht und die Infusion über eine Venenverweilkanüle appliziert. Ein Facharzt für Anästhesiologie befand sich in telefonischer Rufbereitschaft.

Mit der Infusion startete auch die Blutentnahme aus der Venenverweilkanüle des kontralateralen Armes zur Bestimmung der Talinololserumspiegel. Die Entnahmen fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: -0,5 h, -0,33 h, -0,17 h, 0 h (Infusion komplett eingelaufen), 0,33 h, 0,67 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h, 3,5 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h, 36 h p.a.. Der Ablauf des Studientages verlief standardisiert wie unter 3.4.2 beschrieben.

3.7.4 Pharmakokinetische Untersuchungen mit Talinolol nach oraler Gabe

An den in Kapitel 3.1 angegebenen Tagen wurden nach der Durchführung der Standardprozeduren (siehe oben) die Prüfpräparate mit 100 ml stillem Wasser oral appliziert. Die Compliance wurde durch Mundkontrolle gesichert.

Die Blutentnahmen fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: 0h, 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 3,5 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h, 36 h p.a.. Der Ablauf des Studientages verlief standardisiert wie oben beschreiben

3.8 HPLC-Analytik

3.8.1 Bestimmung der Talinololserumkonzentration

Die Serumkonzentrationen von Talinolol wurden im GLP-Labor des Instituts für Pharmakologie nach Flüssig-flüssig-Extraktion mittels validierter HPLC-Methode mit fluorimetrischer Detektion bestimmt (Zschesche, 1997).

Geräte und Chemikalien

- Talinolol AWD, Dresden, Deutschland, Ch.-Nr: 9209877
- Propranolol AWD, Dresden, Deutschland, Ch.-Nr.: 336758/1494
- Azetonitril Baker, Niederlande, Ch.-Nr.: 9933730003
- Diethylether Merck, Darmstadt, Deutschland, Ch.-Nr.: K 21248521
- Natriumkarbonat Merck, Darmstadt, Deutschland, Ch.-Nr. A 832992505
- Triethylammoniumphosphatpufferlösung
Fluka, Buchs, Schweiz, Ch.-Nr.:49322/1

- Zentrifugen Heraeus Megafuge 1.0/1.0R
- Horizontalschüttler THYS 2, MLW, Deutschland

Probenvorbereitung

Es wurden 0,5 ml Serum mit 100 µl gesättigter Natriumkarbonat-Lösung und 25 µl interner Standardlösung (Endkonzentration 87,68 ng/ml Propranolol) gemischt und anschließend 10 min mit 5 ml Diethylether geschüttelt. Die organische Phase wurde unter leichtem Luftstrom bei 40°C evaporiert und der Rückstand in 120 µl der mobilen Phase aufgenommen. Davon wurden 25 µl in die Trennsäule eingespritzt.

Die Qualitätskontrollproben wurden zu Beginn der klinischen Prüfung mit gepooltem Serum hergestellt und wie Serumproben von Probanden gelagert und vermessen. Kalibratoren wurden für jede Messreihe frisch bereitet.

Folgende Kalibratoren wurden angesetzt:

- für Talinolol: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/ml,

Qualitätskontrollwerte wurden wie folgt hergestellt:

- für Talinolol: 22,5, 225, 750 ng/ml,

Die Vertrauensbereiche (5 – 1000 ng/ml) umfaßten sicher C_{max} , das im Mittel 249 ng/ml (p.o.-Gabe) bzw. 432 ng/ml (i.v.-Gabe) betrug. Die quantitativen Nachweisgrenzen lagen bei ca. 1 % vom mittleren C_{max} nach Talinololinfusion und ca. 1,5 % nach p.o. Gabe.

Chromatographische Bedingungen

- Instrumente HPLC-Kombination (Merck-Hitachi, Deutschland) bestehend aus: Pumpe L-6200, Autosampler AS-2000A, Fluoreszenzdetektor L 1050, Säulenthermostat jetstream (MITU, Deutschland), HPLC-Manager D 6500 zur Integration der Chromatogramme.
- Trennsäule Merck LiChrospher 60, RP-select B, 125-3, 5 µm, no. 432940

- Temperatur 30°C
- Detektion: Extinktion 252 nm, Emission 332 nm
- mobile Phase: 0,025 M Triethylammonium-Phosphat-Pufferlösung (pH 3,46), isokratisch gemischt mit 23% Acetonitril .
- Flow 0,8 ml/min

Auswertung

Die verwendete chromatographische Methode war spezifisch für racemisches Talinolol und den internen Standard. Die Auswertung erfolgte mit der internen Standardmethode unter Verwendung der Peak-Höhen-Verhältnisse. Die Eichkurven wurden mittels linearer Regression bestimmt, gewichtet mit $1/x$ (x = Konzentration).

Die Wiederfindung von Talinolol im Serum betrug 82,3 - 92,9 % für 25, 100 und 500 ng Analyt/ml und die von Propranolol 85,3 % bei 43,8 ng Analyt/ml. Richtigkeit und Präzision der Eichkurven und day-to-day Variationen von wurde nach DAB 10 berechnet und erfüllten die Anforderungen an die quantitative Arzneimittelanalytik bei Bioverfügbarkeits-, Bioäquivalenzstudien und pharmakokinetischen Studien (Shah et al., 1992). Folgende Intra- und Interassay-Variationen wurden erreicht (Tabelle 3):

Tabelle 3: Qualitätsangaben zur quantitativen Analytik von Talinolol im Serum von Probanden der Studie Tal-Thy 0299.

Variationen	Richtigkeit	Präzision
<u>Talinolol</u>		
-intraassay	98,3 - 100 %	92,8 – 98,5 %
-day-to-day	96,9 – 97,7 %	96,7 – 96,8 %

Alle Berechnungen erfolgten mit dem Labor-Computerprogramm WINVAL.

3.8.2 Bestimmung von Talinolol und seiner Metabolite im Urin

Die Identifizierung und Quantifizierung von Talinolol und seiner Hauptmetaboliten (4-trans-Hydroxytalinolol, 3-cis-Hydroxytalinolol) im Urin erfolgte mittels Zweisäulen-HPLC-System im GLP-Labor des Institut für Pharmakologie bestimmt (Oertel et al., 1994). Die quantitative Nachweisgrenze betrug für Talinolol und seine Metabolite 50 ng/ml.

3.9 Biometrische Methoden

Folgende pharmakokinetischen Parameter von Talinolol wurden ermittelt:

- absolute Bioverfügbarkeit (f_a)
- maximale Serumkonzentration C_{max}
- Zeitpunkt der maximalen Serumkonzentration t_{max}
- terminale Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$)
- totale Clearance (Cl_{tot})
- renale Clearance (Cl_{ren})
- metabolische Clearance (Cl_{metab})
- residuale Clearance ($Cl_{residual}$)
- kumulative Ausscheidung von Talinolol und seinen Metaboliten in den Urin ($A_{e, Tal}, A_{e, Metab}$)

Nach i.v.-Gabe wurden außerdem das Verteilungsvolumen V_z bestimmt.

Methoden der Berechnung

C_{max} und t_{max} wurden direkt den Serumkonzentrations-Zeitkurven entnommen. Alle anderen Parameter wurden mit dem Programm TOPFIT 2.1 ermittelt. Die Fläche unter der Kurve wurde mit Hilfe der Trapezregel bis zum letzten Messpunkt mit einer Konzentration oberhalb der quantitativen Nachweisgrenze berechnet und mittels Standardtechniken bis unendlich extrapoliert (Sauter et al., 1992)

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t_{\text{last}}} + \frac{\hat{C}_{\text{last}}}{\lambda_z}$$

$$\hat{C}_{\text{last}} = C_z \cdot e^{-\lambda_z \cdot t_{\text{last}}}$$

Wobei $AUC_{0-t_{\text{last}}}$ = Fläche unter der Kurve von 0 bis t_{last}

C_{last} = für den Zeitpunkt t_{last} errechnete Serumkonzentration

t_{last} = Zeitpunkt des letzten Meßwertes oberhalb der quantitativen Nachweisgrenze

λ_z = terminale Eliminationskonstante

C_z = fiktive Konzentration zum Zeitpunkt 0 ist.

λ_z und C_z wurden durch nichtlineare Approximation ermittelt.

Die absolute Bioverfügbarkeit berechnet sich für jeden Probanden aus

$$BA_{\text{abs}} = \frac{AUC_{\text{po}} \cdot D_{\text{iv}}}{AUC_{\text{iv}} \cdot D_{\text{po}}}$$

CL_{tot} , V_z und V_{ss} wurden modellunabhängig berechnet. Die biologische Halbwertszeit ($t_{1/2}$) ergibt sich aus

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda_z}$$

Die Berechnung der renalen (CL_{ren}), der metabolischen (CL_{metab}) und der residualen Clearances (CL_{residual}) wurde durch Messung der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge von unverändertem und metabolisiertem Talinolol möglich:

$$CL_{\text{ren}} = \frac{A_{\text{e(Talinolol)}}}{AUC_{0-\infty}}$$

$$CL_{\text{metab}} = \frac{A_{\text{e(Metabolite)}}}{AUC_{0-\infty}}$$

$$CL_{\text{resid}} = CL_{\text{tot}} - CL_{\text{ren}} - CL_{\text{metab}}$$

Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 5.0 bzw. SAS 6.11. Die Stichproben wurden durch Berechnung des Medians, bzw. des arithmetischen Mittels und der IQR bzw. der Standardabweichungen charakterisiert. Statistische Vergleiche erfolgten mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde einheitlich $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Compliance und Verträglichkeit

Die klinische Prüfung wurde von Oktober 1999 bis Februar 2000 auf der Probandenstation des Pharmakologischen Institutes der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald durchgeführt. Alle Probanden beendeten die Studie entsprechend dem Studienprotokoll. Als Nebenwirkung traten leichte Kopfschmerzen auf (n = 1), eine Probandin berichtete über eine Appetitzunahme. Bei vier Probanden trat während der Studie ein leichter Infekt der oberen Luftwege auf. Eine Medikamenteneinnahme war nicht erforderlich. Ein Proband zog sich während der Studie im häuslichen Umfeld eine Patellaluxation zu. Das betroffene Knie wurde durch einen Gipsverband ruhig gestellt. Die Studienteilnahme war zu keiner Zeit gefährdet. Das Auftreten von Symptomen wie Hitzewallungen, Nervosität und Schlaflosigkeit wie sie bei klinisch manifester Hyperthyreose beobachtet werden, wurde bei keinem der Probanden gefunden.

4.2 Bestimmung der Schilddrüsenparameter

Die Schilddrüsenparameter T3, fT4 und TSH wurden vor Studienbeginn, am 7. und 15. Tag der Thyroxinapplikation, sowie im Rahmen der Abschlussuntersuchung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Einzelwerte sind den Tabellen A1-A3 des Anhangs zu entnehmen. Vor Studienbeginn lagen die drei untersuchten Parameter bei allen Patienten im Normbereich. Unter der oralen Gabe von Thyroxin war ein Anstieg des freien T4 (fT4) auf die Werte einer subklinischen Hyperthyreose zu beobachten. Die T3-Werte stiegen bei 6 von 8 Probanden an. Die TSH-Spiegel sanken bei allen Probanden während der Thyroxinapplikation. Eine Woche nach Beendigung der Thyroxingabe erreichten die gemessenen Schilddrüsenparameter wieder ihre Ausgangswerte.

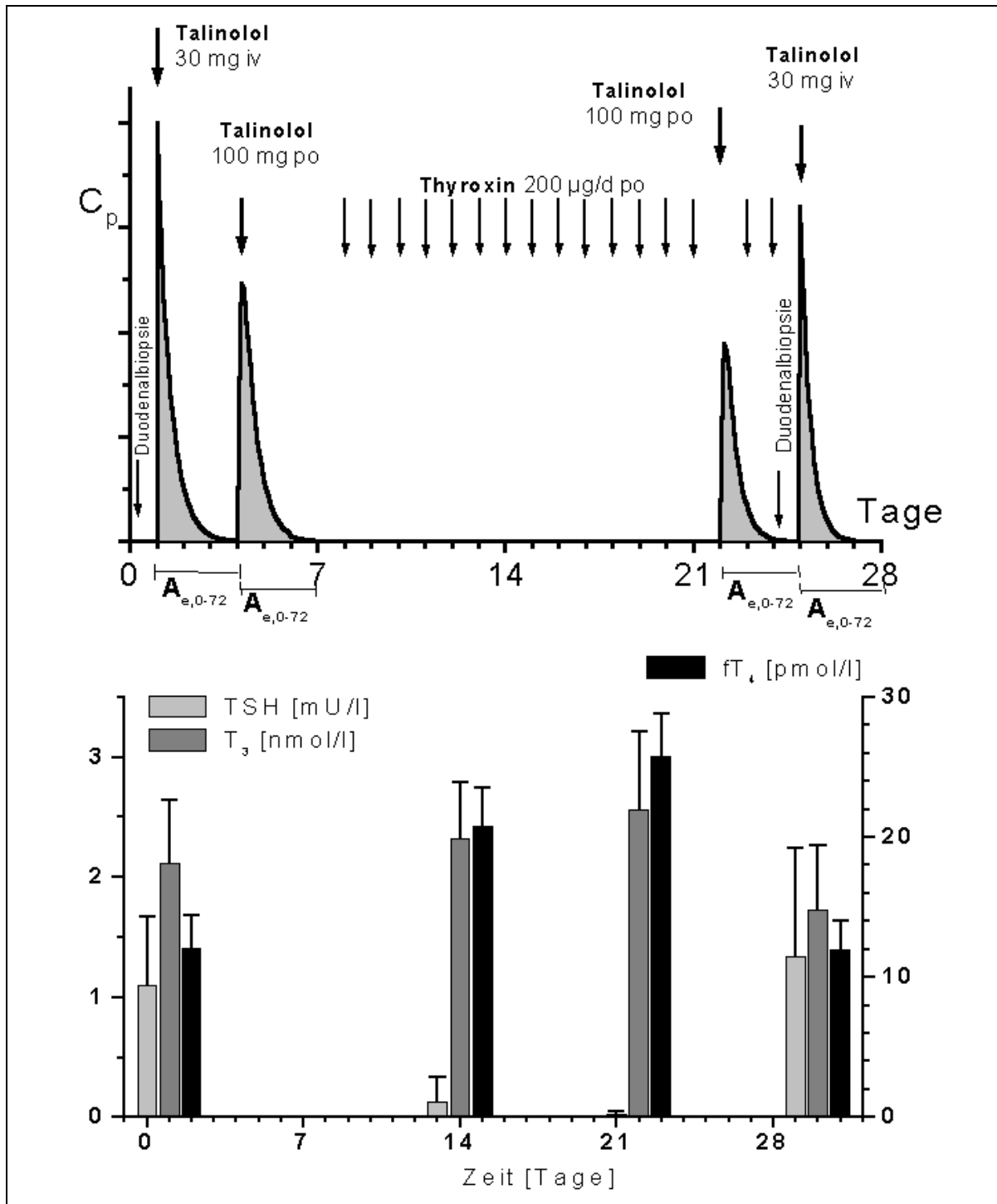


Abbildung 3: Schilddrüsenparameter TSH, T_3 und fT_4 im Verlauf der Studie

4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Die Gewinnung der Gewebeprobe erfolgte wie unter 3.4.2 beschrieben. Intestinales mukosales P-gp wurde immunhistochemisch im Rahmen der Aufnahmeuntersuchung und nach 17tägiger oraler Gabe von Thyroxin untersucht (siehe 3.5). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 und 5 dargestellt. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, nahm nach P-gp-Induktion mit Thyroxin die mittlere optische Dichte [mOD] bei allen 8 Probanden zu. Die Zunahme war statistisch signifikant (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)

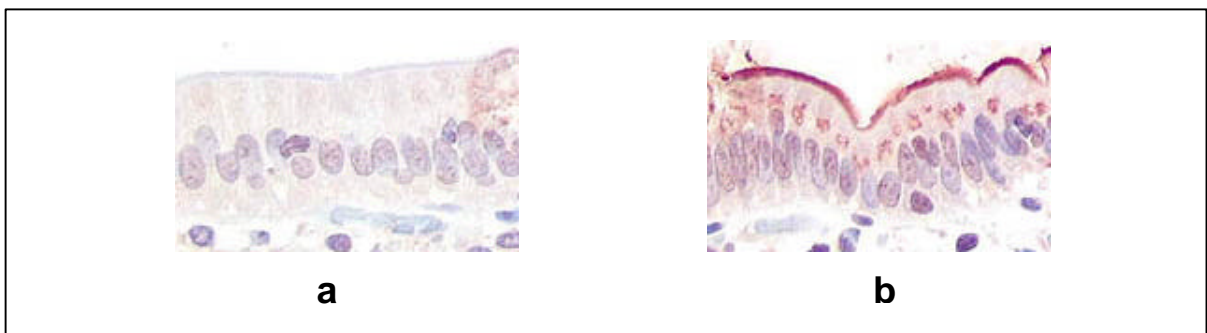


Abbildung 4 : Immunfärbung der Biopiate vor (a) und nach (b) Gabe von Thyroxin

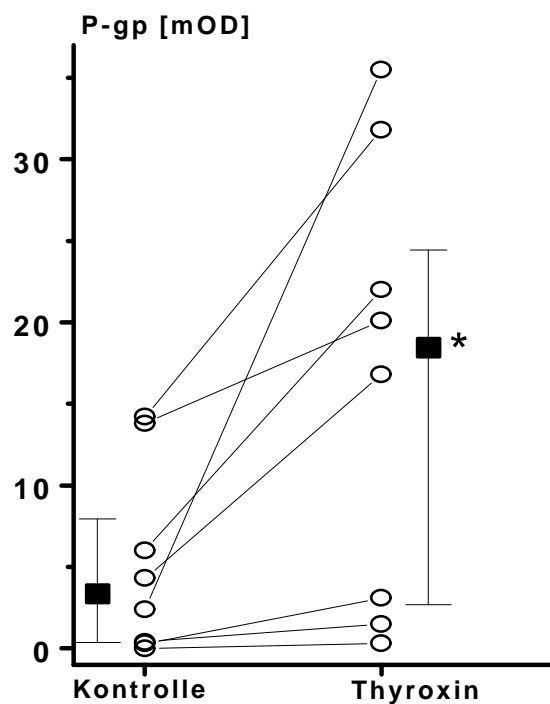


Abbildung 5 : Zunahme der P-gp-Expression durch Gabe von Thyroxin

4.4 Bestimmung der MDR1 mRNA-Expression durch RT-PCR-Technik

Mit Hilfe der RT-PCR (siehe 3.6) wurde die mRNA-Expression in der duodenalen Mukosa bestimmt. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung. In 6 von 8 Probanden nimmt die P-gp mRNA-Expression nach Thyroxingabe zu. Die Einzelwerte sind im Anhang Tabelle A5 dargestellt.

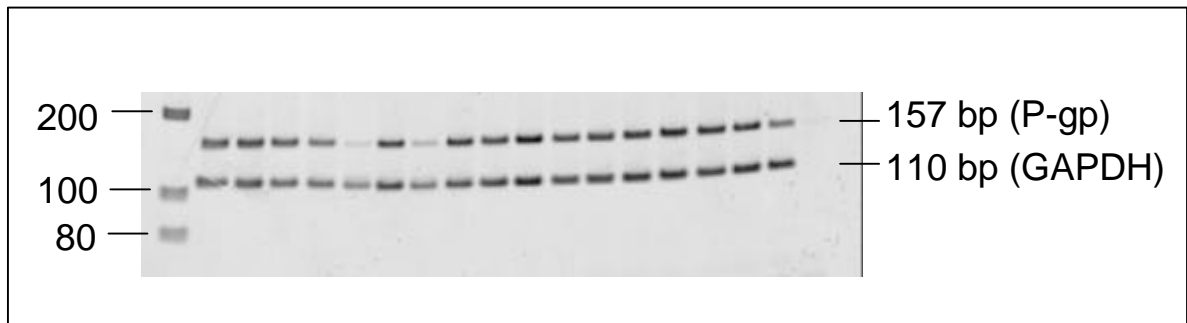


Abbildung 6 :Gelfärbung nach RT-PCR für MDR1- mRNA für 8 Proben jeweils vor und nach Thyroxingabe.

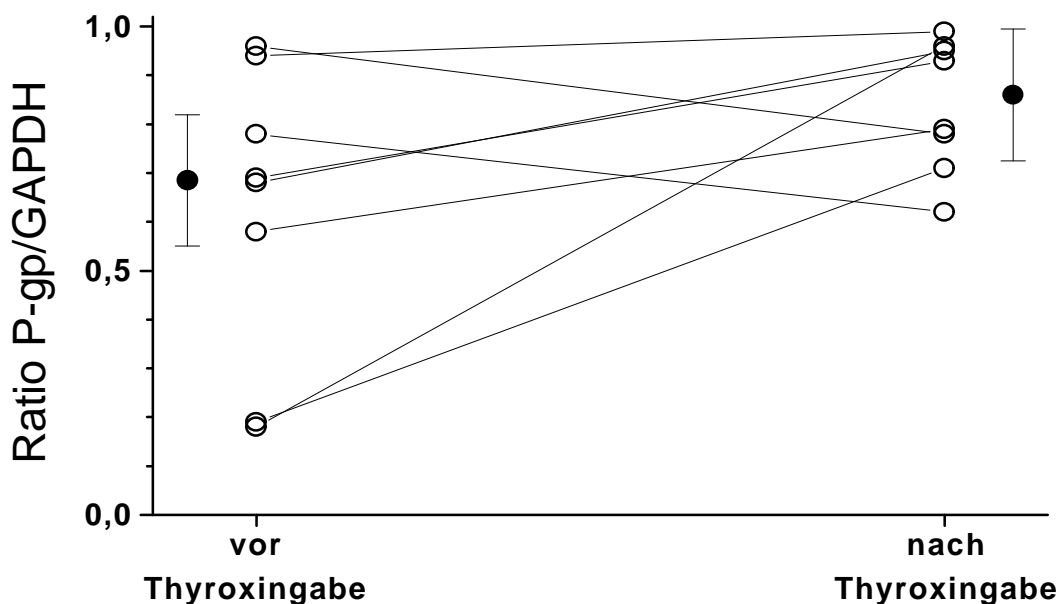


Abbildung 7 : Zunahme der m-RNA-Expression nach Induktion mit Thyroxin

4.5 Pharmakokinetik von Talinolol nach intravenöser Applikation

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen nach intravenöser Gabe vor und nach der Gabe von Thyroxin sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Einzelkurven der individuellen Blutkonzentrations-Zeit-Profile der 4 männlichen und 4 weiblichen Probanden zeigt Abbildung A1 im Anhang. Eine Auflistung der kinetischen Daten ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Maximale Konzentrationen (C_{max}) um 400 ng/ml wurden für 30 mg Talinolol am Ende der intravenösen Infusion gemessen. Danach erfolgte eine biexponentielle Elimination des Arzneimittels. Die AUC lag im Durchschnitt bei 1200 ng· h/ml und das Verteilungsvolumen von Talinolol bei 6,5 l/kg. Die Halbwertszeit lag bei 10,8 h. Die totale Clearance ist zu 44 % durch renale Elimination und 1,2 % durch Bio-transformation mit nachfolgender renaler Ausscheidung hervorgerufen. Die verbleibenden 54,8 % entfielen auf die nicht experimentell ermittelte Residualclearance (CL_{res}).

Nach Thyroxingabe waren folgende Veränderungen zu beobachten:

- Die Halbwertszeit von Talinolol verringerte sich signifikant von 10,8 auf 10,16 h.
- Alle anderen bestimmten pharmakokinetischen Parameter zeigten keine signifikanten Veränderungen (vergl. Tab 4.)

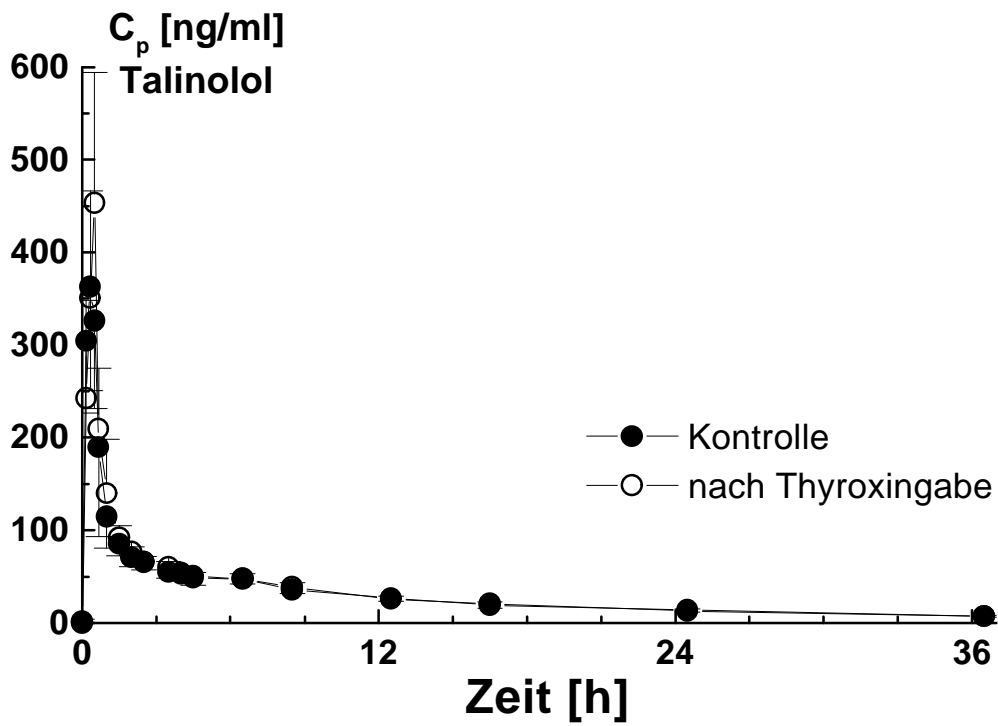


Abbildung 8 : Serumkonzentrations-Zeit-Kurven (arithmetisches Mittel) nach intravenöser Applikation von 30 mg Talinolol vor (ausgefüllte Kreise) und nach (offene Kreise) Gabe von Thyroxin.

Tabelle 4 : Pharmakokinetik bei intravenöser Gabe von 30 mg Talinolol vor und nach Thyroxingabe; (arithmetisches Mittel \pm Standardabweichungen)

Parameter		Kontrolle	Thyroxin
V_z	[l/kg]	6.56 \pm 0.96	6.11 \pm 0.60
$AUC_{0-\infty}$	[ng·h/ml]	1222 \pm 190	1244 \pm 75
C_{max}	[ng/ml]	398 \pm 71	465 \pm 131
$t_{1/2}$	[h]	10.8 \pm 0.71	10.16 \pm 0.94*
CL_{tot}	[ml/min]	417 \pm 61	403 \pm 24
CL_{ren}	[ml/min]	185 \pm 35	206 \pm 39
CL_{met}	[ml/min]	5.3 \pm 4.0	4.7 \pm 1.9
CL_{res}	[ml/min]	227 \pm 45	192 \pm 34

p < 0.05 (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)

4.6 Pharmakokinetik von Talinolol nach oraler Applikation

In Abbildung 9 sind die Serumkonzentrations-Zeit-Kurven (arithmetische Mittelwerte) für oral verabreichtes Talinolol vor und nach der Gabe von Thyroxin dargestellt. Die Einzelwertkurven sind im Anhang unter Abbildung A2 aufgeführt. Die errechneten kinetischen Daten zeigt die Tabelle 5.

Nach oraler Gabe von 100 mg Talinolol wurden nach ca. 4 h mittlere C_{\max} -Werte von 245 ng/ml gemessen. Die AUC lag im Durchschnitt bei 2843 ng·h/ml. Die Halbwertszeit lag bei 11,7 h. Die scheinbare totale Clearance ist zu 25 % durch renale Elimination und 0,6 % durch Biotransformation mit nachfolgender renaler Ausscheidung hervorgerufen. Die verbleibenden 74,4 % gingen zu Lasten der nicht experimentell ermittelten Residualclearance (CL_{res}).

Nach Thyroxingabe waren folgende Veränderungen zu beobachten:

- C_{\max} blieb unverändert
- Die Halbwertszeit von Talinolol verringerte sich signifikant von 11,7 auf 10,7 h.
- Die Bioverfügbarkeit nahm von 69 auf 59 % ab
- Alle anderen bestimmten pharmakokinetischen Parameter zeigten keine signifikanten Veränderungen (vergl. Tab 5)

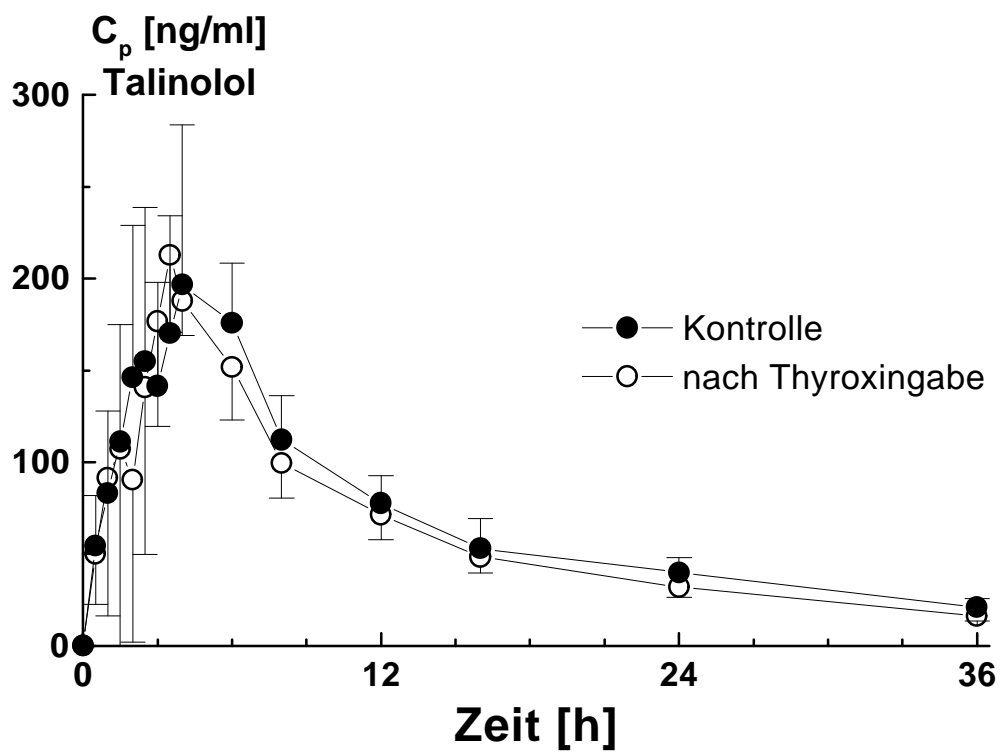


Abbildung 9 : Serumkonzentrations-Zeit-Kurven (arithmetische Mittel) nach oraler Applikation von 100 mg Talinolol vor (ausgefüllte Kreise) und nach (offene Kreise) Gabe von Thyroxin

Tabelle 5 : Pharmakokinetik bei oraler Gabe von 100 mg Talinolol vor und nach Thyroxingabe (arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichungen).

Parameter		Kontrolle	Thyroxin
F	[%]	69.8 ± 11.2	59.9 ± 8.7
AUC _{0-∞}	[ng·h/ml]	2843 ± 636	2489 ± 437
C _{max}	[ng/ml]	245 ± 46	253 ± 93
t _{1/2}	[h]	11.70 ± 1.52	10.7 ± 1.19*
CL _{tot}	[ml/(min)]	610 ± 123	686 ± 111
CL _{ren}	[ml/(min)]	154 ± 41	171 ± 30
CL _{met}	[ml/(min)]	4.2 ± 3.3	5.6 ± 2.4
CL _{res}	[ml/(min)]	452 ± 99	510 ± 98

p < 0.05 (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)

für CL bei oraler Administration gilt: CL/F

Die pharmakokinetischen Daten von Talinolol wurden auf eine Korrelation zu den Schilddrüsenparametern (T3, fT4 und TSH) und den Ergebnissen der Expressionsassays (Immunhistochemie, RT-PCR) hin untersucht. Bei einem Signifikanzniveau von 0,05 konnte keine Korrelation gefunden werden.

5. Diskussion

Das Verständnis von Interaktionen zwischen Arzneimitteln ist in den vergangenen Jahren stark gestiegen. Mit der eingehenden Untersuchung des Cytochrom P450-Systems sind viele Interaktionen erklärbar und vorhersagbar. Es sind jedoch auch Arzneimittelinteraktionen bekannt geworden (z.B. Digoxin-Rifampicin), die nicht auf einer Modulation des Stoffwechsels beruhen können, da die entsprechenden Substanzen beim Menschen kaum verstoffwechselt wird (z.B. Digoxin). In der Literatur sind mehrere Fälle von Patienten beschrieben, die bei gleichzeitiger Gabe von Digoxin und Rifampicin subtherapeutische Konzentrationen von Digoxin aufwiesen (Gault et al., 1984 ; Novi et al., 1980 ; Schreiber et al., 1980). In einer kürzlich publizierten Arbeit konnten Greiner und Mitarbeiter zeigen, dass für diese Interaktion eine Induktion des P-gp im Duodenum verantwortlich ist (Greiner et al., 1999). Diese Induktion führte zu einem vermehrten Vorkommen von P-gp in den Enterozyten, wodurch nach oraler Gabe in vermehrtem Ausmaß Digoxin in das Darmlumen sezerniert wurde. Dadurch wurde die Bioverfügbarkeit von Digoxin erheblich vermindert.

Eine niedrigere Bioverfügbarkeit von Digoxin wurde auch bei Patienten mit hyperthyreoten Schilddrüsenerkrankungen beobachtet. Dieses Phänomen ist seit langer Zeit bekannt und durch mehrerer Studien belegt (Doherty and Perkins, 1966 ; Croxson and Ibbertson, 1975 ; Gilfrich, 1976 ; Shenfield et al., 1977). Die Ursache dieser Plasmaspiegelverminderung konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, da die Ergebnisse der einzelnen Studien stark differierten. Neben einem erhöhten fiktiven Verteilungsvolumen wurde eine erhöhte biliäre (Hartman et al., 1975) und renale (Doherty and Perkins, 1966 ; Croxson and Ibbertson, 1975 ; Bonelli et al., 1978) bzw. nicht-renale (Gilfrich, 1976) Clearance diskutiert. Ferner wurde schon 1975 von Watters und Mitarbeitern eine verminderte orale Absorption diskutiert (Watters and Tomkin, 1975). Seit kurzem ist bekannt, dass Digoxin als Substrat von P-gp aktiv in das Darmlumen sezerniert wird (Greiner et al., 1999). Daher ist denkbar, dass Schilddrüsenhormone wie Rifampicin als Induktor von P-gp fungieren und somit die intestinale Absorption und Sekretion anderer Stoffe beeinflussen könnten.

Auch für die β -Adrenozeptorenblocker Atenolol und Propranolol konnte eine veränderte Pharmakokinetik unter hyperthyreoten Stoffwechselbedingungen gefunden werden (Feely et al., 1978 ; Geffner et al., 1990 ; Hallengren et al., 1982). Sie sind gleichfalls Substrat von P-gp (Geffner et al., 1990 ; Karlsson et al., 1993). Aus neueren Untersuchungen geht hervor, dass auch Talinolol, ein weiterer β -Blocker, Substrat des ABC-Transporters P-Glykoprotein ist (Spahn-Langguth et al., 1998 ; Wetterich et al., 1996). Nach oraler und intravenöser Gabe wird die Substanz aktiv in das Darmlumen sezerniert (Gramatte et al., 1996). Die Sekretion kann durch Modulatoren von P-gp wie Verapamil (Gramatte and Oertel, 1999) oder Erythromycin (Schwarz et al., 2000) gehemmt und Induktoren des Transportproteins wie Rifampicin beschleunigt werden (Westphal et al., 2000). Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Talinolol unter dem Einfluss von Schilddrüsenhormonen liegen hingegen noch nicht vor. Sie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt und werden im folgenden diskutiert.

Talinolol ist ein selektiver Antagonist an postsynaptischen β_1 -Rezeptoren, der zur medikamentösen Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt wird (Fachinformation, 1999). Für die vorliegende Studie wurde Talinolol ausgewählt, weil es einerseits Substrat von P-gp ist und andererseits günstige kinetische Eigenschaften aufweist. Dieser β -Blocker ist gut verträglich und wird nur in sehr geringem Ausmaß biotransformiert (lediglich 1% wird in Form hydroxylierter Metabolite renal eliminiert). Eine Glukuronidierung und Sulfatierung erfolgt nicht. Der größte Teil der Substanz wird unverändert renal (ca. 55 %) und 45 % extrarenal, hauptsächlich biliär und über die Fäces ausgeschieden (Schmidt, 1995).

Applikation von Schilddrüsenhormonen

Die Probanden erhielten über 17 Tage jeden Morgen 200 μ g L-Thyroxin. Diese Dosis entspricht derjenigen, die im Rahmen der Schilddrüsendiagnostik zur TSH-Suppression vor Durchführung einer „Suppressionsszintigraphie“ appliziert wird (Meng, 1992). Unter dieser Medikation gelang es, bei den zuvor euthyreoten Pro-

banden eine subklinische Hyperthyreose zu induzieren, d.h. es wurde bei allen Probanden eine deutliche Suppression des die Schilddrüse-stimulierenden Hormons (TSH) erreicht. Die zuvor im Normbereich befindlichen Schilddrüsenhormone fT4 und T3 stiegen unter der Thyroxingabe an. Eine hyperthyreote Stoffwechsellage war bei keinem Probanden zu beobachten. Aus ethischen Gründen waren höhere Thyroxindosen, die zur Induktion einer klinischen Hyperthyreose notwendig gewesen wären, nicht vertretbar. Bei 2 Probanden konnte trotz eines fT4-Anstiegs keine Zunahme, sondern ein Absinken der T3-Plasmakonzentration gefunden werden. Sie sind nicht mit den Probanden identisch, bei denen in der MDR1 mRNA-Untersuchung keine Induzierbarkeit durch Thyroxin gefunden wurde. Das Auftreten einer in der Literatur für einige β -Blocker beschriebene T4-T3-Konversionshemmung (Geffner and Hershman, 1992) wurde eigenen Untersuchungen zufolge für Talinolol nicht beobachtet, so dass die beobachtete Abnahme von T3 zur Zeit nur unzureichend erklärbar ist.

Charakterisierung der P-gp-Expression durch Immunhistochemie und RT-PCR in Duodenalbiopsien

Durch immunhistochemische Färbung und RT-PCR der duodenalen Gewebeproben konnte eine Induktion des intestinalen P-Glykoproteins durch das Schilddrüsenhormon Thyroxin gezeigt werden. Während nach der Gabe von Thyroxin alle Proben einen Anstieg der mittleren optischen Dichte nach immunhistochemischer Färbung zeigten, war eine Zunahme der MDR1 mRNA nur bei 6 der 8 Biopsien zu beobachten. Die Proben zweier Probanden zeigten bei niedriger Basalexpression eine besonders starke Induzierbarkeit der Expression nach Thyroxingabe sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene. Eine Korrelation zu den pharmakokinetischen Daten der beiden Individuen wurde nicht gefunden.

Eine Steigerung der intestinalen P-gp Expression konnte auch von Westphal und Mitarbeitern nach Behandlung mit dem Induktor Rifampicin gefunden werden (Westphal et al., 2000). Die Unterschiede der Expression waren jedoch stärker ausgeprägt und die Korrelation zu den pharmakokinetischen Daten war vorhan-

den. Dies deutet wiederum darauf hin, dass die Induktion in der vorliegenden Studie nicht ausreichend war und lässt weitere Untersuchungen notwendig erscheinen.

Wie oben beschrieben waren die Veränderungen der Immunhistochemie und der RT-PCR bei zwei der acht Probanden besonders stark ausgeprägt. Es ist daher zu überlegen, ob Mutationen des MDR1-Gens für die bei diesen Probanden ausgesprochen geringe basale Expression verbunden mit einer starken Induzierbarkeit verantwortlich sind. Mehrere Mutationen des humanen MDR1-Gens wurden kürzlich von Hoffmeyer (Hoffmeyer et al., 2000) beschrieben. Welche Bedeutung den an verschiedenen Orten des Gens lokalisierten Mutationen für die Expression und Funktion des Proteins zukommt, ist derzeit noch unklar.

Pharmakokinetische Untersuchungen

Nach intravenöser Gabe von 30 mg Talinolol wurden kurz nach Ende der Infusion (30 min) maximale Serumkonzentrationen um 400 ng/ml gemessen. Dieser Wert liegt etwas niedriger als die in der Literatur gefundenen Werte (Tausch et al., 1995 ; Westphal et al., 2000). Die durchschnittliche AUC_0 (1200 ng·h/ml) sowie die terminale Eliminationshalbwertszeit (10,8) sind mit den in der Literatur gefundenen Daten vergleichbar (Schmidt, 1995 ; Terhaag et al., 1989 ; Tausch et al., 1995)

Die totale Clearance lag mit 5,9 ml/(min*kg) zwischen den bei Tausch (Tausch et al., 1995) und den bei Terhaag (Terhaag et al., 1989) gefundenen Werten. Die renale Clearance (2,65 ml/(min*kg)) ist vergleichbar mit den in der Literatur angegebenen Werten. Die von uns bestimmte metabolische und nicht-renale Clearance lag etwas höher als die Literaturdaten (Tausch et al., 1995).

Nach der Gabe von L-Thyroxin kam es zu einer signifikanten Abnahme der terminalen Halbwertszeit. Alle anderen pharmakokinetischen Parameter von Talinolol blieben unverändert. Untersuchungen von Greiner (Greiner et al., 1999) mit Digoxin zeigten ähnliche Modifikationen der Kinetik nach intravenöser Applikation. Eine

Komedikation mit Rifampicin zeigte nur mäßige Veränderungen der i.v. Kinetik von Digoxin, während für die orale Gabe eine deutliche Abnahme der Bioverfügbarkeit von Digoxin zu beobachtet war.

Nach oraler Applikation von Talinolol ließ sich bei den Serumkonzentrations-Zeit-Kurven aller Probanden ein Doppelpeak beobachten. Dieses Phänomen wurde auch von anderen Autoren nach oraler Talinololgabe beschrieben (Terhaag et al., 1989 ; Westphal et al., 2000 ; Gramatte et al., 1996). Die Entstehung dieser Doppelpeaks ist vermutlich auf eine lokalisationsabhängige intestinale Absorption von Talinolol zurückzuführen, d.h. die Absorption von Talinolol findet überwiegend im proximalen Dünndarm (Duodenum, oberes Jejunum) statt, was den ersten Peak erklärt. Der verbleibende Arzneistoff gelangt in tiefere Dünndarmabschnitte, d.h. in Bereiche, in denen vermehrt Wasser resorbiert wird. Weitere Talinololmengen werden durch den parazellulär verlaufenden Wasserinflux mitgezogen. Dadurch entsteht das zweite Absorptionsmaximum. Derartige Absorptionsmechanismen werden auch für andere Arzneistoffe wie Ranitidin diskutiert, für die ebenfalls ein Doppel- bzw. Multippeakphänomen gezeigt werden konnte (Gramatte et al., 1994).

Die im Rahmen der Studie gemessene Bioverfügbarkeit von 69% entspricht etwa den in der Literatur aufgeführten Werten (Fachinformation, 1999), während die AUC (2843 ng•h/ml) und C_{max} (245 ng/ml) leicht unter den in der Literatur angegebenen Werten lagen.

Nach Gabe von Thyroxin nahm die AUC, Bioverfügbarkeit und die terminale Halbwertszeit von oral gegebenem Talinolol ab. Die Veränderung der terminalen Halbwertszeit war signifikant. Die Gesamtclearance stieg nach Thyroxingabe deutlich an. Diese Veränderung war nicht signifikant, lässt sich jedoch durch die Zunahme der Residualclearance bei 7 der 8 Probanden gut erklären. Die nach oraler Gabe im Vergleich zur intravenösen Applikation ausgeprägteren pharmakokinetischen Veränderungen nach Thyroxingabe sind am ehesten durch die höhere lokale Arzneistoffkonzentrationen bedingt. Dadurch wird der am Enterozyten vorliegende Arzneistoff in hohem Maße durch das induzierte P-gp wieder in das Darmlumen zurückgepumpt und somit seine Resorption verhindert. Nach

intravenöser Gabe wird der Arzneistoff im Blut verteilt und gelangt durch Diffusion oder andere, P-gp unabhängige, Transportprozesse in den Enterozyten. Auf diese Weise werden wahrscheinlich zu keiner Zeit so hohe Konzentrationen am Transporter erreicht wie das nach oraler Administration der Fall ist, so dass eine Induktion von P-gp kaum Einfluss auf die Pharmakokinetik des betreffenden Arzneimittels hat.

Talinolol wird im menschlichen Körper kaum metabolisiert. Die bislang durchgeführten Studien konnten zeigen, dass weniger als 1% des Talinolols über die Niere in hydroxylierter Form ausgeschieden wird (Trausch et al., 1995 ; Westphal et al., 2000). Ein hepatischer Phase-II-Metabolismus ist nicht bekannt. Erwartungsgemäß wurden auch in der vorliegenden Studie durch Thyroxinbehandlung keine Veränderung des metabolischen Clearance von Talinolol gefunden.

Da Unterschiede bei der Metabolisierung offensichtlich keine Rolle spielen, müssen andere Mechanismen für die unter Thyroxingabe beobachtete verminderte Halbwertszeit von Talinolol verantwortlich sein. Da auch die renale Clearance unter Thyroxineinfluss nicht signifikant ansteigt, scheint auch eine Zunahme der glomerulären Filtrationsrate, wie sie zum Teil bei hyperthyreoten Patienten auftritt (Bonelli et al., 1978 ; Gilfrich, 1976), zumindest nicht allein die Ursache zu sein.

Die vorliegenden pharmakokinetischen Parameter sprechen eher dafür, dass Thyroxin wie auch Rifampicin ein Induktor von P-gp sein könnte (Greiner et al., 1999). Dies würde auch die eingangs beschriebene unter Hyperthyreose verminderte Bioverfügbarkeit des gleichfalls nicht metabolisierten P-gp Substrats Digoxin erklären (Doherty and Perkins, 1966 ; Shenfield et al., 1977). Ähnlich der mit Talinolol durchgeführten vorliegenden Studie fanden Gilfrich und Mitarbeiter auch eine erhöhte nicht-renale Clearance von Digoxin (Gilfrich, 1976). Mit der im Rahmen der vorliegenden Studie gegebenen Thyroxindosis ließ sich bei den Probanden lediglich eine subklinische Hyperthyreose erzielen. Die erzielten Ergebnisse sind daher als richtungsweisend für eine mögliche Nachfolgestudie mit hyperthyreoten Patienten zu werten.

6 Zusammenfassung

Bei gleichzeitiger Gabe mehrerer Arzneimittel kann es zum Auftreten von Arzneimittelinteraktionen kommen. Neben metabolischen Wechselwirkungen, die immer dann auftreten, wenn sich zwei Pharmaka in ihrem Stoffwechsel gegenseitig beeinflussen, spielen auch Interaktionen mit membranalen Transportproteine eine wesentliche Rolle. Das bekannteste dieser Transportproteine ist das P-Glykoprotein (P-gp). Es wurde zuerst in Tumorzellen entdeckt und ist für einen Teil der bei der Chemotherapie von Tumoren beobachteten Multidrug Resistenz (MDR) verantwortlich. Mittlerweile ist bekannt, dass P-Glykoprotein nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in gesunden Geweben wie Leber, Niere, Gehirn und Darm exprimiert wird. Intestinales P-Glykoprotein beeinflusst die Resorption von Arzneimitteln indem es die Pharmaka nachdem sie in den Enterozyten aufgenommen wurden wieder in das Darmlumen zurückpumpt. Die Resorption des Stoffes wird somit vermindert. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass neben Zytostatika auch andere Arzneimittel wie der β -Adrenozeptorenblocker Talinolol und das Herzglykosid Digoxin Substrate von P-gp sind. Ferner ist bekannt, dass es Substanzen wie z.B. Rifampicin gibt, die die Aktivität von P-gp verändern können.

Basierend auf der Tatsache, dass Digoxin-Plasmaspiegel bei hyperthyreoten Patienten niedriger sind als bei euthyreoten Personen, sollte mit der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob Schilddrüsenhormone einen Einfluß auf die intestinale P-gp-Expression haben.

Dazu wurde an 8 gesunden Probanden (4 männl., 22-29 Jahre) die Pharmakokinetik von intravenös (30 mg) und oral (100 mg) appliziertem Talinolol vor und nach 17tägiger Gabe von Thyroxin untersucht. Mittels Immunhistochemie und RT-PCR wurde die intestinale P-gp-Expression in Dünndarmbiopsien, welche den Probanden vor und nach Thyroxin-Gabe entnommen wurden, bestimmt.

Aus der Untersuchung gingen folgende Ergebnisse hervor: (1) Durch 17tägige Gabe von Thyroxin lässt sich bei gesunden Probanden das Bild einer subklini-

schen Hyperthyreose erzielen. (2) Nach der Behandlung mit Thyroxin war sowohl in der Immunhistochemie als auch in der RT-PCR ein Anstieg der P-gp-Expression zu beobachten. (3) Die pharmakokinetischen Daten nach oraler Gabe von Talinolol weisen darauf hin, dass Thyroxin ein Induktor des Transportproteins P-gp sein könnte (Abnahme der Bioverfügbarkeit; signifikante Abnahme der Halbwertszeit). Nach intravenöser Applikation konnte keine Veränderung der Pharmakokinetik von Talinolol gezeigt werden.

Die vorliegenden Ergebnissen zeigen, dass Thyroxin die Expression von intestinalem P-gp induziert. Aufgrund dieses Effektes ist damit zu rechnen, dass die Therapie mit Arzneimitteln, die durch P-gp transportiert werden, bei hyperthyreoten Patienten beeinflusst wird.

7. Literatur

Bendayan,R, 1996, Renal drug transport: a review: *Pharmacotherapy*, v. 16, p. 971-985.

Bonelli,J, H Haydl, K Hruby, G Kaik, 1978, The pharmacokinetics of digoxin in patients with manifest hyperthyroidism and after normalization of thyroid function: *Int.J.Clin.Pharmacol.Biopharm.*, v. 16, p. 302-306.

Bordow,SB, M Haber, J Madafiglio, B Cheung, G M Marshall, M D Norris, 1994, Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma: *Cancer Res.*, v. 54, p. 5036-5040.

Borst,P, A H Schinkel, J J Smit, E Wagenaar, L van Deemter, A J Smith, E W Eijdens, F Baas, G J Zaman, 1993, Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoproteins in mammals: *Pharmacol.Ther*, v. 60, p. 289-299.

Borst,P, N Zelcer, A van Helvoort, 2000, ABC transporters in lipid transport: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1486, p. 128-144.

Caldwell,JH, C T Cline, 1976, Biliary excretion of digoxin in man: *Clin.Pharmacol.Ther*, v. 19, p. 410-415.

Chu,TM, E Kawinski, T H Lin, 1993, Characterization of a new monoclonal antibody F4 detecting cell surface epitope and P-glycoprotein in drug-resistant human tumor cell lines: *Hybridoma*, v. 12, p. 417-429.

Cordell,JL, B Falini, W N Erber, A K Ghosh, Z Abdulaziz, S MacDonald, K A Pulford, H Stein, D Y Mason, 1984, Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes): *J.Histochem.Cytochem.*, v. 32, p. 219-229.

Cordon-Cardo,C, J P O'Brien, D Casals, L Rittman-Grauer, J L Biedler, M R Melamed, J R Bertino, 1989, Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 86, p. 695-8.

Croxson,MS, H K Ibbertson, 1975, Serum digoxin in patients with thyroid disease: Br.Med.J., v. 3, p. 566-568.

Dale,KY, 1999, The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic Drug-Drug Interactions: Journal of Clinical Pharmacology, v. 39, p. 1203-1211.

de Lannoy,IA, M Silverman, 1992, The MDR1 gene product, P-glycoprotein, mediates the transport of the cardiac glycoside, digoxin: Biochem.Biophys.Res.Comm., v. 189, p. 551-557.

Doherty,JE, W H Perkins, 1966, Digoxin metabolism in: Ann.Intern.Med., v. 64, p. 489-507.

Evers,R, G J Zaman, L van Deemter, H Jansen, J Calafat, L C Oomen, R P Oude Elferink, P Borst, A H Schinkel, 1996, Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells: J.Clin.Invest, v. 97, p. 1211-1218.

Fachinformation. Cordanum. ASTA MEDICA and AWD. 1-5. 1999. Frankfurt/Main, BPI Service GmbH. Fachinformation. Ref Type: Serial (Book,Monograph)

Feely,J, J Crooks, I Stevenson, 1978, Alterations in plasma propranolol steady-state concentration in thyroid disease: Clin.Pharmacol.Ther., v. 23, p. 112-113.

Feely,J, N Peden, 1984, Use of beta-adrenoceptor blocking drugs in hyperthyroidism: Drugs, v. 27, p. 425-446.

Ford,JM, W N Hait, 1990, Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer: Pharmacol.Rev., v. 42, p. 155-199.

Fromm,MF, K Dilger, D Busse, H K Kroemer, M Eichelbaum, U Klotz, 1998, Gut wall metabolism of verapamil in older people: effects of rifampicin- mediated enzyme induction: Br.J.Clin.Pharmacol., v. 45, p. 247-255.

Fromm,MF, B Leake, D M Roden, G R Wilkinson, R B Kim, 1999, Human MRP3 transporter: identification of the 5'-flanking region, genomic organization and alternative splice variants: Biochim.Biophys.Acta, v. 1415, p. 369-374.

Frye,RL, E Braunwald, 1961, Studies on digitalis III. The influence of triiodothyronine on digitalis requirements: Circulation, p. 376-382.

Gatmaitan,ZC, I M Arias, 1993, Structure and function of P-glycoprotein in normal liver and small intestine: Adv.Pharmacol., v. 24, p. 77-97.

Gault,H, L Longerich, M Dawe, A Fine, 1984, Digoxin-rifampin interaction: Clin.Pharmacol.Ther, v. 35, p. 750-754.

Geffner,DL, J M Hershman, 1992, Beta-adrenergic blockade for the treatment of hyperthyroidism: Am.J.Med., v. 93, p. 61-68.

Geffner,DL, J Sladek, J M Hershman, 1990, Pharmacokinetics and clinical effects of atenolol in therapy of hyperthyroidism: Drugs Exp Clin.Res., v. 16, p. 167-173.

Gilfrich,HJ, 1976, [Studies on the pharmacokinetics of digoxin in patients with hyperthyroidism]: Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med., v. 82 Pt 2, p. 1726-1728.

Gramatte,T, E el Desoky, U Klotz, 1994, Site-dependent small intestinal absorption of ranitidine: Eur.J.Clin.Pharmacol., v. 46, p. 253-259.

Gramatte,T, R Oertel, 1999, Intestinal secretion of intravenous talinolol is inhibited by luminal R- verapamil: Clin.Pharmacol.Ther, v. 66, p. 239-245.

Gramatte,T, R Oertel, B Terhaag, W Kirch, 1996, Direct demonstration of small intestinal secretion and site-dependent absorption of the beta-blocker talinolol in humans: Clin.Pharmacol.Ther, v. 59, p. 541-549.

Greiner,B, M Eichelbaum, P Fritz, H P Kreichgauer, O von Richter, J Zundler, H K Kroemer, 1999, The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin: *J.Clin.Invest*, v. 104, p. 147-153.

Hallengren,B, O R Nilsson, B E Karlberg, A Melander, L Tegler, E Wahlin-Boll, 1982, Influence of hyperthyroidism on the kinetics of methimazole, propranolol, metoprolol and atenolol: *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, v. 21, p. 379-384.

Hartman,CR, C D Klaassen, D H Huffman, 1975, The biliary excretion of digoxin and metabolites in hyperthyroid rats: *Clinical Research*, v. 23, p. 220A.

Hedman,A, B Angelin, A Arvidsson, O Beck, R Dahlqvist, B Nilsson, M Olsson, K Schenck-Gustafsson, 1991, Digoxin-verapamil interaction: reduction of biliary but not renal digoxin clearance in humans: *Clin.Pharmacol.Ther*, v. 49, p. 256-262.

Hoffmeyer,S, O Burk, O von Richter, H P Arnold, J Brockmoller, A Johne, I Cascorbi, T Gerloff, I Roots, M Eichelbaum, U Brinkmann, 2000, Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P- glycoprotein expression and activity in vivo: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 97, p. 3473-3478.

Holtbecker,N, M F Fromm, H K Kroemer, E E Ohnhaus, H Heidemann, 1996, The nifedipine-rifampin interaction. Evidence for induction of gut wall metabolism: *Drug Metab Dispos.*, v. 24, p. 1121-1123.

Hunter,J, B H Hirst, 1997, Intestinal role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption: *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 25, p. 129-157.

Juliano,RL, V Ling, 1976, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 455, p. 152-162.

Karlsson,J, S M Kuo, J Ziemniak, P Artursson, 1993, Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P- glycoprotein: *Br.J.Pharmacol.*, v. 110, p. 1009-1016.

Kerr,DJ, J Graham, J Cummings, J G Morrison, G G Thompson, M J Brodie, S B Kaye, 1986, The effect of verapamil on the pharmacokinetics of adriamycin: *Cancer Chemother.Pharmacol.*, v. 18, p. 239-242.

Kim,AE, J M Dintaman, D S Waddell, J A Silverman, 1998, Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by P-glycoprotein: *J.Pharmacol.Exp Ther*, v. 286, p. 1439-1445.

Kivisto,KT, G Bookjans, M F Fromm, E U Griese, P Munzel, H K Kroemer, 1996, Expression of CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7 in human duodenal tissue: *Br.J.Clin.Pharmacol.*, v. 42, p. 387-389.

Kolars,JC, W M Awni, R M Merion, P B Watkins, 1991, First-pass metabolism of cyclosporin by the gut: *Lancet*, v. 338, p. 1488-1490.

Kolars,JC, P Schmiedlin-Ren, J D Schuetz, C Fang, P B Watkins, 1992, Identification of rifampin-inducible P450III_{A4} (CYP3A4) in human small bowel enterocytes: *J.Clin.Invest*, v. 90, p. 1871-1878.

Lawrence,JR, D J Sumner, W J Kalk, W A Ratcliffe, B Whiting, K Gray, M Lindsay, 1977, Digoxin kinetics in patients with thyroid dysfunction: *Clin.Pharmacol.Ther*, v. 22, p. 7-13.

Lee,CG, M M Gottesman, C O Cardarelli, M Ramachandra, K T Jeang, S V Ambudkar, I Pastan, S Dey, 1998, HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter: *Biochemistry*, v. 37, p. 3594-3601.

Ling,V, 1997, Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance: *Cancer Chemother.Pharmacol.*, v. 40 Suppl, p. S3-S8.

Lum,BL, M P Gosland, 1995, MDR expression in normal tissues. Pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors: *Hematol.Oncol.Clin.North Am.*, v. 9, p. 319-336.

Meng,W, 1992, *Schilddrüsenerkrankungen*, Jena-Stuttgart, Fischer.

Muller,M, P L Jansen, 1998, The secretory function of the liver: new aspects of hepatobiliary transport: J.Hepatol., v. 28, p. 344-354.

Neuhoff,S, P Langguth, C Dressler, T B Andersson, C G Regardh, H Spahn-Langguth, 2000, Affinities at the verapamil binding site of MDR1-encoded P-glycoprotein: drugs and analogs, stereoisomers and metabolites: Int.J.Clin.Pharmacol.Ther, v. 38, p. 168-179.

Novi,C, F Bissoli, V Simonati, T Volpini, A Baroli, G Vignati, 1980, Rifampin and digoxin: possible drug interaction in a dialysis patient [letter]: JAMA, v. 244, p. 2521-2522.

Oertel,R, K Richter, B Trausch, A Berndt, T Gramatte, W Kirch, 1994, Elucidation of the structure of talinolol metabolites in man. Determination of talinolol and hydroxylated talinolol metabolites in urine and analysis of talinolol in serum: J.Chromatogr.B Biomed.Appl., v. 660, p. 353-363.

Sauter,R, V W Steinijs, E Diletti, A Bohm, H U Schulz, 1992, Presentation of results from bioequivalence studies: Int.J.Clin.Pharmacol.Ther Toxicol., v. 30 Suppl 1, p. S7-30.

Schinkel,AH, 1997, The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins: Semin.Cancer Biol., v. 8, p. 161-170.

Schinkel,AH, E Wagenaar, C A Mol, L van Deemter, 1996, P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs: J.Clin.Invest, v. 97, p. 2517-2524.

Schinkel,AH, E Wagenaar, L van Deemter, C A Mol, P Borst, 1995, Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A: J.Clin.Invest, v. 96, p. 1698-1705.

Schmidt,J, 1995, Talinolol, ein klinisch bewährter β 1-selektiver Betablocker - Eine Übersicht zu pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften: Perfusion, p. 291-296.

Schreiber,V, J Stepan, I Gregorova, F Kolbel, T Pribyl, J Jahodova, V Janovska, 1980, [Digoxin-like immunoreactivity in serum of hyperthyroid rats with hypertrophy of the heart is not caused by aldosterone]: *Sb Lek.*, v. 82, p. 305-308.

Schütz,W, 1996, *Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: das Herz*, in W Forth, D Henschler, W Rummel, and K Starke (eds), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*: Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, p. 363-406.

Schwarz,UI, T Gramatte, J Krappweis, R Oertel, W Kirch, 2000, P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans: *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.*, v. 38, p. 161-167.

Shah,VP, K K Midha, S Dighe, I J McGilveray, J P Skelly, A Yacobi, T Layloff, C T Viswanathan, C E Cook, R D McDowall, 1992, *Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies*. Conference report: *International Journal of Pharmaceutics*, p. 1-7.

Shenfield,GM, J Thompson, D B Horn, 1977, Plasma and urinary digoxin in thyroid dysfunction: *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, v. 12, p. 437-443.

Sikic,BI, G A Fisher, B L Lum, J Halsey, L Beketic-Oreskovic, G Chen, 1997, Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P- glycoprotein: *Cancer Chemother.Pharmacol.*, v. 40 Suppl, p. S13-S19.

Spahn-Langguth,H, G Baktir, A Radschuweit, A Okyar, B Terhaag, P Ader, A Hanafy, P Langguth, 1998, P-glycoprotein transporters and the gastrointestinal tract: evaluation of the potential in vivo relevance of in vitro data employing talinolol as model compound: *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.*, v. 36, p. 16-24.

Sparreboom,A, J van Asperen, U Mayer, A H Schinkel, J W Smit, D K Meijer, P Borst, W J Nooijen, J H Beijnen, O van Tellingen, 1997, Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 94, p. 2031-2035.

Tanigawara,Y, N Okamura, M Hirai, M Yasuhara, K Ueda, N Kioka, T Komano, R Hori, 1992, Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1): *J.Pharmacol.Exp Ther*, v. 263, p. 840-845.

Terhaag,B, K Richter, K Feller, 1989, Untersuchungen zum pharmakokinetischen Verhalten des selektiven beta-Rezeptorenblockers Talinolol (Cordanum) am Menschen: *Zeitschrift für Klinische Medizin*, v. 44, p. 187-189.

Trausch,B, R Oertel, K Richter, T Gramatte, 1995, Disposition and bioavailability of the beta 1-adrenoceptor antagonist talinolol in man: *Biopharm.Drug Dispos.*, v. 16, p. 403-414.

Vallabhaneni,VR, 1998, Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier: *Proc.Natl.Acad.Sci.*, v. 96, p. 3900-3905.

van Asperen,J, 1999, The functional role of p-Glykoprotein in the blood-brain barrier: *J.of Pharm.sciences*, v. 86/8, p. 881-884.

Wacher,VJ, C Y Wu, L Z Benet, 1995, Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy: *Mol.Carcinog.*, v. 13, p. 129-134.

Watkins,PB, S A Wrighton, E G Schuetz, D T Molowa, P S Guzelian, 1987, Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man: *J.Clin.Invest*, v. 80, p. 1029-1036.

Watters,K, G H Tomkin, 1975, Letter: Serum digoxin in patients with thyroid disease: *Br.Med.J.*, v. 4, p. 102.

Westphal,K, A Weinbrenner, M Zschesche, G Franke, M Knoke, R Oertel, P Fritz, O von Richter, R Warzok, T Hachenberg, H M Kauffmann, D Schrenk, B Teerhaag, H K Kroemer, W Siegmund, 2000, Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in man: a new type of drug-drug-interaction: *Clin.Pharmacol.Ther*, v. 68, p.345-55.

Wetterich,U, H Spahn-Langguth, E Mutschler, B Terhaag, W Rosch, P Langguth, 1996, Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinolol enantiomers: *Pharm.Res.*, v. 13, p. 514-522.

Wuttke,W, 2000, Endokrinologie, in RF Schmidt, G Thews, and F Lang (eds), *Physiologie des Menschen*: Berlin,Heidelberg,New York, Springer-Verlag, p. 370-407.

Zamora,JM, H L Pearce, W T Beck, 1988, Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells: *Mol.Pharmacol.*, v. 33, p. 454-462.

Zschesche,M, 1997, Single dose bioequivalence study to compare formulations of Cordanum. Quantitative determination of talinolol in human serum: Validation Report for Arzneimittelwerk Dresden GmbH, Dresden.

Zucker,SN, G Castillo, H S Band, 1997, Down-regulation of the mdr gene by thyroid hormone during *Xenopus laevis* development: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 129, p. 73-81.