

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med Michael Wendt)
und
der Abteilung für Klinische Pharmakologie
des Instituts für Pharmakologie
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Werner Siegmund)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Regulation von Expression und Funktion der
Transporterproteine Mdr1 und Mrp2 in exkretorischen
Organen bei experimentell induzierter Sepsis**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Medizinischen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2008

vorgelegt von:

Michael Schmidt
geb. am 23.09.1983
in Rostock

Dekan:	Prof. Dr. H. K. Kroemer
1. Gutachter:	Prof. Dr. C. Lehmann
2. Gutachter:	Prof. Dr. T. W. Scheeren
Tag der Disputation:	08.04.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Vorbetrachtungen	2
2.1	Definition und Pathophysiologie der Sepsis	2
2.2	Membrantransporter	5
2.2.1	<i>multidrug</i> -Resistenz	6
2.2.2	MDR1 und MRP2	6
2.2.3	Physiologische Expression und Funktion der Transporter	8
2.2.4	Regulation der Transporter-Expressionen	11
2.2.5	Talinolol als <i>probe-drug</i> für den Mdr1-vermittelten Transport	12
3	Aufgabenstellung	13
4	Material und Methoden	14
4.1	Geräte und Chemikalien	14
4.2	Versuchsdurchführung	17
4.3	CASP-Modell	19
4.4	Talinololanalytik	20
4.4.1	Quantitative Bestimmung von Talinolol in Organhomogenaten	20
4.4.2	Quantitative Bestimmung von Talinolol in Urinproben	21
4.4.3	Quantitative Bestimmung von Talinolol in Stuhlproben	22
4.4.4	Quantitative Bestimmung von Talinolol im Serum	23
4.4.5	Überprüfung der zur Talinololanalytik verwendeten Methoden	23
4.4.5.1	Revalidierung der Talinololbestimmung in Organhomogenaten	23
4.4.5.2	Revalidierung der Talinololbestimmung in Urin- und Stuhlproben	25
4.5	Messung der mRNA-Expression	26
4.5.1	Gewebezerkleinerung und Zellaufschluss	26
4.5.2	mRNA-Isolation	26
4.5.3	Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion	27
4.5.4	Quantitative Real-time Polymerase Kettenreaktion	29
4.5.4.1	Probenaufarbeitung	29
4.5.4.2	Methodische Grundlagen	30
4.5.4.3	Auswertung	32
4.6	Berechnungen und Statistik	35

5	Ergebnisse	36
5.1	mRNA-Expressionen von <i>Mdr1b</i> und <i>Mrp2</i>	36
5.1.1	Expressionsmuster von <i>Mdr1b</i> und <i>Mrp2</i> in Rattenorganen	36
5.1.2	Vergleich der <i>Mdr1b</i> -Expression zwischen den Kontrollgruppen	38
5.1.3	<i>Mdr1b</i> -Expression bei induzierter Sepsis	39
5.1.4	<i>Mrp2</i> -Expression bei induzierter Sepsis	41
5.2	Pharmakokinetik von Talinolol	43
5.2.1	Serumkonzentrationen von Talinolol	43
5.2.2	Talinolol-Ausscheidung über den Urin	43
5.2.3	Talinolol-Ausscheidung über den Stuhl	43
5.2.4	Talinololverteilung in den Organen	46
6	Diskussion	49
7	Schlussfolgerungen	61
8	Zusammenfassung	62
9	Literaturverzeichnis	63
10	Appendix	70

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BSEP	<i>bile salt export pump</i>
Caco-2	<i>human colorectal adenocarcinoma cells</i>
CASP	<i>colon ascendens stent peritonitis</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLP	<i>coecal ligation and puncture</i>
C _T	<i>threshold cycle</i>
CYP	<i>Cytochrom P-450 System</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EHBR	<i>esai hyperbilirubinaemic rat</i>
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i>
GY/TR-	<i>Groningen Yellow, Mrp2-defizient</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i>
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography - tandem mass spectrometry</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MDR1/Mdr1	<i>multidrug resistance (neue Nomenklatur: ABCB1)</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRP2/Mrp2	<i>multidrug resistance-associated protein (neue Nomenklatur: ABCC2)</i>
NTCP	<i>Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OATP	<i>organic anion transporting polypeptide</i>
OAT	<i>organic anion transporter</i>
OCT	<i>organic cation transporter</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
r	<i>Korrelationsquotient</i>

RLT-Puffer	<i>RNA lysis and tissue-Puffer</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription -PCR</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SLC	<i>solute carrier</i>
SOP	<i>standard operating procedure</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TJ	<i>tight junction</i>
TR-	Mrp2-defizient
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glukuronosyltransferase

1 Einleitung

Die Sepsis stellt bis in die heutige Zeit eine große klinische und therapeutische Herausforderung für die Intensivmedizin dar [1] und ist auf den chirurgischen und internistischen Intensivstationen ein sehr häufiges Krankheitsbild mit hoher Mortalität, welche sich in den letzten Jahrzehnten nur geringfügig verringert hat [2-4]. Aufgrund international unterschiedlicher Angaben zu Prävalenz, Inzidenz und Mortalität der Sepsis [5] wurde im Jahr 2003 vom Kompetenznetz Sepsis (SepNet) in Deutschland eine repräsentative Querschnittsstudie durchgeführt, in der erstmalig für den Standort Deutschland der Stellenwert dieser Erkrankung auf den Intensivstationen gezeigt werden konnte. Mit einer Prävalenz der Sepsis von 12,4%, der schweren Sepsis und des septischen Schocks von 11,0% sowie einer Letalität der schweren Sepsis von 55,2% zählt die Erkrankung mit bis zu 57000 Todesfällen pro Jahr neben der koronaren Herzkrankheit und dem Myokardinfarkt zu den häufigsten Todesursachen. Die Inzidenz wird auf 100/100000 für die Sepsis und auf 116/100000 für die schwere Sepsis pro Jahr geschätzt. Dies bedeutet 75000 bzw. 79000 Erkrankte pro Jahr allein in Deutschland [6, 7]. Nicht nur die Folgen der Sepsis sind für viele Patienten schwerwiegender als bei den meisten anderen Erkrankungen, auch die gesundheitsökonomischen Auswirkungen der Sepsis sind dramatisch. Die Kosten für einen Patienten mit schwerer Sepsis betragen zirka 1100 bis 1300 Euro pro Tag [8, 9], wodurch sich die Behandlungskosten in Deutschland auf ein bis zwei Milliarden Euro pro Jahr belaufen und somit 19 bis 42% der Kosten einer Intensivstation ausmachen [9, 10].

Gerade bei der in der Zukunft alternden Bevölkerung muss bei steigenden Inzidenzraten der Sepsis im höheren Lebensalter [11], verknüpft mit den hohen Kosten und der daraus resultierenden Belastung des Gesundheitssystems, die Priorität von Forschung und Wissenschaft auf das schwere Krankheitsbild Sepsis gelegt werden [5]. Deren Behandlung wird durch den erheblichen Einfluss der Infektion auf die Expression von medikamentenmetabolisierenden Enzymen [12] und Membrantransportern [13] hinsichtlich einer hoch variablen Pharmakokinetik erheblich erschwert. Hierzu ist dringend weitere Forschung an der Sepsis zur weiteren Klärung der Pathophysiologie und Verbesserung der medikamentösen Therapie notwendig.

2 Theoretische Vorbetrachtungen

2.1 Definition und Pathophysiologie der Sepsis

Die Entwicklung internationaler Leitlinien für Diagnostik und Therapie setzen einheitliche Definitionen des Krankheitsbildes voraus. Nachdem Schottmüller im Jahre 1914 die Sepsis als Symptome einer Krankheit definierte, welche durch die Streuung von Bakterien, ausgehend von einem lokal abgegrenzten Fokus, ausgelöst wird [14], blieb diese Definition über viele Jahrzehnte als allgemein gültig bestehen. 1991 definierte Bone das Krankheitsbild aufgrund neuer Erfolge in der medikamentösen Therapie differenzierter, jedoch stand weiterhin die Entzündung am Anfang der Pathogenese [15]. Klinische Studien konnten nun besser miteinander verglichen werden. Ausgehend von der Erkenntnis, dass ein Erkrankungsbild, welches dem der Sepsis gleicht, auch einen nichtinfektiösen Auslöser haben kann, einigten sich 1991 die Teilnehmer der *ACCP/SCCM Consensus Conference* des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* auf Definitionen der unterschiedlichen Schweregrade der Sepsis [16].

Demnach liegt das *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) dann vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind und keine Infektion nachgewiesen ist:

- Temperatur $< 36\text{ °C}$ oder $> 38\text{ °C}$
- Herzfrequenz $> 90/\text{min}$
- Atemfrequenz $> 20/\text{min}$, und / oder PaCO_2 arteriell $< 32\text{ mmHg}$
- Leukozyten $< 4000/\mu\text{l}$ oder $> 12000/\mu\text{l}$ oder mehr als 10 % unreife Neutrophile im Differentialblutbild.

Wird zusätzlich zu diesen Kriterien eine Infektion klinisch vermutet oder mikrobiologisch nachgewiesen, wird dies fortan als Sepsis bezeichnet. Als schwere Sepsis wird der Zustand definiert, bei dem die oben genannten Kriterien zutreffen und zusätzlich infektionsbezogene Organdysfunktionen, Hypotension oder eingeschränkte Organperfusionen auftreten. Der folgende septische Schock ist durch eine fortbestehende arterielle Hypotonie, welche trotz intensiv geführter Volumentherapie oder der Notwendigkeit einer Katecholamintherapie besteht, gekennzeichnet. Diese Definitionen haben bis auf kleine Veränderungen zur

verbesserten Abgrenzbarkeit der Schweregrade bis heute Gültigkeit [17]. Die komplexe Diagnosestellung, bestehend aus einer Kombination von Vitalparametern, Laborwerten und Organfunktionen, zeigt gleichzeitig die Schwierigkeit, die Sepsis frühzeitig zu erkennen und somit eine adäquate Therapie einzuleiten.

Ursachen für die Entstehung des septischen Krankheitsbildes sind Infektionen durch Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten. Aber auch Traumata sowie Verbrennungen und die Pankreatitis können zum SIRS und folgend zur Sepsis führen [18].

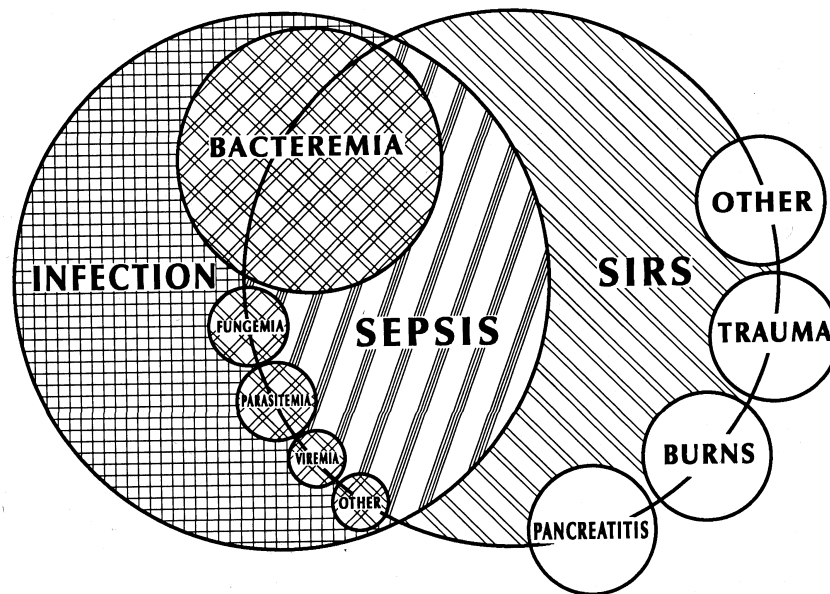


Abbildung 1: Zusammenspiel von *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), Infektion und Sepsis [16].

Bei mikrobiologisch nachgewiesener Bakteriämie (45%) umfasst das Erregerspektrum jeweils ca. 50% grampositive und gramnegative Bakterien [6, 19]. Mikroorganismen und deren Toxine führen über die Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems zur Bildung und Freisetzung von Mediatoren. Dies wird bei gramnegativen Bakterien durch das Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Zellmembran hervorgerufen, bei grampositiven Bakterien hingegen durch z. B. Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren und Exotoxine [20-22]. Bei einem lokal

umschriebenen Infektionsfokus vermitteln die pro-inflammatorischen Mediatoren, v. a. der Tumornekrosefaktor- (TNF) α , Interleukin- (IL) 1β , IL-2 und IL-6, die Erregerelimination sowie die Entfernung zerstörten Gewebes im geschädigten Gebiet. Eine überschießende Wirkung wird durch die folgende kompensatorische Antwort anti-inflammatorischer Mediatoren (z. B. IL-4, IL-10 und lösliche TNF- α Rezeptoren) verhindert [21]. Kann der Infektionsfokus bei schwereren Infektionen nicht abgegrenzt werden, gelangen die Mediatoren in die systemische Zirkulation, um neutrophile Granulozyten, T- und B- Lymphozyten, Blutplättchen sowie Gerinnungsfaktoren an den Ort der Infektion zu locken [21]. Des Weiteren bewirken sie eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen am Gefäßendothel, welches zur gesteigerten Endothel-Anheftung und Transmigration von Leukozyten führt [22, 23]. Werden die pro-inflammatorischen Mediatoren durch im Körper streuende Erreger oder deren Toxine so stark stimuliert, dass sie durch kompensatorische Mechanismen nicht mehr gebremst werden können, richtet sich das aus dem Gleichgewicht geratene System in einer massiven, den gesamten Organismus betreffenden Reaktion immer mehr auch gegen körpereigenes Gewebe [21, 24, 25]. Für die Pathophysiologie von entscheidender Bedeutung ist die Störung der Barrierefunktion des Gefäßendothels. LPS und TNF- α sowie die Bildung freier Sauerstoffradikale führen zum apoptotischen Untergang von Endothelzellen. Als Folge der erhöhten Permeabilität des Gefäßendothels entsteht ein interstitielles Ödem, welches zusammen mit der verstärkten Aktivierung des NO-Systems und der daraus resultierenden Gefäßdilatation zur fortschreitenden Reaktionsunfähigkeit der Gefäße führt [23]. Der sinkende Widerstand der Arteriolen und Venolen sowie die Abnahme des Blutvolumens infolge der defekten Barriere des Gefäßendothels können zunächst über einen Anstieg von Herzfrequenz und Herzschlagvolumen kompensiert werden. Ist der Abfall des systemvaskulären Widerstands nicht mehr durch einen Anstieg des Herzzeitvolumens zu kompensieren, entsteht die volle Ausprägung des hyperdynamen septischen Schocks [26]. Des Weiteren führt das septische Krankheitsgeschehen zu einer übermäßigen Aktivierung des Gerinnungssystems mit der Ausbildung multipler, kleine Gefäße verschließende, Mikrothromben. Die Folge ist eine Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen [23]. Durch den hohen Verbrauch von Gerinnungsfaktoren entwickelt sich eine disseminierte intravasale Koagulopathie. Die zum Teil stark beeinträchtigten

Vitalparameter und das Multiorganversagen stellen den Endpunkt der im Vorgegangenen beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge in der schweren Sepsis dar.

Der Darm spielt als Schockorgan bei Traumata und Sepsis eine bedeutende Rolle. Eine Störung der intestinalen Mikro- und Makrozirkulation mit fortschreitender Störung der Barrierefunktion des Darmepithels führt zur erleichterten Invasion und Streuung von Darmbakterien in den Körper, wodurch eine generalisierte Entzündung des Organismus ausgelöst oder weiter verstärkt werden kann. Der Magen-Darm-Trakt ist somit als Motor der Sepsis zu betrachten [27, 28]. Doch nicht nur das Darmepithel wird maßgeblich beeinflusst, auch die Membranbarrieren im zentralen Nervensystem, in der Leber und der Niere sowie im Hoden werden in ihrer Funktion limitiert. Neben der vermehrten Durchlässigkeit der Barrieren moduliert die Entzündungsreaktion auch die Expressionsmuster von Transportproteinen sowie metabolisierenden Enzymen, wodurch sich die pharmakokinetischen Parameter von Medikamenten und toxischen Produkten drastisch ändern können. Die Folge können schwer vorhersagbare Verteilungen und Wirkspiegel von Medikamenten sowie eine Gewebeakkumulation von Toxinen sein [12, 13].

2.2 Membrantransporter

Die gastrointestinale Absorptions- und Sekretionskapazität sowie der intestinale und hepatische *first-pass*-Metabolismus sind von großer Relevanz für die Höhe der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen. Viele Medikamente wie der kardioselektive Betablocker Talinolol unterliegen im menschlichen Organismus aber keiner nennenswerten Verstoffwechslung, dennoch ist die Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation oft eingeschränkt (bei Talinolol: 55%), welches auf eine inkomplette Resorption im Dünndarm zurückzuführen ist [29]. Ursächlich für diese Beobachtung sind die in den letzten Jahren charakterisierten *multidrug*-Transportproteine.

2.2.1 *multidrug*-Resistenz

Die Membrantransporter wurden erstmals in Tumorzellen beschrieben. Ihnen wurde eine große Bedeutung bei der Entwicklung der *multidrug*-Resistenz im Verlauf der zytostatischen Therapie von Tumoren beigemessen. Hierbei konnte eine übermäßig starke Expression von Transportproteinen in Tumorzellen beobachtet werden, die in den Membranen verankert sind und Xenobiotika aktiv aus Geweben und Zellen unter ATP-Verbrauch eliminieren. Die deutlich erniedrigte intrazelluläre Wirkstoffkonzentration als Folge der vermehrten Expression von Efflux-Transportern führte zur Bezeichnung der *multidrug resistance* [30, 31].

2.2.2 MDR1 und MRP2

Nach heutigen Erkenntnissen haben diese Transportproteine zusätzlich entscheidenden Einfluss auf die Pharmakokinetik vieler Arzneistoffe. Sie sind physiologisch in allen Membranen schrankenbildender Organe wie Darm, Leber, Niere, Gehirn und Hoden vorhanden, asymmetrisch in der basolateralen und apikalen Zellmembran verteilt und durchziehen sie mit zahlreichen transmembranen Domänen. Durch ihre Barriere- und Transportfunktion wird ein konstantes und gut regulierbares inneres Milieu geschaffen [32]. Gemeinsam ist ihnen ein jeweils weites Spektrum an Substraten, wobei es zu Überschneidungen unter den einzelnen Transportern kommen kann. Von großem Interesse für die Pharmakokinetik eines Arzneistoffes im Organismus ist neben der Absorption und Biotransformation die aktive Elimination aus Geweben unter ATP-Verbrauch. Zwei wichtige und gut charakterisierte Vertreter für diesen als Efflux-Transport bezeichneten Prozess sind die Membranproteine MDR1 (*multidrug resistance protein 1*, kodiert durch das MDR1-Gen, neue Nomenklatur: ABCB1) und das *multidrug resistance-associated protein 2* (MRP2, kodiert durch das MRP2-Gen, neue Nomenklatur: ABCC2), welche zur Familie der ABC- (*ATP-binding cassette*) Transporter gehören.

Tabelle 1: Alte und neue Nomenklatur der ABC-Transporter MDR1 und MRP2

Organismus	MDR1		MRP2	
	Neue Bezeichnung	Alte Bezeichnung	Neue Bezeichnung	Alte Bezeichnung
Mensch	ABCB1	MDR1, P-Glykoprotein	ABCC2	MRP2, cMOAT
Ratte	Abcb1a/b	Mdr1a/b,	Abcc2	Mrp2, cmoat
Maus	Abcb1a/b	Mdr1a/b,	Abcc2	Mrp2, cmoat

MDR1 und MRP2 sind in nahezu allen Organen mit Barrierefunktion in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert, wobei sie auf der apikalen Seite von polarisierten Zellen lokalisiert sind [33, 34]. Über diesen Mechanismus des aktiven Auswärtstransportes werden Zellen, Gewebe und schließlich der gesamte Organismus vor einer übermäßigen Akkumulation einerseits von Stoffwechselendprodukten, andererseits von einer Vielzahl von Medikamenten und deren toxischen Metaboliten geschützt [33, 35].

Obwohl MDR1 ein sehr breit gefächertes Substratspektrum besitzt, transportiert es vorzugsweise Stoffe mit amphiphilem, kationischem Charakter wie Zytostatika, Antibiotika, Kalzium-Kanal-Antagonisten, Immunsuppressiva, HIV-Proteasehemmer und Betablocker wie Talinolol [34, 36]. MRP2 hingegen bevorzugt v. a. organische Anionen wie sulfatierte und glukuronidierte Konjugate. Dies stellt einen wichtigen Detoxifikationsmechanismus zahlreicher endogener und exogener Substanzen dar (z. B. Bilirubin, Morphin). Jedoch können auch nicht metabolisierte Arzneistoffe wie z. B. die Chemotherapeutika Vinblastin, Vincristin, Doxorubicin und Cisplatin sowie Methotrexat Substrate von MRP2 sein [34]. Des Weiteren konnte durch Studien gezeigt werden, dass die Pharmakokinetik von Talinolol neben der *MDR1*-mRNA-Expression und dem MDR1 Proteingehalt auch vom Grad der Expression von MRP2 auf mRNA und Proteinebene beeinflusst wird. Folglich ist zu vermuten, dass Talinolol auch ein MRP2 Substrat sein könnte [37]. Wie wichtig MRP2 für die Entgiftung

zahlreicher endogener und exogener Substanzen ist, kann am Beispiel von Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom sowie an GY/TR- (*Groningen yellow* / Mrp2-defizient) und EHBR (*esai hyperbilirubinaemic rat*) Rattenstämmen gezeigt werden [34, 38, 39]. Ihnen gemeinsam ist ein Mangel an MRP2 mit konsekutiv verminderter biliärer Sekretion von Glutathion-Konjugaten und Bilirubinglukuroniden, welcher sich u. a. als Ikterus äußert [34, 39].

2.2.3 Physiologische Expression und Funktion der Transporter

Die Enterozyten des Darms beeinflussen durch das komplexe Zusammenspiel von Resorption, Metabolismus und Elimination in großem Maße die Bioverfügbarkeit oral verabreichter Arzneimittel und Nährstoffe. Es ist anzunehmen, dass Aufnahmetransporter (Abbildung 2) den Transport zahlreicher Substanzen aus dem Darmlumen in die Enterozyten vermitteln, auch wenn dieser Prozess nur sehr unzureichend charakterisiert ist. Die hohe Expression von Phase I und II metabolisierenden Enzymen ist verantwortlich für den großen *first-pass*-Effekt vieler oral applizierter Substanzen. Efflux-Transporter der apikalen Membran wie MDR1 und MRP2 transportieren resorbierte sowie metabolisierte Stoffe zurück ins Darmlumen und tragen damit zur limitierten Absorption vieler Medikamente bei. Zusätzlich besteht ein basolateraler Transport über die Proteine MRP1 und MRP3 ins Blut und somit in den Organismus. Vor allem der Metabolismus und aktive Auswärtstransport tragen zur Effektivität der intestinalen Absorptionsbarriere gegen Xenobiotika bei [40, 41].

Eine der wichtigsten Aufgaben der Leber ist die Detoxifikation von Stoffwechselendprodukten und Xenobiotika aus dem Blut. Diese werden über Aufnahmetransporter der basolateralen Seite aus der systemischen Zirkulation bzw. dem Pfortaderblut in die Hepatozyten aufgenommen. Phase I und II Enzyme der hepatischen Biotransformation führen zu einer Entgiftung und Umwandlung zu Substraten, die u. a. durch MDR1 und MRP2 über die kanalikuläre Membran in die Gallenflüssigkeit sezerniert werden [41]. Organische Anionen und deren Konjugate, wie Bilirubinglukuronid sowie sulfatierte Gallensalze, werden zur Bildung der Gallenflüssigkeit ebenfalls aus den Leberzellen in die Gallengänge transportiert [34].

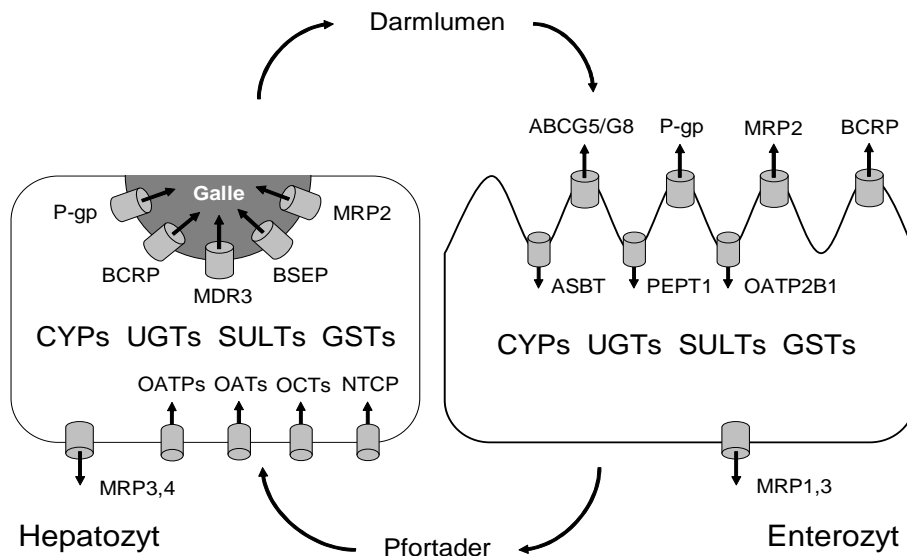


Abbildung 2: Darstellung der Aufnahme- und Effluxtransporter im Darm und in der Leber. Abkürzungen: ABC, *ATP-binding cassette*; BCRP, *breast cancer resistance protein*; BSEP, *bile salt export pump*; MRP, *multidrug resistance associated protein*; MDR, *multidrug resistance*; OAT, *organic anion transporter*; OATP, *organic anion transporting polypeptide*; OCT, *organic cation transporter*; NTCP, *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*; P-gp, P-Glykoprotein; UGT, *UDP-Glukuronosyltransferase*; SLUT, *Sulfotransferase*; Glutathion-S-Transferase [42].

Die Niere hat neben der Aufrechterhaltung der Wasser- und Elektrolythomöostase, Hormonproduktion sowie Blutdruckregulation die Aufgabe, Stoffwechselprodukte und Metabolite von Xenobiotika über den Urin auszuscheiden. MDR1 und MRP2 sind auf der apikalen Seite von Epithelzellen des proximalen Tubulussystems lokalisiert und transportieren die aus dem Blut aufgenommenen Stoffe in das Tubuluslumen [43]. Des Weiteren bestimmt das komplexe Netzwerk aus Aufnahmetransportern (OATs und OCTs) der Niere in entscheidendem Maße die renale Ausscheidung einer Vielzahl von Stoffen, welches im Nachfolgenden dargestellt ist.

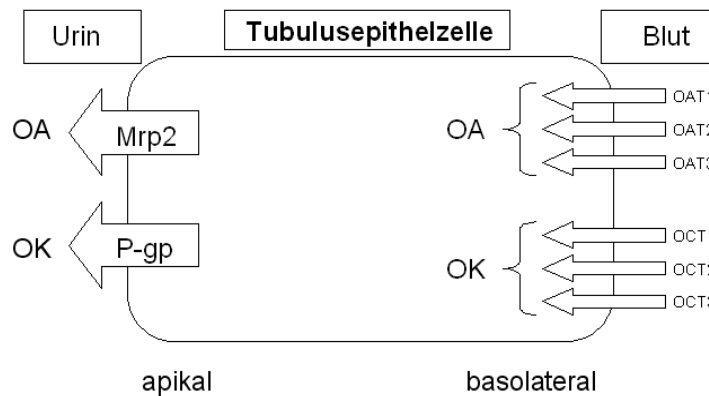


Abbildung 3: Darstellung der Influx- und Effluxtransporter in der Niere. Modifiziert nach [44]. Abkürzungen: P-gp, P-Glykoprotein; Mrp, *multidrug resistance associated protein*; OA, organisches Anion; OAT, *organic anion transporter*; OCT, *organic cation transporter*; OK, organisches Kation.

Die an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligten Kapillaren des Gehirns haben einen speziellen strukturellen Aufbau. *Zonulae occludentes* und *tight junctions* dichten das Endothel vollständig ab, so dass kein parazellulärer Transport gelöster Stoffe möglich ist [45]. MDR1 und MRP2 befinden sich in der luminalen Plasmamembran der Endothelzellen. Nach der aktiven Xenobiotikaaufnahme können potentiell toxische Substanzen und Medikamente über die Efflux-Transporter eliminiert werden [45].

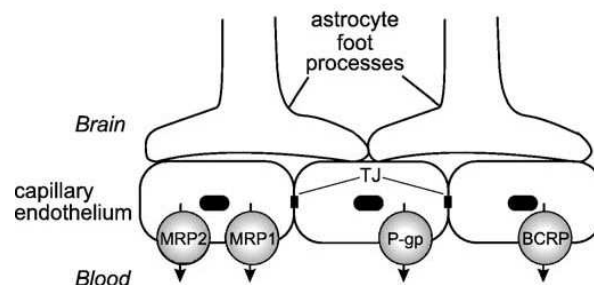


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke mit Lokalisation der Transportproteine MRP1 und 2, P-gp und BCRP [43]. Abkürzungen: TJ, *tight junctions*; MRP, *multidrug resistance associated protein*; P-gp, P-glykoprotein; BCRP, *breast cancer resistance protein*

Die ähnlich aufgebaute Blut-Hoden-Schranke dient der Protektion von Stammzellen vor toxischen Produkten. Während MDR1 auf der luminalen Oberfläche von kapillären Endothelzellen exprimiert ist, bleibt die Bedeutung des nur in sehr geringem Ausmaße vorhandenen MRP2 unklar [43].

2.2.4 Regulation der Transporter-Expressionen

Eine Veränderung des Expressionsgrades von Transporterproteinen kann die Aufnahme sowie Verteilung und in der Folge den Wirkungs- bzw. Schädigungsgrad von Xenobiotika und toxischen Produkten, die Substrate dieser Transporter sind, beeinflussen. Am Beispiel des MDR1-Substrates Digoxin, welches keiner Biotransformation unterliegt, konnte in Studien gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Gabe von Verapamil die Ausscheidung von Digoxin über den Urin verringert, die Konzentration im Blut jedoch deutlich erhöht war. Diese Beobachtung kann mit einer Hemmung des MDR1 durch Verapamil erklärt werden [46]. Weitere Inhibitoren sind Itraconazol, Cyclosporin A und Chinidin [35]. Rifampicin hingegen induziert intestinales MDR1, welches wiederum zu verringerten Digoxin- und Talinolol- Plasmaspiegeln führte [47, 48]. MRP2 ist ebenfalls durch Rifampicin induzierbar [49]. Doch nicht nur Toxine und Arzneistoffe verändern die Expression von MDR1 und MRP2, sondern auch entzündliche Prozesse. Das bakterielle Endotoxin LPS sowie die nachfolgend ausgeschütteten pro-inflammatorischen Mediatoren TNF- α , IL-1 β und IL-6 können als Folge einer Entzündung oder Infektion eine Vielzahl von Membrantransportern in ihrer Expressionsrate modifizieren [13]. Ein gutes Beispiel hierfür stellen Endotoxin behandelte Ratten mit deutlich reduziertem *Mdr1*- und *Mpr2*- Expressionslevel und erhöhter intestinaler Absorption von *Mdr1*- und *Mpr2*- Substraten dar. Des Weiteren konnte eine erhöhte Kumulation von *Mdr1*-Substraten im Hirngewebe bei einer erniedrigten *Mdr1*-Expressionsrate gezeigt werden [12].

Die Expressionsrate von medikamententransportierenden Membranproteinen wird durch andere Arzneistoffe oder entzündliche Reaktionen wie dem septischen Krankheitsbild modifiziert. Bei fehlender Anpassung der Dosis führt dies zu erhöhten oder verminderten Arzneimittel-Plasmaspiegeln und hat somit einen großen Einfluss auf die klinische Pharmakotherapie.

2.2.5 Talinolol als *probe-drug* für den Mdr1-vermittelten Transport

Die Expression von Transportproteinen kann durch etablierte Methoden der PCR-Technologie bestimmt werden. Zur Charakterisierung der Funktion von Membrantransportern werden *probe-drugs* verwendet, welche möglichst nur Substrat eines Transporters sein sollten und keiner nennenswerten Biotransformation unterliegen. Konzentrations- und Verteilungsänderungen in den untersuchten Medien sind Ausdruck einer veränderten Transporterfunktion. Über die Messung der Expression auf Genebene und des tatsächlichen Transports als Ausdruck funktionell aktiver Membrantransportproteine können wichtige Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung der Transporter und deren Regulationsmöglichkeiten erlangt werden. In der Klinischen Pharmakologie der Universität Greifswald wird der kardioselektive Betablocker Talinolol als *probe-drug* zur Quantifizierung des Mdr1-vermittelten Transports genutzt. Der seit 1975 zur Therapie des Bluthochdrucks und der koronaren Herzkrankheit verwendete Arzneistoff liegt bei pH 7,4 vorwiegend als Kation vor und weist eine mittlere Lipidlöslichkeit auf. Die orale Bioverfügbarkeit beträgt bei lediglich geringer Biotransformationsrate 55% [50, 51].

Es konnte in zahlreichen *in vitro* Untersuchungen an *human colorectal adenocarcinoma* (Caco-2) Zellen, in Tierversuchen und in klinischen Studien am Menschen ein aktiver, gegen einen Konzentrationsgradienten gerichteter Transport von Talinolol durch Mdr1/MDR1 über Membranen gezeigt werden, welcher Ausdruck der eingeschränkten Bioverfügbarkeit ist. Dieser Prozess ist durch Erythromycin und Verapamil hemmbar sowie durch Rifampicin und Carbamazepin induzierbar [37, 48, 52-55]. Des Weiteren wurde für die simultane orale Applikation der MDR1-Substrate Digoxin und Talinolol im menschlichen Organismus eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Digoxin nachgewiesen, deren Ursache eine Sättigung der apikal gerichteten MDR1-Transportkapazität ist [56].

Auch der MDR1 Genotyp hat einen entscheidenden Einfluss auf die Expression des Effluxtransporters MDR1 und trägt damit zur Variabilität der Talinololkinetik bei [57].

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Talinolol ebenfalls ein Substrat von MRP2 ist, da gezeigt werden konnte, dass die Pharmakokinetik von Talinolol sowohl mit der MDR1-, als auch mit der MRP2-Expression des Darms korreliert [37]. Außerdem reicherte sich Talinolol in zahlreichen Organen *Mrp2*-defizienter Ratten an [51].

3 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war es, durch ein operatives Sepsismodell, welches sehr nah an der pathophysiologischen Entstehung der abdominalen Sepsis orientiert ist, den Einfluss der Entzündung sowohl auf die mRNA-Expression der Effluxtransporter Mdr1 und Mrp2 als auch auf deren Funktion durch Verteilungsveränderungen des *probe-drug* Talinolol in einer Spätphase der Sepsis in schrankenbildenden Organen zu zeigen. Hierzu wurden die Gewebe Jejunum, Ileum, Leber, Niere, Gehirn und Hoden auf Genexpression und Talinololkonzentration untersucht. Des Weiteren wurden zur Beschreibung der Pharmakokinetik von Talinolol dessen Konzentration im Blut sowie die Ausscheidungen über Urin und Stuhl gemessen. Zur besseren Abgrenzbarkeit des Einflusses von Mdr1 und Mrp2 auf die Talinolokinik wurden die Untersuchungen in Wildtyp-Tieren und Mrp2-defizienten (TR-) Ratten gleichermaßen durchgeführt.

Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen für die vorliegende Promotionsarbeit:

1. Transporterexpression

- In welchem Maße sind Mdr1 und Mrp2 in den verschiedenen Organen nicht-septischer Ratten exprimiert?
- Wie ist das Mdr1-Verteilungsmuster von TR- Tieren im Vergleich zum Wildtyp?
- Welche Auswirkung hat die Infektion auf die Expression von Mdr1 und Mrp2 in den oben genannten Organen drei Tage nach Sepsisinduktion in Bezug auf nicht-septische Ratten?

2. Transporterfunktion

- Wie erfolgen Verteilung und Ausscheidung von Talinolol bei TR- Tieren im Vergleich zum Wildtyp?
- Wie verändert die Infektion die pharmakokinetischen Parameter von Talinolol als Ausdruck von Funktion und Bedeutung der Auswärtstransporter Mdr1 und Mrp2 drei Tage nach Sepsisinduktion im Vergleich zu nicht septischen Tieren?
- Gibt es Zusammenhänge zwischen Transporter-Expression und Talinolokinik septischer und nicht septischer Tiere?
- Ist Talinolol ein Substrat von Mrp2?

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Chemikalien

a) Geräte zur Probenaufarbeitung

- Zentrifuge: Heraeus® Megafuge® 1,0R, Kendro Laboratory Products International Sales, Langenselbold, Deutschland
- Konzentrator : Techne Dri Block® DB-3, thermo Dux GmbH, Wertheim, Deutschland
- Mischer: Vortexmischer VF2, Janke & Kunkel IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
- Ultraschallbad: USR 54H, Merck, Bruchsal, Deutschland
- Horizontalschüttler: Thys2, VEB MLW Labortechnik, Ilmenau, Deutschland
- Homogenisator: Ultratutax T25 basic, IKA®- Labortechnik, Staufen, Deutschland

b) HPLC mit Fluoreszenz-Detektion:

- Pumpe: L 6200A Intelligent Pump, MERCK- Hitachi, Darmstadt, Deutschland
- Probengeber : AS 2000A, MERCK- Hitachi, Darmstadt, Deutschland
- Fluoreszenz-Detektor: RF 551, MERCK- Hitachi, Darmstadt, Deutschland
- Säulenofen: L5025 Column Thermostat, MERCK- Hitachi, Darmstadt, Deutschland
- Entgaser: ERC- 3315, ERC, Alteglofsheim, Deutschland
- Schnittstelle: D6000 *Interface*, MERCK- Hitachi, Darmstadt, Deutschland

c) HPLC mit Massenspektrometrie:

- Chromatographie: Agilent 1100 Series HPLC System Agilent, Böblingen, Deutschland
- Detektor: API 4000 LC/MS/MS System mit Turbo-Ion[®]-Spray, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

d) Geräte zur mRNA-Expressionsmessung:

- RT Reaktion: Eppendorf Mastercycler gradient, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge: Centrifuge 5804R, Eppendorf- Netheler- Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge (*Tubes*): Centrifuge 5415D, Eppendorf- Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- Detektor: ABI Prism[®] 7700 Sequence Detector, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- Metallmühle: Mikro- Dismembrator S, B. Braun, Melsungen, Deutschland

e) Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Talinolol: Arzneimittelwerk Dresden, Deutschland
- L- Propranolol: Arzneimittelwerk Dresden, Deutschland
- Acetonitril: J. T. Baker, Deventer, Niederlande
- Ethanol: Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Methanol: J. T. Baker, Deventer, Niederlande
- Diethylether: MERCK, Darmstadt, Deutschland
- Natriumcarbonat: MERCK, Darmstadt, Deutschland
- Triethylammonium-phosphat: Fluka, Buchs, Schweiz
- Phosphorsäure: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Methylcellulose: Universitätsapotheke Greifswald

- TaqMan[®] RT Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Reagenzien:
- Platinum[®] Taq Invitrogen[™], Karlsruhe, Deutschland
DNA-Polymerase:
- dNTP: Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- ROX Reference Dye: Invitrogen[™], Karlsruhe, Deutschland
- RNeasy-Kit: Qiagen, Hilden, Deutschland
- MgCl₂ (25mM): Promega, Mannheim, Deutschland
- KCl: Fluka, Steinheim, Deutschland
- Tris- Puffer pH 8,4: Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Mercaptoethanol: Lancaster, Frankfurt/Main, Deutschland
- Optical Caps: Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- Mikrotiterplatten Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
(MicroAmp):
- GeneExpression Assays Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
(*Mdr1*, *Mrp2*, 18S rRNA):
- Aqua ad iniectabilia: B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Pentobarbital: Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
- Venenverweilkanüle: 18 G, Ohmeda, Helsingborg, Schweden
- Nahtmaterial: 7/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland
5/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland

4.2 Versuchsdurchführung

Das nachfolgend beschriebene Tierexperiment mit dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-012/06 wurde vom zuständigen Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF) geprüft und genehmigt. In unseren Versuch wurden jeweils 12 männliche Wildtyp- und Mrp2-defiziente Lew.1W-Ratten (220 - 320 Gramm) aus der universitätseigenen Tierzucht der Abteilung für Tierversuchskunde eingeschlossen. Die bei Wistar-Ratten natürlich auftretende Mutation im Genbereich von Mrp2 wurde in den Lew.1W-Stamm eingekreuzt, so dass Mrp2-defiziente Lew.1W Tiere zur Verfügung standen. Zunächst wurden die Tiere in zwei Gruppen mit je sechs Tieren randomisiert.

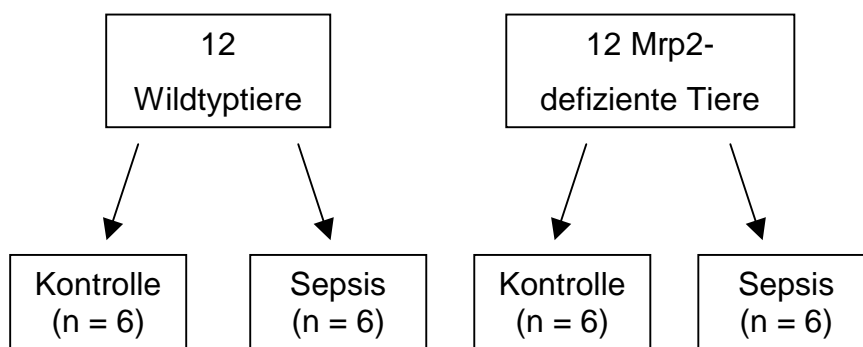


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tierzuordnung zu den Versuchsgruppen.

Die Tiere wurden über die gesamte Versuchsdauer unter Standardbedingungen in klimatisierten Inkubationsschränken (Flufrance, Wissous, Frankreich) in Polykarbonat-Käfigen mit StandardEinstreu (je drei Ratten pro Käfig) unter 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus, einer Temperatur von 22 °C und einer relativen Luftfeuchte zwischen 55 und 60% bei freiem Zugang zu angesäuertem Wasser (pH 3) und Standardfutter (ssniff, Soest, Deutschland) gehalten.

Nach einer Adaptationsphase von 14 Tagen wurden alle Tiere sieben Tage vor und drei Tage nach der CASP- bzw. Sham-CASP-Operation (entspricht der Kontrolle in unserem Versuchsprotokoll) täglich zwischen acht und neun Uhr mit 50 mg/kg Talinolol behandelt, welches in einer 0,5%igen Methylcelluloselösung suspendiert

über eine Schlundsonde oral verabreicht wurde. Zur Gewinnung von Sammelurin wurden die Tiere am letzten Versuchstag für 24 Stunden nach der letzten Talinolol-Dosis in Stoffwechsellkäfige verbracht, in denen kontinuierlich der ausgeschiedene Urin aufgefangen wurde. Der Stuhl der Ratten wurde über die letzten drei Tage des Versuchs gesammelt. Die Urin- und Stuhlproben wurden bis zur analytischen Auswertung bei -20 °C gelagert. Die Ratten wurden unter Verwendung von Diethylether narkotisiert, über eine Supraorbitalpunktion entblutet und tierschutzgerecht getötet. Das gewonnene Blut wurde heparinisiert und nachfolgend bei 1000 U/min für zwei Minuten zur Gewinnung von Serum zentrifugiert. Unmittelbar danach erfolgte die Dissektion der Tiere unter Entnahme der Organe Gehirn, Jejunum, Ileum, Leber, Hoden und Niere, welche unmittelbar gewogen und bei -20 °C eingefroren wurden. Zuvor wurde jeweils ein kleines Gewebestück asserviert, welches in Cryotubes bei -80 °C separat für die mRNA-Expressionsmessungen eingelagert wurde. Die Betreuung aller oben aufgeführten Schritte der Narkose, Tötung und Organentnahme erfolgte durch fachkundige Mitarbeiter der Institute.

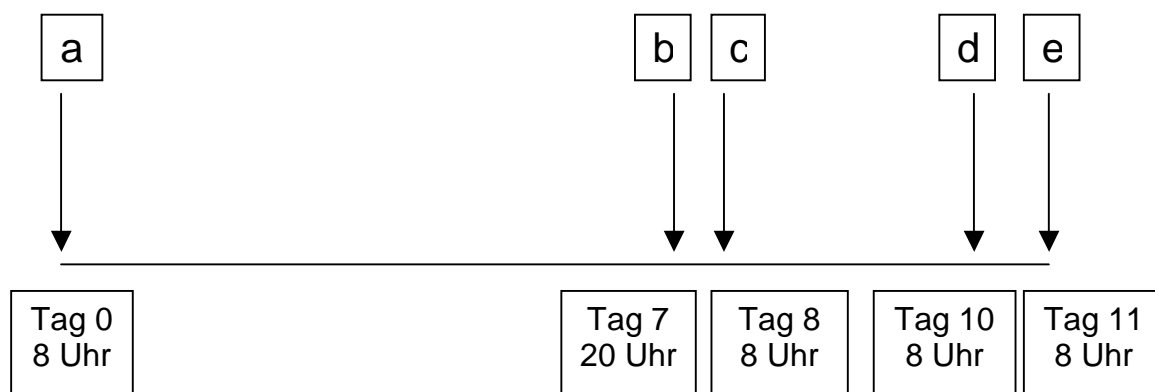


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung.

- a → Beginn der Talinolol-Gabe
- b → CASP bzw. Sham-CASP
- c → Beginn der Stuhlsammlung
- d → letzte Talinolol-Gabe und Beginn der Urinsammlung
- e → Ende des Versuchs und der Stuhl-/Urinsammlung, Tötung der Tiere, Organentnahmen

4.3 CASP-Modell

Anlehnend an das CASP-Modell der Maus [58] wurde im Labor der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin die Operationstechnik auf die Ratte übertragen und etabliert [59]. Die Durchführung der CASP-Operation erfolgte unter einer Pentobarbital-Narkose (60 mg/kg Körpergewicht), wobei das Anästhetikum intraperitoneal appliziert wurde. Im Folgenden wurde nach Desinfektion der Abdominalregion der Ratte ein etwa zwei Zentimeter langer, medianer Schnitt zur Eröffnung der Bauchhöhle angelegt. Nach Aufsuchen des *Colon ascendens* wurde dieses ungefähr ein bis zwei Zentimeter oberhalb des ileozökalen Übergangs mit einer Venenverweilkanüle der Größe 18 G durchstoßen. Hierbei wurde die Flexüle auf der Gegenseite des Ansatzes des Mesenteriums, außerhalb des Verlaufes der die *Mucosa* versorgenden Gefäße, eingebracht, die Stahlkanüle zurückgezogen, die umgebene Kunststoffkanüle an drei Stellen durch eine Naht (Fadenstärke 7/0) fixiert und auf 3 mm gekürzt. Nachdem die Durchlässigkeit und feste Fixation des Kunststoffröhrchens durch leichten Druck auf das Zökum geprüft worden war, wurde die muskuläre und kutane Schicht der Bauchdecke separat mit einer Naht (Stärke 5/0) verschlossen.

Bei Verwendung eines 18 G Stents lag in vorangegangenen Untersuchungen die Mortalität bei 53% [59]. Es handelt sich somit um ein subletales Modell einer polymikrobiellen Sepsis.

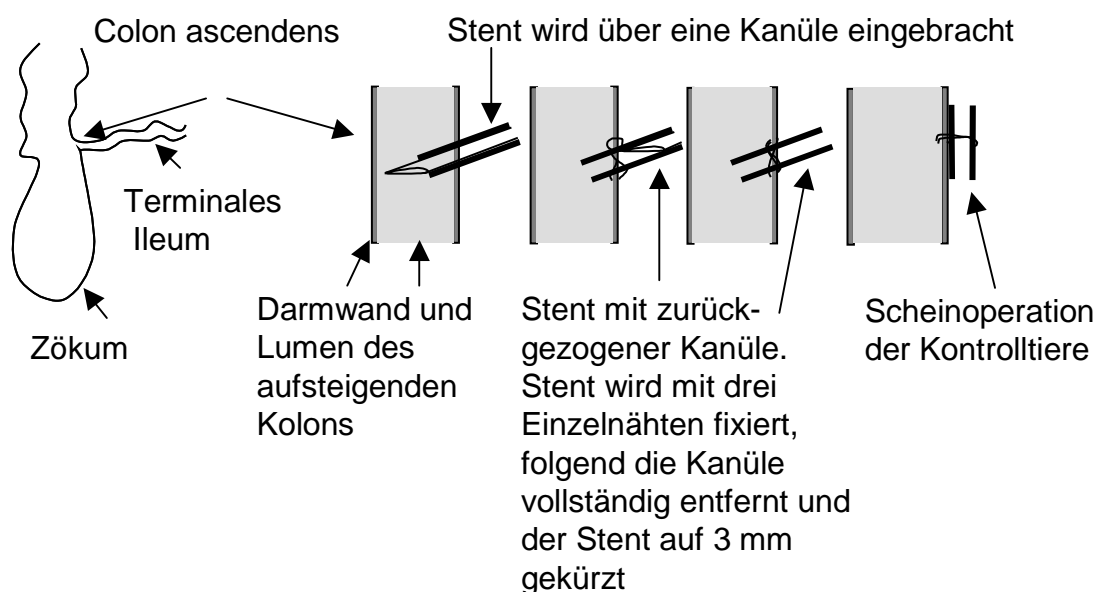


Abbildung 7: Schematische Darstellung der CASP-Operation.

4.4 Talinololanalytik

In den entnommenen Organen Jejunum, Ileum, Leber, Niere, Hoden und Gehirn sowie Urin und Stuhl wurde der Modellarzneistoff Talinolol durch die *high pressure liquid chromatography* (HPLC) mit nachgeschaltetem Fluoreszenzdetektor quantitativ bestimmt.

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte bei den Organhomogenaten und Urinproben durch die Anwendung der internen Standardmethode. Die über der Basislinie dargestellte Höhe der Peaks von Talinolol und Propranolol in den Chromatogrammen wurde ausgewertet und das Verhältnis der Peakhöhe des Analyten zur Peakhöhe von Propranolol bestimmt. Bei der Quantifizierung von Talinolol im Stuhl wurde die absolute Peakhöhe ohne Nutzung des internen Standards Propranolol analysiert. Durch lineare Regression mit der Wichtung $1/x$, wobei x die Konzentration darstellt, konnten durch Nutzung des Programms WinVal, Version 0,86b (Autor: Frank Siegmund) die Kalibrationsgeraden ermittelt werden. Abweichend hiervon führten wir die Bestimmung von Talinolol im Serum mittels HPLC und LC-MS/MS-System durch. Die Auswertung erfolgte mittels der validierten Software Analyst Version 1.4. unter Nutzung des Peak-Flächen-Verhältnis.

4.4.1 Quantitative Bestimmung von Talinolol in Organhomogenaten

Hierbei wurde die im Labor validierte Methode (SOP 04-2000) unter Verwendung der Chromatographie-Säule LiChroCART[®] 250-4 (MERCK, gefüllt mit LiChrospher[®] 100 RP18e, 5 μ m, 4,6 x 100 mm) revalidiert. Die Chromatographie erfolgte isokratisch unter Verwendung einer mobilen Phase bestehend aus 70% 0,025 M Triethylammoniumphosphat-Puffer (pH 3) und 30% Acetonitril bei einer Flussrate von 1 ml/min. Von den Organen wurde nach kurzem Antauen circa ein Gramm abgetrennt und zusammen mit dem fünffachen Masseanteil (m/m) an destilliertem Wasser homogenisiert. Im Folgenden wurde 1 ml Organhomogenat in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 25 μ l der Stammlösung der internen Standard-Lösung (= 43,84 ng (S)-Propranolol) versetzt. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert, der Überstand in ein Schliffröhrchen überführt und mit 200 μ l gesättigter Na₂CO₃-Lösung (pH = 12) gemischt. Im Weiteren wurden 5 ml Diethylether zur Flüssig-Flüssig-Extraktion hinzugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur in den Horizontalschüttler gestellt. Nach einer

fünfminütigen Zentrifugation bei 4000 U/min wurde die organische Phase abgehoben und bei 40 °C eingedampft. Die getrockneten Rückstände wurden in 150 µl mobiler Phase aufgenommen, in Vials pipettiert und sequenzgerecht in den Probengeber verbracht, wobei 50 µl der Lösung ins chromatographische System injiziert wurden. Parallel zu den Versuchsproben wurden Kalibrationsgeraden von 3 bis 1000 ng/ml sowie Qualitätskontrollen bei 6, 100, 200, 500 und 900 ng/ml aufgearbeitet und vermessen. Als Arzneistoff-freie Leermatrix zur Bereitung der Kalibrationsreihen diente ein Gemisch aus Herz-, Leber- und Nierengewebe vom Schwein, welches in Analogie zu den Messproben mit fünf Masseteilen destillierten Wassers homogenisiert wurde.

4.4.2 Quantitative Bestimmung von Talinolol in Urinproben

Bei der Aufarbeitung des Urins wurde auf eine bereits vorhandene Standardarbeitsanweisung des Pharmakologischen Instituts zurückgegriffen und diese revalidiert (SOP 05-1997). Es wurden hierbei die mit LiChrospher® 60 RP-Select B (5 µm) gefüllte Säule Eco CART® 125-3 sowie die mobile Phase der Zusammensetzung 80% 0,025 M Triethylammoniumphosphatpuffer (pH 3) und 20% Acetonitril verwendet. Nach vollständigem Auftauen wurde der Urin vor der Aufarbeitung aufgrund der hohen Talinololkonzentration 1 : 1000 mit destilliertem Wasser vorverdünnt. Zu 0,5 ml dieser in ein Schliffröhrchen überführten Verdünnung wurden 100 µl gesättigte Na₂CO₃-Lösung sowie 25 µl der Stammlösung des internen Standards (= 43,84 ng (S)-Propranonol) und Talinolol für die Kalibrationsreihen zugesetzt. Anschließend wurde diese Mischung mit 5 ml Diethylether versetzt und für 15 Minuten im Horizontalschüttler bei Raumtemperatur extrahiert. Die obere organische Phase wurde nach einer Zentrifugation von fünf Minuten bei 4000 U/min abgehoben, in ein neues Schliffröhrchen gegeben und unter leichtem Luftstrom bei 40 °C zur Trocknung gebracht. Die an der Wand des Schliffröhrchens haftenden Substanzen wurden in 120 µl mobiler Phase aufgenommen und in Vials pipettiert, aus denen 25 µl in das chromatographische System injiziert wurden. Im gleichen Arbeitsgang wie die untersuchten Rattenproben wurden Kalibratorproben im Konzentrationsbereich von 5 bis 1000 ng/ml und Proben zur Überprüfung der analytischen Qualität mit 100, 400 und 800 ng/ml aufgearbeitet. An jedem Messtag

wurde eine derartige Kalibrationsgerade aus Leerurin von nicht mit Talinolol behandelten Ratten erstellt.

4.4.3 Quantitative Bestimmung von Talinolol in Stuhlproben

Für die Bestimmung von Talinolol aus dem gewonnenen Rattenstuhl konnte ebenfalls eine vorhandene Arbeitsanweisung (SOP 04-2003) verwendet werden, die in leicht modifizierter Form einer Revalidierung unterzogen wurde. Auch hier wurden wie bei der Aufarbeitung des Urins die mit LiChrospher® 60 RP-Select B (5 µm) gefüllte Säule Eco CART® 125-3 und die mobile Phase der Zusammensetzung 80% 0,025 M Triethylammoniumphosphatpuffer (pH 3) und 20% Acetonitril verwendet. Zunächst wurde der Stuhl gewogen und mit dem neunfachen Masseanteil (m/m) an destillierten Wasser verdünnt und homogenisiert. Nachfolgend musste durch die hohen Konzentrationen ein zweiter Verdünnungsschritt (1 + 200) durchgeführt werden. 0,5 ml dieser Verdünnung wurden mit 0,5 ml Wasser, 100 µl gesättigter Na₂CO₃-Lösung sowie Talinolol für die Kalibrationsreihen in ein Schliffröhrchen pipettiert und mit 5 ml Diethylether für 10 Minuten im Horizontalschüttler bei Raumtemperatur extrahiert. Darauf folgte eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 4000 U/min. Nach Abheben von 4 ml der oberen organischen Phase in ein neues Schliffröhrchen wurde 300 µl verdünnte Phosphorsäure (Wasser : Phosphorsäure 85% = 250 : 1) hinzugegeben, 10 Minuten im Horizontalschüttler rückextrahiert und anschließend bei 4000 U/min für zwei Minuten zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgehoben und verworfen. Die saure Wasserphase wurde direkt in die Vials überführt und 35 µl in das chromatographische System eingespritzt.

Im Gegensatz zur Aufarbeitung der Gewebe- und Urinproben kann es bei den Stuhlproben aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Matrix aus einer Vielzahl von Substanzen, die im basischen Milieu mit extrahiert werden können, zu Verunreinigungen im Chromatogramm und somit zu einer erschwerten Auswertung kommen. Von Talinolol ist aber bekannt, dass es sich auch im sauren Milieu extrahieren lässt. Viele der durch die basische Extraktion noch in der organischen Phase befindlichen Substanzen besitzen diese Eigenschaft aber nicht, weshalb durch die Rückextraktion weniger bzw. quantitativ deutlich geringer ausgeprägte Störpeaks im Chromatogramm zu beobachten sind. Der von nicht mit Talinolol behandelten Ratten gesammelte Stuhl wurde identisch zu dem beschriebenen

Vorgehen für die Erstellung von Kalibrationsreihen im Konzentrationsbereich von 50 bis 3000 ng/ml und Qualitätskontrollproben mit 50, 250 und 1000 ng/ml aufgearbeitet.

4.4.4 Quantitative Bestimmung von Talinolol im Serum

Für die quantitative Bestimmung von Talinolol aus Rattenserum liegt eine validierte Methode mit dem Agilent 1100 Series HPLC System und dem API 4000 LC-MS/MS System im GLP Labor des Instituts für Pharmakologie vor. Hierbei werden nach dem Auftauen des Rattenserums 100 µl Serum in ein Schliffröhrchen pipettiert, 10 µl der Arbeitslösung 2 des Internen Standards (entspricht 0,1 ng/µl Propranolol), Talinolol für die Kalibrationsreihen, 50 µl gesättigte Na₂CO₃-Lösung sowie drei Milliliter Diethylether zur Extraktion hinzugefügt. Die aufgearbeiteten Proben wurden für 10 Minuten im Horizontalschüttler extrahiert und für zwei Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert, folgend die organische Phase abgehoben und in ein neues Schliffröhrchen überführt, in welchem es unter leichtem Luftstrom bei ca. 40 °C evaporisiert wurde. Die Rückstände wurden anschließend in 100 µl mobile Phase aufgenommen, wovon 10 µl in das chromatographische System injiziert wurden.

4.4.5 Überprüfung der zur Talinololanalytik verwendeten Methoden

4.4.5.1 Revalidierung der Talinololbestimmung in Organhomogenaten

Da für die Bestimmung von Talinolol aus Organhomogenaten bereits eine validierte Methode (SOP 04-2000) vorlag, war es lediglich notwendig, die Gültigkeit der Methode durch eine Revalidierung zu überprüfen. Dazu wurde ein Homogenat aus je einem Drittel Herz, Leber und Niere hergestellt und nach der vorhandenen Arbeitsanweisung aufgearbeitet. Die aus fünf unabhängig voneinander bearbeiteten und vermessenen Kalibrationsreihen sowie die aus den dazugehörigen Qualitätskontrollen ermittelten Werte für Präzision und Richtigkeit mussten innerhalb der Grenzen von ± 15% bzw. 85 bis 115%, für den niedrigsten Kalibrierwert ± 20% bzw. 80 bis 120%, liegen. Zum Leerhomogenat wurden folgende Konzentrationen an Talinolol zur Kalibrierung hinzugegeben: 3, 5, 10, 25, 50, 120, 250, 400, 700 und 1000 ng/ml. Bei den Qualitätskontrollen, welche separat zu den Kalibrierproben bearbeitet wurden, wurden 6, 100, 200, 500 und 900 ng/ml Talinolol zum

Leerhomogenat gegeben. Im Chromatogramm konnten die jeweiligen Peaks ohne Interferenzen dem internen Standard Propranolol und dem Analyten Talinolol zugeordnet werden. Zur zweifelsfreien Identifizierung wurden die Substanzen einzeln in der mobilen Phase und im Leerhomogenat vermessen und die Retentionszeiten verglichen. Die mathematische Auswertung für Präzision und Richtigkeit der Kalibrationsproben und Qualitätskontrollen sind nachfolgend aufgeführt und ergaben einen linearen Zusammenhang im Konzentrationsbereich zwischen 3 und 1000 ng Talinolol pro Milliliter. Der Korrelationsquotient der Kalibrationsgeraden war jeweils größer als $r = 0,99869$.

Tabelle 2: Angaben zu Präzision und Richtigkeit bei der Bestimmung von Talinolol in Organhomogenaten (n = 5).

Kalibrationsreihen (between-run)		Qualitätskontrollen (between-run)	
Präzision [%]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
1,6 bis 2	-5,7 bis 3,1	4,6 bis 7,8	2,1 bis 6,3

Im Vorfeld der Messungen der Kalibrationsreihen wurde auch versucht, eine Talinololkonzentration von 1 ng/ml wiederholbar präzise und richtig zu bestimmen. Dieser Bereich unterlag aber zu großen Abweichungen, so dass der Kalibrationswert von 3 ng/ml als niedrigster definiert wurde. Die Wiederfindung von Talinolol und Propranolol aus der Leermatrix im Vergleich zur Extraktion aus mobiler Phase wurde nicht ermittelt, da sie sich im Rahmen der initialen Methodenentwicklung als ausreichend hoch erwiesen hat (77% und 89%) und die Methode nicht abgewandelt wurde. Ebenso wurden keine Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt.

4.4.5.2 Revalidierung der Talinololbestimmung in Urin- und Stuhlproben

Zur Aufarbeitung und Revalidierung der quantitativen Talinololbestimmung in Urin und Stuhl durch bereits im Labor etablierte Methoden wurden fünf Kalibrationsreihen für Talinolol im Urin mit den Konzentrationen 5, 20, 50, 100, 250 und 1000 ng/ml sowie Qualitätskontrollen mit 10, 400 und 800 ng/ml und sechs Kalibrationsgeraden für die Detektion von Talinolol im Rattenstuhl mit Konzentrationen von 50, 100, 250, 500, 750, 1000 und 3000 ng/ml sowie Qualitätsproben von 50, 250 und 1000 ng/ml Talinolol vermessen. Sowohl der Peak des Analyten Talinolol als auch der des internen Standards Propranolol konnten im Chromatogramm des Leerurins und in mobiler Phase durch Basislinientrennung gut voneinander abgegrenzt werden. Die Kalibrationsgeraden sowie die dazugehörigen Qualitätskontrollen des Stuhls und Urins zeigen eine ausreichende Linearität im gesamten Kalibrationsbereich, wobei Richtigkeit und Präzision in einem Bereich von 85 bis 115%, beim kleinsten Kalibrationswert 80 bis 120% betragen sollten. Der Korrelationsquotient der Urin-Kalibrationsgeraden war stets größer als $r = 0,99951$, bei den Stuhl-Kalibrationsgeraden jeweils größer als $r = 0,99871$.

Tabelle 3: Angaben zu Präzision und Richtigkeit bei der Bestimmung von Talinolol in Urin (n = 5) und Fäzes (n = 6).

	Kalibrationsreihen (between-run)		Qualitätskontrollen (between-run)	
	Präzision [%]	Richtigkeit [%]	Präzision [%]	Richtigkeit [%]
Urin	1,4 bis 9,5	-5,2 bis 5,5	2,1 bis 7,3	0 bis 6,8
Stuhl	1,8 bis 12,3	-8,5 bis 7,6	10,1 bis 15,3	-0,2 bis 4,1

4.5 Messung der mRNA-Expression

4.5.1 Gewebezerkleinerung und Zellaufschluss

Von jeder der bei -80 °C gelagerten Organproben wurden 20 bis 30 mg abgetrennt und mit 250 μl RLT-Puffer (Bestandteil des RNeasy-Kits, welches in 4.5.2 zur mRNA-Isolation verwendet wurde) sowie frisch bereiteter Mercaptoethanol-Lösung versetzt (Verhältnis 100 : 1 (v/v)). Mercaptoethanol wird verwendet, um chemische Verbindungen wie Disulfidbrücken in Proteinen aufzubrechen. Der RLT-Puffer dient durch seinen Bestandteil Guanidin-Isothiocyanat der Inaktivierung von RNAsen. Organprobe und Puffer wurden zusammen im RNase-freiem Eppendorfgefäß unter Stickstoff aufbewahrt. Anschließend wurde das gefrorene Gemisch in eine gekühlte Kugelmühle überführt und für 45 Sekunden bei 2500 U/min im Mikro-Dismembrator zerkleinert. Das Homogenat wurde im Folgenden zurück ins Eppendorfgefäß überführt und wieder bei -80 °C eingefroren.

4.5.2 mRNA-Isolation

Die Isolation erfolgte mit dem RNeasy Kit (Quiagen) nach Vorschrift des Herstellers. Nachdem die Proben langsam auf Eis angetaut waren, wurden sie mit 350 μl RLT-Puffer zur Inaktivierung der RNAsen versetzt und vorsichtig homogenisiert. Die nun entstandene Lösung (250 μl aus 4.5.1 + 350 μl) wurde auf eine Shredder-Säule gegeben und für zwei Minuten bei 13000 U/min zur Zerstörung bzw. Abtrennung der noch vorhandenen Gewebetrümmer zentrifugiert. Zum Zentrifugat wurden 600 μl 70%iger Ethanol gegeben und 600 μl dieser Lösung auf eine RNA-Isolationssäule (*spin column*) pipettiert. Durch den Alkohol wird die RNA hoch-affin zur Silicon-Gel-Membran dieser Säule. Anschließend wurde für 30 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert, das Filtrat verworfen und dieselbe Säule mit den restlichen 600 μl Lösung beschickt und erneut zentrifugiert. Auch dieser Durchfluss wurde verworfen. Die auf der Säule haftende RNA wurde jetzt mit 700 μl RW-Puffer gewaschen und für 30 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, die Säule in ein neues, steriles RNase-freies Gefäß überführt, zweimal mit 500 μl RPE-Puffer versetzt und zentrifugiert. Im Gegensatz zur ersten Zentrifugation für 30 Sekunden bei 10000 U/min wurde die zweite Zentrifugation zur Trocknung der Säule und Lösung der letzten Alkoholreste für zwei Minuten bei 10000 U/min

durchgeführt. RW- und RPE-Waschpuffer haben die Aufgabe, Verunreinigungen von der Silikonmembran der Säule zu lösen. Die getrocknete Säule wurde folgend zur Elution der ersten RNA-Fraktion in ein neues, steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben, mit 30 µl RNase-freiem Wasser versetzt und anschließend für 30 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. Für die zweite RNA-Fraktion wurde dieser Schritt wiederholt. Je 5 µl der beiden gewonnenen Fraktionen wurden im Weiteren mit 45 µl RNase-freiem Wasser verdünnt, der Rest sofort bei -80 °C tiefgefroren. Die verdünnte RNA-Lösung wurde im BioPhotometer von Eppendorf UV-photometrisch vermessen. Dazu wurde der Extrakt nach Bestimmung des Blindwertes mit 50 µl Wasser in Küvetten pipettiert und von beiden Fraktionen die RNA-Konzentration mittels der Absorption bei 260 nm ermittelt. Grundlage für die Berechnung der Gesamt-RNA-Konzentration der eingefrorenen Proben bildete das **Lambert-Beer-Gesetz**.

$$C = A \times U \times V$$

C - Konzentration

A - Absorption bei 260 nm

U - Umrechnungsfaktor

V - Verdünnungsfaktor

Die Grundlage zur Quantifizierung der RNA mittels UV-Photometrie ergibt sich aus der Eigenschaft, dass Nukleinsäuren im UV-Bereich bei der Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen. Bei 280 nm befindet sich das Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan und Phenolen. Der Quotient der Absorption ($A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$), welcher idealerweise zwischen 1,7 und 2,0 liegen sollte, gibt die Reinheit der extrahierten RNA an. Werte unterhalb von 1,7 weisen auf eine hohe Konzentration von Proteinen hin, während Werte oberhalb von 2 ein Hinweis auf Verunreinigungen durch Nukleotidverbindungen infolge verstärkten enzymatischen Nukleinsäure-Abbaus sein können. Die ermittelte Konzentration ist ein wesentlicher Bestandteil für die sich anschließenden Schritte der Expressionsmessung.

4.5.3 Reverse Transkriptase (RT)-Reaktion

Die Expressionsmessung von Genen mittels der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*real time*-PCR) kann nur von DNA, nicht aber von der RNA direkt bestimmt werden. Aus diesem Grund muss zuvor aus der gewonnenen RNA komplementäre DNA

(cDNA) synthetisiert werden. Die Proben, welche bei der Isolation und Anreicherung der mRNA gewonnenen wurden, mussten in einem ersten Arbeitsschritt mit Aqua ad iniectabilia auf eine einheitliche Konzentration (in diesem Versuch 100 ng/μl) verdünnt werden, um die Proben nach der Genexpressionsmessung miteinander vergleichen zu können.

Die Reagenzien des TaqMan®RT-Kits wurden nach der im Folgenden beschriebenen Vorschrift vereinigt und mit 11,55 μl der im Vorfeld auf eine mRNA-Konzentration von 100 ng/μl eingestellten Probe durch vorsichtiges, mehrfaches Aufziehen mit der Pipette homogenisiert. Für die RT-Reaktion im Eppendorf-Cycler wurde folgendes Temperaturprofil angewandt: 10 Minuten Inkubation zur Anlagerung der Random Hexamere an die RNA bei 25 °C, anschließend 30 Minuten reverse Transkription bei 48 °C mit Synthese der komplementären DNA und fünf Minuten Transkriptase-Inaktivierung bei 95 °C. Schließlich wurden die Proben mit der cDNA bis zur Durchführung des nächsten Reaktionsschrittes bei –80 °C aufbewahrt.

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Substanzen des TaqMan®RT-Kits.

	verwendete Vorschrift Volumen in μl	Herstellervorschrift Volumen in μl
RNA-Konzentration	100 ng/μl	2-200 ng/μl
Endvolumen pro Probe	30	100
10X RT-Puffer	3,00	10
25 mM MgCl	6,60	22
dNTP-Mix	6,00	20
Random Hexamer	1,50	5
RNAse Inhibitor	0,60	2
Reverse Transkriptase	0,75	2,5
RT-Mix-Volumen/Probe	18,45	61,5
Probenvolumen	11,55	38,5

4.5.4 Quantitative Real-time Polymerase Kettenreaktion

4.5.4.1 Probenaufarbeitung

Die im vorhergehenden Schritt hergestellte cDNA enthält bei vollständig abgelaufener reverser Transkription eine cDNA-Konzentration von 100 ng/μl. Die von uns verwendeten Expressions-Assays der Firma Applied Biosystem arbeiten aber nur optimal bei einer Konzentration < 50 ng/μl, so dass die Proben im ersten Schritt mit Wasser zur Erfüllung dieser Anforderungen verdünnt wurden. Anschließend musste ein Curry Master Mix (CMM), der dem kommerziell erhältlichen Master Mix von Applied Biosystems nachempfunden ist, mit folgender Zusammensetzung hergestellt werden. Hierbei wurden die verwendeten Volumina für eine 96-Well-Platte mit einem 20%igen Überschuss zum Ausgleich von Pipettierverlusten berechnet. Der CMM wurde im Vorfeld der Untersuchungen für mehrere quantitative PCR-Läufe hergestellt bei -20 °C gelagert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Curry Master Mix.

Curry Master Mix	Volumina in μl
Wasser	595
1M Tris (pH 8.4)	50
2M KCl	60
25 mM MgCl	275
Glycerol	95
10 mM dNTP	50
ROX	25
Summe	1150

Anschließend wurden dem CMM Wasser, die genspezifischen Primer und Sonden (Gene-Assay Reagenz von Applied Biosystems) und schließlich die stets gut gekühlte Platinum[®] Taq-Polymerase entsprechend dem nachfolgenden Schema hinzugegeben.

Tabelle 6: Pipettierschema der *real-time* PCR.

	Volumen in μl
Ansatz pro Well:	20
CMM	10
Wasser	7,5
20X Gen-Assay	0,5
Taq-Polymerase	0,07
cDNA-Menge/Well	2

Aufgrund der doppelten Probenvermessung wird jede Probe für jedes Gen doppelt auf die 96-Well-Platte (MicroAMP, Applied Biosystems) aufgetragen und mit Optical Caps (Applied Biosystems) verschlossen. Daraufhin wurde die 96-Well-Platte bei 900 U/min für 30 Sekunden zentrifugiert und im ABI PRISM 7700 der *real-time* PCR unterzogen. Parallel zu jedem zu vermessenden Gen wurde das Referenzgen 18S rRNA nach demselben Schema aufgearbeitet und im gleichen Lauf vermessen. Des Weiteren wurden zur Prüfung auf Verunreinigungen zwei Leerkontrollen ohne Zusatz von cDNA (*no template control*) vermessen.

4.5.4.2 Methodische Grundlagen

Die PCR ist eine *in vitro* Methode, welche es labortechnisch ermöglicht, definierte Abschnitte der DNA zu vervielfachen. Der gewünschte Bereich der DNA wird durch die Zugabe von sequenzspezifischen Primern, Trinukleotiden und einer Polymerase zur genetischen Matrix sowie sich wiederholender Temperaturschemata exponentiell vervielfältigt.

Prinzipiell kann die Real-time PCR in 3 Schritte unterteilt werden.

a) Als erster Schritt findet die Denaturierung, d. h. die Spaltung jeglicher Verbindungen zwischen den cDNA Strängen, statt.

b) Folgend lagern sich die gen- und somit sequenzspezifischen Primer und die fluoreszenzmarkierte Sonde an die cDNA. Jede der Sonden besteht aus Oligonukleotiden, die an ihrem 5'-Ende einen als Reporter bezeichneten Fluoreszenzstoff wie zum Beispiel FAM (6-Carboxyfluorescein) und an ihrem 3'-Ende ein Quencher-Molekül wie TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) tragen. Weiterhin befindet sich am 3'-Ende ein Phosphatrest, der verhindern soll, dass die Oligonukleotide der Sonde als Primer erkannt werden. Licht mit der Wellenlänge von 488 nm kann den Reporter zur Fluoreszenz anregen. Dies passiert jedoch nicht, wenn die Sonde als Ganzes an die DNA gebunden hat. Der Quencher, der sich in der Nähe des Reporters befindet, verhindert die spezifische Fluoreszenz.

c) Die hitzestabile TaqPolymerase kann in der sich anschließenden Elongation ausgehend vom Primer Nucleotide gemäß der komplementären Basenpaarung an den cDNA Matrizenstrang binden. Stößt sie dabei auf die ebenfalls an die cDNA gebundene Sonde, kann die TaqPolymerase aufgrund ihrer 5',3'-Exonukleaseaktivität Nucleotide der Sonde abspalten. Die Spaltung der Sonde führt zu einer zunehmenden Entfernung zwischen Reporter und Quencher. Folglich beginnt der Reporter, angeregt durch Laserlicht mit der Wellenlänge von 488 nm, mit einer spezifischen Emissionswellenlänge zu fluoreszieren. Die Anzahl der pro Zyklus synthetisierten Kopien der im Sondenbereich liegenden DNA bestimmen die Fluoreszenzintensität. Durch die exponentiell steigende Menge an cDNA wächst auch die Fluoreszenz in gleichem Maße. In der Regel werden 40 bis 50 solcher Zyklen pro Probe durchgeführt [60].

Tabelle 7: Temperaturschema der real-time PCR.

Prozess	Temperatur (°C)	Zeit
initiale Denaturierung	50	2 min
Aktivierung der Polymerase	95	10 min
im nachfolgenden 40 Zyklen:		
• Denaturierung	95	15 s
• Anlagerung und Elongation	60	60 s

4.5.4.3 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte durch die ABI PRISM™ Sequence Detection Software (Vers. 1.6) anhand des Vervielfältigungsdiagramms (Amplification Plot). Diese Aufzeichnung beinhaltet die registrierten Fluoreszenzsignale bei jedem der 40 Vervielfältigungszyklen. Das Fluoreszenzsignal ist als ΔR_n (y-Achse) gegen die Zykluszahl der PCR (x-Achse) aufgetragen.

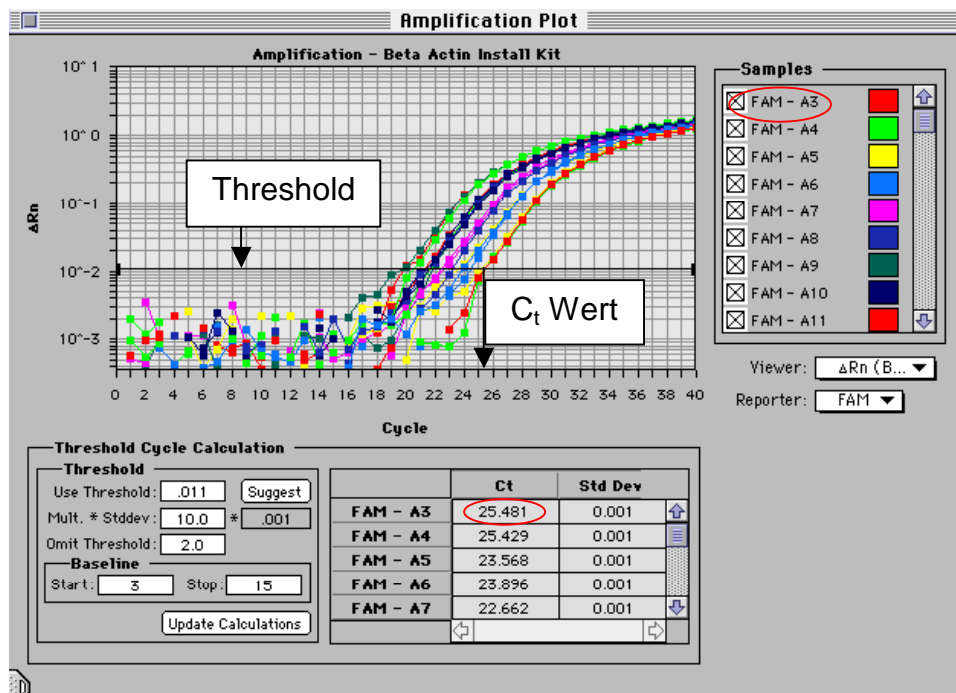


Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung eines Vervielfältigungsdiagramms (Amplification Plot), modifiziert nach [60].

R_n repräsentiert den Quotienten aus Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes und der Emissionsintensität eines jedem Reaktionsansatz zugefügten passiven Referenzfarbstoffes ROX. Indem von jedem R_n -Wert in jedem Zyklus die zugehörige Hintergrundaktivität subtrahiert wird, erhält man den ΔR_n -Wert. Die Auswertung eines solchen Amplifikation Plots erfolgt durch die Festlegung eines Schwellenwertes (*Threshold*), welcher idealerweise im linearen Bereich der Fluoreszenzkurve sowie ca. eine Zehnerpotenz oberhalb der Hintergrundaktivität liegen sollte. Aus dem

Schnittpunkt der Fluoreszenzkurve mit der Schwelle lassen sich bei senkrechter Projektion auf die x-Achse die zu diesem Zeitpunkt abgelaufenen PCR-Zyklen (Threshold Cycle (C_T)) ablesen. Innerhalb des linearen Bereiches kann eine Effizienz der PCR von 100% angenommen werden. Daher bedeutet eine Erhöhung des C_T -Wertes um eins eine Verdopplung der vorhandenen Kopienzahl der DNA [60]. Ausgehend von den für jede Probe ermittelten C_T -Werten der Zielgene sowie der dazugehörigen Referenzgene kann über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode ein relativer Vergleich der Kopienzahl zwischen mehreren Versuchsgruppen angestellt werden [61]. Die Kontrollgruppen werden dabei jeweils als Bezugsgruppen herangezogen. Als Referenzgene werden Gene genutzt, die idealerweise physiologisch in allen Zellen der untersuchten Gewebe der Tiere vorkommen und zugleich weder durch exogene oder endogene Einflüsse in ihrer Expression beeinflussbar sind. Sie werden auch als sogenannte *housekeeping* Gene bezeichnet. In dem vorliegenden Experiment wurde 18S rRNA benutzt.

Mathematische Herleitung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode: (modifiziert nach [60])

Übersteigt das Signal einer Probe den Schwellenwert (C_T), so geben die nachfolgenden Gleichungen (1) und (2) die Anzahl der bis zu diesem Zeitpunkt während der PCR vervielfältigten cDNA des Zielgens sowie des Referenzgens an.

(1) Grundgleichung für das Zielgen

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = \text{konst.}(K)$$

- X_T → Anzahl der amplifizierten Moleküle des Zielgens beim C_T -Wert
- X_0 → Startkopienzahl des Zielgens
- E_X → Effizienz der PCR des Zielgens
- $C_{T,X}$ → Thresholdwert des Zielgens

(2) Grundgleichung für das Referenzgen

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = \text{konst.}(K)$$

R_T → Anzahl der hergestellten Referenzmoleküle beim C_T -Wert

R_0 → Startkopienzahl Referenzmoleküle

E_R → Effizienz der Referenz-Amplifikation

$C_{T,X}$ → Thresholdwert für die Referenz

Dividiert man im Folgenden Gleichung (1) durch Gleichung (2), kann dieser Quotient als konstant betrachtet werden.

(3) Division X_T durch R_T

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \text{konst.}(K)$$

(4) Setzt man die Effizienzen beider Reaktionen als gleich voraus ($E = E_X = E_R$), dann gilt:

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = \text{konst.}(K)$$

$C_{T,X} - C_{T,R} = \Delta C_T$ (Differenz der C_T Werte von Zielgen und Referenzgen)

(5) Umstellen der Gleichung nach $X_N \equiv X_0/R_0$, da dieser Quotient das gesuchte Verhältnis des Zielgens zum Referenzgen wiedergibt

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

$X_N = X_0/R_0$ (auf Referenz normalisiertes Zielgen)

Im Folgenden muss die in Gleichung (5) relativ zum *housekeeping*-Gen ermittelte Expression des Zielgens ins Verhältnis zu einer Kontrolle, hier der relativen Genexpression in der Kontrollgruppe, gesetzt werden.

(6) Division eines jeden X_N -Wertes des durch den X_N -Wert eines Kalibrators

$$X_{N,X} / X_{N,kal} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,X} - \Delta C_{T,kal}$$

kal = Kalibrator

$X_{N,kal}$ ~ Referenzgen

Wird eine Effizienz der Methode von 100% angenommen, ergibt sich die endgültige Rechenvorschrift wie folgt:

$$X_{rel.} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$X_{rel.}$ = Konzentration des Zielgens in Bezug auf das Referenzgen in Relation zu einem Kalibrator (bzw. einer definierten Kontrollgruppe)

4.6 Berechnungen und Statistik

Die bei der TaqMan *real time*-PCR und der Chromatographie ermittelten Daten wurden unter Verwendung der Datenverarbeitungssoftware EXCEL 7.0 zusammengefasst und weiterführende Berechnungen durchgeführt. Das Softwarepaket SPSS 9.0 wurde zur statistischen Auswertung genutzt. Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung dar. Um signifikante Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen festzustellen, wurde der Mann-Whitney-U-Test unter Berücksichtigung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von fünf Prozent verwendet.

5 Ergebnisse

Die Anzahl der Tiere, deren Organe, Serum, Urin und Stuhl für die Auswertung zur Verfügung standen, weicht von den sechs Tieren ab, welche anfangs pro Gruppe in den Versuch einbezogen wurden. In der Kontrollgruppe der Wildtypiere beendeten nur fünf Ratten den Versuch. Grund hierfür war der Tod einer Ratte während der Operation, vermutlich zurückzuführen auf einen Narkosezwischenfall. In der Sepsisgruppe der Mrp2-defizienten Tieren überlebten nur vier Ratten die Sepsis. Sie starben 17 bzw. 20 Stunden nach der CASP-Operation (subletales Modell).

5.1 mRNA-Expressionen von *Mdr1b* und *Mrp2*

5.1.1 Expressionsmuster von *Mdr1b* und *Mrp2* in Rattenorganen

Das *Mdr1b*-Gen war im Organismus der Ratte unterschiedlich verteilt. In der Leber konnte die höchste Expression gemessen werden, folgend wurden bei der Auswertung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode die Expressionsdaten der anderen Organe ins Verhältnis zur Leber gesetzt. In den untersuchten Darmabschnitten war die *Mdr1b*-mRNA-Expression um 30% geringer ausgeprägt als in der Leber, wobei der Expressionsgrad in Ileum und Jejunum nahezu gleich war. In der Niere und im Gehirn konnten nur etwa 10% des *Mdr1b*-mRNA-Expressionslevels der Leber detektiert werden, im Hoden waren es sogar nur fünf Prozent.

Die *Mdr1b*-Verteilung in Mrp2-defizienten Ratten entsprach dem der Wildtyp-Tiere. Übereinstimmend mit der *Mdr1b*-mRNA-Expression konnten auch in Bezug auf die *Mrp2*-mRNA regionale Unterschiede mit dem höchsten Gehalt in der Leber festgestellt werden. In den Darmabschnitten zeigte sich im Jejunum eine ca. 12-fach höhere Expression als im Ileum. In Niere und Hoden war das *Mrp2*-mRNA-Level relativ zur Leber drastisch reduziert. Die *Mrp2*-mRNA-Expression im Gehirn war nur bei drei von sechs Tieren in kaum detektierbaren Mengen vorhanden.

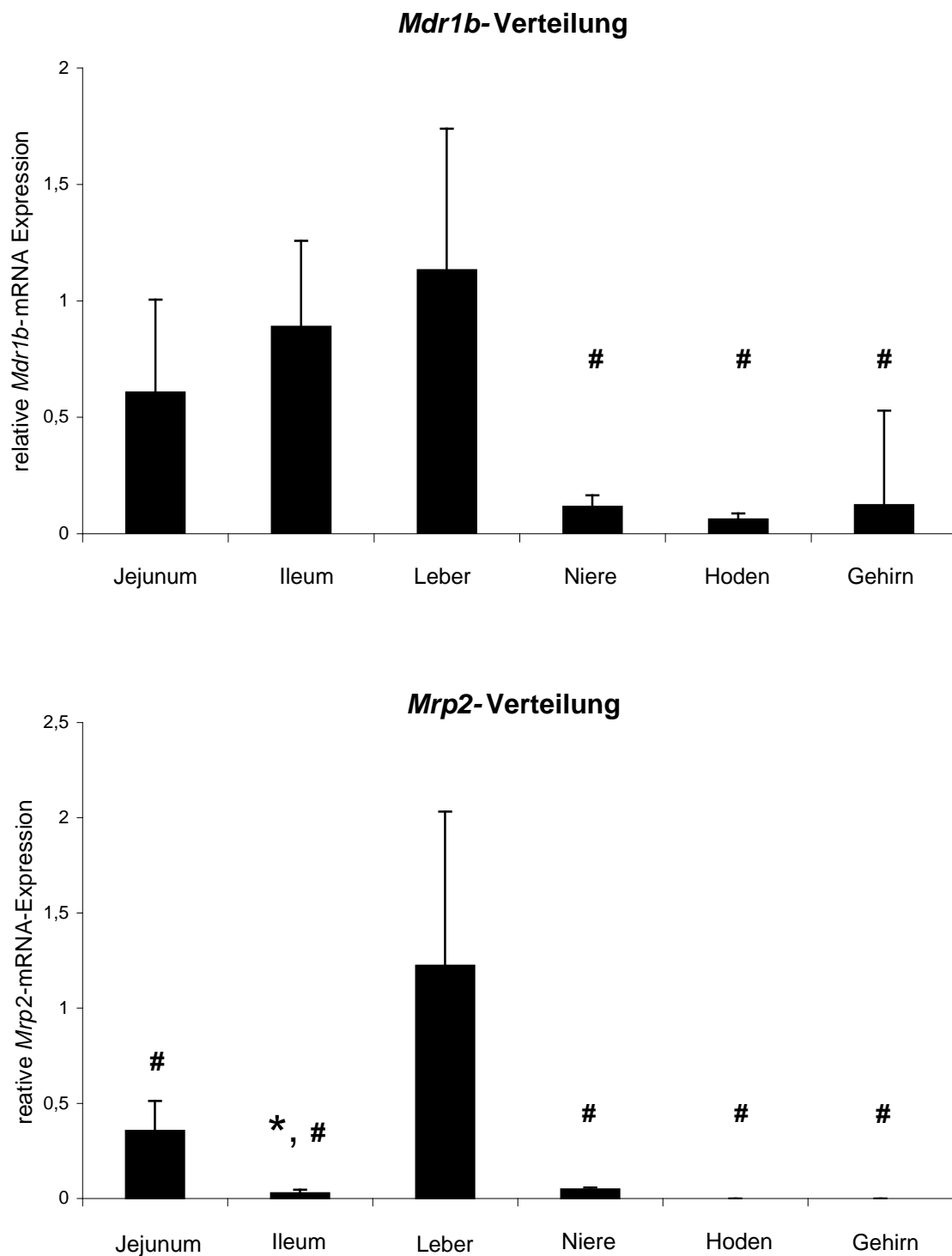


Abbildung 9: Vergleich der relativen *Mdr1b*- (obere Graphik) und *Mrp2*-mRNA-Expression (untere Graphik) in Bezug auf das Referenzgen 18S rRNA, jeweils relativiert auf die Leber, in Darm, Leber, Niere, Hoden und Gehirn von je 5 Lew.1W-Ratten ohne Sepsisinduktion (*# $p < 0,05$; * = Vergleich der Expression zum Jejunum, # = Vergleich der Expression zur Leber; Mann-Whitney-U-Test).

5.1.2 Vergleich der *Mdr1b*-Expression zwischen den Kontrollgruppen

Weiterhin ist es notwendig, vergleichend die Kontrollgruppe der Wildtyptiere und die der *Mrp2*-defizienten Tiere (TR-) zu betrachten. Eine kompensatorische Genregulation des *Mdr1b*-Gens bei *Mrp2*-Defizienz wäre für weitere Betrachtungen von entscheidender Bedeutung.

Hierbei war im Jejunum eine signifikante Senkung der *Mdr1b*-mRNA-Expression der Transporter-defizienten Tiere auf 44% zu sehen, in der Niere auf 52%. In den anderen Organen war kein Unterschied in der Expression von *Mdr1b* festzustellen.

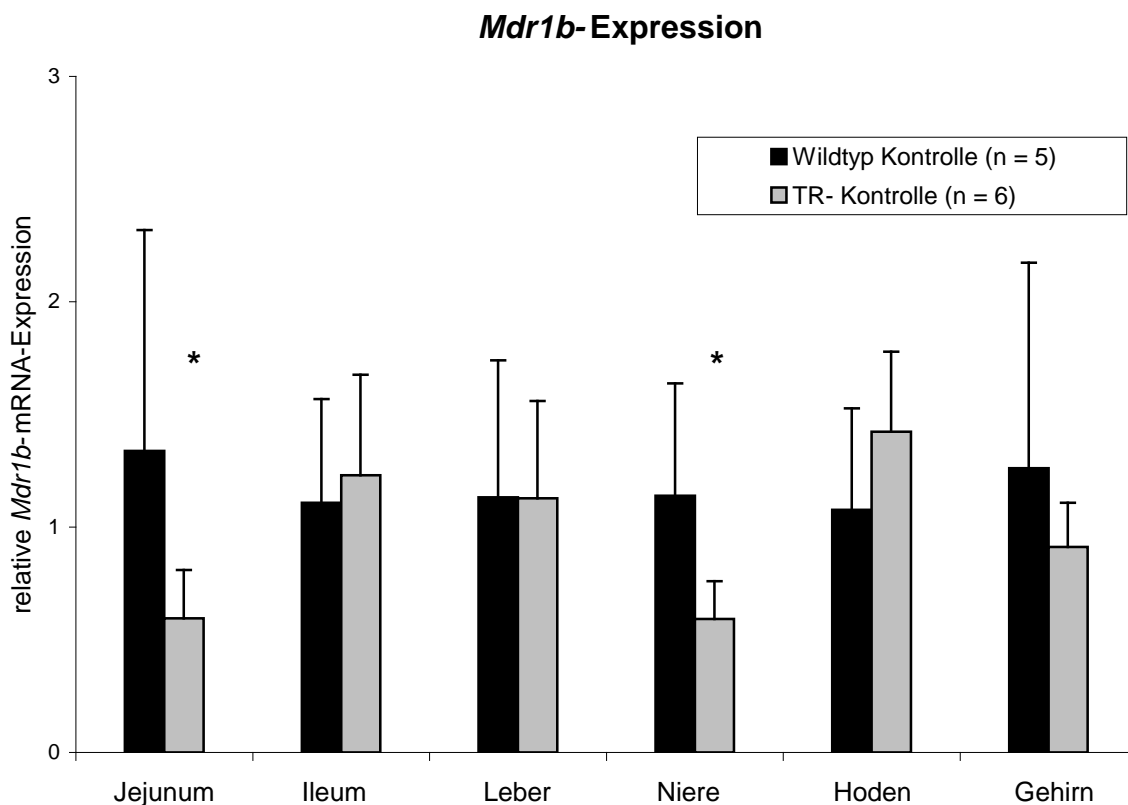


Abbildung 10: Vergleich der relativen *Mdr1b*-mRNA-Expression von Wildtyp-Tieren mit *Mrp2*-defizienten Tieren (TR-) in Bezug auf das Referenzgen 18S rRNA in den untersuchten Organen bei *Leu.1W*-Ratten (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

5.1.3 *Mdr1b*-Expression bei induzierter Sepsis

Sowohl beim Wildtyp als auch bei den *Mrp2*-defizienten Tieren ließen sich bei der CASP-induzierten Sepsis Veränderungen in der *Mdr1b*-Expressionsrate feststellen.

Bei Wildtypmatten zeigte sich in der Leber ein signifikanter Anstieg der *Mdr1b*-Expression auf über das 2,5-fache gegenüber der Kontrollgruppe. Die anderen untersuchten Organe, dargestellt in Abbildung 11, wiesen keine signifikanten Veränderungen auf.

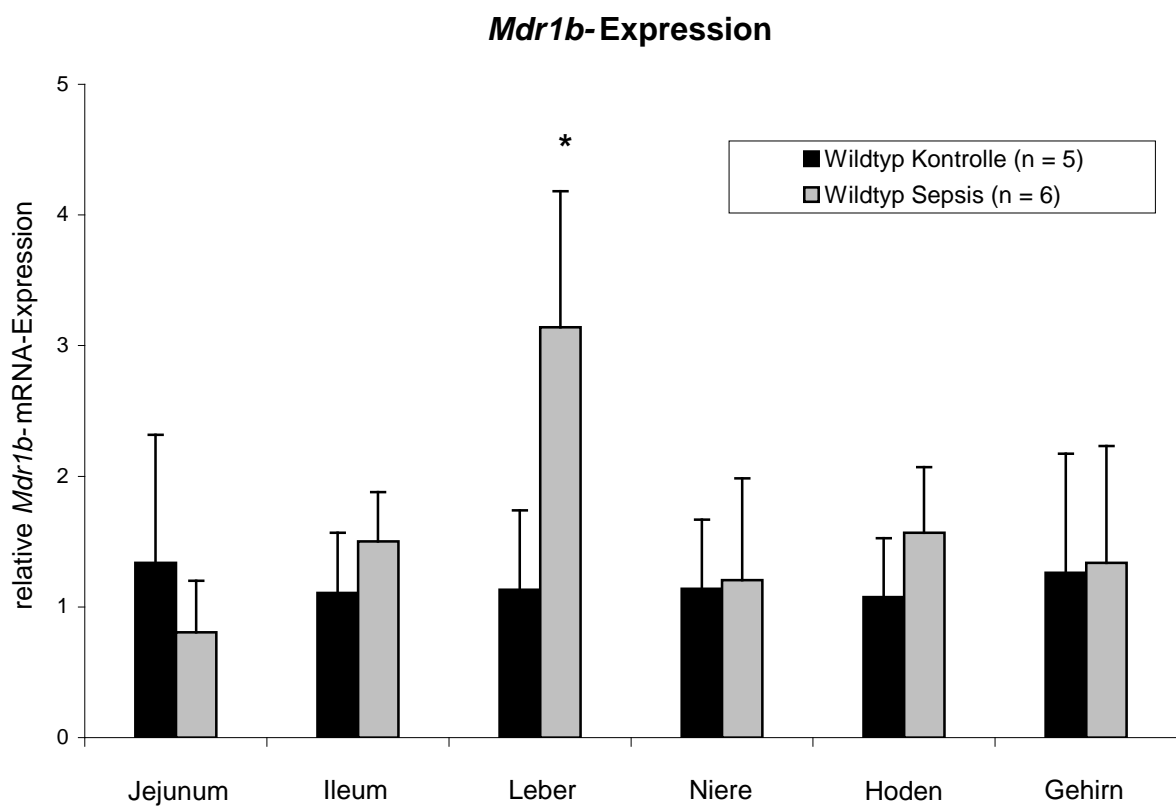


Abbildung 11: Vergleich der relativen *Mdr1b*-mRNA-Expression von Wildtyp-Tieren in Bezug auf das Referenzgen 18S rRNA ohne (schwarze Säulen) und mit (graue Säulen) experimentell-induzierter Sepsis in den untersuchten Organen bei Lew.1W-Ratten (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

In der Sepsisgruppe der Mrp2-defizienten Ratten konnte hinsichtlich der *Mdr1b*-mRNA-Expression im Jejunum eine signifikante Verminderung um ca. 40% im Vergleich zur nicht septischen Gruppe nachgewiesen werden. In allen anderen Organen änderte sich die Expressionsrate nicht signifikant.

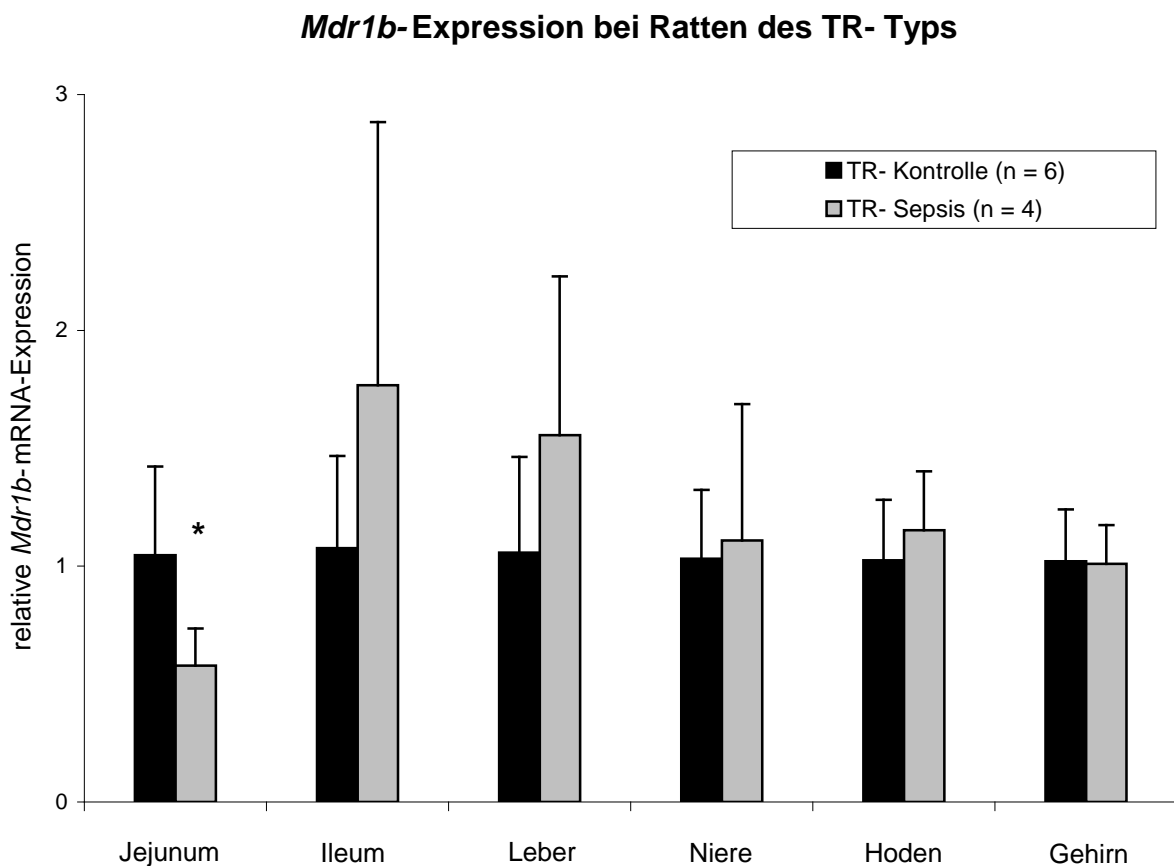


Abbildung 12: Vergleich der relativen *Mdr1b*-mRNA-Expression von Mrp2-defizienten Ratten in Bezug auf das Referenzgen 18S rRNA ohne (schwarze Säulen) und mit (graue Säulen) experimentell-induzierter Sepsis in den untersuchten Organen bei Lew.1W-Ratten (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

5.1.4 *Mrp2*-Expression bei induzierter Sepsis

Unter den Bedingungen der Sepsis war in der Versuchsgruppe der Wildtypiere im Ileum eine statistisch signifikante Expressionserhöhung der *Mrp2*-mRNA auf fast das dreifache der Expression der Kontrollgruppe zu finden. In den anderen Organen ließ sich in Bezug auf das Expressionsniveau von *Mrp2* kein Unterschied feststellen. Im Gehirn lag die *Mrp2*-Expressionen unter der Bestimmungsgrenze.

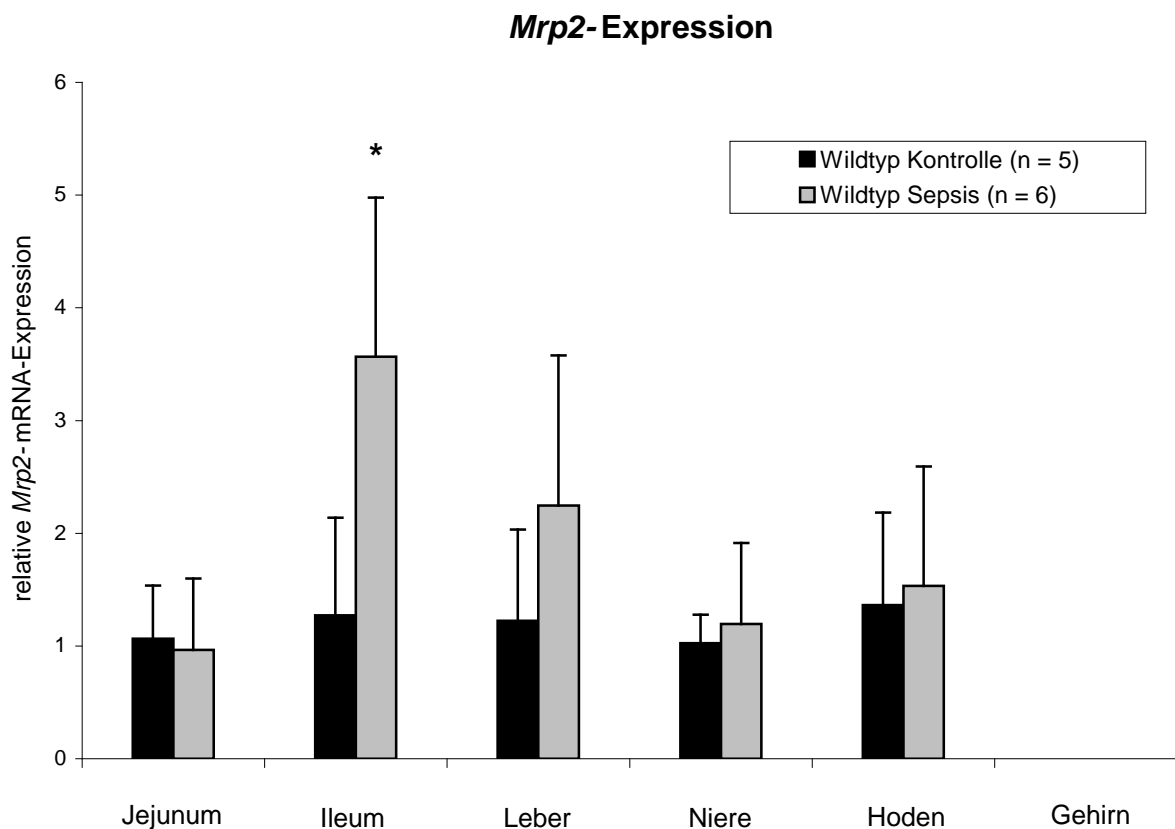


Abbildung 13: Vergleich der relativen *Mrp2*-mRNA-Expression von Wildtypieren in Bezug auf das Referenzgen 18S rRNA ohne (schwarze Säulen) und mit (graue Säulen) experimentell-induzierter Sepsis in den untersuchten Organen bei Lew.1W-Ratten (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

Zur Überprüfung der Gültigkeit der Transporterdefizienz wurde in der Leber von *Mrp2*-defizienten Ratten die *Mrp2*-mRNA-Expression gemessen. Bei der durchgeführten PCR konnten wir bei den *Mrp2*-defizienten Tieren zirka acht Prozent der *Mrp2*-mRNA-Menge des Wildtyps nachweisen. Auf eine Bestimmung der *Mrp2*-Expression in den anderen Organen der transporterdefizienten Tiere verzichteten wir.

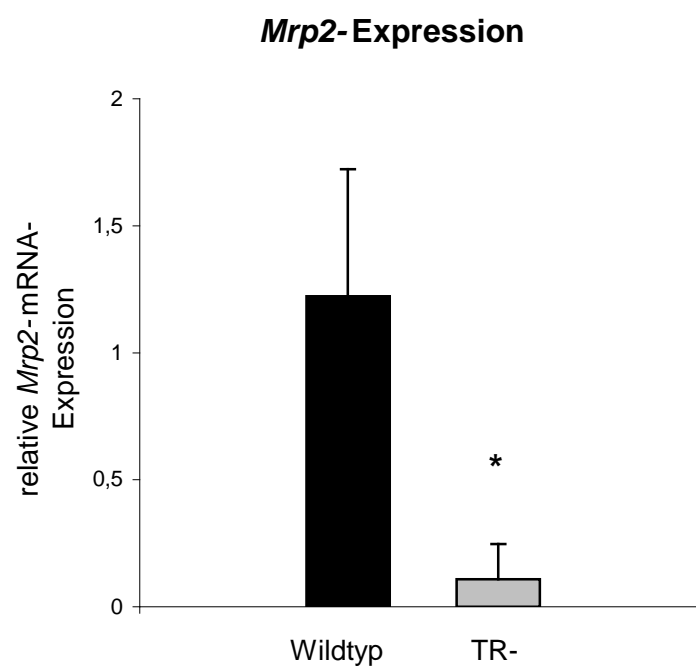


Abbildung 14: Vergleich der relativen *Mrp2*-mRNA-Expression in Bezug auf das Referenzgen 18S rRNA in der Leber von 5 Tieren des Wildtyps (schwarze Säulen) und 6 TR- (graue Säulen) Lew.1W-Ratten ohne Sepsis (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

5.2 Pharmakokinetik von Talinolol

5.2.1 Serumkonzentrationen von Talinolol

Aus früheren Untersuchungen der Pharmakokinetik von Talinolol in Ratten war bekannt, dass sich die zu erwartenden Serumkonzentrationen in einem Bereich bewegen werden, welche nicht sicher und valide mit der *high pressure liquid chromatography* (HPLC) und nachgeschalteter Fluoreszenzdetektion bestimmt werden können. Deshalb wurde im Unterschied zu der Bestimmung von Talinolol aus den Organen, Urin und Stuhl eine bereits etablierte und validierte LC-MS/MS- (*Liquid chromatography with Tandem Mass Spectrometry*) Methode zur quantitativen Analytik angewandt.

Die Serumkonzentrationen von Talinolol in Wildtyp-Tieren waren in der Kontrollgruppe signifikant um das 20-fache gegenüber der septischen Gruppe erhöht. Innerhalb der Mrp2-defizienten Tiere war kein Unterschied zwischen Kontroll- und Sepsisgruppe vorhanden.

5.2.2 Talinolol-Ausscheidung über den Urin

Die CASP-induzierte Sepsis führte weder bei den Wildtyp-Tieren ($p = 0,086$) noch bei den Mrp2-defizienten Tieren ($p = 0,201$) zu signifikanten Veränderungen in der Talinolol-Ausscheidung über den Urin. Jedoch zeichnet sich in den beiden septischen Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ein Trend im Sinne einer absoluten Ausscheidungszunahme von Talinolol (+ 7% bei Wildtyp- bzw. + 5% bei Mrp2-defizienten Tieren) während der Sepsis ab.

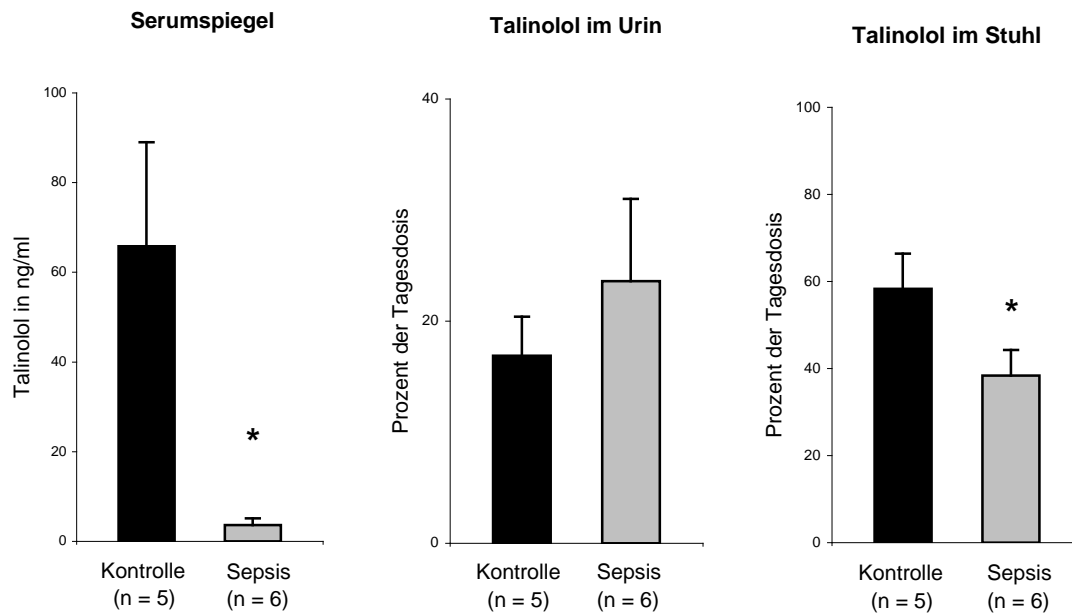
5.2.3 Talinolol-Ausscheidung über den Stuhl

Ab der 12. Stunde nach Stentimplantation wurde der Stuhl täglich im 24-stündigen Abstand asserviert. Dieser wurde für jeden Tag separat analysiert sowie die kumulative Ausscheidung bestimmt. Bei den Wildtyp-Tieren war während der Sepsis die Talinolol-Ausscheidung mit dem Stuhl signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe um 20 bis 30% reduziert. Bei den Mrp2-defizienten Ratten schied die Kontrollgruppe ein Drittel weniger Talinolol als die Kontrollgruppe der Wildtypratten aus.

Tabelle 8: Pharmakokinetische Parameter von Talinolol bei Wildtyp-Tieren und Mrp2-defizienten Lew.1W-Ratten ohne und mit CASP induzierter Sepsis nach wiederholter oraler Gabe von 50 mg/kg Talinolol (*,† p < 0,05, relativ zu Wildtyp Kontrolle; Mann-Whitney-U-Test).

	Wildtyp		Mrp2 defizient	
	Kontrolle (n = 5)	Sepsis (n = 6)	Kontrolle (n = 6)	Sepsis (n = 4)
Talinolol im Serum (ng/ml)	65,8 (±23,19)	3,6* (±1,51)	6,9 (±3,31)	6,9 (±4,38)
Talinolol im Urin (mg/d)	2,7 (±1,13)	3,2 (±1,04)	2,6 (±0,9)	3,2 (±0,64)
Talinolol im Stuhl (% der Dosis)	58,3 (±24,34)	38,3* (±17,71)	42,4[†] (±14,60)	38,6 (±41,16)

Pharmakokinetische Parameter des Wildtyps



Pharmakokinetische Parameter der Mrp2-defizienten Tiere

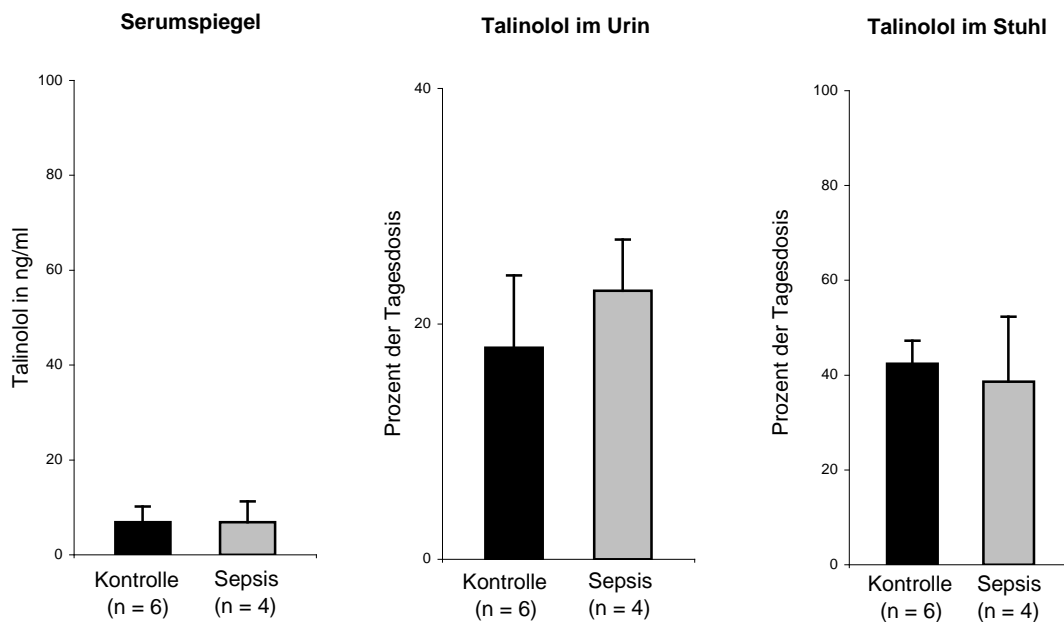


Abbildung 15: Vergleich der Talinolol-Serumkonzentrationen sowie der Talinololausscheidung über Urin und Stuhl von Kontrolltieren (schwarze Säulen) und septischen Ratten (graue Säulen) des Lew.1W-Stamms beim Wildtyp (oben) und bei Mrp2-defizienten Tieren (unten) nach wiederholter oraler Gabe von 50 mg/kg Talinolol (* $p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test).

5.2.4 Talinololverteilung in den Organen

Ohne Sepsisinduktion:

Das Fehlen des Mrp2-Transporters führte bei den defizienten Tieren im Bezug auf die Talinololkonzentrationen in der Leber zu einer nominalen Steigerung auf über das Doppelte ($p = 0,055$) im Vergleich zum Wildtyp. Im Hoden hingegen sank die Konzentration von Talinolol bei Abwesenheit des Mrp2-Transporters nominal. Die Konzentrationen im Gehirn und in der Niere zeigten keine Unterschiede.

Mit Sepsisinduktion:

Beim Vergleich von Kontroll- und Sepsis-Gruppe hinsichtlich der Talinolol-Gewebekonzentrationen in der Leber konnten weder bei Wildtyp- noch bei *Mrp2*-defizienten Ratten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Bei Letzterem bewirkte die Sepsis einen deutlichen Anstieg der Talinolol-Konzentration auf das Doppelte, verfehlte aber knapp die statistische Signifikanz ($p = 0,055$).

Im Gehirn hingegen verminderte sich die Konzentration des Modell-Arzneistoffs Talinolol in beiden septischen Gruppen signifikant auf jeweils etwa ein Drittel des Gehalts der Kontrollgruppen.

In Niere und Hoden konnte beim Wildtyp und bei *Mrp2*-defizienten Ratten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und Sepsis-Gruppen nachgewiesen werden.

Die Gewebekonzentrationen von Talinolol in den verschiedenen Organen sind in der folgenden Tabelle sowie den sich anschließenden Grafiken aufgeführt. Auch die Konzentrationen im Jejunum und Ileum wurden analytisch vermessen, jedoch aufgrund der fehlenden Aussagekräftigkeit nicht mit ausgewertet. So konnte nicht eindeutig differenziert werden, welcher Anteil des gemessenen Talinolols Darminhalt (Lumen) bzw. Gehalt im Darmgewebe darstellt.

Tabelle 9: Gewebekonzentrationen von Talinolol bei Wildtyp- und Mrp2-defizienten Lew.1W-Ratten ohne und mit CASP-induzierter Sepsis nach wiederholter oraler Gabe von 50 mg/kg Talinolol (* $p < 0,05$, relativ zur Kontrolle des Wildtyps; Mann-Whitney-U-Test).

	Wildtyp		Mrp2-defizient	
	Kontrolle (n = 5)	Sepsis (n = 6)	Kontrolle (n = 6)	Sepsis (n = 4)
Leber (ng/g)	69,5 35,95	51,5 17,91	159,5 69,98	308,2 150,53
Gehirn (ng/g)	81,7 48,86	26,6* 18,71	62,4 21,83	20,9* 8,29
Niere (ng/g)	126,6 94,26	92 29,88	144,6 62,66	125,5 32,74
Hoden (ng/g)	9609,6 1254,56	9920,1 1222,1	7678,5[†] 769,79	9436,8 1632,71

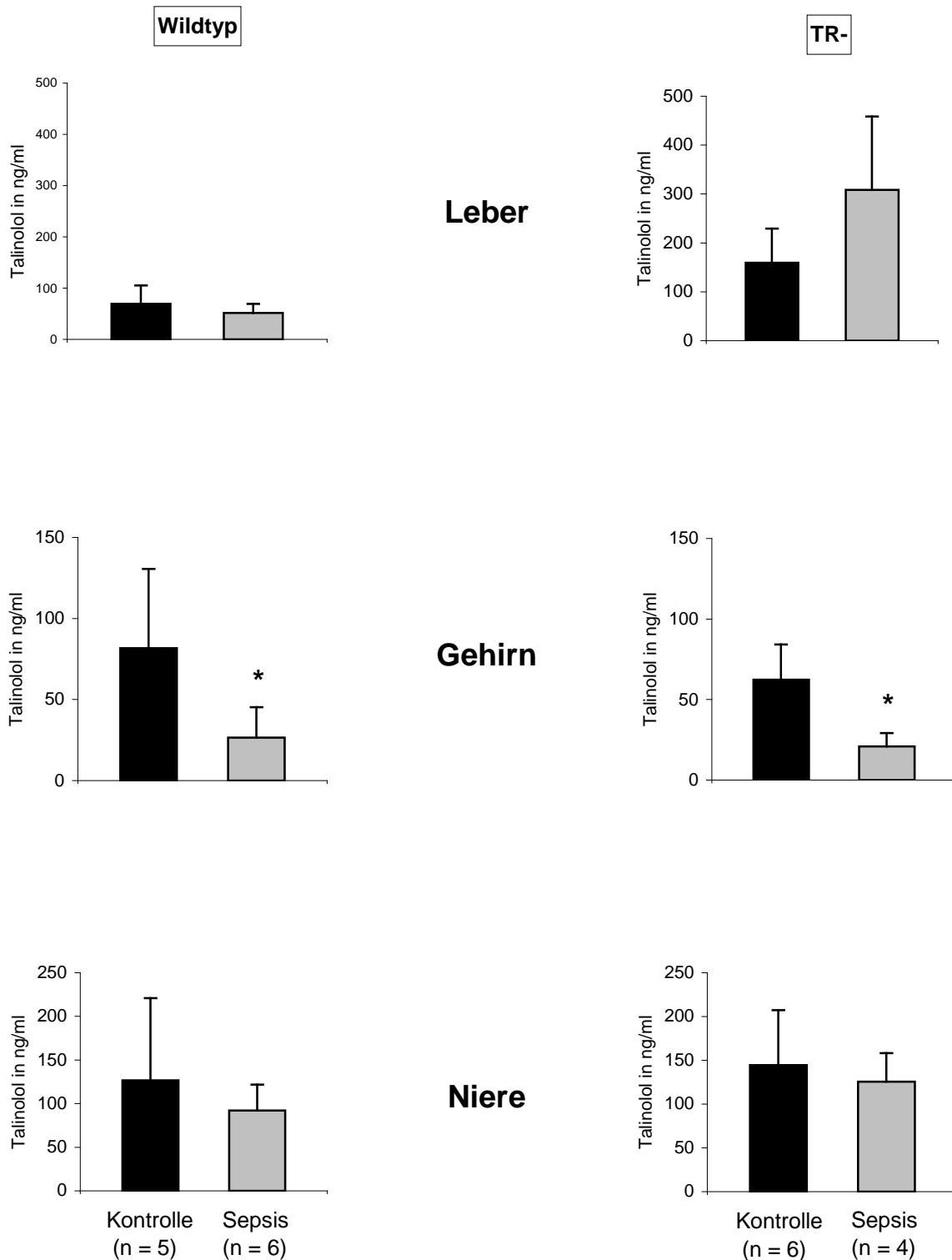


Abbildung 16: Talinolol-Konzentrationen in Leber, Gehirn und Niere beim Wildtyp (links) und bei Mrp2-defizienten (rechts) Lew.1W-Ratten ohne (schwarz) und mit (grau) CASP-induzierter Sepsis nach wiederholter oraler Gabe von 50 mg/kg Talinolol (* $p < 0,05$, relativ zur Kontrolle; Mann-Whitney-U-Test).

6 Diskussion

Methodendiskussion

Die Erforschung der pathophysiologischen Zusammenhänge der Sepsis erfordert ein standardisiertes, experimentelles Vorgehen, welches möglichst nah am realen klinischen Krankheitsbild orientiert sein sollte. Dabei ist zu beachten, dass jedes Tiermodell einen Kompromiss zwischen Standardisierung und klinischer Relevanz darstellt [62]. Prinzipiell gibt es mehrere Möglichkeiten, eine generalisierte Entzündung in einem Organismus zu erzeugen. Beispielsweise durch eine Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) und Terpentin oder durch operative Modelle mit kontinuierlicher Freisetzung von Bakterien. Zu Letzterer zählen die zökale Ligatur mit Punction (CLP – coecal ligation and puncture) und die *colon ascendens stent peritonitis* (CASP) [63].

Die intravenöse oder intraperitoneale Injektion von LPS ist ein gut etabliertes und reproduzierbares Sepsismodell. Hieraus entstammen viele Erkenntnisse zur Pathophysiologie, jedoch ist die klinische Anwendbarkeit oft begrenzt. Den Mediatoren TNF- α , IL-1 β und IL-6 konnte im Tierversuch eine entscheidende Rolle für die Sepsisentstehung zugeschrieben werden [64]. Ergebnisse von LPS-Tierexperimenten, in denen die Behandlung mit TNF- α -Antikörpern zur Senkung der Letalität führte [65], konnten weder in Tierexperimenten mit lebenden Pathogenen [66] noch in klinischen Studien bestätigt werden. Die Behandlung mit löslichen TNF- α -Rezeptoren zeigte sogar eine dosisabhängige Steigerung der Mortalität bei septischen Patienten [67] und Ratten mit CLP [68]. Dies macht deutlich, dass die LPS-Injektion nicht die gleiche Reaktion des Organismus auslöst wie bei Sepsismodellen mit lebenden Organismen oder der humanen Sepsis. Des Weiteren haben die Zytokin-Level von TNF- α und IL-6 bei septischen Patienten ein späteres und niedrigeres Maximum im Verhältnis zum LPS-Modell [65]. Das heißt, Vergleiche zwischen LPS und klinisch-orientierten Modellen sind nur limitiert möglich, da die Änderungen der Zytokinkonzentrationen in unterschiedlichem Ausmaß und Abstand zur Sepsisinduktion eintreten. Ein zusätzlicher Nachteil des LPS-Modells stellt die nicht vom Pathogen an sich, sondern vom gereinigten Endotoxin ausgelöste septische Reaktion dar. Es wird somit nur die Auswirkung einer

Bakterienkomponente beschrieben, nicht die des gesamten Keims. Die limitierte Aussagekräftigkeit und klinische Übertragbarkeit des LPS-Modells wird durch die einmalige oder serielle LPS-Applikation untermauert, die nicht der physiologischen Sepsistentstehung mit kontinuierlicher Pathogen- und Toxinfreisetzung entspricht.

Beim Vergleich von CLP und CASP, welche beide modellhaft die abdominelle Sepsis infolge einer bakteriellen Streuung in die freie Bauchhöhle nachahmen, konnten große Unterschiede festgestellt werden. Insgesamt waren bei der CLP nur geringe Zytokin-Mengen im Blut nachweisbar. Maier et al. vermuteten, dass Mäuse mit CLP aufgrund einer massiven Bakterienfreisetzung nach Ischämie und Nekrose des legierten Zökums starben und nicht vom abgekapselten Abszess mit niedriger Zytokinfreisetzung [62]. Im Gegensatz hierzu steht die starke, stetig steigende inflammatorische Antwort der CASP [62], die zum klinischen Sepsisbild einer progredienten, systemischen Reaktion passt. Daher eignet sich die CLP als Modell für einen intraabdominellen Abszess. Die CASP hingegen stellt ein Modell einer diffusen Peritonitis mit nachfolgender Sepsis dar [62]. Ein Vorteil des CASP-Modells ist die gute Reproduzierbarkeit, wobei die Schwere der Reaktion sowie das Überleben vom gewählten Durchmesser des Stents abhängen [62]. So kann je nach Fragestellung ein subletales oder letales Modell generiert werden.

Zusammenfassend kann aus Experimenten mit Mäusen [58] und Ratten [59] deutlich ableitet werden, dass das CASP Modell geeignet ist, die Situation der Sepsis, v. a. bei Anastomoseninsuffizienz nach abdominal-chirurgischen Eingriffen mit sich anschließender Peritonitis, im Tierexperiment nachzuvollziehen.

Die Bakteriämie, hervorgerufen durch Enterokokken, *Bacillus* spp, *E.coli*, *Proteus* und *Enterobacter* spp, führt nach Rekrutierung von Entzündungszellen zum *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) [58]. Hierbei ist schon ersichtlich, dass eine polymikrobielle Sepsis einen anderen inflammatorischen Reiz darstellt als nur das LPS gramnegativer Bakterien. Jedoch simuliert die CASP nur einen Teil der sepsisauslösenden Foci, die Aussagen können also nur auf die abdominelle Sepsis angewendet werden. Dies ist eine der entscheidenden Limitationen des CASP-Modells.

mRNA-Expressionsmuster von *Mdr1* und *Mrp2* ohne Sepsisinduktion

Aus der Quantifizierung der gewebespezifischen Expression von Transporterproteinen wie *Mdr1* und *Mrp2* können Rückschlüsse auf deren Bedeutung und Beteiligung an Transportprozessen in den untersuchten Organen gezogen werden. Unsere Ergebnisse konnten eine steigende Expression der *Mdr1b*-mRNA vom Jejunum zum Ileum sowie ein sehr niedriges Level im Gehirn und Hoden nachweisen und stimmen mit bereits veröffentlichten Daten überein [69-71]. Abweichend von vorherigen Arbeiten konnten wir eine sehr hohe, die anderen Organe übersteigende Expression in der Leber messen. Zwar beschrieben auch Dietrich et al. [69] eine hohe MDR1-Expression in der humanen Leber, andere Publikationen hingegen zeigten nur sehr geringe Mengen an *Mdr1b*-mRNA [71]. Wodurch diese Unterschiede zustande kommen, ist fraglich. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung verschiedener Rattenstämme (z. B. Wistar, Lew.1W, Sprague-Dawley), jedoch kamen auch Oswald et al. bei Versuchen am gleichen Rattenstamm (Lew.1W) zu gegensätzlichen Ergebnissen. Allerdings sei angemerkt, dass der Vergleich mit unseren Ergebnissen aufgrund einer speziellen Lipiddiät sowie der Vorbehandlung der Tiere mit Ezetimib nur eingeschränkt möglich ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es in Folge dessen zu Veränderungen der Genexpression von Transporterproteinen kommt. Zusätzlich waren die Tiere der Kontrollgruppe in unserem Versuch scheinoperiert. Auch dies könnte einen möglichen Stimulus für eine veränderte *Mdr1b*-mRNA-Regulation darstellen, obwohl in anderen Publikationen gezeigt wurde, dass hierdurch keine Bakterien in die freie Bauchhöhle gelangen. Der in der Folge ausbleibende Anstieg der Zytokinproduktion dürfte zu keiner Modifikation in der Transporter-Expression führen [58, 59].

Hinsichtlich der *Mrp2*-mRNA-Expression spiegeln unsere Resultate die Ergebnisse zahlreicher publizierter Arbeiten wider [69, 70, 72]. *Mrp2* war in der Leber am höchsten exprimiert und nahm im Dünndarm von proximal nach distal zu. Niere, Hoden und Gehirn zeigten nur geringe Expressionslevel.

Grundsätzlich muss also festgehalten werden, dass *Mrp2* und *Mdr1* in der Leber am höchsten exprimiert sind. Hieraus schlussfolgern wir, dass die Transporter im hepatischen Gewebe einen besonders hohen Stellenwert haben und somit Expressionsänderungen von großer funktioneller Relevanz im Bezug auf Arzneistoffkinetik und Toxinkumulation sind.

Expression und Funktion von Transporterproteinen in der Sepsis

Der Darm hat entscheidenden Einfluss auf die Absorption und folglich die Bioverfügbarkeit oral aufgenommener Medikamente und anderer Xenobiotika [13]. Eine entscheidende Rolle hierbei spielen die apikal in der Darmmukosa lokalisierten Effluxtransporter Mdr1 und Mrp2, die resorbierte Fremdstoffe aktiv ins Darmlumen sezernieren und somit aus dem Organismus eliminieren können [73]. Infektionen und Entzündungen können pharmakokinetische Parameter oral aufgenommener Substanzen durch eine Veränderung des Expressionsgrades von Auswärtstransportern beeinflussen [74]. Die Veränderungen der Expressionslevel im Magen-Darm-Trakt werden wie in der Leber durch eine Dysbalance der verschiedenen Entzündungsmediatoren ausgelöst. TNF- α führt sowohl zu einer verminderten Expression von MDR1-mRNA als auch zum reduzierten Effluxtransport des Mdr1-Substrates Rhodamin 123 in Caco-2 Zellen. Interessanterweise führt das Zytokin IFN- γ zur Induktion von *MDR1*-mRNA und Mdr1-Protein-Expression [75]. Unsere Ergebnisse zeigten im Jejunum eine nominal verminderte *Mdr1b*-Expression sowie unveränderte *Mrp2*-Level. Parallel hierzu stellt sich bei den Wildtyp-Tieren eine um ca. 20% reduzierte fäkale Ausscheidung der täglich oral applizierten Talinololmenge dar, welches durch eine erhöhte Resorption in Folge einer verminderten Expression von Efflux-Transportern oder verstärkter Expression von Influx-Transportern erklärt werden kann. Letzteres wurde jedoch im Rahmen dieser Studie nicht untersucht. Kalitsky-Szirtes et al. stellten ebenfalls eine verminderte Sekretion des Mdr1-Substrates Digoxin sowie des Mrp2-Substrates 5-CFDA/5-carboxyfluorescein (5-CF) heraus. Auch dies war Ausdruck der gesteigerten Absorption bei LPS-induzierter Verminderung der *Mdr1a*-, *Mdr1b*- und *Mrp2*-mRNA-Expression im Jejunum [74]. Im Ileum hingegen zeigte sich in unserem Versuch eine unveränderte *Mdr1b*- und eine stark induzierte *Mrp2*-mRNA-Expression in der Sepsis, welches von den Ergebnissen von Kalitsky-Szirtes et al. abweicht [74]. Als Ursache für diese Diskrepanz kommen einerseits die hohe Variabilität zwischen den Tierspezies Ratte und Maus, andererseits das zur Auslösung der Sepsis gewählte Modell in Frage. Letztendlich bleibt aber offen, warum in der Sepsis die untersuchten Effluxtransporter im Jejunum und Ileum gegensätzlich reguliert sind. Derartige Ergebnisse wurden bisher in keiner Veröffentlichung beschrieben und benötigen zur Klärung weitere Untersuchungen.

Für den Modellarzneistoff Talinolol wurde als Hauptresorptionsort das Jejunum identifiziert, so dass die Ergebnisse dieses Dünndarmbereichs und nicht die des Ileums von entscheidender Bedeutung sind [76]. Das ist durch die unterschiedliche intestinale Verteilung von Mdr1 und die größere Resorptionsoberfläche des Jejunums im Vergleich zum Ileum begründet. Die zunehmende Expression von proximal nach distal im Darm ergibt im Jejunum ein Absorptionssfenster, da dort weniger Mdr1 die Resorption limitiert. Von Stephens et al. wurde beschrieben, dass nicht das durch *Mdr1b*-kodierte, sondern nur das durch *Mdr1a*-kodierte Mdr1 am intestinalen Efflux von Mdr1-Substraten beteiligt ist [77]. Dies würde bedeuten, dass unsere Ergebnisse hinsichtlich der *Mdr1b*-mRNA-Expression keine funktionelle Relevanz hätten. Als Limitation dieser Untersuchung sei jedoch angemerkt, dass zum einen Mäuse verwendet wurden und zum anderen nur die mRNA-Expression im Ileum gemessen wurde. Dort konnte die *Mdr1b*-mRNA lediglich in geringem Maße nachgewiesen werden, welches als logische Folge nur einen sehr begrenzten Einfluss auf die Verteilung von Mdr1-Substraten haben kann. Die Aussage des fehlenden Einflusses von Mdr1b ist somit nur bedingt auf unseren Versuch übertragbar, da wir bei Lew.1W-Ratten sehr hohe mRNA-Expressionen nachweisen konnten.

An der umfangreichen biliären Exkretion von Talinolol, die bei oraler Applikation ein Vielfaches der Ausscheidung über den Urin beträgt [78], ist maßgeblich der Transporter Mdr1, eventuell auch Mrp2 beteiligt. Bei Wildtyp-Ratten konnten wir während der Sepsis eine um 25% reduzierte Talinololanreicherung in der Leber zeigen. Hierzu passend stieg die *Mdr1b*-mRNA-Expression auf das 2,5-fache und die von *Mrp2* auf das 1,8-fache, letzteres erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Vos et al. beschrieben erstmals die deutlich gesteigerte hepatische *Mdr1b*-Expression unter LPS-Sepsis bei unverändertem *Mdr1a*-Level, welches die Ergebnisse unseres Versuchs bestätigen [79]. Die Autoren deuteten dies als eine Kompensation der deutlich verminderten *Mrp2*-Expression. Die 6 Stunden nach LPS-Applikation nicht mehr nachweisbare *Mrp2*-mRNA konnte nach 48 Stunden wieder detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in weiteren Versuchen gezeigt werden [80, 81]. Möglicherweise beginnt hier, in der Phase des sich von der Sepsis erholenden Organismus, eine kompensatorische Antwort mit steigender *Mrp2*-Expression, auch über die Ausgangswerte hinaus. Unsere Messungen fanden

84 Stunden nach Sepsis-Induktion statt, so dass eine hyperregeneratorische Expression eine plausible Erklärung für die gesteigerten *Mrp2*-Level sein kann. Im Gegensatz hierzu stehen die von Piquette-Miller et al. durchgeführten Experimente, in denen eine um 50 bis 70% reduzierte hepatische *Mdr1*-Protein-Expression, deutlich verminderte mRNA-Level von *Mdr1a*, *Mdr1b* und *Mrp2* sowie ein um 50% gesunkener Auswärtstransport des *Mdr1*-Substrates Rhodamin 123 dargestellt werden konnte [82]. Diese differenten Ergebnisse sind begründbar mit dem abweichenden Sepsis-Modell (LPS). Allerdings zeigten Morgan et al. schon an Cytochrom P450 Enzymen der Leber, dass sich das Expressionsmuster während der Entzündung im LPS-Modell von der Infektion mit lebenden Organismen unterscheidet [12]. Dies ist auch für die differenzierte Regulation der Effluxtransporter denkbar. Hinzu kommen die von uns verwendeten Lew.1W-Ratten im Gegensatz zu den Sprague Dawley-Ratten von Piquette-Miller et al., welche unterschiedliche Veränderungen in den Expressionsraten hervorrufen können.

In vielen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass Änderungen in der Expressionsrate von *Mdr1* in der Leber durch inflammatorische Stimuli zu Veränderungen in Transport, Verteilung und Akkumulation von Transportersubstraten führen [13]. Wir haben erniedrigte Konzentrationen von Talinolol in der Leber mit parallel gesteigerter *Mdr1b*-mRNA-Expression nachgewiesen. Das könnte als eine evolutionär gewachsene Antwort des Körpers auf die systemische Infektion zur Entfernung von Toxinen aus dem Organismus gewertet werden. Eine andere Studie zeigte jedoch eine verminderte biliäre Elimination des *Mdr1*-Substrats Digoxin bei erhöhtem *Mdr1b*-Level, aber verminderter *Mdr1a*-Expression und unveränderter Digoxinkonzentration in der Leber [80]. Eine Erklärung dessen könnte eine andere Publikation liefern, in der beschrieben wurde, dass die Pharmakokinetik von Digoxin nicht vom *Mdr1b*-Level abhängt und somit der Expressionsänderung keine entscheidende Rolle beigemessen werden sollte. Vielmehr wurde die verminderte *Mdr1a*-mRNA als Ursache der verminderten Exkretion über die Gallenflüssigkeit herangezogen [83]. Des Weiteren beschrieben Cherrington et al. eine während der Entzündung verminderte Expression der in der basolateralen Membran der Leber lokalisierten Aufnahmetransporter *Oatp1*, 2 und 4 sowie gesteigerte Level der ebenfalls basolateral gelegenen Auswärtstransporter *Mrp1* und *Mrp3*. Dies stellt einen

kompensatorischen Mechanismus der Leber in der Sepsis zum Schutz vor der Schädigung durch toxische Substanzen dar. Da Digoxin auch ein Oatp-Substrat ist, ist zu vermuten, dass so weniger Digoxin in die Leber und folglich auch in die Gallenflüssigkeit gelangt [81]. Weitere Beispiele für den Zusammenhang von *Mdr1*-Expression und Verteilungsänderung von dessen Substraten zeigen die verminderte hepatobiliäre Exkretion von Doxorubicin sowie die vermehrte Anhäufung von ^{99m}Tc-Sestamibi in der Leber in Folge einer entzündlich *Mdr1*-Downregulation [84].

Talinololkinetik in Stuhl, Urin und Blut

Die bei der Sepsis sinkende Ausscheidung von Talinolol über den Stuhl kann zum einen Folge der verminderten jejunalen *Mdr1b*-mRNA-Expression sein, zum anderen aber auch auf die verminderte transporter-vermittelte biliäre Sekretion zurückgeführt werden. Eine gesteigerte renale Exkretion könnte demzufolge einer systemischen Talinolol-Akkumulation kompensatorisch entgegenwirken. Hartmann et al. zeigten im LPS-Modell an Mäusen, dass während der Sepsis in der Leber die *Mdr1a*-mRNA-, *Mdr1b*-mRNA- und *Mdr1*-Protein-Expression vermindert war. Die Niere hingegen wirkte der eingeschränkten exkretorischen Funktion der Leber über eine Induktion der *Mdr1*-Protein-Expression bei gleichbleibendem *Mdr1b*-Level entgegen. Als Folge dessen war sowohl die renale Clearance als auch die Menge des mit dem Urin ausgeschiedenen des *Mdr1*-Substrates Doxorubicin um das 2,5- bzw. 3-fache erhöht [85]. Dies konnten wir nur zum Teil mit unseren Ergebnissen bestätigen. In der Niere steigt während der Sepsis die Talinololausscheidung über den Urin auf das 1,4-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe an, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Die *Mdr1b*- und *Mrp2*-mRNA-Expression des Wildtyps waren unverändert. Auch Hartmann et al. zeigten eine gleichbleibende *Mdr1b*-mRNA-Expression bei gleichzeitig gesteigerter *Mdr1*-Proteinmenge, jedoch wurde dies in unserem Versuch nicht quantifiziert. Es ist somit durchaus vorstellbar, dass ein induziertes *Mdr1* in Analogie zu Hartmann et al. mitverantwortlich für die Erhöhung der renalen Ausscheidung ist. Insgesamt muss aber festgestellt werden, dass unsere Ergebnisse nur bedingt Indizien für eine zur Leber kompensatorisch erhöhten Talinololexkretion über die Niere im septischen CASP-Modell liefern. Da das *Mdr1*-Substrat Doxorubicin gleichzeitig eine *Mdr1*-Induktion bewirkt, lassen die publizierten Daten von Hartmann et al. aber nur eingeschränkt eine Aussage zum Einfluss der LPS-

Applikation auf die Transporterexpression sowie Doxorubicinkinetik zu [86, 87]. Folglich überschneiden sich die Effekte der Sepsis mit denen des Substrates. Des Weiteren können auch andere Transportproteine, bei denen Talinolol ebenfalls ein Substrat ist, an der Sekretion beteiligt sein und bei unveränderter *Mdr1b*-mRNA-Expression zur gesteigerten Ausscheidung mit dem Urin führen [85]. Außerdem hat neben den sekretorischen Transportern das komplexe Netzwerk aus Aufnahmetransportern (OATs und OCTs) der Niere eine große Bedeutung für das Ausmaß der Talinololausscheidung. Die Auswirkungen der Sepsis auf diese Determinanten des Arzneistofftransportes in der Niere wurden bisher nicht untersucht.

Beim Vergleich der Kinetiken der *Mdr1*-Substrate Talinolol und Doxorubicin ist der unbekannte Anteil der jeweiligen passiven Filtration und der aktiven Sekretion an der renalen Gesamtausscheidung nicht zu vernachlässigen. Diese unbekannt Parameter erschweren die Interpretation der Ergebnisse bei den unterschiedlichen Versuchsprotokollen.

Neben der Verteilung von Talinolol in den Organen sowie dessen Ausscheidung über Urin und Stuhl ist der Blutspiegel ein weiterer entscheidender pharmakokinetischer Parameter. Aufgrund unserer Ergebnisse mit verminderter fäkaler Exkretion und der nur mäßig gesteigerten renalen Exkretion des *Mdr1*-Substrats Talinolol in der Sepsis haben wir eine gleichbleibende oder erhöhte Serumkonzentration vermutet. Diese Annahme stützten Untersuchungen mit dem *Mdr1*-Substrat Doxorubicin. Nach LPS-Applikation zeigten sich unveränderte Serum- und Gewebekonzentrationen [85]. Unsere Resultate der CASP-induzierten Sepsis sind jedoch hierzu völlig konträr. Talinolol erreichte in der Sepsisgruppe der Wildtyp-Tiere nur ca. fünf Prozent der Kontrollgruppen-Konzentration. Das wäre mit einer überproportionalen renalen Ausscheidung erklärbar, jedoch schieden die septischen Ratten nur sieben Prozent mehr Talinolol über den Urin aus als die nicht septische Vergleichsgruppe. Hingegen sank aber die fäkale Exkretion um ca. 20%. Dies entspricht einer täglichen Akkumulation von 2,1 mg pro Tag im Organismus der Ratten. Da aber die Serumkonzentrationen in der Sepsis nur ein Bruchteil der nicht septischen Tiere beträgt, bliebe als weitere Erklärung dessen nur eine vermehrte Talinololanreicherung in den Geweben. Wir konnten aber weder verminderte Expressionslevel der Effluxtransporter *Mdr1* und *Mrp2* noch eine verstärkte

Akkumulation von Talinolol in den untersuchten Organen zeigen. In der Leber und im Gehirn war hingegen das Gegenteil zu beobachten. In septischen Ratten sank die Konzentration von Talinolol intrahepatisch auf 75%, intracerebral auf fast ein Drittel in Relation zur Kontrollgruppe. Eine Begründung für diese Veränderungen im Gehirn kann bei gleichbleibender *Mdr1b*-Expression einerseits die induzierte Expression von Effluxtransportern wie *Mdr1* durch gesteigerte *Mdr1a*-mRNA-Level darstellen. Andererseits könnte dieses Phänomen durch eine Sepsis-induzierte Herabregulation von Transporterproteinen der Blut-Hirn-Schranke erklärt werden, welche die aktive Aufnahme von Substraten aus dem Blut über die Endothelzellen ins Gehirn vermitteln. Goralski et al. beschrieben eine sechs Stunden nach LPS-Injektion verminderte Expression des Influxtransporters *Oatp2* (*organic anion transporting polypeptide 2*) [80]. Dessen Substrat Digoxin war aber intracerebral erhöht, so dass dieses Ergebnis keine Erklärung unserer Resultate erbringen kann. Außerdem wurde bisher nicht beschrieben, dass Talinolol ein *Oatp*-Substrat ist. Nähere Erkenntnisse zu weiteren Transportproteinen und deren Regulation als Antwort auf eine inflammatorische Stimulation müssen Studien in der Zukunft liefern. Eventuell stellen die verstärkte Expression von Effluxtransportern sowie die verminderte Expression von Aufnahmetransportern eine Schutzmöglichkeit des Gehirns in der Sepsis dar. Es bleibt völlig unklar, wieso die Sepsis zu reduzierten Konzentrationen von Talinolol im Serum führte. Eine Begründung könnte die Tatsache liefern, dass Talinolol in Ratten über Cytochrom P450 Enzyme metabolisiert wird. Obwohl beim Menschen nur eine sehr geringe Biotransformation von Talinolol von etwa einem Prozent durch Cytochrom 3A4 stattfindet [88], konnte in einem Versuch an Wistar-Ratten gezeigt werden, dass zusätzlich zum unveränderten Talinolol in etwa die gleiche Menge an hydroxylierten Metaboliten über die Niere ausgeschieden wird [51]. Eine andere Studie wies sogar nur ein Drittel unverändertes Talinolol an der Gesamtausscheidung über den Urin nach [78]. Die Metabolite des Talinolol haben wir aber in keiner der Matrices quantifiziert. Für Rifampicin als bekannten Induktor von *Mdr1* konnte bereits eine nominal verminderte Talinololausscheidung bei signifikant erhöhter Exkretion der Metabolite über den Urin um mehr als das Doppelte gezeigt werden [51]. Gleiches wäre während der Sepsis vorstellbar. Eine Induktion der verstoffwechselnden Enzyme mit gesteigerter Metabolisierung durch entzündliche Reize könnte eine Verschiebung des Verhältnisses von unveränderten

Talinolol und dessen Metaboliten zugunsten von Letzterem bewirken. Dies würde die nahezu ausbleibende, aber eigentlich zu erwartende Steigerung der renalen Exkretion sowie die sinkende Talinololkonzentration im Blut erklären. Jedoch ist aus publizierten Daten ersichtlich, dass Cytochrom P450 Enzyme durch die Entzündung herunterreguliert werden [89]. In der Folge müsste die Konzentration von Talinolol in Blut und Urin bei verminderter Metabolisierung steigen, was jedoch in unseren Versuchen nicht beobachtet werden konnte.

Einfluss von Mrp2 auf die Talinolokinetik

Zur Prüfung des Einflusses von Mrp2 auf die Talinololverteilung wurden Mrp2-defiziente Ratten verwendet. Zunächst musste aber untersucht werden, ob die Mrp2-Defizienz zu kompensatorisch veränderten Expressionsraten anderer, ebenfalls am Auswärtstransport beteiligter Transporter führt. Hierzu wurden die Kontrollgruppen des Wildtyps und der TR- Tiere verglichen. Eine Kompensation des Mrp2-Transporterdefekts ist über die Hochregulierung der *Mdr1b*-mRNA-Expression denkbar. In unserem Versuch war aber die *Mdr1b*-Expression bei Mrp2-defizienten Ratten in der Niere und im Jejunum auf 52% bzw. 45% verringert. Die anderen Organe zeigten keinen Unterschied zwischen Wildtyp-Ratten und TR- Tieren. Johnson et al. beobachteten beim Vergleich der Protein-Level vom Wildtyp und von Mrp2-defizienten Ratten eine insgesamt gleichbleibende Expression von Mdr1 in Leber, Niere, Gehirn und Darm. Die gleichzeitig erhöhten Mrp3-Level wurden als Mechanismus gedeutet, der einer intrahepatischen Anhäufung von Mrp2-Substraten entgegenwirkt und diese über den Blutweg der renalen Ausscheidung zuführt [90]. Oswald et al. beschrieben ebenfalls keine Veränderungen in der intestinalen *Mdr1a*-mRNA-Expression bei TR- Ratten mit Ausnahme eines verringerten Expressionlevels im Ileum. In der Leber hingegen war sowohl die *Mdr1a*- als auch die *Mdr1b*-mRNA vermehrt exprimiert [70]. Hoffmann et al. beobachteten in der Leber bei TR- Tieren ebenfalls eine deutliche *Mdr1* Überexpression auf mRNA-Ebene bei allerdings gleichbleibendem Proteingehalt [91]. Diese teils differenten Unterschiede könnten mit den unterschiedlichen Versuchsabläufen begründet sein, indem Komponenten dessen selbst einen Einfluss auf die Transporterexpression haben. Unter anderem verwendeten Hoffmann et al. und Johnson et al. Wistar-Ratten, Oswald et al. wie wir Lew.1W-Ratten.

Im Folgenden wird die Frage diskutiert, ob der Effluxtransporter Mrp2 in den Organen mit sekretorischer Funktion einen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Talinolol hat. Eine Antwort hierauf könnte ein Vergleich der Kontrollgruppen des Wildtyps mit denen der Transporter-defizienten Tiere liefern. Bei nahezu gleichbleibender *Mdr1*-Expression auf mRNA-Ebene in Leber, Hoden, Gehirn und Ileum bzw. verminderter Expression in Niere und Jejunum, wäre eine Akkumulation von Talinolol zu erwarten, wenn es neben *Mdr1* auch ein *Mrp2*-Substrat wäre. Dies konnten wir in der Leber von TR- Ratten zeigen, in der die Konzentration von Talinolol nominal auf über das Doppelte im Vergleich zum Wildtyp stieg. In den anderen Organen konnten wir dies nicht nachweisen.

Im Gegensatz zu unseren Resultaten zeigten frühere Untersuchungen am Institut für klinische Pharmakologie in Greifswald eine sehr starke Zunahme der Talinolol-Konzentrationen in den Organen Leber, Niere, Hoden und Gehirn *Mrp2*-defizienter Tiere im Vergleich zum Wildtyp [51]. Zusätzlich wurde in der Arbeit eine Verzehnfachung der Serumspiegel in den TR- Tieren beschrieben. Das ist mit einer verminderten biliären Clearance infolge des *Mrp2*-Transportermangels und Akkumulation von Talinolol in der Leber zu erklären [51]. Dieses Ergebnis steht in völligem Gegensatz unseren Resultaten, bei denen die Serumkonzentrationen von Talinolol bei TR- Tieren auf 12% des Wildtyps sanken. Weiterhin fanden wir eine verringerte Ausscheidung des *probe-drugs* mit dem Stuhl bei unveränderter renaler Exkretion. Eine logische Konsequenz wären erhöhte Serum- oder Organkonzentrationen. Beides konnte in unseren Versuchen nicht gezeigt werden. Aus diesen Fakten wird ersichtlich, dass unsere Ergebnisse keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Talinololkinetik und der *Mrp2* Expression offenbaren. Lediglich die erhöhten Konzentrationen in der Leber als Folge des verminderten kanalikulären Transportes würde auf einen Zusammenhang hindeuten. Verminderte Plasmaspiegel sowie eine verminderte bzw. gleichbleibende Kumulation in den Organen sprechen eher dagegen. Die gesunkene Ausscheidung von Talinolol über den Stuhl kann auch Folge der vermindert exprimierten *Mdr1b*-mRNA des Jejunums sein und weist nicht zwangsläufig den fehlenden *Mrp2*-Transport nach. Im Gegensatz zu unseren Versuchen konnte A. Bernsdorf in ihren Untersuchungen eindeutig zeigen, dass das Fehlen des Effluxtransporters *Mrp2* zu einer verstärkten Anhäufung von Talinolol in den Organen sowie zu einer erhöhten

Serumkonzentration als mögliche Folge der verminderten biliären Ausscheidung führt [51]. Wodurch jedoch die Unterschiede zu unserem Experiment zustande kommen, ist unklar. Eine Möglichkeit der Erklärung bietet die Tatsache, dass A. Bernsdorf für Ihre Untersuchungen Wistar-Ratten, wir hingegen Tiere des Lew.1W-Stamms verwendeten.

Mrp2 hat in unseren Versuchen auf die Talinololkinetik nur begrenzt Einfluss. Sowohl der alleinige Mrp2-Mangel als auch der Mrp2-Mangel mit zusätzlicher Sepsis offenbarte nur in der Leber eine Assoziation dieses Transporters mit der Talinololverteilung.

Fehlerdiskussion

Zusammenfassend muss bemerkt werden, dass es in unseren experimentellen Versuchen aufgrund der geringen Tierzahl pro Versuchsgruppe und der daraus resultierenden niedrigen Power in der statistischen Auswertung zur Überinterpretation oder Unterbewertung von Ergebnisse kommen kann. Diese wiederum können möglicherweise die teilweise differenten Ergebnisse im Bezug auf andere Studien erklären. Des Weiteren führt ein Sepsismodell mit ohnehin hochvariablem Krankheitsverlauf zwangsläufig zu Streunungen bei gleichzeitig höchster Sorgfältigkeit in der Versuchsdurchführung. Auch dies könnte zu einer Fehlinterpretation führen. Zuletzt seien die in der Literatur differenten Sepsismodelle und Tierspezies angemerkt, die einen direkten Vergleich erschweren und Unterschiede in den Ergebnissen hervorrufen.

7 Schlussfolgerungen

In Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnte die Beeinflussung der Transporterexpressionen in den Membranen des Gastrointestinaltraktes und eine bisher weitgehend unbekannte Pharmakokinetik von Arzneistoffen unter den Bedingungen der Sepsis aufgezeigt werden, welche modellhaft auch auf andere Organsysteme übertragen werden kann. Die Folge dieser Veränderungen können erhöhte Konzentrationen von Toxinen und Medikamenten im Organismus sein, die eine Dosisanpassung bei der medikamentösen Therapie septischer Patienten erfordert.

Ingesamt bedarf es noch einer Vielzahl von experimentellen Untersuchungen vor allem an Tiermodellen, welche an der pathophysiologischen Sepsisentstehung orientiert sind. Gerade die Aufklärung der Veränderungen an Membranbarrieren in der Sepsis ist als Basis für eine verbesserte und sichere medikamentösen Therapie wichtig.

8 Zusammenfassung

Die Sepsis und der septische Schock stellen die häufigste Todesursache auf chirurgischen Intensivstationen dar. Viele Studien haben gezeigt, dass die Barrierefunktion in sekretorischen Organen, wie z. B. Leber, Gehirn und Darm, durch das septische Krankheitsbild beeinflusst wird. Wichtige Determinanten dieser Organbarrieren sind die Effluxtransporter *multidrug resistance protein 1* (kodiert durch *Mdr1*) und das *multidrug resistance-associated protein 2* (*Mrp2*). Sie haben großen Einfluss auf die Absorption und Verteilung sowie Ausscheidung von potentiell toxischen Xenobiotika, unter anderem auch Arzneimittel. Unser Ziel war es, mit der vorliegenden Arbeit einerseits die Expression, andererseits die Funktion der Membran-Transporter *Mdr1* und *Mrp2* in verschiedenen Organen mit und ohne Sepsis zu untersuchen. Des Weiteren sollte geklärt werden, inwieweit Talinolol als *probe drug* neben dem bereits gut charakterisierten Transport über *Mdr1* auch ein Substrat für *Mrp2* ist. Hierzu wurden jeweils 12 männliche Lew.1W-Ratten des Wildtyps und 12 des *Mrp2*-defizienten Stamms mit Talinolol vorbehandelt. Je sechs Tieren beider Rattenstämme wurde ein Röhrchen in die Darmwand implantiert (*colon ascendens stent peritonitis – CASP*), die Kontrolltiere wurden scheinoperiert. Nach drei Tagen wurde die *Mdr1b*- und *Mrp2*-mRNA-Expression über die *real time reverse transcription*- Polymerasekettenreaktion im Jejunum, Ileum, Leber, Niere, Gehirn und Hoden analysiert. Weiterhin bestimmten wir sowohl aus den oben genannten Organen als auch aus dem Blut sowie dem gesammelten Urin und Stuhl die Talinololkonzentrationen mittels *high pressure liquid chromatography* (HPLC) und Fluoreszenzdetektion.

Septische Ratten des Wildtyps zeigten gegenüber ihrer Kontrolle eine nominal gesunkene jejunale *Mdr1b*-mRNA-Expression mit einer gleichzeitig um 20% verminderten Talinololausscheidung über den Stuhl als möglichen Ausdruck der gestörten Absorptionsbarriere des Darms. Weiterhin waren die *Mdr1b*-mRNA-Level in der Leber erhöht, jedoch ließ sich die zu erwartende Reduzierung der intrahepatischen Talinololkonzentration nicht bestätigen. Die Konzentrationen von Talinolol im Gehirn sanken während der Sepsis auf fast ein Drittel der Kontrollgruppe bei unveränderter *Mdr1*-Expression. *Mrp2* scheint hingegen keinen Einfluss auf die Talinololkinetik während der Sepsis zu haben.

9 Literaturverzeichnis

1. Ackermann F, Gastmeier P, and Ruf B; *Prävention der nosokomialen Sepsis*, Werdan, K., Schuster, H. P., Müller-Werdan, U., Sepsis und MODS, Springer, Heidelberg, 2005, Vol. 4, 153-162.
2. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone H-G, Gerlach H, Gründling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Stüber F, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Weiler N, Welte T, and Werdan K; *Diagnose und Therapie der Sepsis - S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e. V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)*: Teil 1*. Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2006, 43: 369-384.
3. Friedman G, Silva E, and Vincent JL; *Has the mortality of septic shock changed with time*. Crit Care Med, 1998, 26: 2078-2086.
4. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, and Vincent JL; *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008*. Crit Care Med, 2008, 36: 296-327.
5. Moss M and Martin GS; *A global perspective on the epidemiology of sepsis*. Intensive Care Med, 2004, 30: 527-529.
6. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grund S, Gruending M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, and Reinhart K; *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007, 33: 606-618.
7. Engel C, Brunkhorst FM, Löffler M, and Reinhart K; *Diagnose und Epidemiologie der Sepsis*. Ärztebl. Thüringen, 2007, 18: 414 - 417.
8. Moerer O, Plock E, Mgbor U, Schmid A, Schneider H, Wischnewsky MB, and Burchardi H; *A German national prevalence study on the cost of intensive care: an evaluation from 51 intensive care units*. Crit Care, 2007, 11: R69.
9. Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, and Burchardi H; *Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use*. Intensive Care Med, 2002, 28: 1440-1446.
10. Moerer O and Burchardi H; *The cost of sepsis*. Anaesthetist, 2006, 55 Suppl 1: 36-42.
11. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, and Pinsky MR; *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med, 2001, 29: 1303-1310.
12. Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, Charles KA, Clarke SJ, Kacevska M, Liddle C, Richardson TA, Sharma R, and Sinal CJ; *Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer*. Drug Metab Dispos, 2008, 36: 205-216.

13. Petrovic V, Teng S, and Piquette-Miller M; *Regulation of drug transporters during infection and inflammation*. Mol Interv, 2007, 7: 99-111.
14. Schottmüller H; *Wesen und Behandlung der Sepsis*. Verhandlung des 31. Deutschen Kongresses für Innere Medizin, 1914, 31: 257-280.
15. Bone RC; *Let's agree on terminology: definitions of sepsis*. Crit Care Med, 1991, 19: 973-976.
16. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, and Sibbald WJ; *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. Chest, 1992, 101: 1644-1655.
17. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, and Ramsay G; *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Crit Care Med, 2003, 31: 1250-1256.
18. Muller-Werdan U, Prondzinsky R, Witthaut R, Stache N, Heinroth K, Kuhn C, Schmidt H, Busch I, and Werdan K; *The heart in infection and MODS (multiple organ dysfunction syndrome)*. Wien Klin Wochenschr, 1997, 109 Suppl 1: 3-24.
19. Bodmann KF and Vogel F; *Antimikrobielle Therapie den Sepsis*. Chemotherapie J, 2001, 10: 43-56.
20. Jerala R; *Structural biology of the LPS recognition*. Int J Med Microbiol, 2007, 297: 353-363.
21. Bone RC, Grodzin CJ, and Balk RA; *Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process*. Chest, 1997, 112: 235-243.
22. Cohen J; *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002, 420: 885-891.
23. Peters K, Unger RE, Brunner J, and Kirkpatrick CJ; *Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis*. Cardiovasc Res, 2003, 60: 49-57.
24. Oberholzer A, Oberholzer C, and Moldawer LL; *Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity*. Shock, 2001, 16: 83-96.
25. Christoph A, Werdan K, and Müller-Werdan U; *HerzAkutMedizin-Ein Manual für die kardiologische, herzchirurgische, anästhesiologische und internistische Praxis - Sepsis*, Steinkopff, Darmstadt, 2006, Vol. 2, 704-758.
26. Bone HG, Sielenkämper A, and Booke M; *Oxygen delivery in sepsis – since 10 years more questions than answers*. Anaesthesist, 1999, 48: 63–79.
27. Ragaller M and Gottschlich B; *Akutes Darmversagen in der Intensivmedizin–Therapeutische Ansätze*. Intensivmed, 2005, 42: 627–638.
28. Clark JA and Coopersmith CM; *Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the "motor" of critical illness*. Shock, 2007, 28: 384-393.
29. Trausch B, Oertel R, Richter K, and Gramatte T; *Disposition and bioavailability of the beta 1-adrenoceptor antagonist talinolol in man*. Biopharm Drug Dispos, 1995, 16: 403-414.
30. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, and Melamed MR; *Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues*. J Histochem Cytochem, 1990, 38: 1277-1287.

31. Juliano RL and Ling V; *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976, 455: 152-162.
32. Fromm M; *Transport in Membranen und Epithelien*, Schmidt, R. F. , Lang, F., Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. Springer, Heidelberg, 2007, Vol. 30, 41-54.
33. Szakacs G, Varadi A, Ozvegy-Laczka C, and Sarkadi B; *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)*. Drug Discov Today, 2008, 13: 379-393.
34. Chan LM, Lowes S, and Hirst BH; *The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability*. Eur J Pharm Sci, 2004, 21: 25-51.
35. Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, and Unadkat JD; *The role of transporters in drug interactions*. Eur J Pharm Sci, 2006, 27: 501-517.
36. Takano M, Yumoto R, and Murakami T; *Expression and function of efflux drug transporters in the intestine*. Pharmacol Ther, 2006, 109: 137-161.
37. Giessmann T, May K, Modess C, Wegner D, Hecker U, Zschesche M, Dazert P, Grube M, Schroeder E, Warzok R, Cascorbi I, Kroemer HK, and Siegmund W; *Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans*. Clin Pharmacol Ther, 2004, 76: 192-200.
38. Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, and Oude Elferink RP; *A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome*. Hepatology, 1997, 25: 1539-1542.
39. Paulusma CC and Oude Elferink RP; *The canalicular multispecific organic anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man*. J Mol Med, 1997, 75: 420-428.
40. Gotoh Y, Suzuki H, Kinoshita S, Hirohashi T, Kato Y, and Sugiyama Y; *Involvement of an organic anion transporter (canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance-associated protein 2) in gastrointestinal secretion of glutathione conjugates in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 292: 433-439.
41. Oswald S, Grube M, Siegmund W, and Kroemer HK; *Transporter-mediated uptake into cellular compartments*. Xenobiotica, 2007, 37: 1171-1195.
42. Oswald S, Koll C, and Siegmund W; *Disposition of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in mdr1a/b (-/-) mice*. J Pharm Sci, 2007, 96: 3478-3484.
43. Leslie EM, Deeley RG, and Cole SP; *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 204: 216-237.
44. Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, and Deray G; *Renal tubular drug transporters*. Nephron Physiol, 2006, 103: p97-106.
45. Fricker G and Miller DS; *Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier*. Pharmacology, 2004, 70: 169-176.
46. Verschraagen M, Koks CH, Schellens JH, and Beijnen JH; *P-glycoprotein system as a determinant of drug interactions: the case of digoxin-verapamil*. Pharmacol Res, 1999, 40: 301-306.

47. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, and Kroemer HK; *The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin*. J Clin Invest, 1999, 104: 147-153.
48. Westphal K, Weinbrenner A, Zschesche M, Franke G, Knoke M, Oertel R, Fritz P, von Richter O, Warzok R, Hachenberg T, Kauffmann HM, Schrenk D, Terhaag B, Kroemer HK, and Siegmund W; *Induction of P-glycoprotein by rifampin increases intestinal secretion of talinolol in human beings: a new type of drug/drug interaction*. Clin Pharmacol Ther, 2000, 68: 345-355.
49. Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W, and Schrenk D; *The effect of rifampin treatment on intestinal expression of human MRP transporters*. Am J Pathol, 2000, 157: 1575-1580.
50. Gramatte T, Oertel R, Terhaag B, and Kirch W; *Direct demonstration of small intestinal secretion and site-dependent absorption of the beta-blocker talinolol in humans*. Clin Pharmacol Ther, 1996, 59: 541-549.
51. Bernsdorf A; *Untersuchung zur Verteilung von Talinolol bei Ratten nach Behandlung mit Induktoren und Inhibitoren des P-Glykoprotein*, Mathematisch-naturwissenschaftliche Diplomarbeit, Greifswald, 2000.
52. Schwarz UI, Gramatte T, Krappweis J, Oertel R, and Kirch W; *P-glycoprotein inhibitor erythromycin increases oral bioavailability of talinolol in humans*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2000, 38: 161-167.
53. Gramatte T and Oertel R; *Intestinal secretion of intravenous talinolol is inhibited by luminal R-verapamil*. Clin Pharmacol Ther, 1999, 66: 239-245.
54. Wetterich U, Spahn-Langguth H, Mutschler E, Terhaag B, Rosch W, and Langguth P; *Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinolol enantiomers: concentration- and dose-dependent absorption in vitro and in vivo*. Pharm Res, 1996, 13: 514-522.
55. Spahn-Langguth H, Baktir G, Radschuweit A, Okyar A, Terhaag B, Ader P, Hanafy A, and Langguth P; *P-glycoprotein transporters and the gastrointestinal tract: evaluation of the potential in vivo relevance of in vitro data employing talinolol as model compound*. Int J Clin Pharmacol Ther, 1998, 36: 16-24.
56. Westphal K, Weinbrenner A, Giessmann T, Stuhr M, Franke G, Zschesche M, Oertel R, Terhaag B, Kroemer HK, and Siegmund W; *Oral bioavailability of digoxin is enhanced by talinolol: evidence for involvement of intestinal P-glycoprotein*. Clin Pharmacol Ther, 2000, 68: 6-12.
57. Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK, and Cascorbi I; *The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol*. Clin Pharmacol Ther, 2002, 72: 572-583.
58. Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, and Pfeffer K; *Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis*. Infect Immun, 1998, 66: 2300-2309.
59. Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, Maier S, Grundling M, Grisk O, Wendt M, Heidecke CD, and Lehmann C; *Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes*. Shock, 2007, 28: 59-64.

60. Schild TA; *7700 SDS Workshop*, Einfuehrung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie (Vers. 2.1), Applied Biosystems GmbH Weiterstadt, 1998.
61. Livak KJ and Schmittgen TD; *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
62. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, and Heidecke CD; *Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis*. *Shock*, 2004, 21: 505-511.
63. Rittirsch D, Hoesel LM, and Ward PA; *The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis*. *J Leukoc Biol*, 2007, 81: 137-143.
64. Luster MI, Germolec DR, Yoshida T, Kayama F, and Thompson M; *Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver*. *Hepatology*, 1994, 19: 480-488.
65. Zanetti G, Heumann D, Gerain J, Kohler J, Abbet P, Barras C, Lucas R, Glauser MP, and Baumgartner JD; *Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. Comparative protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor-alpha and to lipopolysaccharide*. *J Immunol*, 1992, 148: 1890-1897.
66. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, and Mak TW; *Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection*. *Cell*, 1993, 73: 457-467.
67. Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, and Benjamin E; *Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein*. *The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group*. *N Engl J Med*, 1996, 334: 1697-1702.
68. Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, and Remick DG; *Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia*. *J Immunol*, 1992, 148: 2724-2730.
69. Dietrich CG, Geier A, and Oude Elferink RP; *ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut*. *Gut*, 2003, 52: 1788-1795.
70. Oswald S, Westrup S, Grube M, Kroemer HK, Weitschies W, and Siegmund W; *Disposition and sterol-lowering effect of ezetimibe in multidrug resistance-associated protein 2-deficient rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318: 1293-1299.
71. Brady JM, Cherrington NJ, Hartley DP, Buist SC, Li N, and Klaassen CD; *Tissue distribution and chemical induction of multiple drug resistance genes in rats*. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30: 838-844.
72. Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR, and Klaassen CD; *Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300: 97-104.
73. Mayer U, Wagenaar E, Beijnen JH, Smit JW, Meijer DK, van Asperen J, Borst P, and Schinkel AH; *Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdr 1a P-glycoprotein*. *Br J Pharmacol*, 1996, 119: 1038-1044.

74. Kalitsky-Szirtes J, Shayeganpour A, Brocks DR, and Piquette-Miller M; *Suppression of drug-metabolizing enzymes and efflux transporters in the intestine of endotoxin-treated rats*. Drug Metab Dispos, 2004, 32: 20-27.
75. Belliard AM, Lacour B, Farinotti R, and Leroy C; *Effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on intestinal P-glycoprotein expression, activity, and localization in Caco-2 cells*. J Pharm Sci, 2004, 93: 1524-1536.
76. Bernsdorf A; *Intestinale Absorptionsmechanismen-Pharmakokinetische Untersuchungen mit dem Modellarzneistoff Talinolol*, Mathematisch-naturwissenschaftliche Dissertation, Greifswald, 2005.
77. Stephens RH, O'Neill CA, Bennett J, Humphrey M, Henry B, Rowland M, and Warhurst G; *Resolution of P-glycoprotein and non-P-glycoprotein effects on drug permeability using intestinal tissues from mdr1a (-/-) mice*. Br J Pharmacol, 2002, 135: 2038-2046.
78. Klemm W and Wenzel A; *The pharmacokinetics of 1-(4-cyclohexylureidophenoxy)-2-hydroxy-3-tert-butylaminopropane (talinolol, Cordanum, 02-115) 2. Excretion, blood level and distribution of the 14C-labeled compound in the rat*. Pharmazie, 1975, 30: 675-677.
79. Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, Jansen PL, and Muller M; *Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver*. Hepatology, 1998, 28: 1637-1644.
80. Goralski KB, Hartmann G, Piquette-Miller M, and Renton KW; *Downregulation of mdr1a expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin*. Br J Pharmacol, 2003, 139: 35-48.
81. Cherrington NJ, Slitt AL, Li N, and Klaassen CD; *Lipopolysaccharide-mediated regulation of hepatic transporter mRNA levels in rats*. Drug Metab Dispos, 2004, 32: 734-741.
82. Piquette-Miller M, Pak A, Kim H, Anari R, and Shahzamani A; *Decreased expression and activity of P-glycoprotein in rat liver during acute inflammation*. Pharm Res, 1998, 15: 706-711.
83. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, and Borst P; *Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94: 4028-4033.
84. Wang JH, Scollard DA, Teng S, Reilly RM, and Piquette-Miller M; *Detection of P-glycoprotein activity in endotoxemic rats by 99mTc-sestamibi imaging*. J Nucl Med, 2005, 46: 1537-1545.
85. Hartmann G, Vassileva V, and Piquette-Miller M; *Impact of endotoxin-induced changes in P-glycoprotein expression on disposition of doxorubicin in mice*. Drug Metab Dispos, 2005, 33: 820-828.
86. Fardel O, Lecreur V, Daval S, Corlu A, and Guillouzo A; *Up-regulation of P-glycoprotein expression in rat liver cells by acute doxorubicin treatment*. Eur J Biochem, 1997, 246: 186-192.
87. Maitra R, Halpin PA, Karlson KH, Page RL, Paik DY, Leavitt MO, Moyer BD, Stanton BA, and Hamilton JW; *Differential effects of mitomycin C and doxorubicin on P-glycoprotein expression*. Biochem J, 2001, 355: 617-624.

88. Zschiesche M, Lemma GL, Klebingat KJ, Franke G, Terhaag B, Hoffmann A, Gramatte T, Kroemer HK, and Siegmund W; *Stereoselective disposition of talinolol in man*. J Pharm Sci, 2002, 91: 303-311.
89. Aitken AE, Richardson TA, and Morgan ET; *Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006, 46: 123-149.
90. Johnson BM, Zhang P, Schuetz JD, and Brouwer KL; *Characterization of transport protein expression in multidrug resistance-associated protein (Mrp) 2-deficient rats*. Drug Metab Dispos, 2006, 34: 556-562.
91. Hoffmann K and Loscher W; *Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR(-) rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats*. Epilepsia, 2007, 48: 631-645.

10 Appendix

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf folgendem Kongress als Posterpräsentation vorgestellt:

European Society of Intensive Care Medicine
20th Annual Congress Berlin, Germany, 2007

Schmidt M, Oswald S, Lustig M, Pavlovic D, Siegmund W, and Lehmann C

Efflux transporter protein expression and function in different tissues
during experimental sepsis.

Intensive Care Medicine, 2007, 33 (suppl.2): 26.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Allgemeine Angaben

Name: Michael Schmidt
Wohnort: Amberg 13, 18055 Rostock
Geburtsdatum: 23. September 1983
Geburtsort: Rostock
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1990 - 1994 Grundschule Lüdershagen
1994 - 2003 Katharina-von-Hagenow-Gymnasium Barth
Schulabschluss: Juni 2003, Abitur

Studium

seit Oktober 2003 Medizinstudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
05.09.2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ende 2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Studentische Hilfskraft:

- Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Leitung von Tutorien zur Physikumsvorbereitung, 2005-2008, Prof. Walther
- Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Tutor für das Blockpraktikum Orthopädie im 2. klinischen Jahr, 2008, Prof. Lahm

Praktisches Jahr:

- erstes Tertial: Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten, Kopf- und Halschirurgie, Universitätsklinikum Greifswald
- zweites Tertial: Chirurgie, Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg
- drittes Tertial: Innere Medizin, Dietrich-Bonhoeffer-Klinikum Neubrandenburg

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ch. Lehmann und bei Herrn Prof. Dr. W. Siegmund für die Bereitstellung des Themas dieser interdisziplinären Dissertationsarbeit sowie die technische und materielle Ausstattung bedanken.

Dr. Stefan Oswald gilt ein ganz besonderer Dank. Er war jederzeit eine große Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche und der analytischen Methoden. Weiterhin unterstützte er mich tatkräftig durch das kritische Durchschauen der Dissertationsmanuskripte.

Für die Hilfe bei der Arbeit im Labor danke ich den Mitarbeitern des GLP-Labors Dr. E. Scheuch, Frau G. Schumacher und Frau S. Bade.

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin danke ich Frau Will für die Hilfe bei der Organisation des Tierversuchs, Dr. D. Pavlovic für die zahlreichen Anregungen bei der Postergestaltung und Dr. K. Meißner für das Korrekturlesen.

Insbesondere sei auch Frau Dr. M. Lustig für die Operation der Tiere, oft auch spät nach Ende des Klinikdienstes, gedankt.

Des Weiteren sei an alle anderen Mitarbeiter beider Einrichtungen ein herzlicher Dank für die schöne Zeit und Zusammenarbeit in den Räumen des Pharmakologischen Instituts gerichtet.

Einzigartig war und ist die Unterstützung meiner Familie bei der Anfertigung der Dissertation und während des gesamten Studiums.

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Doreen danken. Sie gab mir viel Kraft, hatte immer Geduld und Verständnis und korrigierte zahlreich die Manuskripte.