

1. Einleitung

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

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

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

1.1.1. Synthese, Freisetzung und Abbau der γ -Aminobuttersäure

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

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

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

1.1.2. GABA-Rezeptoren

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

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

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

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

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

1.1.3. Synthetische Analoga

1.1.3.1. Baclofen

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

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

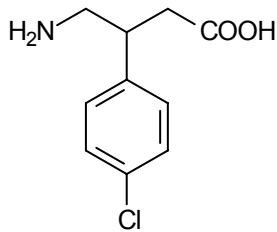


Abbildung 1:

Strukturformel von Baclofen

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

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

1.1.3.1.1. *Pharmakodynamik*

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

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

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

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

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

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

1.1.3.1.2. Pharmakokinetik

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

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

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

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

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

1.1.3.1.3. Alternativen zur Therapie der Spastik mit Baclofen

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

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

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

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

1.1.3.1.4. Resorption von Baclofen: Einfluss aktiver Transportprozesse

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

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

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

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

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

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

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

1.1.3.2. Gabapentin

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

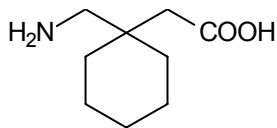


Abbildung 2:

Strukturformel von Gabapentin

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

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

1.1.3.2.1. Therapeutische Bedeutung

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

Die Einteilung der Epilepsie erfolgt in:

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

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

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

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

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

1.1.3.2.2. Pharmakokinetik von Gabapentin

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

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

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

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

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

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

1.1.3.2.3. Resorption von Gabapentin: Einfluss aktiver Transportprozesse

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

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

1.2. Schrankeneffekte des Körpers

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

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

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

1.2.1. Äußere Schranken des Körpers

1.2.1.1. Intestinum

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

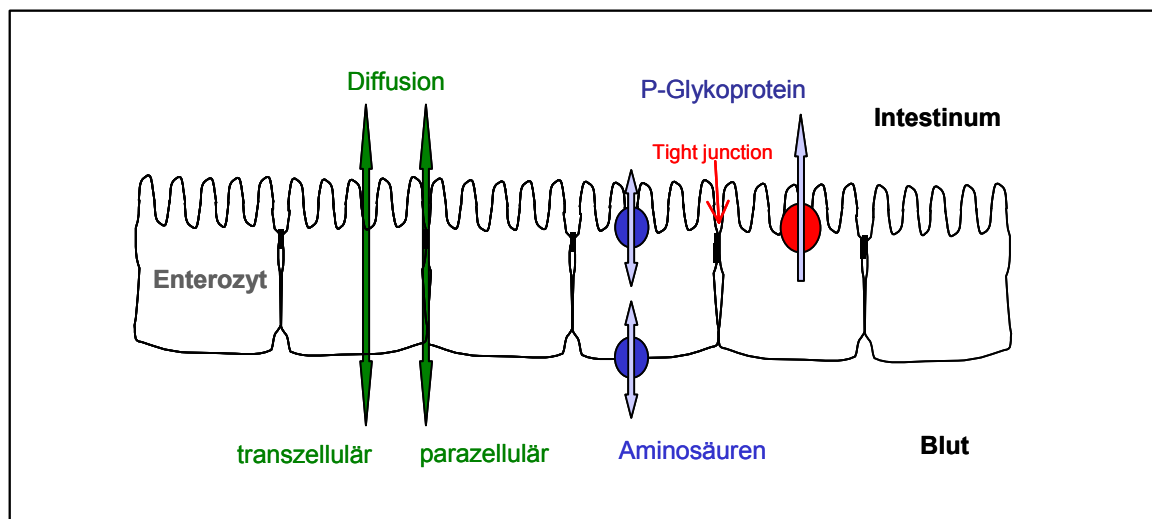


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Enterozyten des intestinalen Epithels: Passive Diffusion und aktive – absorptive sowie exsorptive – Transportprozesse bestimmen die Resorptionsrate einer Substanz

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

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

1.2.1.2. Mund- und Nasenschleimhaut

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

1.2.1.3. Respirationstrakt

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

1.2.1.4. Haut

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

1.2.2. Blut-Gewebe-Schranken

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

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

1.2.2.1. Blut-Hirn-Schranke

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

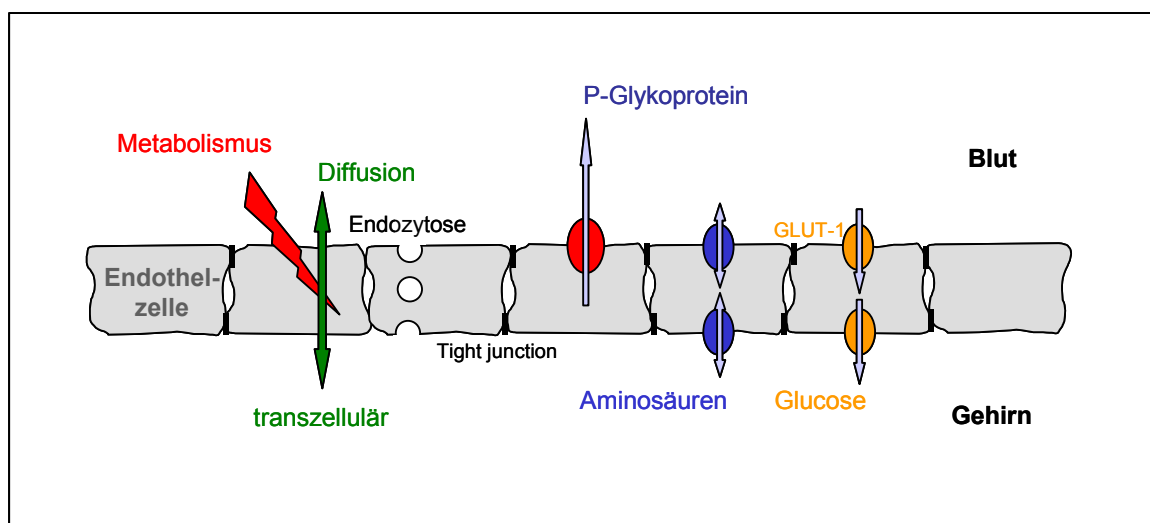


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Kapillarendothelzellen als anatomische Grundlage der Blut-Hirn-Schranke sowie einige ihrer passiven und aktiven Transportmechanismen

1.2.2.2. Blut-Plazenta-Schranke

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

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

1.2.2.3. Blut-Retina-Schranke

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

1.3. Membrantransport und Absorptionsmechanismen

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

1.3.1. Diffusion

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

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

1.3.2. Endozytose – Vesikulärer transzellulärer Transport

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

1.3.3. Transport

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

1.3.3.1. Carrier-vermittelter Transport

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

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

1.3.3.2. Aktiver Transport

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

1.4. Transporter

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

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

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

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

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

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

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

1.4.1. Aminosäuretransporter

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4.1.1. Neutrale (zwitterionische) Aminosäuren

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

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

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

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

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

1.4.1.2. Kationische Aminosäuren

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

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

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

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

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

1.4.1.3. Anionische Aminosäuren

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

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

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

1.4.1.4. Superfamilie der Natrium- und Chlorid-abhängigen Neurotransmittertransporter

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

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

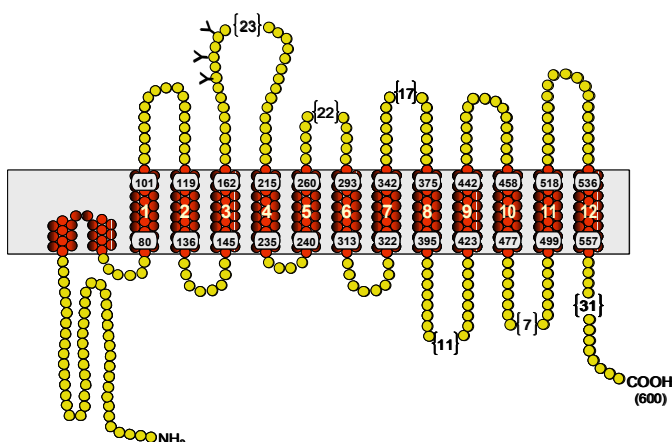


Abbildung 5:
Schematische Darstellung des GABA-Transporters GAT-1 (SLC6A1)

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4.2. Oligopeptidtransporter

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

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

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

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

1.4.3. P-Glykoprotein

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

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

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

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

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

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

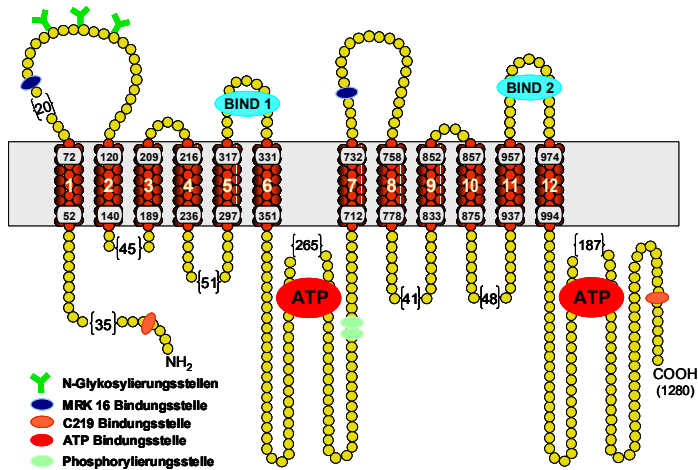


Abbildung 6:
Schematische Darstellung des P-Glykoproteins

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.1. Beeinflussung von Makromolekülen als Ursache von Interaktionen

Arzneistoff-Arzneistoff-Interaktionen durch Beeinflussung von Makromolekülen basieren entweder

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

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

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

1.5.1.1. Pharmakokinetische Interaktionen basierend auf Biotransformationsprozessen

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

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

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

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

1.5.1.2. Interaktionen basierend auf Wechselwirkungen beim aktiven Transport

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.2. Veränderungen der Plasmaproteinbindung als Ursache für Interaktionen

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

1.6. Prodrugs

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

Sinnvoll können Prodrugs sein bei Wirkstoffen:

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

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

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

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