

Verteilung von Pharmaka ins Gehirn

**- Korrelation mit der Lipophilie und Abhängigkeit vom
Applikationsweg -**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Dipl. Chem. Bernd Herber
geb. am 01. Juni 1968 in Flörsheim

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Spahn-Langguth
2. Prof. Dr. P. Nuhn
3. Prof. Dr. G. Baktir

Halle (Saale), den 28.10.2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004420

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004420>]

Für meine Eltern und Geschwister

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.

***J.W. Goethe, Italienische Reise
Caserta, den 16. März 1787***

Die experimentellen Daten zur vorliegenden Dissertationsschrift wurden größtenteils in der Zeit von Oktober 1994 bis Februar 1997 im Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler (Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie) der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main erarbeitet und danach noch durch einige kleinere Experimente ergänzt, die an der Martin-Luther-Universität in Halle/S. am Fachbereich Pharmazie durchgeführt wurden.

Frau Professorin Dr. H. Spahn-Langguth danke ich für die Überlassung des Themas und Ihre stete Unterstützung, obwohl Sie während der Bearbeitung meines Dissertationsprojektes eine C3-Professur an der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg übernahm.

Herrn Professor Dr. Dr. E. Mutschler, wie auch seinem Nachfolger im Amt, Herrn Prof. Dr. W. E. Müller, gilt mein Dank für die Gastfreundschaft, die mir in Frankfurt auch nach ihrem (formalen) Weggang noch über viele Monate gewährt wurde.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Langguth, jetzt Pharmazeutisches Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, bedanke ich mich herzlich für seine Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen am Departement Pharmazie der ETH Zürich zu einer Zeit, als in Frankfurt bzw. Halle die entsprechenden Untersuchungen noch nicht durchführbar waren. Herrn Dr. P. Ader - ehemals Postdoc in der Arbeitsgruppe in Halle/S. - gilt mein Dank für die Unterstützung bei verschiedenen Ex-vivo/In-vitro-Untersuchungen, bei Frau A. Soldner - Frankfurt/M. - bedanke ich mich für die Unterweisung in verschiedene tierexperimentelle Arbeitstechniken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau I. Bischoff, Frau A. Hanses, Herrn A. Hermening, Frau S. Kober, Herrn A. Kurz, Frau S. Neuhoff, Frau A. Soldner sowie allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in Frankfurt und Halle für das hervorragende Arbeitsklima und die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn Dipl. Ing. S. Bihler (Institut für Pharmazeutische Chemie) und Herrn Dr. T. Geller vom Institut für Organische Chemie der TU Berlin (AK Prof. Dr. Schmalz, jetzt Bayer AG Wuppertal) für deren stete Hilfsbereitschaft bei der Aufnahme und Interpretation zahlreicher NMR- und MS-Spektren sowie für die Unterstützung bei Synthesefragen.

Frau Dr. S. Monz (Frankfurt) gilt mein Dank für die Hilfe bei der Berechnung und Interpretation von Konformationsvorschlägen mit Hilfe der Molecular-Modelling-Software Momo.

Schließlich möchte ich mich beim Cusanuswerk für die Aufnahme in die Graduiertenförderung und die hiermit verbundene ideelle wie finanzielle Förderung über den gesamten Zeitraum des Dissertationsprojektes ganz herzlich bedanken.

Verwendete Abkürzungen

λ_z	Geschwindigkeitskonstante
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
Å	Angström (Längeneinheit: 1 Å = 100 pm)
APP	Amyloid-Präcursor-Protein
AUC	Fläche unter der Kurve („area under the curve“)
AUMC	Fläche unter der ersten Momentkurve („area under the first moment curve“)
Bac	Baclofen
Bac-1P	Baclofen-1-propylester
Bac-2P	Baclofen-2-propylester
Bac-B	Baclofen-n-butylester
Bac-E	Baclofenethylester
Bac-M	Baclofenmethylester
BE	Benzoylecgonin
BHS	Blut-Hirn-Schranke (=BBB, „blood brain barrier“)
CDA	Chirales Derivatisierungsreagenz („chiral derivatizing agent“)
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CIP	Cahn, Ingold und Prelog-Nomenklatur
CL	Clearance
Cl-Phe	Chlorphenylalanin
C _{max}	maximale Konzentration
COMT	Catecholamin-O-Methyl-Transferase
COX	Cyclooxygenase
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CSP	Chirale stationäre Phase
D	Dosis
D ₃ -BE	dreifach deuteriertes Benzoylecgonin
DA	Dopamin
DAT	Demenz vom Alzheimer-Typ
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
EEG	Elektroenzephalogramm
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
eV	Elektronenvolt (Energieeinheit)
F	Bioverfügbarkeit
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FDA	Food and Drug Administration
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GIT	Gastrointestinaltrakt
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie („high-performance liquid chromatography“)
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intrathekal
i.v.	intravenös
Ind	Indometacin
IS	innerer Standard
J	Kopplung im ¹ H-NMR [Hz]

K	Kelvin
KG	Körpergewicht
Kok	Kokain
LC	Flüssigkeitschromatographie („liquid chromatography“)
LSD	Lysergsäurediethylamid
MAO	Monoaminoxidase
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MeOD	deuteriertes Methanol
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholinoethan-Sulfonsäure-Monohydrat
MHPG	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol
MRT	mittlere Verweilzeit („mean residence time“)
MS	Massenspektroskopie
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
n.n.	nicht nachweisbar
NA	Noradrenalin
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NBD-Chlorid	4-Chlor-7-nitro-benzofurazan
ND ₂	deuterierte Aminofunktion
NMDA	N-Methyl-d-Aspartat
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
NP	Normalphase („normal phase“)
NSAID	Nichtsteroidale Antirheumatika („non-steroidal anti-inflammatory drugs“)
ODS	„octadecyl silica“
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
p.a.	zur Analyse
p.o.	peroral
P-GP	P-Glycoprotein
QK	Qualitätskontrollprobe
R/S-Cl-Phe	R/S-Chlor-Phenylalanin
RP	Umkehrphase („reversed phase“)
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SIM	Selected Ion-Modus
TCA	Trizyklisches Antidepressivum
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
THF	Tetrahydrofuran
t _{max}	Zeitpunkt, zu dem die maximalen Konzentration erreicht ist
TMS	Trimethylsilan
U	Umdrehungen
V _{ss}	Verteilungsvolumen im steady-state
W	Watt [J×s ⁻¹]; Leistungseinheit
WHO	Weltgesundheitsorganisation („world health organisation“)
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

	Kapitel	Seite
1.	<i>Einleitung</i>	1
1.1.	Historie der Anwendung von Arzneistoffen, Stimulantien und „Wellness“-Drogen früherer Zeiten, die auf das Zentralnervensystem (ZNS) wirken	1
1.2.	Wirkstofftransport in das ZNS und Möglichkeit zur Erhöhung seiner Selektivität	5
2.	<i>Beschreibung der untersuchten Wirkstoffe</i>	8
2.1.	Kokain - Verwendung, Wirkungsmechanismen und Kinetik	8
2.2.	Tranylcypromin	10
2.2.1.	Charakterisierung affektiver Störungen (Depressionen), einem wichtigen Indikationsgebiet für Tranylcypromin	10
2.2.2.	Therapiemöglichkeiten – Einordnung des Tranylcypromin	11
2.2.3.	Pharmakologie und Toxikologie des Tranylcypromin (TCP)	11
2.2.4.	Physikochemische und kinetische Eigenschaften - Chiralität	13
2.3.	Baclofen	14
2.3.1.	Pathophysiologie und Therapiemöglichkeiten spastischer Bewegungsstörungen - Die Rolle von Baclofen	14
2.3.2.	Pharmakologische Eigenschaften des Baclofen	15
2.4.	Indometacin	18
2.4.1.	Indometacin bei Demenz - Demenzielle Syndrome	18
2.4.2.	Therapeutische Möglichkeiten der Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT)	19
2.4.3.	Pharmakologie und Toxikologie des Indometacin	21
3.	<i>Problemstellung</i>	23
4.	<i>Ergebnisse</i>	25
4.1.	Untersuchungen zu Kokain	25
4.1.1.	Analytische Methode für Kokain und Benzoyllecgonin	25
4.1.2.	Kokain- und BE-Konzentrationen im Blut, Liquor und Hirngewebe	25

	Kapitel	Seite
4.1.3.	Applikationsabhängige Unterschiede in den Gewebekonzentrationen: Gehirn/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten als Maß für die Gewebeselektivität	27
4.2.	Untersuchungen zu Tranylcypromin	30
4.2.1.	Analytische Methode zur enantiospezifischen Bestimmung in Blut und Gewebe	30
4.2.2.	TCP-Blut-Konzentrationen	32
4.2.3.	TCP-Hirn- und -Liquor-Konzentrationen	35
4.2.4.	Gehirn/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten als Maß für die Gewebeselektivität	36
4.2.5.	Untersuchungen an Caco-2-Zellmonolayern	39
4.3.	Untersuchungen zum Baclofen	41
4.3.1.	Analytische Methode für Baclofen in Blut und Geweben	41
4.3.2.	Baclofen-Blut-Konzentrationen	42
4.3.3.	Baclofen-Gehirn- und -Liquor-Konzentrationen und hieraus berechnete Gewebe/Blut-Quotienten	43
4.3.4.	Baclofen-Penetrationsversuche Everted-sac-Modell der Ratte	45
4.4.	Untersuchungen zu den Baclofen-Esterderivaten	47
4.4.1.	Synthese der Baclofen-Esterderivate und Versuch der Entwicklung einer analytischen Methode	47
4.4.2.	In-vivo-Spaltung der Baclofenester-Derivate im Rattenvollblut und Rattenhirngewebe	47
4.4.3.	Untersuchungen zur Konformation der Baclofen-Esterderivate	49
4.5.	Untersuchungen zum Indometacin	52
4.5.1.	Analytische Methode für Indometacin in Blut und Geweben	52
4.5.2.	Indometacin-Blut-Konzentrationen	52
4.5.3.	Indometacin-Hirn- und Liquor-Konzentrationen	53
4.5.4.	Hirngewebe/Blut- und Liquor/Blut-Quotienten	55
4.6.	Korrelation der Gewebe/Blut-Quotienten gegen Lipophilie-Parameter	57
5.	<i>Diskussion</i>	59
5.1.	Kokain	59
5.1.1.	Kokain- und BE-Konzentrationen in Blut, Liquor und Hirngewebe der Ratte	59
5.1.2.	Gehirn/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten	60
5.2.	Tranylcypromin	60
5.2.1.	Bioanalytische Methode	60
5.2.2.	TCP-Blutkonzentrationen	61
5.2.3.	Gewebe-Konzentrationen und Membranpermeation	62

	Kapitel	Seite
5.3.	Baclofen	63
5.3.1	Baclofen-Blut-Konzentrationen	63
5.3.2.	Gewebe-Konzentrationen und berechnete Gewebe/Blut-Quotienten	63
5.3.3.	Baclofen-Penetrationsversuche am Everted-sac-Modell der Ratte	63
5.4.	Baclofen-Esterderivate	64
5.4.1.	In-vivo- und In-vitro-Stabilität der Baclofen-Esterderivate	64
5.4.2.	Untersuchungen zur Konformation der Baclofen-Esterderivate	64
5.5.	Indometacin	65
5.5.1.	Indometacin-Blut-Konzentrationen	65
5.5.2.	Indometacin-Gewebe-Konzentrationen und Gewebe/Blut-Quotienten	66
5.6.	Korrelation der Gewebe/Blut-Quotienten und der Lipophilie-Parameter	67
5.7.	Die potentielle Relevanz der Nasalapplikation	67
6.	<i>Experimenteller Teil</i>	68
6.1.	Synthesen	68
6.1.1.	Geräte	68
6.1.2.	Chemikalien	68
6.1.3.	Synthese der Baclofen-Esterderivate	68
6.2.	In-vivo-, Ex-vivo/In-vitro- und In-vitro-Untersuchungen	70
6.2.1.	Geräte und Materialien	70
6.2.2.	Chemikalien	72
6.2.3.	Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kinetik in Hirngewebe und Blut	73
6.2.4.	Studien zu individuellen Konzentrations-Zeit-Profilen	74
6.2.5.	Untersuchungen am umgestülpten Darmsäckchen („Everted sac“) der Ratte	75
6.2.6.	Permeation von Tranlylcypromin durch Caco-2-Monolayer	75
6.2.7.	Ex-vivo/In-vitro-Untersuchungen zur Stabilität der Tranlylcypromin-Enantiomere	76
6.2.8.	Versuche zur Bestimmung der Konzentration der Baclofenester-Derivate	77
6.2.8.1.	Direkte Bestimmung	77
6.2.8.2.	Indirekte Bestimmung (= Rückspaltung zu Baclofen)	78
6.2.9.	Ex-vivo/In-vitro-Untersuchungen zur Stabilität der Baclofenester-Derivate bei der Probengewinnung bzw. in Proben; Esterhydrolyse in Proben	80

	Kapitel	Seite
6.3.	Allgemeine Berechnungsverfahren; Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter	81
6.4.	Analytischer Teil	83
6.4.1.	Geräte	83
6.4.2.	Chemikalien, Reagenzlösungen und Puffer für mobile Phasen	84
6.4.3.	Quantifizierung von Kokain und Benzoylecgonin via GC/MS	85
6.4.3.1.	Probenvorbereitung für die Bestimmung von Kokain und Benzoylecgonin	85
6.4.3.2.	Chromatographisches System für die Bestimmung von Kokain und Benzoylecgonin (GC/MS)	86
6.4.4.	Analytische Methode zur Quantifizierung von Tranlylcypromin	89
6.4.4.1.	Probenvorbereitung für die Tranlylcypromin-Bestimmung	89
6.4.4.2.	Chromatographisches System	90
6.4.5.	Analytische Methode zur Quantifizierung von Baclofen	90
6.4.5.1.	Probenvorbereitung für die Baclofen-Bestimmung	90
6.4.5.2.	Chromatographisches System für Baclofen	91
6.4.5.3.	Methodenvalidierung bei Tranlylcypromin und Baclofen	91
6.4.6.	Analytische Methode zur Quantifizierung von Indometacin	99
6.4.6.1.	Probenvorbereitung für die Indometacin-Bestimmung	99
6.4.6.2.	Chromatographisches System für Indometacin	99
6.4.6.3.	Erhobene Validierungsparameter für Indometacin	99
7.	Zusammenfassung	101
8.	Literaturverzeichnis	<i>i – xviii</i>
9.	Anhang	<i>I</i>
9.1.	Untersuchte Wirkstoffe	<i>I</i>
9.2.	Programmierschritte für den AS 4000/Merck Hitachi-Autosampler	<i>III</i>
9.3.	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten	<i>IV</i>
9.4.	Gewichte von Versuchstieren und entnommenen Organen	<i>IV</i>
9.5.	Darstellung von Kalibrierfunktionen zur Quantifizierung des rac-Baclofen bzw. der Tranlylcypromin-Enantiomere aus verschiedenen Matrices	<i>XI</i>
9.6.	Einzelwerte aus den kinetischen Studien zum Kokain und Benzoylecgonin	<i>XIII</i>
9.6.1.	Konzentrationen in Blut, CSF und Hirngewebe	<i>XIII</i>
9.6.2.	Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten nach Kokain-Applikation	<i>XIV</i>

	Kapitel	Seite
9.7.	Daten aus kinetischen Studien zum Tranylcypromin einschließlich der kinetischen Auswertung	XV
9.7.1.	Tranylcypromin-Blutkonzentrations-Zeit-Verläufe	XV
9.7.2.	Untersuchung der Gewebeverteilung nach Applikation von Tranylcypromin A: Verteilung in verschiedene Hirnareale (Gemessene Konzentrationen in Blut, CSF und Geweben)	XV
9.7.3.	Untersuchung der Gewebeverteilung nach Applikation von Tranylcypromin B: (-)-Tranylcypromin/(+)-Tranylcypromin-Quotienten	XVIII
9.7.4.	Untersuchung der Gewebeverteilung nach Applikation von Tranylcypromin C: Gewebe/Blut-Quotienten nach Applikation von Tranylcypromin	XIX
9.7.5.	Tranylcypromin-Konzentrationen aus Permeationsuntersuchungen	XXI
9.8.	Einzelwerte aus den kinetischen Studien zum Baclofen	XXII
9.8.1.	Individuelle Baclofen-Blutkonzentrations-Zeit-Verläufe	XXII
9.8.2.	Untersuchung der Gewebeverteilung nach Applikation von Baclofen - Konzentrationen in Blut, CSF und Hirngewebe	XXIII
9.8.3.	Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten nach Baclofen-Applikation	XXIV
9.8.4.	Baclofen-Konzentrationen aus den Everted-sac-Untersuchungen	XXIV
9.8.5.	Ergebnisse der In-vivo-Untersuchungen mit Baclofenestern	XXV
9.9.	Einzelwerte aus den kinetischen Studien zum Indometacin	XXVI
9.9.1.	Konzentrationen in Blut, CSF und Hirngewebe	XXVI
9.9.2.	Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten nach Indometacin-Applikation	XXVIII

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

1. Einleitung

1.1. Historie der Anwendung von Arzneistoffen, Stimulantien und „Wellness“-Drogen früherer Zeiten, die auf das Zentralnervensystem (ZNS) wirken

Kenntnisse und Zeugnisse über prähistorische Krankheitsverläufe bzw. über angewendete Therapieformen sind ausgesprochen selten. Bekannte chirurgische Eingriffe, bei denen therapeutische Indikationen vermutet werden, stellen beispielsweise Trepanationen dar, die zur Zeit des Neolithikums zahlreich durchgeführt wurden und bei denen Narbenbildungen von langer Überlebenszeit zeugen.

Zu den jedoch am häufigsten praktizierten Therapieformen von Heilern (Medizinmännern, Schamanen, Zauberpriestern) gehörte der Versuch, durch das Versetzen in außergewöhnliche oder veränderte Bewußtseinszustände Versöhnung mit verstimmten Dämonen zu erwirken. Die Induktion solcher Bewußtseinszustände kann entweder durch psychokinetische und/oder pharmakologische Stimuli ausgelöst werden. Psychokinetische Stimuli basieren entweder auf Reduktion der Umweltstimulatoren durch Meditation oder Einsiedelei oder umgekehrt auf Reizüberflutung, bewirkt durch monoton-rhythmische Stimulation wie Gesang, Musik und Trancetanz. Der Heiler kann in diesem „Durchgangszustand“ die durch Tabuübertretung entstandene Krankheit behandeln. Als pharmakologische Stimuli werden je nach Ethnie verschiedene psychotrop wirkende Stoffe (Tab. 1.1.) angewandt.

Neben dem Einsatz entsprechender psychisch aktiver Substanzen und Techniken im Rahmen von Krankheitsbehandlung wurden diese auch bei kultischen Handlungen eingesetzt. Beispiele hierfür sind Feiern, die Übergänge im sozialen Gefüge markieren (z.B. Geburt, Pubertät, Heirat oder Einsetzungsrituale) [Eckart, 1990].

Es ist nicht verwunderlich, daß psychisch aktive Substanzen, solange sie im Rahmen von kultischen - d.h. heiligen - oder kurativen Handlungen angewendet wurden, kaum zu Mißbrauchsproblemen führten. Erst die Zerstörung des betroffenen Kulturkreises führte zu hedonistischem Gebrauch und schließlich zu einem verstärkten Abusus [Römpp und Schurz, 1972; Schmidbauer und vom Scheidt, 1989; Julien, 1997].

Während im allgemeinen eine orale Aufnahme der Droge selbst oder entsprechender Zubereitungen (z.B. Extrakte) erfolgte, wurden auch andere komplexere Applikationsvarianten entwickelt. Beispiele hierfür sind die pulmonale Aufnahme von Cannabis-, Opium- oder Tabakzubereitungen. Bei bestimmten Substanzen - z.B. Kokain, Cathidin oder Tabak - ist eine buccale Aufnahme beschrieben worden [De Smet, 1985]. Sogenannte „Hexensalben“ wurden kutan angewendet [Römpp und Schurz, 1972; Schmidbauer und vom Scheidt, 1989; Julien, 1997].

Als weiterer Applikationsweg hat sich die Aufnahme über die Nasenhöhle entwickelt. Von Gonzales de Oviedo y Valdez, einem Begleiter von Kolumbus, wird beispielsweise 1492 über indianische Kulturen in Kuba folgendes berichtet:

„Die Indianer üben unter anderen Lastern ein sehr schädliches, das darin besteht, eine Art Rauch zwecks Betäubung in sich aufzunehmen, den sie Tabaco nennen. Die Kazinken nehmen hierzu ein gegabeltes Rohr in Form eines Ypsilon, geben die beiden Gabelenden in die Nasenlöcher und das Rohr in ein angezündetes Kraut. In dieser Weise ziehen sie dann den entstehenden Rauch ein-, zwei-, drei-, viermal ein, soviel sie eben vertragen können, bis sie bewußtlos werden und wie berauscht auf der Erde hingestreckt in einen schweren und tiefen Schlaf verfallen.“ [entnommen aus Schmidbauer und vom Scheidt, 1989].

Tabelle 1.1.: Auswahl der von verschiedenen Ethnien verwendeten psychoaktiver Substanzen			
Gruppe	Bezeichnung	Wirkstoff bzw. Wirkstoffgruppe	Vorkommen bzw. Herstellung
Dämpfende Substanzen nicht selektiv Opioide	Wein, Bier Opium	Ethanol Morphin, Codein	Alkoholische Gärung <i>Papaver somniferum</i>
Stimulanten Dopamin-Wiederaufnahmehemmer Dopamin freisetzende Wirkstoffe Adenosin-Antagonisten Acetylcholin-Agonisten	Khat Kaffee Tee Kakao Tabak	Kokain d-nor-Isoephedrin Koffein Koffein Theobromin Nicotin Muscarin Arecolin	<i>Erythroxylon coca</i> <i>Catha edulis</i> Sterculiaceen-Arten <i>Hex paraguariensis, Thea sinensis,</i> <i>Paullinia cupana</i> <i>Nicotinia tabacum, Nicotinia rustica</i> <i>Amanita muscaria</i> <i>Areca catechn Linné</i>
Psychedelische und halluzinogene Substanzen anticholinerge Psychedelika noradrenerge Psychedelika serotonerge Psechedelika Cannabinoide	Hexensalben Yopo, Cohoba, Epenà Ololiuqui Haschisch, Charas, Bhang, Gamja, Sinsenilla, Cannabis	Scopolamin, Atropin Mescaline Myristicin, Elemicin Dimethyltryptamin Psilocybin, Psilocin Bufotenin Harmin Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	<i>Atropa belladonna, Datura stramonium, Hyoscyamus niger,</i> <i>Mandragora officinarium</i> <i>Lophophora williamsii</i> <i>Myristica fragrans</i> <i>Viola callophyloidea, Piptadenia peregrina</i> <i>Psilocybe, Panaeolus, Conoybe</i> <i>Piptadenia peregrina, Krötensekrete</i> <i>Rivea corymbosa, Iponoea violacea</i> <i>Pegam harmala</i> <i>Cannabis sativa var. indica</i>

In ausführlichen Arbeiten stellt De Smet eine Vielzahl von nasal angewendeten, psychotrop wirksamen Substanzen in einer Reihe von rituell verwendeten Drogen vor [De Smet, 1985; De Smet und Rivier, 1985; De Smet und Lipp, 1987]. Beispiele hierfür sind schwerpunktmäßig Halluzinogene (z.B. Yopo, Epéna oder Cohoba), aber auch Tabak (s. Tab. 1.1.).

Die Nasenhöhle (und den restlichen Respirationstrakt) wird ebenfalls im Rahmen der sog. „Aromatherapie“ als Resorptionsfläche genutzt. Diese Therapieform wird wie folgt definiert:

„Aromatherapie ist die Anwendung von Duftstoffen zur Heilung, Linderung oder Verhinderung von Krankheiten, Infektionen oder Unwohlsein lediglich durch Inhalation dieser Substanzen“ [Buchbauer, 1996].

Beachtet man die lange Geschichte der Riechstoffe, so ist ersichtlich, daß deren Gebrauch ursprünglich rituelle und/oder therapeutische Motivationen zugrunde lagen. Für viele Aromen wurden bereits in vorchristlicher Zeit horrend Geldbeträge bezahlt, und sie stellten aufgrund ihres materiellen Wertes „königliche“ Gastgeschenke dar.

Es konnte in neuerer Zeit durch Tierversuche gezeigt werden, daß bei Inhalation von bestimmten Aromen psychische Effekte zu beobachten sind. Beispielsweise steigert der Hauptinhaltsstoff von Rosmarin (1,8-Cineol) die lokomotorische Aktivität von Mäusen in Abhängigkeit von der Atemluftkonzentration [Kovar et al., 1987]. Analoge Beobachtungen konnten mit Aromen aus Wacholder und Latschenkiefer gemacht werden [Ammon, 1989].

Bei Versuchen an gesunden Probanden konnten psychische Wirkungen von Aromen nachgewiesen werden, die in der Volksmedizin bereits lange bekannt sind und z.B. als Sedativum (Lavendel) oder als Stimulans (Jasmin) genutzt wurden. In einer Studie an psychogeriatrischen Patienten konnte durch das Verdunsten von Lavendelaroma im Schlafraum sowohl die Schlafdauer als auch die Schlafqualität verbessert werden [Hardy et al., 1995].

Über einen sedierenden Effekt hinaus wurde im Tierversuch nachgewiesen, daß die Inhalation von Lavendelaroma zur dosisabhängigen Unterdrückung von durch Pentetrazol, Nikotin oder Elektroschock induzierten Krämpfen an Mäusen führt [Yamada et al., 1994]. Im „Forced swimming test“ an Ratten war eine antidepressive Potenz von Limonenaroma nachweisbar [Komori et al., 1995].

Ob die günstigen Einflüsse der Aromatherapie durch nasale und/oder pulmonale Aufnahme in den Organismus und/oder durch psychologische Wirkung und reflektorische Beeinflussung zustande kommt, ist jedoch bis heute ungeklärt [Buchbauer, 1996].

In der naturwissenschaftlich orientierten westlichen Medizin wurde in den 20er Jahren dieses Jahrhunderts erstmals über die Möglichkeit einer nasalen Applikation zur (systemischen) Therapie berichtet. Es wurden hierbei pulverisierte Hypophysenhinterlappen zur Therapie des Diabetes insipidus centralis eingesetzt. Erst mehrere Jahrzehnte später standen synthetische Substanzen für die Therapie dieser Erkrankung zur Verfügung, die ebenfalls über diesen Weg dem Organismus zugeführt werden (z.B. Desmopressin) [Choay und Choay, 1946; Carter und Shorr, 1947; Fredrikson, 1996].

An diesem Beispiel wird deutlich, für welche Substanzgruppen der nasale Applikationsweg hauptsächlich verwendet wird. Durch Umgehung des Gastro-Intestinal-Traktes (GIT) und des First-pass-Effektes der Leber ist so die Gabe von Peptiden bzw. allgemein von „High-clearance-drugs“ möglich.

In Tabelle 1.2. sind Beispiele für solche Substanzen angegeben, für die - in der Regel erfolgreich - Untersuchungen zur nasalen Applikation mit dem Ziel einer Erhöhung der systemischen Verfügbarkeit durchgeführt wurden.

Huang gelang es, die Bioverfügbarkeit von Indomethacin an Ratten durch Nasalapplikation signifikant zu erhöhen [Huang et al., 1995]. Da jedoch die nach Verabreichung nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAID's) zu beobachtenden GIT-Nebenwirkungen im wesentlichen auf deren systemischen Wirkmechanismus zurückzuführen sind (s. Kapitel 3.4.3.), ist dieser Ansatz hier eher fraglich. Im Gegensatz dazu konnte durch die Umgehung des GIT für den α -Adrenozeptor-Antagonisten Bromocriptin bei Anwendung als nasale Zubereitung neben einer Umgehung von First-pass-Mechanismen auch eine deutlich bessere Verträglichkeit erreicht werden [Cicinelli et al., 1996].

Tab. 1.2.: Beispiele für nasal applizierbare Substanzen zur sytemischen Anwendung.	
Wirkstoffe	Quelle
Hormone und Releasinghormone	
Calcitonin	[Reginster et al., 1994; Foti et al., 1995; Reginster et al., 1995; Avioli, 1996; Plosker und Mctavish, 1996; Thamsborg et al., 1996]
Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH)	[Bergquist et al., 1979]
Choriongonadotropin	[Mutschler, 1996]
Thyreotropin-Releasinghotmon (TRH)	[Jorgensen und Bechgaard, 1994]
Somatotropin	[Albertssonwikland et al., 1995; Laursen et al., 1996]
Progesteron	[Hussain et al., 1981; Cicinelli et al., 1994]
Erythropoietin	[Shimoda et al., 1995]
Neuropeptid Y	[Lacroix et al., 1996]
Insulin	[Dondeti et al., 1995; Merkus et al., 1996; Valensi et al., 1996]
Elcatonin, ATCH	[Cremaschi et al., 1991; Cremaschi et al., 1996a; Cremaschi et al., 1996b]
High-clearance-drugs	
Propranolol	[Hussain et al., 1979; Ahn et al., 1995]
Verapamil	[Yazan et al., 1996]
Nitroglycerin	[Hill et al., 1981]

In einigen Fällen konnte auch eine Immunisierung über eine nasale Applikation von Impfstoffen erzielt werden. So gelangen Impfungen gegen Diphtherie und Tetanus beim Meerschwein [Gizurason et al., 1996] und gegen Influenza-Viren beim Menschen [Hashigucci et al., 1996].

Neben der erwünschten Aufnahme bei Nasalapplikation zur Verbesserung der systemischen Verfügbarkeit kann es über die Atemwege – auch über die Nasalschleimhaut - zu einer Resorption von toxischen Substanzen, z.B. Acrolein, Acetaldehyd oder Chloroform kommen [Larson et al., 1996; Morris, 1996; Morris, 1997].

1.2. Wirkstofftransport in das ZNS und Möglichkeit zur Erhöhung seiner Selektivität:

Applikation auf die Nasenschleimhaut: Bei Arzneistoffen mit dem Zielort ZNS wurde in vielen Fällen eine gute Wirksamkeit bei Nasalapplikation gefunden. Zur Therapie von Migräne konnte die Wirksamkeit von nasal appliziertem Dihydroergotamin [Humbert et al., 1996] wie auch von Lidocain [Maizels et al., 1996] gezeigt werden. Zur Narkosevorbereitung bei Kindern wurde Ketamin auf nasalem Weg erfolgreich eingesetzt [Malinovsky et al., 1996]. Wallace diskutiert die nasale Anwendung von Benzodiazepinen zur Therapie von epileptischen Anfällen bei Kindern [Wallace, 1997]. Als neuere Möglichkeit zur Unterstützung der Raucherentwöhnung stehen seit einiger Zeit verschiedene Zubereitungen von Nikotin zur nasalen Anwendung zur Verfügung [Sutherland et al., 1992; Schneider et al., 1995; Nightingale, 1996; Schneider et al., 1996; Tonnesen et al., 1996].

Von verschiedenen Autoren wird berichtet, daß die Anwendung von schleimhautabschwellenden Nasentropfen (α -Sympathomimetika; z.B. Phenylephrin) im Falle von Überdosierung und/oder chronischem Gebrauch zu toxischen Psychosen führen [Snow et al., 1980; Escobar und Karno, 1982]. Auch sind erhebliche zentralnervöse Nebenwirkungen (Agitiertheit, Schlaflosigkeit, Angstzustände mit Halluzinationen sowie epileptiforme Anfälle) insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern - auch bei ordnungsgemäßigem Gebrauch - beobachtet worden [Soderman et al., 1984]. In einer toxikologisch ausgerichteten Studie mit an Kokain gewöhnten Probanden konnte dem gegenüber kein Unterschied in der psychotropen Wirkung zwischen nasal appliziertem Kokain und Lidocain erkannt werden [Van Dyke et al., 1979]. In einer weiteren Arbeit zur Untersuchung der Pharmakodynamik von nasal appliziertem Kokain an gesunden Probanden sollte ebenfalls Lidocain als lokalanästhetisch wirksames Placebo dienen. Im Verlauf der Studie zeigte sich interessanterweise, daß die als „Placebo“ nasal applizierte Dosis von 0,2 mg/kg KG Lidocain bei den Versuchspersonen eine stärkere psychotrope Wirkung aufwies, als eine entsprechende Dosis Kokain. Demgegenüber zeigte bei i.v.-Gabe Lidocain keinerlei, Kokain aber einen starken ZNS-Effekt [Van Dyke et al., 1982].

Ergänzt wird dieser Befund durch eine Arbeit von Fischman, der signifikante Unterschiede in der psychotropen Wirkung zwischen i.v.-Kokainbehandlung einerseits und i.v.-Applikation von Placebo bzw. Lidocain feststellen konnte, so daß offensichtlich für das Ausmaß der psychotropen Wirkung eine deutliche Abhängigkeit vom Applikationsweg besteht [Fischman et al., 1983].

Cholezystokinin wie auch Vasopressin führen nach nasaler Gabe zu höherer Aktivität in speziellen EEG-Ableitungen - jeweils im Vergleich zur i.v.-Gabe - [Pietrowsky et al., 1996a; Pietrowsky et al., 1996b].

Bei tierexperimentellen Untersuchungen konnten weitere Substanzen identifiziert werden, die nach Applikation auf die Nasalmukosa einen ausgeprägten ZNS-Effekt haben. Es konnte von Seki gezeigt werden, daß eine gemeinsame nasale Applikation von Zidovudin und Probenecid zu einer hohen CSF-Konzentration von Zidovudin führt [Seki et al., 1994]. Ähnliche Effekte konnten nach nasaler Gabe von Cephalexin an der Ratte [Sakane et al., 1991b] beschrieben werden. Am Schaf konnte nach i.n.-Applikation von Morphin-6-Glucuronid Analgesie [Illum et al., 1996] und an der Ratte nach i.n.-Gabe von Propiomazin Sedation [Bjerre et al., 1996] beobachtet werden.

Bei toxikologischen Untersuchungen an Ratten konnte von Tjalve nachgewiesen werden, daß Mangan-(Mn²⁺)-Ionen über das Riechepithel aufgenommen und über sekundäre und tertiäre Neurone im ZNS verteilt werden. Im Gegensatz dazu war eine entsprechende

Verteilung von Cadmium-(Cd²⁺)-Ionen nur in Teilen des Bulbus olfactorius zu beobachten [Tjalve et al., 1996].

Die Besonderheiten der Blut-Hirn-Schranke als Permeationsbarriere: Die Hintergründe für eine Applikation auf die Nasenschleimhaut waren zunächst die Umgehung des First-pass-Effektes, der bei peroraler Gabe eine große Rolle spielen kann. Unabhängig davon, ob nun ein Wirkstoff systemisch oder auch lokal appliziert wird, gehorcht der Transport vom Blut in das ZNS offensichtlich anderen Gesetzen als der in die peripheren Gewebe. Diese Sonderstellung ist zunächst vor allem dadurch bedingt, dass die Blutkapillaren im Bereich des Gehirns im Gegensatz zu anderen Geweben im Normalzustand keine Fenestrierung aufweisen und somit die die Kapillaren auskleidenden Endothelzellen eine dichte Barriere darstellen. Seit langem weiß man, dass hydrophile Verbindungen (z.B. quartäre Substanzen) in nur sehr geringem Ausmaß durch die Blut-Hirn-Schranke permeieren. Eine Beziehung zwischen physikochemischen Eigenschaften und Lipophilie wird beschrieben, d.h. sehr hydrophile Substanzen werden nur dann in das ZNS aufgenommen, wenn sie über aktive Transportmechanismen die Membranen der Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke passieren können [De Lange und Danhof, 2002]. Die Verteilung in spezielle Subkompartimente des Gehirns ist vor allem dann von Bedeutung, wenn – erwünschte oder auch unerwünschte – Arzneistoff-Effekte eine bestimmtes Ausmaß der Verteilung in das ZNS voraussetzen [Welch et al., 2002].

Problematik bei Kinetik-Dynamik-Korrelationen und mechanistischen prädiktiven Berechnungen: Unter klinischen Bedingungen verwendet man oft die vergleichsweise problemlos zugängliche CSF als Surrogatmatrix, um Arzneistoffkonzentrationen am „Zielort Gehirn“ zu messen. Allerdings muß schon aufgrund der völlig verschiedenen Zusammensetzung der Gewebe bzw. Matrices hier in der Regel weiter differenziert werden. Man weiß heute außerdem, dass neben den seit längerer Zeit bekannten aktiven nach innen gerichteten Transportprozessen (z.B. für Aminosäuren) auch auswärts gerichtete Transportprozesse von großer Bedeutung sind [Tsuji et al., 1992; Eisenblätter und Galla, 2002]. Von besonderem Interesse sind hierbei heute die exsorptiven Transporter vom Typ des ABC-Transporters 170-P-Glykoprotein. Durch die unterschiedliche Verteilung der Transporter in den verschiedenen Gewebeteilen ist eine Kompartimentierung bedingt, die zu komplexen Beziehungen zwischen der Blutkonzentration, der CSF-Konzentration und der Konzentration in anderen Hirngewebe-Kompartimenten sowie dem Effekt führen kann [De Lange und Danhof, 2002].

Die große Relevanz von Transportern in der Blut-Hirn-Schranke macht deutlich, dass der prädiktive Wert verschiedener Rechenmodelle, die vorwiegend auf der Lipophilie basieren, eingeschränkt ist [Ooms et al., 2002; Rose et al., 2002].

Eine Verbindung, bei der aufgrund des therapeutischen Einsatzes die CSF-Konzentrationen von essentieller Bedeutung sind, ist das antispastische Baclofen (s. 2.3.). Hier wurde eine gute Korrelation zwischen der Dosis und der CSF-Konzentration und ein deutlicher dosisabhängiger Effekt bei intrathekalen Gabe gefunden [Müller et al., 1995].

Mikrodialyse wird in Bezug auf die Untersuchung der Korrelation von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik unter besonderer Berücksichtigung des Wirkortes allgemein als großer Fortschritt angesehen, der bei in Geweben wirksamen Substanzen erstmals einen Zugang zu den freien Wirkkonzentrationen bot.

Mit Hilfe von derartigen Mikrodialyseexperimenten konnte in den Untersuchungen von Silva et al. für L-Dopa, D-Amphetamin und Kokain im Gehirn eine massive Konzentrationssteigerung für Dopamin und verschiedene Metabolite bei nasaler Gabe beobachtet werden. Im Falle von Kokain waren die gefundenen Dopamin-Konzentrationen ipsilateral signifikant höher als auf der kontralateralen Seite, was einen Transport zum Wirkort über den systemischen Kreislauf ausschließt [Silva et al., 1997]. In weiteren

Versuchen an Ratten wurden Hinweise auf die notwendigen Eigenschaften der applizierten Substanzen gewonnen, wenn durch nasale Applikation eine selektivere Verteilung in das Gehirn oder den Liquor cerebrospinalis erreicht werden soll. In einer Reihe von Untersuchungen konnte Sakane die Abhängigkeit der molaren Masse, des Dissoziationsgrades und der Lipophilie beim direkten Transport von der Nasenhöhle in den Liquorraum der Ratte studieren. Es zeigte sich hierbei, daß das Ausmaß der Penetration in die CSF bei der Untersuchung von Dextranen mit steigender molarer Masse abnimmt [Sakane et al., 1995]. Am Beispiel von Sulfisomidin konnte gezeigt werden, daß eine Absorption und der Transport in die CSF um so vollständiger verläuft, je höher der undissoziierte Anteil des Wirkstoffs lag [Sakane et al., 1991a und 1994].

In vielen Fällen kann sowohl das Ausmaß als auch die Geschwindigkeit der nasalen Aufnahme durch die Anwesenheit von Hilfsstoffen, d.h. durch die galenische Zubereitung durch Zusatz von Hilfsstoffen verbessert werden. In Übersichten von verschiedenen Autoren wird der Einsatz solcher Zusatzstoffe diskutiert [Dondeti et al., 1996; Rajewski und Stella, 1996; Sayani und Chien, 1996; Nakamura et al., 2002]. Eine der meist verwendeten Hilfsstoffgruppen stellen Cyclodextrine dar, die – aufgrund der unzureichenden Löslichkeit der Substanz - auch in der vorliegenden Arbeit bei der Untersuchung von R/S-Baclofen verwendet wurden (s. Kapitel Experimenteller Teil).

Die Bedeutung des Transportes durch die Blut-Hirn-Schranke in die verschiedenen Bereiche des Rückenmarks und Gehirns ist von besonderem Interesse bei ZNS-aktiven Verbindungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Substanzen mit sehr unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften, unterschiedlichem kinetischen Verhalten und unterschiedlichen Wirkmechanismen ausgewählt, die in den folgenden Kapiteln charakterisiert sind.

2. Beschreibung der untersuchten Wirkstoffe

2.1. Kokain – Verwendung, Wirkungsmechanismen und Kinetik

Kokain wird aus den Blättern des in Bolivien, Peru, aber auch Malaysia heimischen Kokastrauches *Erythroxylum coca* gewonnen. Das Kauen von mit Kalk vermischten Kokablättern ist im Nordosten von Südamerika bereits seit mehreren tausend Jahren bekannt. Es ist anzunehmen, daß noch bis zur Zeit der Eroberung Perus durch den Spanier Pizarro zwischen 1531 und 1533 der Genuß von Kokablättern als rituelle Handlung nur zu bestimmten Anlässen und/oder nur von ausgewählten Persönlichkeiten der Führungskaste (Inkas) angewendet wurde. Dem Mythos nach stellt die Kokapflanze ein Geschenk von *Manko Kapak* („Sohn der Sonne“) an die Menschen dar. Die göttliche Gabe des Kokastrauches sollte den Hungrigen sättigen, dem Erschöpften neue Kräfte bringen und den Betrübten erheitern [Schmidbauer und vom Scheidt, 1989].

Seit den 20er Jahren wurden Europa und die USA mehrfach von Kokainwellen überschwemmt. In Deutschland wird geschätzt, daß bis zu 1 Million Menschen mindestens einmal in ihrem Leben Kokain konsumiert haben, typische Kokainabhängige sind jung (12 bis 39 Jahre), stellen meist Polytoxikomane dar (Mißbrauch von mindestens drei psychotropen Substanzen), 75% sind männlich und leiden unter psychischen Begleitstörungen wie Phobien, Depressionen, paranoiden Psychosen oder Schizophrenien [Leduc und Mittleman, 1995].

Kokain ist das erste in die Klinik eingeführte Lokalanästhetikum. Trotz der Entwicklung einer Anzahl anderer Lokalanästhetika wird Kokain auch heute noch für diese Indikation in der Therapie eingesetzt. Kokain findet Verwendung als Lokalanästhetikum bei Eingriffen am Auge, Kehlkopf, Nase, Ohr, Rachen oder Kiefer. Die Applikation erfolgt entweder als Lösung oder Salbe. Zu beachten ist jedoch, daß auch bei solchen lokalen Anwendungen aufgrund der guten Resorptionseigenschaften der entsprechenden Schleimhäute schwerwiegende, durch die Aufnahme in den systemischen Kreislauf bedingte Komplikationen (z.B. Myocardinfarkt) auftreten können [Moliterno et al., 1994; Ashchi et al., 1995; Aggarwal et al., 1996].

Kokain intensiviert die synaptischen Wirkungen der Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Serotonin durch Hemmung der Wiederaufnahme in die präsynaptischen Nervenendigungen. Der Einfluß auf das dopaminerge System stellt für die verhaltensverstärkenden und psychostimulierenden Eigenschaften die Hauptursache dar. Es konnte gezeigt werden, daß durch Dopamin wie auch durch Kokain die Entladungsfrequenz von Neuronen in der Area tegmentalis ventralis und im Nucleus accumbens vermindert werden. Es folgt daraus, daß diese Inhibition zu einer positiven Verhaltensverstärkung führt („Hemmung einer Hemmung“). Neben Dopamin ist auch Serotonin an den psychischen Wirkungen des Kokains beteiligt. Es war nachweisbar, daß ein Mangel an Serotonin die Wirksamkeit von Kokain steigert.

Als Wirkungen kann nach Kokaingebrauch eine zentrale Stimulation beobachtet werden, die zu erhöhter Wachheit, Hyperaktivität, gesteigerter psychischer und physischer Leistung sowie Belastbarkeit (Verwendung als Dopingmittel im Spitzensport [Rote Liste, 1996]), erhöhtem Selbstvertrauen, Euphorie sowie sexueller Stimulation führt. Diese positiven Emotionen schlagen innerhalb kurzer Zeit (bei Anwendung von Crack-Zubereitungen innerhalb von Minuten) in gegenteilige Empfindungen um. Es kommt zu Gefühlen der Mutlosigkeit, Verzweiflung und Niedergeschlagenheit, die nur durch Zufuhr einer neuen Dosis Kokain beseitigt werden können. Aus diesem Grund muß die Droge im Fall von Schwerstabhängigen mehrfach stündlich zugeführt werden [Mendelson und Mello, 1996].

Als vegetative Reaktionen sind ein Anstieg des Blutdrucks, der Körpertemperatur, der Herz- und Atemfrequenz sowie die Entwicklung einer Mydriasis zu beobachten. Im Rauschzustand können die psychisch aktivierenden Eigenschaften bis zu Halluzinationen führen, die mit Angst und Panikreaktionen einhergehen, der Gebrauch von Kokain in der Schwangerschaft führt zu schweren pränatalen neurologischen Störungen beim Kind („jittery baby syndrome“)

[Elbert und Rockstroh, 1990; Stafford-Clark und Smith, 1991; Stranorossi et al., 1996; Julien, 1997].

Die Applikation von Kokain ist auf vielfältige Weise möglich. Eine buccale Aufnahme ist insbesondere beim o.g. Kauen von mit Kalk (Base) vermischten Cocablättern durch Freisetzung der freien Kokainbase anzunehmen [De Smet, 1985]; eine orale Gabe scheint für diesen Wirkstoff den in Bezug auf die Bioverfügbarkeit am schlechtesten geeigneten Applikationsweg darzustellen, obwohl meßbare Plasmaspiegel erreicht werden können [Van Dyke et al., 1978]. Neben einer direkten parenteralen (intravenösen) Gabe ist der schnellste Wirkungseintritt durch pulmonale Aufnahme der freien Base (Straßenbezeichnung: „Crack“, „free Base“) zu erreichen [Iten, 1994; Julien, 1997]. Aufgrund des schnellen Wirkungseintritts, der niedrigen Kosten der Crack-Zubereitung und dem vermeintlich saubereren Aufnahmeweg (keine Gefahr einer Hepatitis oder HIV-Infektion) nahm der Kokainmißbrauch in den letzten 10-15 Jahren stark zu [Haim et al., 1995]. Schließlich ist die weit verbreitete Aufnahme von Kokain auf nasalem Weg zu nennen [Iten, 1994; Julien, 1997].

PET-Untersuchungen mit ^{11}C -Kokain wurden zur genaueren Aufklärung des Verteilungsverhaltens von Kokain durchgeführt. Sie zeigten deutlich, dass ^{11}C -Kokain ein geeigneter Radiotracer für den Dopamin-Transporter (DAT) ist. Neben der hohen DAT-Affinität für Kokain wurde auch eine Besetzung der entsprechenden Bindungsstellen durch Methylphenidat nachgewiesen [Fowler et al., 2001].

Kokain durchdringt leicht die Blut-Hirn-Schranke und reichert sich schnell im zentralen Nervensystem (ZNS) an. Nach i.v. Applikation zeigt Kokain einen biexponentiellen Kurvenverlauf.

In der Leber wird Kokain innerhalb kurzer Zeit (30 bis 90 Minuten) fast vollständig metabolisiert [Rofael and Abdel-Rahman, 2002; Sun and Lau, 2001; Lau and Sun, 2002]. Im Blut zirkulierende Plasmaesterasen sind ebenfalls in der Lage, Kokain abzubauen. Auch die Hauptmetaboliten zeigen nach i.v.-Gabe der Muttersubstanz einen biexponentiellen Kurvenverlauf. In Form von biologisch inaktivem Benzoyllecgonin und von Norkokain wird ein Teil der Dosis renal ausgeschieden, auch Ecgonin-Methylester wurde als (Ecgonin-) Metabolit nachgewiesen [Morishima et al., 2001]. Aufgrund dieses kinetischen Profils und der Biotransformationswege werden schwere Intoxikationsverläufe nach einer einmaligen Applikation von Kokain in therapeutischer oder sogar subtherapeutischer Dosis (Einnahme von 30 mg) verständlich. Es handelt sich hierbei um solche Patienten, bei denen bestimmte Enzymdefekte (Kokain-Idiosynkrasie) vorliegen, die zu einer deutlichen Verlängerung der Wirkungsdauer, sowie verstärkter Intensität der Kokainwirkung führen [Iten, 1994]. Weitere schwere Komplikationen können auftreten, wenn bei den betroffenen Patienten eine nicht erkannte Schädigung des Herz-Kreislauf-Systems (z.B. Aneurisma) vorliegt [Riddick, 1994; Billman, 1995; Davis und Swalwell, 1996]. Ursache für das Auftreten von cerebralen Blutungen kann neben einem Blutdruckanstieg auch die Zunahme des cerebralen Blutflusses in verschiedenen Gehirnbereichen nach Kokainkonsum sein [Mathew et al., 1996]. Darüber hinaus konnte in Tierstudien gezeigt werden, daß Kokain Spasmen der Gehirngefäße auslöst, die dann ebenfalls zu Sauerstoffmangel im Gehirngewebe führen [He et al., 1994].

Die Therapie eines Kokainmißbrauchs gestaltet sich in der Regel sehr schwierig. Im Gegensatz zur Methadonsubstitution [Julien, 1997], dem sog. „Turboentzug“ unter Vollnarkose bei Opiatabhängigkeit [Legarda und Gossop, 1994] oder den flankierenden medikamentösen Maßnahmen bei der Alkoholentwöhnung [z.B. Gabe von Antabus[®] (Disulfiram), Nemexin[®] (Naltrexon) oder Campral[®] (Acamprosat)] ist ein pharmakologisch unterstützter Kokainentzug noch nicht möglich, wenn auch Ansatzpunkte hierzu gefunden wurden: Bei klinischen Untersuchungen wurden z.B. vor allem Antidepressiva (Desipramin, Lithiumsalze) eingesetzt, wobei jedoch die beobachteten (geringfügigen) günstigen Effekte möglicherweise auf die Therapie einer entsprechend vorhandenen Grunderkrankung zurückzuführen sind [Siegel, 1985; Mendelson und Mello, 1996; Julien, 1997].

Sowohl in offenen wie auch Placebo-kontrollierten Studien zeigte sich ein positiver Effekt von Bromocriptin auf das „Craving“ („Suchtdruck“) und die Dysphorie bei der Kokainentgiftung. Bei gleichzeitigem Mißbrauch von Kokain und Opiaten hat sich die

Behandlung von Buprenorphin in präklinischen Studien als vorteilhaft erwiesen [Mendelson und Mello, 1996].

In Zukunft kann möglicherweise eine Antikörper-katalysierte Entgiftung von Kokain möglich sein. Ziel des bereits vor einigen Jahren publizierten Konzepts ist die Weiterentwicklung derartiger Antikörper bis zu einer Art „Schutzimpfung“ gegen Kokaingebrauch [Landry et al., 1993].

Insgesamt ist jedoch bis heute kein pharmakologisches Verfahren zur Unterstützung des Kokainentzugs etabliert. Lediglich Abstinenz, Rückfallprävention sowie eine Aufklärung der Ursachen für eine Kokaineinnahme mit Therapie entsprechender zugrunde liegender psychischer Störungen sind gesicherte Behandlungsmethoden.

Aufgrund der hohen Rückfallquoten stellt jedoch die Prävention der Kokainabhängigkeit den besten Therapieansatz dar [Siegel, 1985; Stafford-Clark und Smith, 1991; Julien, 1997].

2.2. Tranylcypromin

2.2.1. Charakterisierung affektiver Störungen (Depressionen), einem wichtigen Indikationsgebiet für Tranylcypromin

Affektive Störungen sind weit verbreitet; etwa 20% aller Menschen leiden im Laufe ihres Lebens unter einer depressiven Episode. Bei der Hälfte der betroffenen Personen wird die Störung so schwer, daß eine Behandlung erforderlich wird. Als Depression werden psychische Verstimmungen bezeichnet, die für den Außenstehenden nicht nachvollziehbar sind [Elbert und Rockstroh, 1990].

Depressionen sind durch den Verlust des Interesses und/oder der Freude an einem Großteil aller Tätigkeiten und Freizeitbeschäftigungen gekennzeichnet. Es zeigt sich eine Herabgestimmtheit; die Patienten sind verzweifelt, leiden unter Antriebsmangel, sind hoffnungs-, appetit- und schlaflos. Sie zeichnen sich durch verlangsamtes Denken, Konzentrationsschwierigkeiten und Hilflosigkeit aus. Trotz Müdigkeit und Abgeschlagenheit sind Patienten häufig von einer quälenden inneren Unruhe erfaßt, die zu Schlafstörungen führen. Äußert sich eine Depression nicht in psychischen, sondern in physischen Symptomen wie Kopfschmerz, Herz- oder Oberbauchbeschwerden, spricht man von „larvierten Depressionen“ [Elbert und Rockstroh, 1990]. Depressionen sind häufig von Angstzuständen begleitet; ca. 15% aller depressiven Patienten sterben durch suizidale Handlungen [Julien, 1997]. In einer retrospektiven Untersuchung konnte gezeigt werden, daß 70% aller Suizidopfer unter depressiven Störungen gelitten haben [Stafford-Clark und Smith, 1991].

Die Ursachen, die zum Ausbruch einer Depression führen, sind bis heute nicht endgültig geklärt. Eine wichtige Rolle spielt ein neurochemisches Ungleichgewicht, an dessen Entstehen die Monoamine Noradrenalin, Serotonin und möglicherweise Dopamin beteiligt sind.

Nach der „Monoaminhypothese“ kommt es beim Mangel von spezifischen Neurotransmittern (z.B. Noradrenalin oder Serotonin) in bestimmten Hirnarealen zu depressiven Verstimmungen, bei einem Überschuß zeigen sich dagegen Symptome einer Manie.

Im Gegensatz zu dieser Hypothese steht jedoch, daß sich unter der Therapie die serotonerge und noradrenerge Neurotransmission innerhalb von Stunden bis Tagen normalisiert wird, während sich ein klinischer antidepressiver Effekt erst nach mehreren Wochen zeigt. Dies spricht dafür, daß die Erhöhung der Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt nur den ersten Schritt einer sich anschließenden Reihe von zellulären Veränderungen darstellt wie Down-Regulation von β - oder Up-Regulation von α_1 -Rezeptoren [Elbert und Rockstroh, 1990; Stafford-Clark und Smith, 1991; Mutschler, 1996; Julien, 1997]. Es muß jedoch klar festgestellt werden, daß die Monoaminhypothese nur ein Teil einer multifaktorellen Genese ist. Bei Ausbruch einer Depression ist das Zusammentreffen von anlagebedingter Vulnerabilität, Lernprozessen, kognitiven Schemata,

verstärkerorientierenden Verhaltensstrategien, Bewältigung von kritischen Lebensereignissen und physiologischen Prozessen zu postulieren, die schließlich zu einem Mißverhältnis zwischen Bewältigungsanforderungen und Reserven führen, welches zu einem endgültigen Zusammenbruch führen kann [Elbert und Rockstroh, 1990].

2.2.2. Therapiemöglichkeiten – Einordnung des Tranylcypromin

Zur Therapie von depressiven Störungen sind eine ganze Reihe von antidepressiv wirksamen Pharmaka in die Therapie eingeführt. Antidepressiva lassen sich nach ihrem Wirkprofil in verschiedene Gruppen einteilen. Nach Kielholz und Pöldinger werden folgende Gruppen unterschieden:

- ◆ Substanzen vom Desipramintyp: Antidepressiv, psychomotorisch aktivierend, antriebssteigernd, eher angstfördernd als angstdämpfend.
- ◆ Substanzen vom Imipramintyp: Antidepressiv, neutral bezüglich psychomotorischer Beeinflussung.
- ◆ Substanzen vom Amitriptylintyp: Antidepressiv, psychomotorisch hemmend, angstdämpfend.

Die Wirkmechanismen der Antidepressiva sind noch nicht bis ins letzte Detail geklärt, jedoch kann durch zahlreiche Befunde der Einfluß auf die Neurotransmitter-Rezeptor-Interaktion gezeigt werden (s.o. „Monoaminhypothese“). Es konnte nachgewiesen werden, daß die meisten antidepressiv wirksamen Stoffe die Wiederaufnahme von Noradrenalin und/oder Serotonin aus dem synaptischen Spalt hemmen. Der Einfluß von verschiedenen Antidepressiva auf verschiedene Neurotransmittersysteme ist unterschiedlich ausgeprägt, so daß früher eine Reuptake-Hemmung von Noradrenalin mit einer Antriebssteigerung und die entsprechende Wiederaufnahmehemmung von Serotonin mit einer Stimmungsaufhellung verbunden wurde. Diese Vorstellung wird jedoch durch neuere Substanzen (z.B. Mianserin), die trotz guter klinischer Wirksamkeit den Reuptake von Monoaminen nicht unterdrücken, in Frage gestellt [Mutschler, 1996].

Im Gegensatz hierzu kommt es bei der Anwendung von MAO-Hemmern zu einer mehr oder weniger selektiven, irreversiblen bzw. reversiblen Hemmung der MAO-Subtypen, die - neben der Catecholamin-o-Methyl-Transferase (COMT) - durch oxidative Desaminierung Catecholamine inaktivieren. Nach Hemmung der MAO steigt die Konzentration der entsprechenden Monoamine im ZNS an [Ravindranath und Boyd, 1995; Julien, 1997].

2.2.3. Pharmakologie und Toxikologie des Tranylcypromin (TCP)

Bei TCP handelt es sich um einen nichtselektiven, irreversiblen Hemmer beider MAO-Subtypen. Die Substanzgruppe der MAO-Hemmer stellte Anfang der 50er Jahre die ersten in die Therapie von Depressionen eingeführten Pharmaka dar. Es zeigte sich bereits nach kurzer Zeit, daß schwere, u. U. sogar tödliche Nebenwirkungen bei Anwendung dieser Substanz auftreten können [Chatterjee und Tosyali, 1995; Munjack und Adler, 1996]. Durch die irreversible und unspezifische Hemmung beider MAO-Subtypen, kann es durch Interaktion mit anderen Wirkstoffen (Sympathomimetika) oder tyraminhaltigen Nahrungsmitteln (Käse, Rotwein, Leber) zu hypertonen Krisen kommen, da diese Substanzen als MAO-B-Substrate nicht mehr rasch genug metabolisiert werden können und so im Organismus kumulieren. Aus diesem Grund wurde TCP lange Zeit als ein sehr risikoreicher Wirkstoff angesehen [Berlin und Lecrubier, 1996].

Tranylcypromin erlebt jedoch heute aus mehreren Gründen ein „Come-back“ [Julien, 1997]:

- ◆ Wenn entsprechende Diätvorschriften eingehalten werden, verursachen irreversible MAO-Hemmer weniger Nebenwirkungen als trizyklische Antidepressiva (TCA).
- ◆ Gerade Patienten, die auf die Behandlung mit TCA's oder selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer (SSRI) nicht oder nur schlecht angesprochen haben, lassen sich mit MAO-Hemmern gut behandeln [Joffe, 1997].
- ◆ MAO-Hemmer zeigen bei sog. „atypischen“ Depressionen mit verlängerter Schlafdauer, Appetit- und Gewichtszunahme eine bessere Wirkung als TCA's.

Zur Behandlung von depressiven Störungen wird Tranylcypromin (Parnate[®]) in einer Dosierung von 5 bis 60 mg/Tag eingesetzt. Die Plasmahalbwertszeit (pharmakokinetische Halbwertszeit) ist mit 2 Stunden sehr kurz (keine Gefahr einer Kumulation), jedoch genügen meist jeweils 5 mg morgens und mittags, um eine ausreichende Wirkung zu erreichen.

Außer zur Therapie von Depressionen wurde TCP auch erfolgreich zur Behandlung der Narkolepsie eingesetzt. [Gernaat et al., 1995].

Wie in Abbildung 3.1. gezeigt, ist eine direkte Korrelation zwischen der Plasmakonzentration und dem Ausmaß der Wirksamkeit nicht möglich [Mallinger et al., 1990; Mallinger und Smith, 1991; Julien, 1997]. Dies ist dadurch bedingt, daß TCP nach Resorption in einen aktiven Metaboliten umgewandelt wird, der irreversibel an beide MAO-Subtypen bindet („suicide-inhibitor“). Dementsprechend beträgt die pharmakodynamische Halbwertszeit mehrere Tage, d.h. bis eine Neusynthese der MAO erfolgt ist [Paech et al., 1980; Penning, 1983; Silverman, 1983; Fagervall und Ross, 1986].

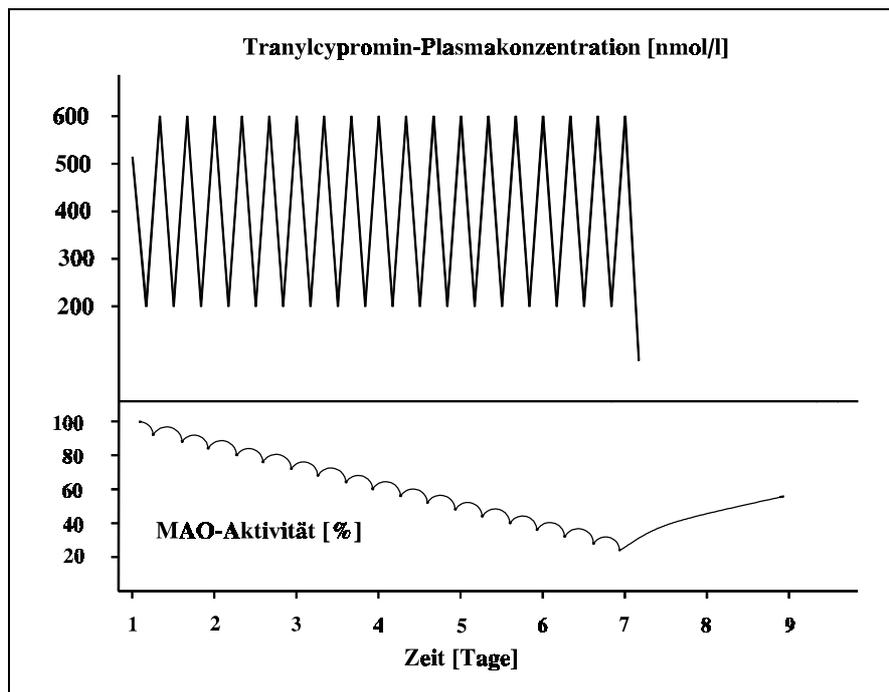


Abb. 3.1.: Tranylcypromin-Plasmaspiegel (3×10 mg/Tag) im Vergleich zur MAO-Aktivität [entnommen aus Julien, 1997].

Nur nicht metabolisiertes TCP wird nach hepatischer Metabolisierung ausgeschieden. Insgesamt erscheinen 71% der Dosis im Urin, jedoch nur ca. 5% als unveränderte Muttersubstanz. Als einer der Hauptmetabolite wird das 4-Hydroxy-TCP angesehen. Ob TCP in-vivo zu Amphetamin umgebaut werden kann, ist nach wie vor strittig und nicht eindeutig geklärt [Baker und Coutts, 1989]. Die meisten neueren Arbeiten deuten allerdings auf ein Nichtvorhandensein dieses Biotransformationsweges hin [Baker et al., 1999; Sherry et al., 2000].

Im Gegensatz zur antidepressiven Wirkung, sind kardiovaskuläre Nebenwirkungen wie z.B. Blutdruck- und Herzfrequenzsteigerung des TCP mit der Plasmakonzentration korrelierbar [Mallinger et al., 1986].

Der Wirkungseintritt ist bedingt durch den Wirkmechanismus verzögert; erst am siebten Tag einer Dauertherapie mit 3×10 mg TCP/Tag zeigt sich eine 70%ige Hemmung der MAO-Aktivität (s. Abb. 3.1.).

TCP ist als Razemat im Handel, wobei das (+)-Enantiomer (1S,2R) eine stärkere Hemmwirkung auf die MAO-Subtypen besitzt, während das (-)-Enantiomer (1R,2S) überwiegend den Reuptake von Catecholaminen aus dem synaptischen Spalt hemmt [Fuentes et al., 1975; Reynolds et al., 1980; Hampson et al., 1986; Tuomisto und Smith, 1986; Coutts und Baker, 1989]. Neben der unterschiedlichen Pharmakodynamik der beiden

TCP-Enantiomere werden auch Unterschiede in der Pharmakokinetik beobachtet. So liegen nach oraler Gabe beim Menschen die Konzentrationen des (-)-TCP im Blut über den entsprechenden Konzentrationen des (+)-Isomers. [Spahn-Langguth et al., 1992; Weber-Grandke et al., 1993; Fachinformation Jatrosom[®] N, 1994].

TCP wird in neuerer Zeit häufig als Biotransformationsinhibitor beim Screening der Rolle von CYP-Isoformen (CYP 2C19) im Metabolismus von Arzneistoffen eingesetzt [Liu et al., 2000]. Allerdings zeigen unveröffentlichte Ergebnisse (Andersson, AstraZeneca Mölndal), dass es sich bei dieser Hemmung nicht (nur) um einen kompetitiven Mechanismus handelt, es findet auch eine – enantioselektive – anscheinend kovalente Bindung an das Enzym statt. Die Umsatzraten von den TCP-Enantiomeren selbst an CYP-Isoenzymen sind bislang nicht bekannt.

Das diastereomere cis-Enantiomerenpaar des Tranylcypromins besitzt keine biologische Aktivität und wird daher nicht als Pharmakon eingesetzt. Als Nebenwirkungen von TCP treten negative Einflüsse auf die Blutdruckregulation auf (Hypo- bzw. Hypertonie), Herzrhythmusstörungen, weiterhin kann es zu Schlafstörungen, Übelkeit und Kopfschmerzen kommen. In seltenen Fällen zeigten sich Halluzinationen und zerebrale Krampfanfälle. Wie bei Anwendung aller Antidepressiva ist bei Wiedereinsetzen der Entschlußfähigkeit die Gefahr von Suizidversuchen gegeben [Rote Liste, 1996; Fachinformation Jatrosom[®] N, 1994].

Wegen der irreversiblen MAO-Blockade, deren Aktivität auch über die akute Anwendung von TCP hinaus reduziert ist, müssen vor chirurgischen Eingriffen mit Allgemeinanästhesie oder Umstellung auf andere Pharmaka ausreichend lange Wartezeiten (für die Neusynthese der MAO) eingehalten werden.

2.2.4. Physikochemische und kinetische Eigenschaften - Chiralität

Bei Tranylcypromin und dem nachfolgend beschriebenen Baclofen handelt es sich um Verbindungen, die ein (Baclofen) oder zwei (TCP) stereogene Zentren im Molekül enthalten. Daher existieren für diese Verbindungen verschiedene Stereoisomere (Enantiomere, Diastereomere).

Beim TCP ergeben sich für dieselbe Konstitutionsformel insgesamt vier verschiedene Stereoisomere: jeweils für cis- sowie die trans-Konfiguration am Cyclopropylring ein Enantiomerenpaar. Beim TCP handelt es sich um das Enantiomerenpaar mit der trans-Konfiguration am Cyclopropylring.

Eine der auffallendsten Eigenschaften von Enantiomeren ist ihre optische Aktivität, d.h. die beiden Enantiomere einer chiralen Verbindung drehen die Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes um den gleichen Betrag, jedoch in die entgegengesetzte Richtung. Ebenso zeigt sich unterschiedliches Verhalten bei Reaktionen in chiraler Umgebung, bei denen immer diastereomere Übergangszustände durchlaufen werden (die nur zufällig gleiche Energien aufweisen), woraus unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten resultieren können. Da die makromolekularen Reaktionspartner von Pharmaka (Enzyme, Rezeptormoleküle) selbst chiral sind, stellen diese Moleküle eine entsprechende chirale Umgebung dar, die zu unterschiedlichen pharmakokinetischen und/oder pharmakodynamischen Eigenschaften der Enantiomere eines racemischen Wirkstoffes führen. Aus diesem Grund wird verständlich, daß unterschiedliche biologische Aktivitäten von Enantiomeren dann häufig zu beobachten sind, wenn das Chiralitätszentrum in der für die Bindung an den Rezeptor relevanten Region lokalisiert ist. Es werden Eutomer und Distomer unterschieden, wobei das stärker wirksame bzw. weniger Nebenwirkungen verursachende Enantiomer als das Eutomer und das schwächer bzw. nicht wirksame Enantiomer als Distomer bezeichnet wird. Wie bereits beschrieben besitzen die beiden Enantiomere des TCP verschiedene pharmakodynamische Eigenschaften. Welche der beiden Wirkmechanismen (MAO-Hemmung oder Monoaminwiederaufnahme-Hemmung) die antidepressive Wirkung trägt oder ob ein pharmakodynamischer Synergismus vorliegt, wurde nicht aufgeklärt [Snyder, 1974].

Aufgrund dieser möglichen Unterschiede in Pharmakokinetik und -dynamik von Enantiomeren einer Substanz sollten bei bioanalytischen Untersuchungen nach Applikation

von Enantiomergemischen enantioselektive Analyseverfahren eingesetzt werden. Bereits 1984 wurde es von Ariens als „sophisticated nonsense“ bezeichnet, wenn solche Analysen mit achiralen Methoden erfolgten [Ariens, 1984]. Da - wie oben beschrieben - Enantiomere im achiralen Milieu über die gleichen physikalischen Eigenschaften verfügen, können diese zur Trennung in diastereomere Derivate oder Komplexe überführt werden, die unterschiedliche physikalische Charakteristika aufweisen. Diese Diastereomerenbildung kann über reversible (Komplexbildung) oder kovalente (irreversible) Bindungen (Derivatisierung) erfolgen. Grundsätzlich werden zwei Möglichkeiten unterschieden:

a) Direkte Enantiomerentrennung:

Hierbei wird der Analyt direkt auf ein achirales analytisches System aufgegeben. Das analytische System kann durch den Zusatz von chiralen Additiven zur mobilen Phase (chirale Eluenten; CE) bei Verwendung einer achiralen stationären Phase oder durch den Einsatz einer chiralen stationären Phase (CSP) mit achiraler mobiler Phase chiral werden. Bei beiden Verfahren der direkten Enantiomerentrennung kommt es zwischen den Analytenmolekülen und dem chiralen System zur Bildung von temporären diastereomeren Komplexen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Stabilität bei der Elution verschiedene Retentionszeiten ergeben. Übersichten zu CE und CSP's wurden von verschiedenen Autoren publiziert [z.B. Däppen et al., 1986; Testa, 1986; Pirkle und Murray, 1993; Subert, 1994].

b) Indirekte Enantiomerentrennung:

Bei indirekten Verfahren zur Enantiomerentrennung wird der chirale Analyt mit einem enantiomerenreinen Reagenz zur Reaktion gebracht. Durch Ausbildung von meist kovalenten Bindungen entsteht ein Paar von Diastereomeren, die dann über unterschiedliche physikochemische Eigenschaften verfügen. Aufgrund dieser Unterschiede ist anschließend eine Trennung der Diastereomeren mit Hilfe eines achiralen chromatographischen Systems möglich [Büschges et al., 1997].

Indirekte Methoden werden besonders bei Untersuchungen von biologischen Proben eingesetzt, da durch die Wahl des Derivatisierungsreagenzes die UV-Absorption erhöht oder fluoreszierende Gruppen in den Analyten eingeführt werden können, woraus sich zusätzlich eine verbesserte Abtrennung störender Begleitkomponenten und/oder eine verbesserte Nachweisbarkeit ergibt.

Um mit einem gewünschten Reagenz umgesetzt werden zu können, müssen im Analyten entsprechende funktionelle Gruppen vorhanden sein. Darüber hinaus muß die optische Reinheit des verwendeten Reagenzes hoch und bekannt sein, um exakte Aussagen zum Enantiomerenverhältnis des Analyten geben zu können. Dabei muß ausgeschlossen werden, daß es aufgrund der bei der Derivatisierung durchlaufenden diastereomeren Übergangszustände zu einer unvollständigen oder verlangsamten Reaktion eines Enantiomeren des Analyten kommt, oder daß im Verlauf der Reaktion eine Razemisierung eintritt. Anforderungen an die Eigenschaften, Synthese und Anwendung von chiralen Derivatisierungsreagenzen (CDA's) sind z.B. von Dyas [1992], Büschges et al. [1997] sowie Görög und Gazdag [1994] zusammengefasst werden.

2.3. Baclofen

2.3.1. Pathophysiologie und Therapiemöglichkeiten spastischer Bewegungsstörungen – Die Rolle von Baclofen

Zu einer spastischen Lähmung kommt es, wenn Anteile des Tractus corticospinalis in ihrem Verlauf geschädigt sind. Die Läsion kann im Gehirn selbst oder im Rückenmark liegen. Mögliche Orte der Läsion können die Zellkörper im Gyrus praecentralis, absteigende Fasern in der Capsula interna, im Hirnstamm oder im Rückenmark sein. Am häufigsten liegen die Schädigungen innerhalb einer Hemisphäre vor der Pyramidenkreuzung. In diesem Fall kommt es zu typischen Ausfällen auf der kontralateralen Körperseite; befindet sich die

Schädigung weiter distal, treten die Symptome ipsilateral auf [Liebman, 1993; Ochs und Reimann, 1995].

Bei der spastischen Lähmung ist davon auszugehen, daß die zweiten motorischen Neurone und damit auch die Reflexbögen intakt sind, Reflexe also ablaufen können. Es fehlen jedoch die hemmenden Einflüsse der von der Area 4 ausgehenden Fasern der ersten motorischen Neurone. Es folgen hieraus gesteigerte phasische und tonische Reflexe und damit ein gesteigerter Muskeltonus (Eigenreflexe), Fremdreflexe der unteren Extremitäten (polysynaptische Reflexe) sind enthemmt, woraus spontane, schmerzhafte Spasmen resultieren [Liebman, 1993; Ochs und Reimann, 1995].

Typisch für eine spastische Bewegungsstörung ist das „Taschenmesserphänomen“, bei dem der Dehnungswiderstand eines Muskels bei passiver Dehnung zunächst ansteigt, um dann bei weiterer Dehnung plötzlich zu verschwinden. Als fakultativ auftretende Defizitsymptome zeigen sich Paresen, Störungen in der Feinmotorik und der Verlust von kutanen Schutzreflexen [Mumenthaler, 1990; Schenck, 1992; Liebman, 1993; Ochs und Reimann, 1995].

Ursächlich für die Entwicklung einer Spastik können neben Traumen, Sauerstoffmangel (z.B. Ertrinkungsunfälle) und cerebrovaskulären Unfällen (Apoplektischer Insult) auch entzündliche oder degenerative Prozesse, sowie eine hereditäre Belastung sein [Ochs und Reimann, 1995; Odwyer et al., 1996; O'Brien et al., 1996].

Als Therapie für die Behandlung einer Spastik sollte zunächst eine optimale krankengymnastische und physikalische Therapie erfolgen, die auch bei einer notwendig werdenden pharmakologischen Intervention weitergeführt werden muß [Siegentaler, 1987; Ochs und Reimann, 1995].

Die pharmakologische Therapie stützt sich auf solche Substanzen, die spinal, supraspinal oder peripher an der neuromuskulären Übertragung angreifen können. Als mögliche Wirkstoffe kommen Benzodiazepine, Tizanidin, Memantin, Baclofen oder das peripher wirksame Dantrolen in Frage [Siegentaler, 1987; Ochs und Reimann, 1995; Mutschler, 1996; Pranzatelli, 1996].

Bei Versagen der oralen Therapie können Baclofen und/oder Morphin mittels automatischer Dosierpumpen auch direkt in den Liquorraum injiziert werden [Ochs und Reimann, 1995]. Erst bei Versagen dieser Therapiemöglichkeiten sollten - als ultima ratio - chirurgische Maßnahmen durchgeführt werden. Hierbei werden bei einem mikrochirurgischen Eingriff die motorischen Faszikel in der Nervenwurzel aufgesucht und selektiv durchtrennt [Siegentaler, 1987; Ochs und Reimann, 1995].

Sind von der spastischen Lähmung definiert umschriebene Muskelpartien betroffen, kann darüber hinaus auch an eine Therapie mit Botulinustoxin gedacht werden [Burbaud et al., 1996; Mutschler, 1996; Simpson et al., 1996].

2.3.2 Pharmakologische Eigenschaften des Baclofen

Baclofen befindet sich seit mehr als 25 Jahren als antispastischer Wirkstoff im klinischen Einsatz. Als Agonist an GABA_B-Rezeptoren stimuliert Baclofen Rezeptoren, die sowohl prä- wie auch postsynaptisch lokalisiert sind [Dunlap, 1981; Hill und Bowery, 1981; Lalley, 1983]. Die relaxierende Wirkung ist auf einer vorwiegend spinal ansetzenden Verstärkung der präsynaptischen Hemmung zurückzuführen, woraus sich eine Dämpfung der mono- und polysynaptischen Reflexübertragung ergibt. Hieraus folgt eine Reduktion des spastischen Muskeltonus und eine Abnahme von Schweregrad und Frequenz der Flexoren- und Extensorenspasmen [Ochs und Reimann, 1995].

Als unerwünschte Nebenwirkungen von oral appliziertem Baclofen zeigen sich die in Tabelle 3.1. dargestellten Symptome. Einen Schwerpunkt nehmen zentrale Nebenwirkungen, insbesondere solche mit dämpfenden Auswirkungen ein.

Nach Absetzen einer Baclofen-Dauertherapie kann es zu psychischen Störungen wie Verwirrtheit, Agitiertheit und Halluzinationen oder auch generalisierten Krampfanfällen kommen. Aus diesem Grund ist ein ausschleichendes Absetzen notwendig.

Da in hoher (toxischer) Dosis Euphorie und Halluzinationen beobachtet werden, besteht für Baclofen ein Missbrauchspotential. So wurde Baclofen in den 70er Jahren mißbräuchlich als Psychodysleptikum eingesetzt [Hulinder und Ostman, 1987].

Bei intrathekaler Anwendung werden bei kontinuierlicher Infusion 50 bis 1200 µg/Tag appliziert, wobei eine sorgfältige Einstellung des Patienten unter Bereithaltung von intensivmedizinischer Ausstattung notwendig ist, um bei auftretenden Komplikationen (z.B. Atemdepression) unmittelbar eingreifen zu können [Ochs und Reimann, 1995; Dressnandt et al., 1996].

zentrales Nervensystem (ZNS)	Sedation, Schwindel, Parästhesien, Akkomodationsstörungen, Muskelschwäche, Atemdepression, Nystagmus, Desorientierung, Konzentrationsstörung, Vergeßlichkeit, Verwirrtheit, Angst, Depression, Dysphorie, Euphorie, Halluzinationen, Paranoia, Agitiertheit, lokale oder generalisierte Krampfanfälle bis hin zum Status epilepticus
Herz-Kreislauf	Hypotonie
Magen-Darmtrakt (GIT)	Nausea, Erbrechen, Mundtrockenheit, Obstipation, Diarrhoe
Harnwege und Geschlechtsorgane	Harninkontinenz, Blasenträgheit, sexuelle Störungen

Außer den in Tabelle 3.1. angegebenen Nebenwirkungen kann es bei dieser Applikationsform zu weiteren Komplikationen kommen. Neben Infektionen der Pumpentasche kann sich eine Meningitis entwickeln. Weiterhin sind Liquorleckagen und Fehldosierungen bekannt. Überdosierungen können zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie Koma und Ateminsuffizienz führen [Ochs und Reimann, 1995; Dressnandt et al., 1996]. Weitere Einsatzmöglichkeiten für Baclofen sind in Tabelle 3.2. angegeben.

Indikation	Quelle
Trigeminusneuralgien	[Zakrzewska und Patsalos, 1992; Cheshire, 1997]
Analgesie	[Fromm, 1994]
chronischer Schluckauf	[Guelaud et al., 1995; Johnson und Kriel, 1996]
Unverricht-Lundborg-Krankheit	[Awaad und Fish, 1995]
Stiff man syndrom	[Mumenthaler, 1990; Seitz et al., 1995; Silbert et al., 1995]
Infektion mit <i>Clostridium tetani</i>	[Müller et al., 1986; Müller et al., 1987]
Typ-1 Diabetes mellitus ¹	[Beales et al., 1995]
zerebrale Ischämie ¹	[Lal et al., 1995].
Asthma bronchiale, Husten, Blasenfunktionsstörungen ¹	[Malcangio und Bowery, 1995]

¹ Noch im experimentellen Stadium

Baclofen weist am dritten Kohlenstoffatom der Kohlenstoffkette ein Chiralitätszentrum auf. Bei enantioselektiven pharmakodynamischen Untersuchungen konnte deutliche Unterschiede in den pharmakodynamischen Eigenschaften der beiden Enantiomere nachgewiesen werden. In der Literatur sind eine Vielzahl von Arbeiten vorhanden, in denen Untersuchungen zur Pharmakodynamik der Baclofenenantiomere durchgeführt wurden. Im folgenden sind Beispiele hierfür beschrieben:

Es konnte in diesen Arbeiten nachgewiesen werden, daß das (-)-Baclofen (Eutomer) über eine - je nach verwendetem Modell - bis zu tausendfach höhere biologische Aktivität verfügt als das entsprechende (+)-Enantiomer (Distomer) [Olpe et al., 1978; Bowery et al., 1980; Hill und Bowery, 1981; Henry, 1982; Terrence et al., 1983; Sawynok und Dickson, 1984; Riesz und Erdo, 1985; Fromm und Terrence, 1987; Pittaluga et al., 1987; Maurin, 1988; Schworer

et al., 1989; Baumann et al., 1990; Giralt et al., 1990; Bonanno et al., 1991; Hong und Henry, 1991a; Hong und Henry, 1991b; Hong und Henry, 1992; Wu und Dun, 1992].

In Arbeiten von anderen Autoren wird eine Korrelation des eutomeren links-drehenden Enantiomers mit der absoluten Konfiguration R nach CIP festgestellt [Smith, 1984; Falch et al., 1986; Herdeis und Hubmann, 1992; Schoenfelder et al., 1993; Ibuka et al., 1995].

Diese Korrelation zwischen der absoluten Konfiguration R und dem Drehsinn (-) [bzw. umgekehrt beim anderen Enantiomer] sowie die Feststellung von z.B. den Autoren Mandema oder Padres, daß es sich beim R-Baclofen um das Eutomer handelt, wurde offensichtlich nie direkt experimentell nachgewiesen.

In einer Arbeit von Chang [Chang et al., 1982] wird anhand der Röntgenstrukturanalyse von racemischen Baclofen und dem Vergleich der hieraus erhaltenen Struktur mit entsprechenden Strukturvorschlägen für GABA geschlossen, daß nur das R-Baclofen nicht jedoch S-Baclofen mit GABA vergleichbare Strukturelemente besitzt. Dementsprechend wird von Chang postuliert, daß es sich beim R-Baclofen um das Eutomer und beim S-Baclofen um das Distomer handeln muß. Experimentelle Untersuchungen zur biologischen Aktivität oder eine Korrelation zwischen der absoluten Konfiguration und dem Drehsinn wurden von Chang nicht durchgeführt.

Von Witczuk stammt eine Arbeit, in der neben der unterschiedlichen Pharmakodynamik der Baclofenenantiomere auch die Zuordnung von Drehsinn und absoluter Konfiguration untersucht wurden [Witczuk et al., 1980]. Die Zuordnung des Drehsinns der Baclofenenantiomere gelang in dieser Arbeit mit Hilfe der Bestimmung des Cotton-Effekts und der zugehörigen ORD- und CD-Kurven. Als Ergebnis wird von Witczuk eine umgekehrte Zuordnung R-(+)- bzw. S-(-)-Baclofen angegeben.

Es zeigt sich ein Konsens zwischen den Autoren Chang und Witczuk, die beide für das Eutomer eine absolute R-Konfiguration ermittelt haben. Der Befund von Witczuk steht jedoch im Gegensatz zu allen oben zitierten Arbeiten, in denen festgestellt wird, daß es sich beim linksdrehenden Enantiomer um das Eutomer handelt.

In der Literatur konnte nur *eine* weitere Arbeit gefunden werden, in der analoge Beobachtungen gemacht werden konnten. DeSousa konnte bei Untersuchungen an Ratten nachweisen, daß R-(+)-Baclofen einen stärkeren Effekt auf das Gedächtnis und Lernverhalten zeigt, als das S-(-)-Baclofen [DeSousa et al., 1994].

Eine endgültige Klärung dieser Korrelation wäre durch Untersuchungen von Baclofen-Einkristallen mittels anormaler Röntgenbeugung möglich.

Trotz der unterschiedlichen pharmakodynamischen Eigenschaften der Baclofenenantiomere befindet sich Baclofen als Razemat im Einsatz, obwohl mittlerweile mehrere enantioselektive Syntheseverfahren für Baclofen publiziert wurden [Herdeis und Hubmann, 1992; Schoenfelder et al., 1993; Ibuka et al., 1995; Yoshifuji und Kaname, 1995; Eriksson et al., 1996; Langlois et al., 1996; Mazzini et al., 1997]. Ein therapeutischer Einsatz des Eutomers erfolgt möglicherweise aufgrund des langwierigen Zulassungsverfahrens unter Erwägung des Kosten-Nutzen-Verhältnisses nicht [De Camp, 1989; De Camp, 1993].

Bei klinisch-pharmakokinetischen Studien wurden nur geringfügige Unterschiede zwischen den Baclofen-Enantiomeren gefunden. Auch bei Rattenstudien ergaben sich – wie beim Menschen – nur bei der renalen Clearance initial signifikante Unterschiede [Spahn-Langguth et al., im Druck]. Konzentrationen von Baclofen im ZNS sind nach systemischer Applikation sehr niedrig, was die intrathekale Gabe erforderlich macht, obwohl man davon ausgeht, dass Baclofen Substrat für Aminosäure-Transporter ist, die auch in der Blut-Hirn-Schranke zu finden sind [Deguchi et al., 1996; Cruaud et al., 1999; Zed et al., 2000].

Modeluntersuchungen zur Resorption nach peroraler Gabe wurden in vitro und in vivo durchgeführt. Bei peroraler Gabe wurde in verschiedenen Studien eine aktive Aufnahme über Aminosäure-Transporter nachgewiesen [Balerio und Rubio, 1996; Moll-Navarro et al., 1996; Cercos-Forte et al., 1995].

2.4. Indometacin

2.4.1. Indometacin bei Demenz - Demenzielle Syndrome

Unter demenziellen Syndromen versteht man eine erworbene, globale Schädigung von höheren zerebralen Funktionen, die beim wachen Patienten zu beobachten sind. Demenzen zeichnen sich durch eine ausgeprägte, irreversibel verlaufende Progredienz aus. Bei den beiden Hauptformen handelt es sich um die Alzheimer'sche „senile“ Demenz (Demenz vom Alzheimerstyp; DAT) und die zerebrovaskuläre Demenz.

Während vor dem 60sten Lebensjahr Demenzen relativ selten auftreten (Ausnahme bei Patienten mit Down-Syndrom [Nelson et al., 1995; Johannsen et al., 1996; Zigman et al., 1996; Visser et al., 1997]) leiden bereits 10% aller 65jährigen unter einer demenziellen Störung, wobei mit weiter steigendem Lebensalter die Wahrscheinlichkeit an einem demenziellen Syndrom zu erkranken, weiter zunimmt [Stafford-Clark und Smith, 1991].

Als klinische Symptome zeigen sich hierbei:

- ◆ Einbußen der Intelligenz (Frischgedächtnis). Es kommt zu Störungen der Aufmerksamkeit, der Konzentrationsfähigkeit und Urteilskraft. Hieraus resultieren Desinteresse, Apathie und örtliche wie zeitliche Desorientiertheit.
- ◆ Einbußen in der emotionalen Integrationsfähigkeit wie emotionale Labilität, die mit Angst oder Depressionen verknüpft sein kann. Es resultieren hypochondrische, querulatorische und argwöhnische Verhaltensweisen, die zu einer zunehmenden Isolation führen.
- ◆ Entgleisungen im Verhalten: Es zeigt sich schamloses bzw. unangemessenes Verhalten, wie rüde sexuelle Annäherungsversuche, Masturbieren oder Urinieren in der Öffentlichkeit.
- ◆ Persönlichkeitsveränderungen und Auswirkungen sozialer Faktoren: Verbleibende Kräfte der Persönlichkeit versuchen Desintegration und psychisches Chaos abzuwehren. Dabei treten Charakterzüge zum Vorschein, die lange Zeit kontrolliert bzw. unterdrückt waren.

Der Krankheitsverlauf ist variabel und kann zwischen 5 und 15 Jahre andauern.

Bei der postmortalen Untersuchung der Gehirne von DAT-Patienten kann eine allgemeine Hirnatrophie nachgewiesen werden, die vor allem den Frontal- und Okzipitalbereich betrifft. Histologisch fallen intrazelluläre Faserbündel (Neurofibrillenbündel) auf, die hyperphosphoryliertes Tau-Protein enthalten. Es werden außerdem Plaques und Fibrillen gefunden, die aus einem Amyloid der Molmasse von ca. 4000 Da (β -A4-Protein) bestehen. Dieses wird aus einem Vorläuferprotein, dem Amyloid-Precursor-Protein (APP), gebildet [Elbert und Rockstroh, 1990; Mutschler, 1996].

Neuropathohistologisch werden sechs Schweregrade der DAT unterschieden. Die Schweregrade I und II sind nur histologisch nachweisbar, im Stadium III und IV werden erste klinische Symptome erkennbar, in den Stadien V und VI zeigt sich schließlich das Vollbild der DAT. Die histologische Veränderungen treten hierbei nicht diffus verteilt im gesamten Gehirn der Patienten auf, sondern zeigen mit dem Schweregrad der Demenz eine charakteristische Verteilung.

Die ersten Veränderungen (Stadien I und II) treten im Bereich dorsal des Bulbus olfactorius auf, sie sind auf eine einzelne Schicht in der transentorhinalen Region beschränkt. In den Stadien III und IV treten zusätzlich Veränderungen in der Hippocampusformation und in weiteren Bereichen des limbischen Systems auf. In den Stadien V und VI schließlich greift der rindenerstörende Prozeß auf den Isocortex über und breitet sich über die gesamte Hirnrinde aus (Abb. 3.2.A-C.) [Braak und Braak, 1991].

Neurochemisch ist eine starke Verringerung des Acetylcholin, der Cholinacetyltransferase und der Acetylcholinesterase nachweisbar. Ebenso ist die Aufnahme von Cholin und in Folge dessen die Acetylcholinbiosynthese verringert. Der Konzentrationsabfall korreliert mit dem Ausmaß der kognitiven Störungen beim Patienten. Im Gegensatz dazu ist die Zahl der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren in kortikalen Strukturen, die cholinergen Projektionen enthalten, nicht verringert [Elbert und Rockstroh, 1990].

Ein weiterer Pathogeneseweg zur Ausbildung der DAT wird im vermehrten oxidativen Streß gesehen. Hierbei kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. H_2O_2), die

dann zu Schädigungen empfindlicher Neurone führen. Als besonders empfindlich gegen oxidativen Streß gelten neuronale Strukturen im Hippocampus, Neocortex und Neostriatum. Eine ausführliche Übersicht über die neurochemischen Veränderungen im Rahmen der Pathogenese der DAT wurde von Palmer [1996] publiziert.

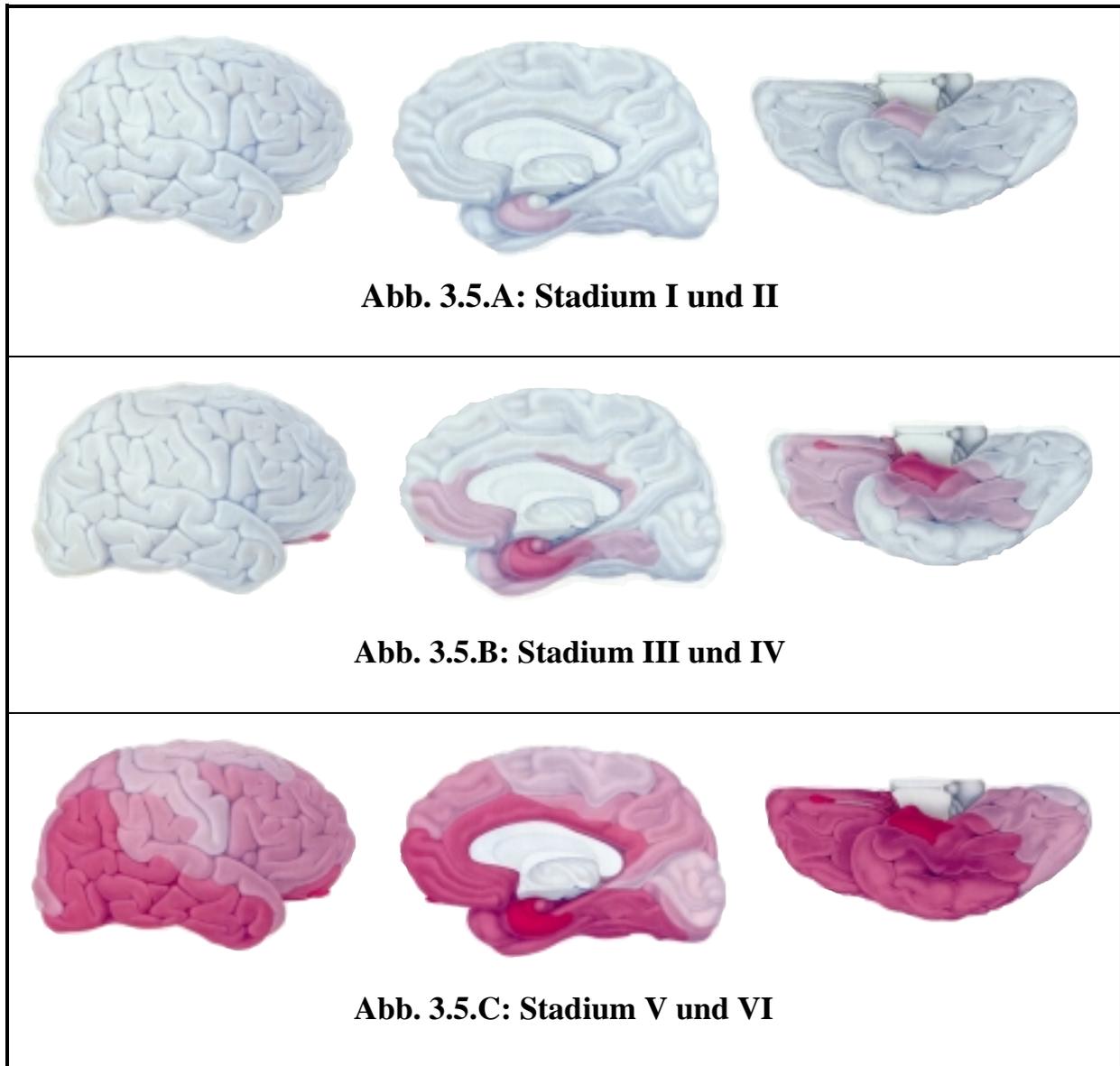


Abb. 3.2.A-C: Neurohistopathologisch differenzierbare Stadien der Alzheimer Demenz mit Darstellung der betroffenen Gehirnregionen. Histologisch veränderte Bereiche sind in Rot dargestellt [entnommen aus Braak und Braak, 1991].

2.4.2. Therapeutische Möglichkeiten bei der Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT)

Eine effektive Therapie der DAT ist bis heute nicht möglich. Zur Verbesserung der Substanzutilisation und des Hirnstoffwechsels werden Nootropika eingesetzt. Nicergolin (Memoq[®]) oder Piracetam (Avigile[®]) sind Beispiele für solche Substanzen. Die hierbei zu beobachtenden Erfolge sind jedoch eher gering [Riederer et al., 1992].

Um die cholinerge Neurotransmission zu verbessern, wurde versucht, die Versorgung mit Acetylcholin durch Gabe von Acetylcholinpräkursoren zu beeinflussen, was jedoch keinen klinischen Erfolg zeigte. Einer der wenigen zur Therapie von DAT zugelassenen Wirkstoffe (Tetrahydroaminoacridin, Cognex[®]) hemmt die Acetylcholinesterase und erhöht so die Konzentration des Neurotransmitters im synaptischen Spalt. Die klinischen Ergebnisse sind

jedoch wenig überzeugend bei gleichzeitigem Auftreten von erheblichen Nebenwirkungen [Mutschler, 1996].

Bei Untersuchungen von Gewebeproben des cerebralen Cortex von Alzheimer-Patienten konnte eine präsynaptische Reduktion der Acetyltransferase-Aktivität und der Dichte von M₂-Muscarinrezeptoren festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu wurde keine Veränderung der M₁-Rezeptordichte beobachtet. Diese Befunde deuten darauf hin, daß M₂-Rezeptoren in den Nervenendungen cholinergischer Bahnen die Freisetzung von Acetylcholin im Sinne von Autorezeptoren regulieren, während postsynaptisch lokalisierte M₁-Rezeptoren die Signale auf die postsynaptische Zelle übertragen [Doods et al., 1993].

Es wird postuliert, daß sich durch selektive M₁-Rezeptoragonisten bzw. M₂- (oder M₄-) Rezeptorantagonisten eine Verbesserung der DAT erreichen lassen [Mash et al., 1985; Doods et al., 1993; Eglon und Watson, 1996]. Während klinisch M₂-Rezeptorantagonisten noch nicht verfügbar sind, befinden sich M₁-Rezeptoragonisten bereits in klinischer Prüfung [Eglon und Watson, 1996; Mutschler, 1996].

Ein anderer Pathomechanismus bei degenerativen Hirnerkrankungen ist eine Überstimulation von NMDA-Rezeptoren, die zu einer toxischen Ca²⁺-Überladung von Nervenzellen führt. Daher gelten NMDA-Antagonisten unter bestimmten Voraussetzungen [Müller et al., 1995] als mögliche neuroprotektive Substanzen. Einen möglichen Wirkstoff stellt Memantin (Akatinol®) dar, der sich bereits als zentralwirksames Muskelrelaxans im klinischen Einsatz befindet [Mutschler, 1996].

Als weitere mögliche Maßnahme wird eine erhöhte Zufuhr von Radikalfängern diskutiert, die entweder die Entstehung von energiereichen und hochreaktiven Molekülen verhindern oder diese noch vor Reaktion mit neuronalen Strukturen abfangen sollen. In Frage kommen hierbei Vitamin A, C und E [Mutschler, 1996]. Begleitend zur pharmakologischen Therapie sollten auch andere nicht-pharmakologische Maßnahmen durchgeführt werden. Durch Aktivierung des Gehirns („Brainjogging“), Bewegung oder Diät können positive Effekte auf die kognitive Leistung erreicht werden. Bereits mit einer geringen körperlichen Dauerbelastung (25 W) konnten optimale Effekte erzielt werden [Riederer et al., 1992].

Als ein weiterer Pathogeneseweg der DAT wird eine chronische Entzündung des ZNS diskutiert: In Gehirnen von DAT-Patienten konnten Entzündungsmediatoren, wie Cytokine und Interleukin-1, nachgewiesen werden, die auf eine chronische Entzündungsreaktion im ZNS hinweisen. Bereits 1987 konnten in Gehirnen von DAT-Patienten solche Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden, die über die zu beobachtenden Vorgänge bei der Beseitigung von abgestorbenen Neuronen hinausgehen [Schnabel, 1993].

Mittlerweile konnten verschiedene Belege für einen solchen Pathogeneseweg gefunden werden. Von Breitner wurde in Zwillingsstudien beschrieben, daß bei Behandlung mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAID) signifikant seltener eine DAT auftritt als bei den unbehandelten Geschwistern [Breitner et al., 1994]. Rich [Rich et al., 1995] beschreibt ähnliche Ergebnisse bei einer retrospektiven Untersuchung von 210 DAT-Patienten. Nach Gabe von NSAID's, die zur Therapie von chronischen Entzündungskrankheiten verabreicht wurden, konnte ein protektiver Effekt gegen die Entwicklung einer DAT nachgewiesen werden. Zum selben Ergebnis kamen Untersuchungen an Leprapatienten, die unter einer Dauertherapie mit Diaphenylsulfon (Dapson) standen. Bei der Autopsie konnte in deren ZNS nur eine geringe Konzentration an senilen Plaques nachgewiesen werden [Schnabel, 1993].

Bei einem Vergleich von 17 epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, daß sowohl eine chronische Arthritis, wie auch die zu deren Therapie eingesetzten anti-entzündlichen Substanzen negativ mit dem Risiko korreliert, eine DAT zu entwickeln [McGeer et al., 1996].

Aufgrund der oben beschriebenen Hinweise auf entzündliche Prozesse im ZNS bei der DAT, sollte eine Therapie oder die Verlangsamung des Progresses mit anti-entzündlich wirksamen Substanzen möglich sein. In der Tat war es möglich, bei einer Untersuchung zur kognitiven Funktion an gesunden älteren Probanden (59-73 Jahre) im Rahmen einer doppelblinden, plazebo-kontrollierten Cross-over-Studie zu zeigen, daß bereits nach wenigen Tagen einer chronischen Indometacingabe (3×25 mg/Tag; p.o.) eine Verbesserung der sensorischen Koordination und des Kurzzeitgedächtnisses zu beobachten war. Im Gegensatz hierzu hat Indometacin keinen Einfluß auf den Grad der Aufmerksamkeit und die

psychomotorische Geschwindigkeit [Bruce-Jones et al., 1994]. Schließlich konnte an einer kleinen Gruppe von Patienten in einer sechsmonatigen doppelblind und plazebokontrolliert durchgeführten Studie (Dosierung: 100 bis 150 mg/d) der Nachweis erbracht werden, daß Indometacin zumindest einen hemmenden Effekt auf den Fortgang der DAT aufweisen konnte [Rogers et al., 1993].

2.4.3. Pharmakologie und Toxikologie des Indometacin

Beim Indometacin handelt es sich um ein NSAID aus der Gruppe der Heteroarylessigsäuren. In Abbildung 3.3. ist der Wirkmechanismus (fast) aller NSAID's angegeben.

NSAID's greifen hemmend in die Prostaglandinsynthese ein. Dies geschieht über die Hemmung der Cyclooxygenase, die für den Umbau von Arachidonsäure und anderen ungesättigten C₂₀-Säuren in cyclische Endoperoxide verantwortlich ist. Diese cyclischen Endoperoxide wiederum stellen die Vorstufen für Prostaglandine, Tromboxan A₂ und Prostacyclin dar, die als Entzündungsmediatoren wirken. Eine Hemmung der Cyclooxygenase führt zu antiphlogistischer, antipyretischer und analgetischer Wirkung.

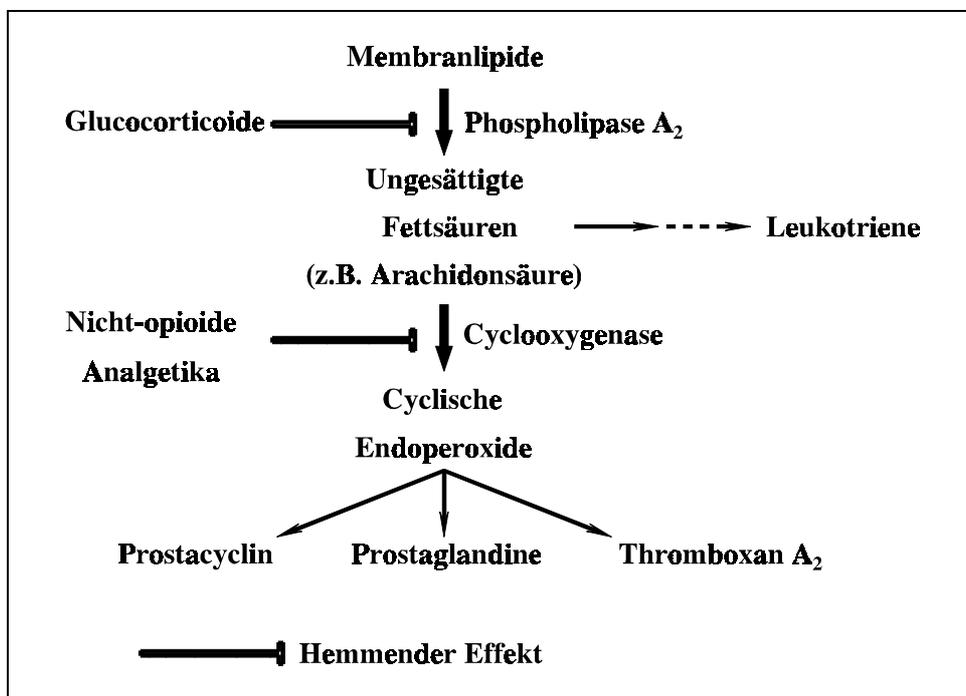


Abb. 3.3.: Allgemeiner Wirkmechanismus von NSAID's in vereinfachter Darstellung [entnommen aus Mutschler, 1996]

Derselbe Wirkmechanismus führt jedoch aufgrund der Hemmung der Prostaglandin-Biosynthese zu Schädigungen der Magenschleimhaut, was zu den unten beschriebenen Nebenwirkungen am GIT führt. Aus diesem Grund wird auch verständlich, daß galenische Maßnahmen (magensaftresistente Tabletten, Suppositorien) die Verträglichkeit NSAID's in Hinsicht auf Nebenwirkungen im GIT nur unwesentlich verbessern können.

Über die Hemmung der Prostaglandin-Biosynthese hinaus kommt es nach Gabe von NSAID's außerdem zu Wechselwirkungen mit anderen Mediatorstoffen und Enzymsystemen, sowie zu einer Beeinflussung von Immunreaktionen und zu einer verringerten Bildung von aktiven Sauerstoffspezies. Indometacin wirkt also auch als „radical scavenger“ [Prasad und Laxdal, 1994].

Indometacin wird bereits seit langer Zeit als Wirkstoff für die Behandlung von rheumatischen Erkrankungen in die Therapie eingesetzt. Als weitere Indikationen sind der akute Gichtanfall, Lumbalgin und Schmerzen nach Traumen (Sportverletzungen) oder operativen Eingriffen angegeben. Als Retardform kommt Indometacin bei primärer Dysmenorrhoe zum Einsatz [Wong et al., 1993].

In zahlreichen Arbeiten wird der Anwendung von Indometacin bei Säuglingen mit Ductus arteriosus und Frühgeborenen beschrieben. Die Applikation von Indometacin führt bei diesen Patienten zu einer verbesserten zerebralen Hämodynamik und Sauerstoffversorgung [McCormick et al., 1993; Benders et al., 1995].

Indometacin wird schnell und vollständig resorbiert, die Plasma-Eiweißbindung liegt bei über 99%, die Plasmahalbwertszeit beträgt 3 bis 11 Stunden, woraus eine mittlere Wirkdauer von 4 bis 6 Stunden resultiert. Die Ausscheidung erfolgt vorwiegend in Form von inaktiven Metaboliten sowohl renal als auch biliär; nur 15% werden unverändert renal ausgeschieden [Wong et al., 1993; Mutschler, 1996]. Hauptsächlich wird bei der Biotransformation das Acylglucuronide gebildet, das vorwiegend im Urin nachweisbar ist. Acylglucuronide (Esterglucuronide) stellen im Allgemeinen reaktive Verbindungen dar [Spahn-Langguth et al., 1997]. Sie können mehr oder weniger schnell zum Aglykon rückgespalten werden, einer Acylwanderung unterliegen oder zu einer kovalenten Bindung führen.

In Bezug auf Wirkungen nach Indometacin-Gabe werden als Nebenwirkungen neben Störungen im GIT (Übelkeit, Erbrechen, Obstipation, Diarrhoe, okkultes Blutverlust, Perforationen), vor allem auch ZNS-Reaktionen wie Verstärkung der Symptome einer Epilepsie oder Parkinson'schen Erkrankung sowie Verschlechterungen bei psychischen Erkrankungen wie Depressionen oder Angst beobachtet. Weiterhin können Nebenwirkungen an anderen Organen (beispielsweise Leber, Niere, Haut, Blut, Auge oder Ohr) auftreten. Die übliche Tagesdosis für die o.a. Indikationen beträgt 50 bis max. 200 mg als Einmalgabe oder auf 2 bis 3 Tagesdosen verteilt [Wong et al., 1993].

3. Problemstellung

Für die Wirkung von Pharmaka im Zentralnervensystem (ZNS) ist das Erreichen des Wirkortes Voraussetzung. Das Ausmaß der Verteilung in das ZNS wird dabei u.a. bestimmt durch die physikochemischen Eigenschaften einer Substanz, wobei die erreichten Hirnkonzentrationen meist um so niedriger sind, je weniger lipophil eine Substanz ist. Insbesondere die Passage der Blut-Hirn-Schranke und der Blut-Liquor-Schranke ist dabei limitierend [Mutschler, 1996; Aigner et al., 1997]. Verantwortlich für die Kompartimentierung ist aber nicht nur deren – spezieller Aufbau (fehlende Fenestrierung, außer bei Tumorerkrankungen in diesem Bereich), sondern auch das Vorkommen von Transportern, die neben Diffusionsmechanismen für den Einwärtstransport von Substanzen (z.B. Aminosäuren) ins Gehirn verantwortlich (und kapazitätslimitierend) sind, aber auch von solchen die auswärts gerichtet sind und die Passage reduzieren oder verhindern können.

Konzentrationserhöhungen am Wirkort ZNS zur Verstärkung eines erwünschten Effektes gehen in der Regel einher mit einer Erhöhung der im Blut vorhandenen Konzentration (Maßnahmen: i.v.-Bolus statt p.o.-Gabe, Dosiserhöhung, Erhöhung der absorbierten Fraktion), sind somit nicht Zielorgan-selektiv und können aufgrund der Konzentrationserhöhung in der Peripherie zu verstärkten unerwünschten Wirkungen führen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Selektivität durch Wahl des Applikationsortes dar. Im Fall von Baclofen, das vor allem bei verschiedenen Erkrankungen im zentralnervösen Bereich (siehe auch Abschnitt 3.3.) eingesetzt wird, wurde z.B. im Sinne einer selektiven Konzentrationserhöhung im ZNS das Verfahren der intrathekalen Applikation optimiert, welches allerdings nur für eine Langzeittherapie geeignet ist.

Ein interessanter neuer Ansatz ergab sich in den letzten Jahren über die Nasalapplikation von Pharmaka. Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe [z.B. Langguth und Spahn-Langguth, 1995] und der von Sakane et al. [1991, 1994, 1995] zeigten bei verschiedenen Substanzen - selbst bei Peptiden - daß nach Applikation auf die Nasalmukosa vergleichsweise hohe ZNS-Konzentrationen resultieren, die sich allein aus den aufgrund eines geringeren First-pass-Effekt höheren Blutkonzentrationen keinesfalls erklären lassen.

Gerade im Falle von Baclofen, das nach peroraler und auch nach intravenöser Applikation eine geringe lokale Verfügbarkeit im ZNS zeigt¹, schien es sinnvoll zu untersuchen, ob auch hier bei Nasalapplikation höhere Gewebe- bzw. CSF-Konzentrationen resultieren als nach systemischer Applikation. Allerdings werden bei der o.g. intrathekalen Injektion je nach applizierter Dosis CSF-Konzentrationen von bis zu 1 µg/ml erzielt [Ochs und Reimann, 1995]. Jedoch könnte bei deutlich erhöhter ZNS-Selektivität im Falle von Baclofen die Nasalapplikation als Alternative zur intrathekalen Applikation dienen oder aber diese ergänzen.

Im Rahmen der durchzuführenden Untersuchungen sollte zunächst auf der Basis bereits beschriebener Verfahren eine Methode zur Quantifizierung von Baclofen etabliert werden. Zudem mußte für die Nasalapplikation bei der Ratte eine Zubereitung hergestellt werden, bei der eine ausreichende Menge des schlecht wasserlöslichen Baclofen in einem vergleichsweise geringen Volumen enthalten sein sollte. In Studien an der Ratte sollten zunächst die kinetischen Basisparameter ermittelt werden, wobei die Substanz intravenös oder auf die Nasalmukosa appliziert wurde. Im zweiten Teil der Untersuchung wurden CSF-, Gewebe- und Blutkonzentrationen in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart evaluiert. Ausgehend von racemischem Baclofen sollten dann verschiedene Ester synthetisiert werden

¹ Die Konzentrationen in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) lagen nach p.o.-Gabe von 4×25 mg Baclofen im steady-state unter der Nachweisgrenze der analytischen Methode [Ochs und Reimann, 1995], ebenso konnten nur geringe CSF-Konzentrationen nach (toxischen) i.v.-Gaben bei Tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden [Deguchi et al., 1995].

und nach Entwicklung eines Analysenverfahrens deren kinetisches Verhalten und Gewebeselektivität im Vergleich zu Baclofen und zudem die hydrolytische und metabolische Stabilität der Ester untersucht werden.

Da zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeit noch keine systematischen Untersuchungen zur Abhängigkeit der erhöhten Organselektivität von physikochemischen Eigenschaften vorlagen, hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, Hinweise auf grundlegende Zusammenhänge im Rahmen der Nasalapplikation (Permeationsweg, Einfluß der Lipophilie auf die Organselektivität) zu erhalten. Dabei wurden als Modellschubstanzen im Laufe der Arbeit das relativ lipophile Tranylcypromin und das hydrophile Baclofen und seine Ester, sowie Indometacin und Kokain eingesetzt. Im Rahmen der Arbeit sollten folgende ergänzenden Untersuchungen durchgeführt werden:

- ◆ In einer Voruntersuchung sollte mit Hilfe zweier leicht zu analysierender Substanzen durch Konzentrationsbestimmungen in verschiedenen *Hirnregionen* in Abhängigkeit der Zeit innerhalb des ZNS den Weg von der Nasalmukosa ins Gewebe bzw. im Vergleich dazu den Zeitverlauf der Verteilung nach intravenöser Gabe zu verfolgen. Als Modellschubstanzen wurden hierbei das Tranylcypromin und das Indometacin ausgewählt.
- ◆ Mit den o.g. vier Substanzen (sowie ggf. den synthetisierten Estern) sollte eine potentielle *Korrelation* der gefundenen Gewebeselektivitäten nach nasaler und systemischer Applikation mit der *Lipophilie* (Verteilungskoeffizienten) evaluiert werden.
- ◆ Da *Transportsysteme*, die in der Blut-Hirn-Schranke vorkommen, auch in den anderen kompartimentierenden Membranen (z.B. Gastrointestinaltrakt), vorhanden sind und zudem von Artursson und Karlsson [1991] und Artursson et al. [1996] eine gewisse Korrelation der Permeation durch Zell-Monolayer aus intestinalen Zellen und durch die Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen wurde, sollte an den (in bezug auf ihre Lipophilie sehr unterschiedlichen) Beispielen Baclofen und Tranylcypromin untersucht werden, ob sich diese Korrelation von der Tendenz her bestätigen läßt.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zu Kokain

4.1.1. Analytische Methode für Kokain und Benzoylecgonin

Aufgrund der großen Relevanz der Konzentrationsbestimmung von Kokain in biologischen Materialien - auch Geweben - sind bereits zahlreiche analytische Verfahren entwickelt worden. Beispiele für analytische Methoden zur Quantifizierung sind gaschromatographische Verfahren (GC) [z.B. Sniegoski und Welch, 1996; Song et al., 1996; Sosnoff et al., 1996]. Weitere Möglichkeiten liegen im Einsatz der Dünnschichtchromatographie (DC) [z.B. Jatlow, 1988; Wiggins et al., 1989; Simpson et al., 1993] oder der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) [z.B. Baliková und Vecerková, 1994; Clauwaert et al., 1996; Fernandez et al., 1996], wobei auffällt, daß HPLC-Verfahren häufiger zu pharmakologisch/toxikologischen Studien eingesetzt werden, während GC-Methoden schwerpunktmäßig im forensischen Bereich zu finden sind. Vor einigen Jahren haben sich auch die Kapillarelektrophorese [z.B. Tagliaro et al., 1993; Tagliaro et al., 1996] und immunochemische Verfahren [z.B. Röhrich et al., 1994; de la Torre et al., 1996] zur Konzentrationsbestimmung von Kokain etablieren können.

Die Konzentrationsbestimmungen des Kokains und Benzoylecgonin wurden mit der analytischen Routinemethode des Zentrums der Rechtsmedizin (ZRM) der Universität Frankfurt/M. zur Konzentrationsbestimmung von Kokain und dessen Hauptmetaboliten Benzoylecgonin (BE) in Urin, Vollblut, Serum oder Plasma durchgeführt. Ohne Probleme konnte dieses Verfahren auf Rattenliquor und -vollblut übertragen werden. Zur Anwendung auf Hirngewebeproben wurde zur Probenvorbereitung eine Festphasenextraktionsmethode entwickelt, die den üblichen Flüssig/Flüssig-Extraktionsverfahren in Bezug auf Arbeitszeit, Lösungsmittel-Verbrauch und vor allem die Wiederfindung überlegen ist [Devane et al., 1989; Spear et al., 1989; Baliková und Vecerková, 1994; Robinson et al., 1994].

Nach Anwendung dieser Festphasenextraktionsmethode konnten selbst in komplexen Matrices wie in Rattenhirngewebe, in humanem Lungengewebe oder in Mageninhalt Wiederfindungsraten von basischen Wirkstoffen in der Größenordnung über 95% erreicht werden. Außerdem zeichnet sich diese Methode durch hohe Selektivität für Alkaloide aus, so dass sich Extrakte ergeben, für deren Bestimmung ein Austausch der nachgeschalteten analytischen Trennmethode (z. B. GC/MS gegen HPLC) nachgewiesenermaßen möglich ist [Herber et al. 1997].

4.1.2. Kokain- und BE-Konzentrationen im Blut, Liquor und Hirngewebe

Die Untersuchungen zum Kokain an der Ratte erfolgte in einer dreiarmligen Studie. Es wurde jeweils sowohl eine Applikation in den Peritonealraum, eine intravenös als auch eine nasal durchgeführt; in allen Fällen waren die Versuchstiere mit Urethan (Carbaminsäureethylester) anästhesiert. Für alle untersuchten Matrices (Rattenvollblut, Rattenliquor und Rattenhirngewebe) konnte eine Quantifizierung sowohl für die Muttersubstanz als auch für den Hauptmetaboliten BE durchgeführt werden.

In Abbildung 4.1.1.A-C sind jeweils die mittleren Konzentrationen von Kokain in den entsprechenden Matrices in Abhängigkeit von den verschiedenen Applikationsarten dargestellt. Im Vollblut wurden nach i.v.-Applikation initial die höchsten Konzentrationswerte von im Mittel 350 ng/ml nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde die Spitzenkonzentration nach Gabe ins Peritoneum erst 10 Minuten nach Applikation erreicht. Der hierbei gefundene Konzentrationswert im Blut lag mit im Mittel 50 ng/ml bei nur etwa 15% der

Maximalkonzentration nach i.v.-Gabe. Nach nasaler Applikation wurde der C_{\max} -Wert nach 20 Minuten nachgewiesen. Er lag mit im Mittel 90 ng/ml bei 25% des höchsten Wertes nach i.v.-Gabe. Die Signifikanzniveaus aus der statistischen Analyse für die Konzentrationsunterschiede sind in Tabelle 4.1.1. angegeben.

Während sich die Konzentrations-Zeit-Verläufe im Rattenblut nach i.v.-Gabe bzw. i.n.-Applikation innerhalb der ersten 20 Minuten bei einer mittleren Konzentration von 90 ng/ml in ihrem Verlauf angeglichen hatten, zeigte sich ein mit der i.v.-Gabe vergleichbarer Konzentrationswert nach Applikation ins Peritoneum erst nach einer Stunde auf einem deutlich niedrigeren Konzentrationsniveau von 40 ng/ml. Bei den übrigen Matrices waren die höchsten Konzentrationen mit 300 ng/ml Liquor und 2300 ng/g Hirngewebe ebenfalls bereits am ersten Messpunkt nach i.v.-Gabe zu beobachten. Die auftretenden absoluten Konzentrationen nach i.n.-Gabe lagen mit 110 ng/ml Liquor bei ca. 40% der nach i.v.-Gabe erreichten Maximalwerte, während nach i.p.-Applikation mit im Mittel 30 ng/ml Liquor nur etwa 10% dieser Konzentration erreicht werden konnten.

Im Hirngewebe der Ratte konnte nach Applikation auf die Nasalmucosa eine Spitzenkonzentration von 950 ng/g nachgewiesen werden, was ebenfalls 40% der nach i.v.-Gabe erreichten Spitzenkonzentration entsprach. Die nach i.p.-Gabe erreichte Gehirnkonzentration lag mit im Mittel 300 ng/g Gewebe - ähnlich wie bei der CSF - nur bei 10% des nach i.v.-Gabe erreichten Spitzenwerts (Abb. 4.1.1).

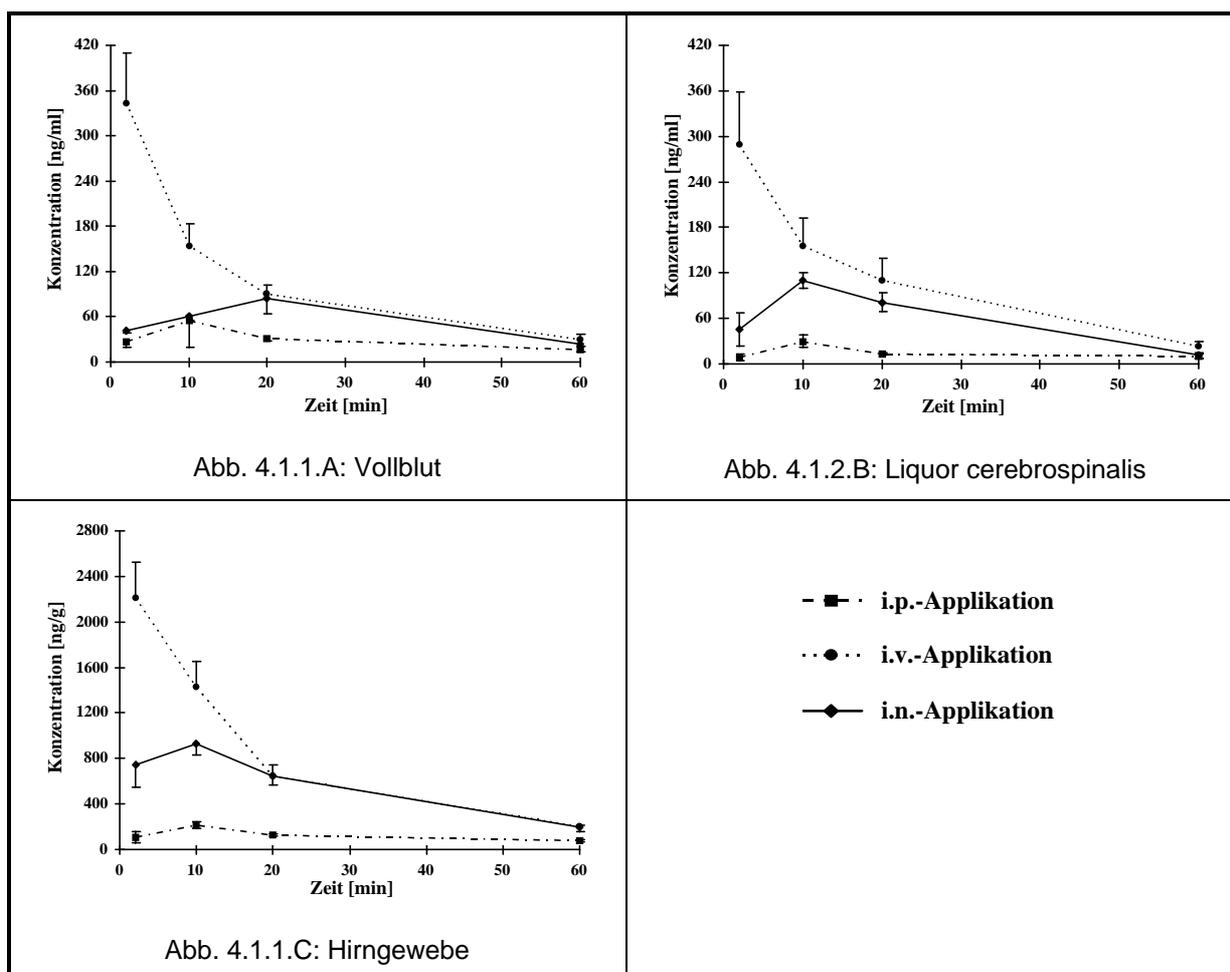


Abb. 4.1.1.A-C: Konzentration von Kokain in verschiedenen Matrices der Ratte nach Applikation von 0,5 mg/kg KG in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart (n = 3).

In Tabelle 4.1.1. sind die Signifikanzniveaus für die ermittelten Kokain-Konzentrationsunterschiede in den einzelnen Matrices dargestellt.

Zeit [min]	p-Werte								
	Blut			CSF			Gehirn		
	i.v. vs. i.n.	i.v. vs. i.p.	i.n. vs. i.p.	i.v. vs. i.n.	i.v. vs. i.p.	i.n. vs. i.p.	i.v. vs. i.n.	i.v. vs. i.p.	i.n. vs. i.p.
2	< 0,01	< 0,01	n.s.	< 0,05	< 0,005	n.s.	< 0,01	< 0,005	< 0,01
10	< 0,01	< 0,05	n.s.	n.s.	< 0,01	< 0,001	< 0,05	< 0,005	< 0,005
20	n.s.	< 0,01	n.s.	n.s.	< 0,05	< 0,005	n.s.	< 0,01	< 0,01
60	n.s.	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	n.s.	n.s.	< 0,005	< 0,05

Die im Rattenblut und -hirngewebe bestimmbaren BE-Konzentrationen lagen im Bereich der Nachweisgrenze der analytischen Methode für diesen Metaboliten. Die BE-Konzentrationen in den untersuchten CSF-Proben waren nicht mehr eindeutig quantifizierbar, weil jeweils nur von einem maximalen Probenvolumen von ca. 100 µl ausgegangen werden konnte (Abb. 4.1.2.A-B).

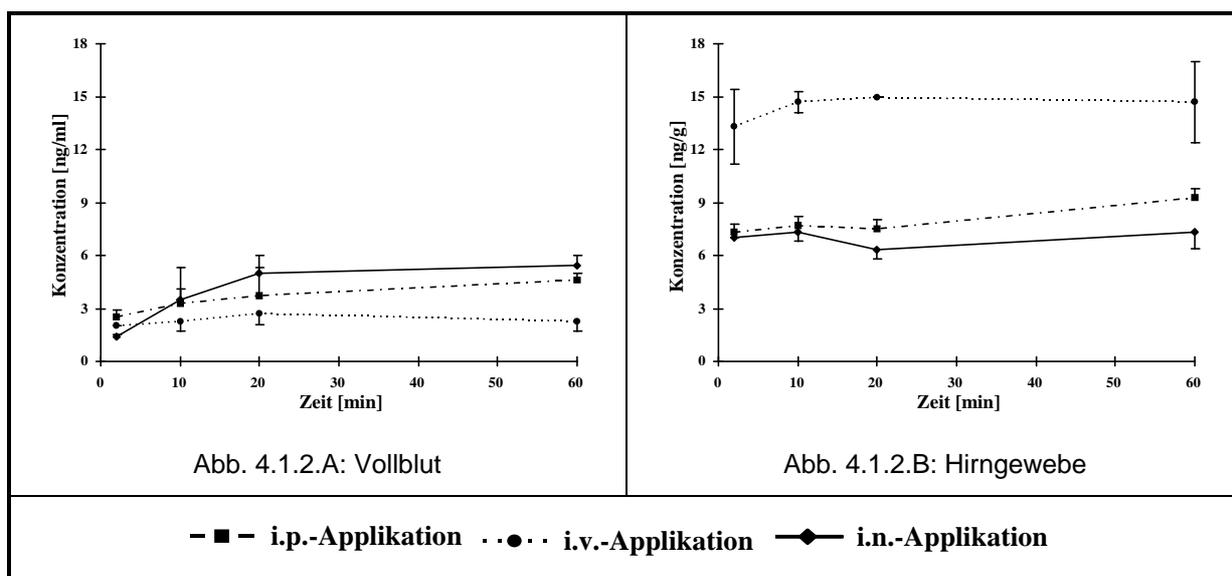


Abb. 4.1.2.A-B: Konzentration von Benzoylcegonin (BE) in verschiedenen Matrices der Ratte nach Applikation von 0,5 mg/kg KG Kokain in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart (n = 3).

4.1.3. Applikationsabhängige Unterschiede in den Gewebekonzentrationen: Gehirn/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten als Maß für die Gewebeselektivität

Um zu prüfen, ob nach der Applikation auf die Nasalmucosa eine erhöhte Gewebespezifität und somit ein verbessertes Gehirntargeting zu erwarten ist als bei den anderen untersuchten

¹ Als nicht signifikant (n.s.) wurde ein p-Wert von > 0,05 angesehen.

Applikationsvarianten wurden die jeweiligen Hirngewebe/Blut- bzw. die CSF/Blut-Quotienten bestimmt. Die errechneten Verhältnisse sind in Abbildung 4.1.3.A-B dargestellt.

Es wurde gefunden, daß die höchsten Hirngewebe/Blut-Quotienten nach Applikation auf die Nasalmukosa zu erreichen sind. Es zeigten sich bereits nach zwei Minuten Hirngewebekonzentrationen, die im Mittel um den Faktor 18 über den Konzentrationen im Vollblut lagen. Im weiteren Verlauf konnte eine Abnahme der Gewebe/Blut-Quotienten in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet werden, bis nach einer Stunde ein mittlerer Quotient von 8 erreicht war. Bei den beiden anderen untersuchten Applikationsvarianten (i.v.- bzw. i.p.-Gabe) wurden deutlich niedrigere Hirngewebe/Blut-Quotienten beobachtet. Der maximale Wert nach i.v.-Gabe lag bei 10; das höchste Hirngewebe/Blut-Verhältnis nach i.p.-Applikation wurde mit im Mittel 6 bestimmt. Zu beachten ist auch, daß in diesen beiden Fällen die maximalen Quotienten nicht initial, sondern mit einer lag-Zeit von ca. 10 Minuten auftraten.

Zwischen den berechneten Hirngewebe/Blut-Quotienten nach i.p.- bzw. i.v.-Gabe kann nur für einen der Messzeitpunkte (20 Minuten) ein signifikanter Unterschied zwischen den Quotienten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu sind die Unterschiede der Hirngewebe/Blut-Quotienten zwischen der i.n.-Gabe und der i.v.- bzw. i.p.-Applikation sowohl zwei als auch 10 Minuten nach Applikation als signifikant anzusehen (s. Tab. 4.1.2.).

Die berechneten CSF/Blut-Quotienten lagen mit im Mittel maximal zwei um eine Zehnerpotenz niedriger als die entsprechenden Gewebe/Blut-Quotienten. Bemerkenswert ist auch, das der maximale Quotient für alle untersuchten Applikationswege nicht initial, sondern erst nach einer lag-Zeit von 5 bis 25 Minuten auftrat (Abb. 4.1.3.B). Daneben fällt für alle untersuchten Applikationsarten eine vergleichsweise hohe Variabilität auf, dennoch war ein signifikanter Vorteil in Bezug auf das Liquor-Targeting (Zeitpunkt 20 Minuten nach Applikation) für die nasale Gabe nachweisbar (Tab. 4.1.2.).

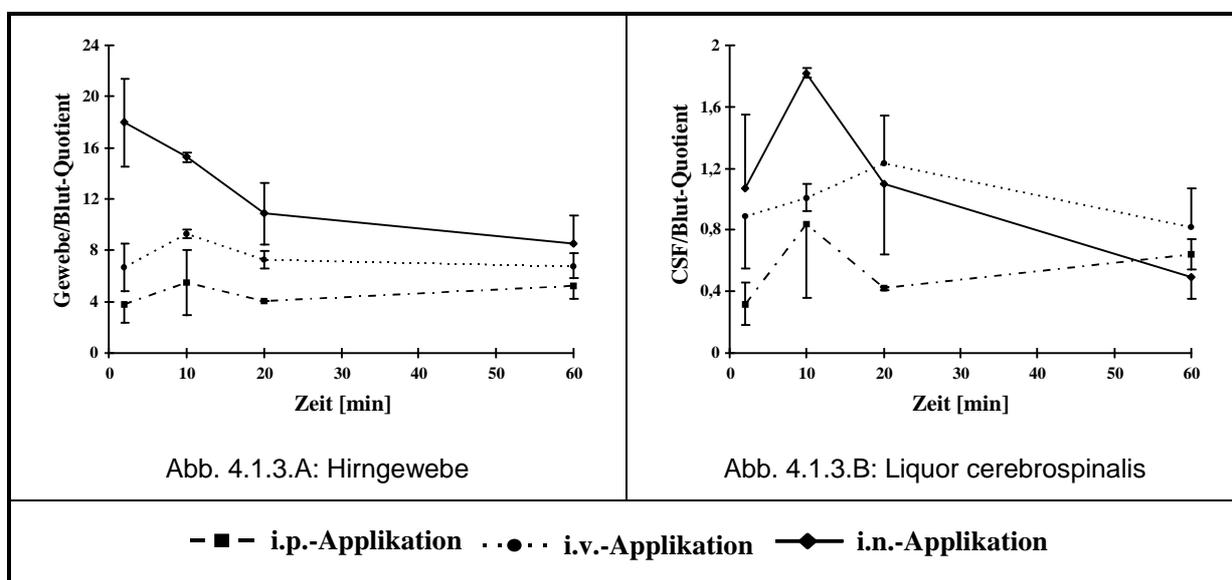


Abb. 4.1.3.A-B: Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten nach Applikation von 0,5 mg/kg KG Kokain an der Ratte in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart (n = 3).

Tab. 4.1.2.: Signifikanzniveaus der Unterschiede der Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten¹ (t-Test nach Student).

Zeit [min]	Hirngewebe/Blut-Quotient			CSF/Blut-Quotient		
	i.v. vs. i.n.	i.v. vs. i.p.	i.n. vs. i.p.	i.v. vs. i.n.	i.v. vs. i.p.	i.n. vs. i.p.
2	< 0,05	n.s.	< 0,01	n.s.	n.s.	n.s.
10	< 0,005	n.s.	< 0,01	< 0,005	n.s.	< 0,05
20	n.s.	< 0,01	n.s.	n.s.	< 0,05	n.s.
60	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

¹ Als nicht signifikant (n.s.) wurde ein p-Wert von > 0,05 angesehen.

4.2. Untersuchungen zu Tranylcypromin

4.2.1. Analytische Methode zur enantiospezifischen Bestimmung in Blut und Gewebe

Aufgrund der Tatsache, daß TCP seit vielen Jahren in der Therapie von affektiven Störungen eingesetzt wird, sind auch bei diesem Arzneistoff zahlreiche analytische Methoden zur Quantifizierung der Konzentrationen in „üblichen“ biologischen Matrices (Blut, Serum, Plasma oder Urin) bekannt. Am weitesten verbreitet sind achirale analytische Methoden - die beim Vorliegen bestimmter Fragestellungen - ausreichende Informationen liefern [z.B. Bailey und Barron, 1980; Krugers-Dagneaux et al., 1992; Aboul-Enein und Abou-Basha, 1996].

Analytische Methoden zum Nachweis von TCP aus Gewebe-Matrices sind bisher selten publiziert worden. Von Calverley et al. [1981] und Baker et al. [1985] werden einander ähnliche GC-Methoden mit Electron-capture-Detektion zum achiralen Nachweis von TCP in Rattenhirn vorgeschlagen. Von der Arbeitsgruppe um Baker wurden verschiedene Arbeiten publiziert, die sich mit dem Metabolismus des TCP beschäftigen. Hierzu wurden analytische Methoden entwickelt, die auch eine Bestimmung von TCP-Metaboliten neben der Muttersubstanz ermöglichen. Als wichtigster Metabolit wurde das 4-Hydroxy-Tranylcypromin identifiziert [Baker et al., 1986; Nazarali et al., 1987; Baker und Coutts, 1989; Baker et al., 1994].

Im Gegensatz zu achiralen analytischen Verfahren wurden bisher nur wenige enantioselektive Analysenmethoden für TCP publiziert. Aboul-Enein und Serignese [1995] stellten ein direktes HPLC-Verfahren vor, mit dem TCP aus Urin mittels einer festen chiralen Phase (chiral solid phase; CSP) enantioselektiv bestimmt werden kann. Ebenfalls mit Hilfe einer CSP und Flüssigchromatographie konnten Smith und Pirkle [1986] die Enantiomere verschiedener psychotroper Substanzen (darunter neben TCP auch Baclofen) aus wäßriger Lösung trennen. Ein indirektes enantioselektives DC-Verfahren wurde von Weber et al. [1984] publiziert. Als chirales Derivatisierungsreagenz (chiral derivatizing agent; CDA) fand hierbei Benoxaprofen-Säurechlorid Verwendung. In der Literatur weit verbreitet ist die Anwendung von ortho-Phthaldialdehyd (OPA) in Kombination mit einem SH-Donor-Molekül als CDA für solche Analyten, die eine primäre Aminofunktion tragen [z.B. Bowyer et al., 1995]. Wird als SH-Donor eine enantiomerenreine Substanz gewählt, so entstehen - im Fall eines chiralen Analyten - bei der Reaktion diastereomere, voneinander chromatographisch trennbare Isoindolderivate.

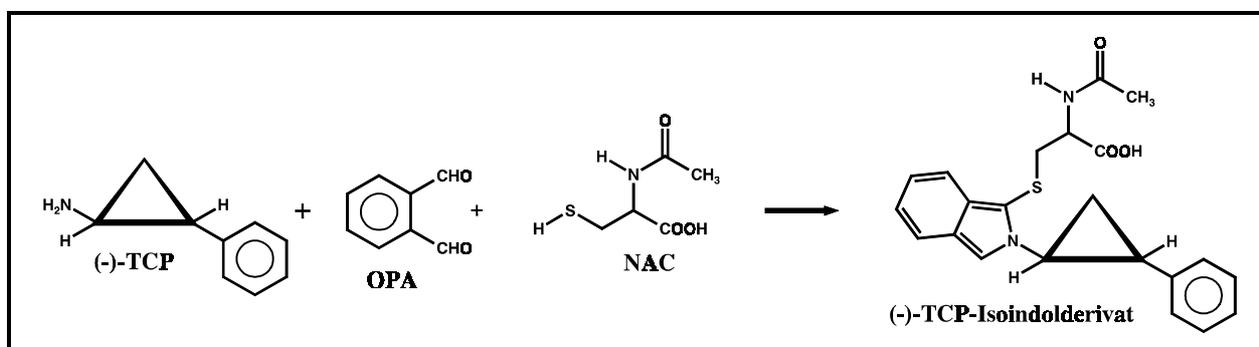


Abb. 4.2.1.: Allgemeines Reaktionsschema der Umsetzung von 1R,2S-(-)-Tranylcypromin mit OPA und dem chiralen SH-Donor NAC.

Als enantiomerenreiner SH-Donor wird sehr häufig **N-Acetyl-L-C**ystein (NAC) verwendet. OPA in Kombination mit NAC wurde in unserem Arbeitskreis bereits in verschiedenen

Studien zur enantioselektiven Analytik von TCP aus Humanplasma und -urin eingesetzt (Abb. 4.2.1.) [Spahn-Langguth et al., 1992; Weber-Grandke et al., 1993]. Diese analytische Methode sollte für die hier vorgestellte Arbeit auf entsprechende Matrices der Ratte (CSF, Blut, Gehirnhomogenat) übertragen werden.

Während die Anwendung des Verfahrens auf Blut und CSF ohne Schwierigkeiten möglich war, konnte bei den Untersuchungen zur Spezifität nach Zugabe von racemischen TCP zu Rattenhirnhomogenat bereits nach wenigen Minuten nur noch eine geringe Konzentrationen an (+)-TCP im Vergleich zum (-)-TCP wiedergefunden werden. In Abbildung 4.2.2.A. ist der entsprechende Konzentrations-Zeit-Verlauf von Ex-vivo/In-vitro-Versuchen dargestellt. Innerhalb von 45 bis 60 Minuten sank die noch verbleibende (+)-TCP-Konzentration bis an die Nachweisgrenze, während die zu messende (-)-TCP-Konzentration nur wenig variierte. Von ähnlichen Phänomenen berichten die Autoren Yonemitsu und Pounder [1993] bzw. Crifasi und Long [1997]. Von Yonemitsu und Pounder konnte nach Inkubation von humanem Vollblut (48 h; 37°C) nur noch 58% der eingesetzten (racemischen) TCP-Konzentration wiedergefunden werden. Von Crifasi und Long wird berichtet, daß nach mehrwöchiger Lagerung (-20°C) von Gewebe-, Urin-, bzw. Blutproben aus humanem Ursprung bei der (achiralen) Wiederholungsbestimmung nur in den Gewebeproben ein Konzentrationsverlust nachweisbar war.

Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die Geschwindigkeit des In-vitro-Abbaus oder der Bindung auch von der Proteinmenge abhängig ist (Abb. 4.2.2.B). Wurde Rattenhirnhomogenat für 15 Minuten auf 60°C erhitzt und erfolgte dann die Inkubation mit racemischem TCP konnten beide Enantiomere im racemischem Verhältnis wiedergefunden werden.

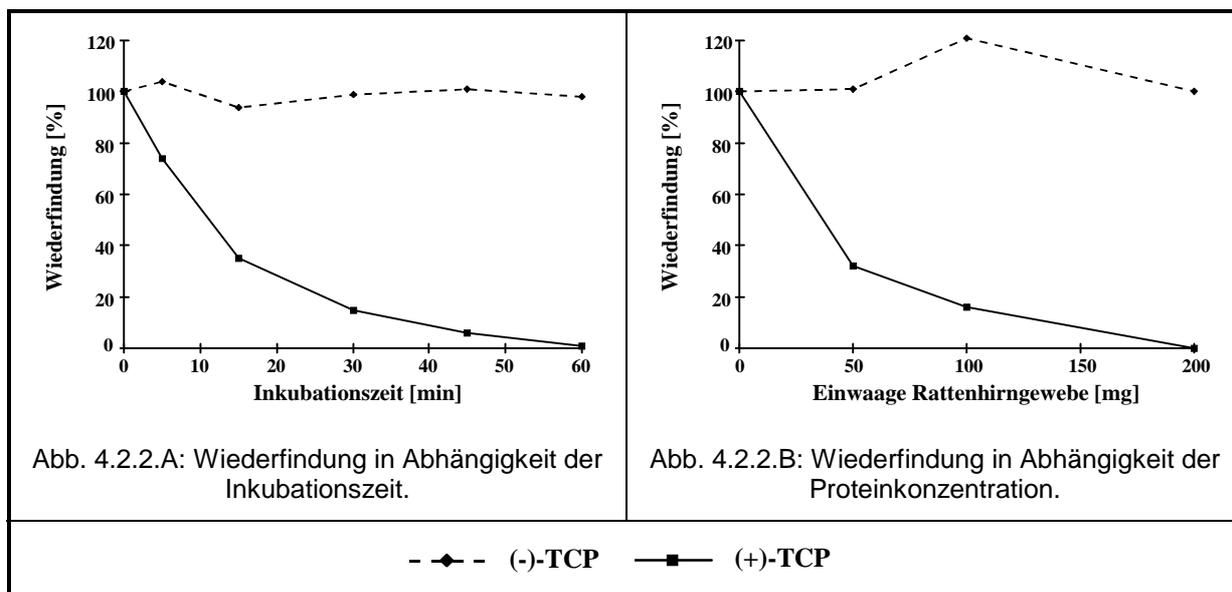


Abb. 4.2.2.A-B: Wiederfindung der TCP-Enantiomere in Abhängigkeit der Inkubationszeit bzw. Proteinkonzentration bei Ex-vivo/In-vitro-Untersuchungen in Rattenhirnhomogenat (Inkubation von 1074 ng/rac-TCP bei +4°C unter Lichtausschluß).

Im Gegensatz dazu war es nicht möglich, vor der thermischen Belastung des Gewebehomogenates zugegebenes rac-TCP nach dem Erhitzen des Gewebes in racemischem Verhältnis nachzuweisen, obwohl sich beide TCP-Enantiomere und das als innerer Standard verwendete D-Amphetamin in Vorversuchen (in wässrige Lösung) unter diesen Bedingungen als thermostabil erwiesen hatten.

In weitergehenden Stabilitätsuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe von Ascorbinsäure eine Protektion des (+)-TCP in der Probe erreicht werden konnte, so daß eine Quantifizierung dieses Enantiomers auch im Hirngewebe möglich war.

4.2.2. TCP-Blut-Konzentrationen

Zunächst erfolgte im Rahmen der Untersuchungen zur individuellen Kinetik bei der Ratte¹ die Bestimmung von pharmakokinetischen Parametern für TCP nach i.v.- bzw. i.n.-Applikation. Aufgrund der verwendeten chiralen Analysenmethode war es möglich, die entsprechenden Daten für beide Enantiomere zu ermitteln.

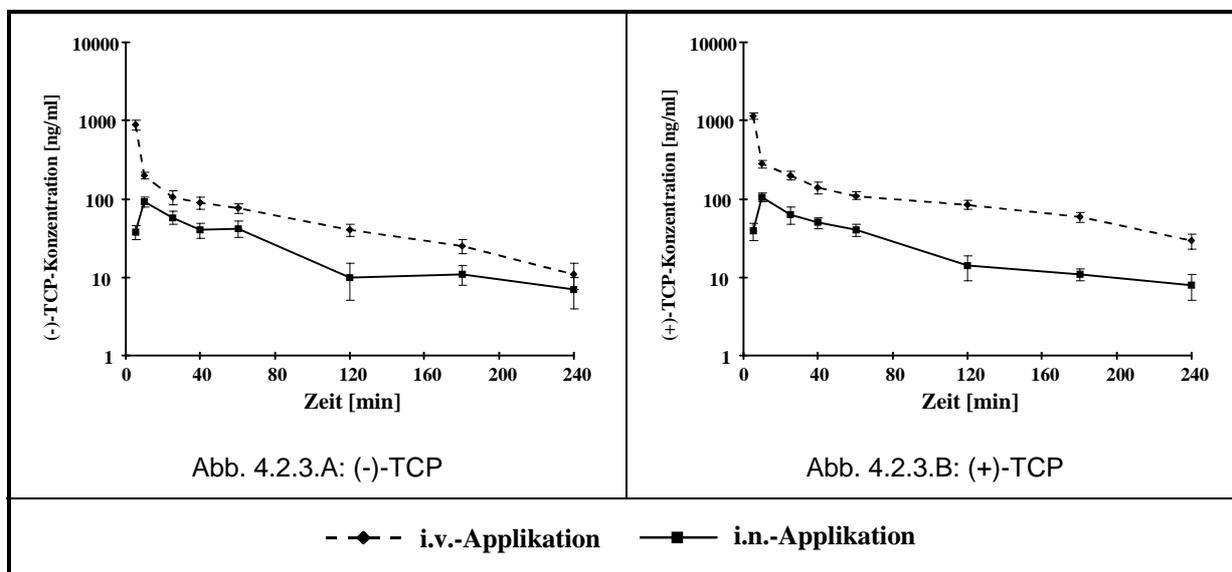


Abb. 4.2.3.A-B: Konzentrations-Zeit-Verlauf von (-)- bzw. (+)-TCP in Rattenblut nach i.v.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP (n = 4).

In Abbildung 4.2.3.A-B sind die Konzentrations-Zeitprofile jeweils nach nasaler und intravenöser Applikation für die TCP-Enantiomere dargestellt. Nach i.v.-Applikation ergaben sich initial als höchste Konzentrationswerte Werte von ca. 1 µg/ml für beide untersuchte Enantiomere. Die C_{max} -Werte nach nasaler Gabe wurden bei den Studien zur individuellen Kinetik erst nach einer Versuchsdauer von 10 Minuten erreicht. Weiterhin war festzustellen, daß sowohl nach i.v.- wie auch i.n.-Applikation die Konzentration des (+)-TCP die des (-)-TCP überstieg. In Tabelle 4.2.1. sind die aus den erhaltenen Blutkonzentrations-Zeit-Profilen an Ratten ermittelten pharmakokinetischen Parameter angegeben.

Tab. 4.2.1.: Mittlere pharmakokinetische Parameter für (-)- bzw. (+)-TCP bei der Ratte.		
Bestimmte Parameter ²	(-)-TCP	(+)-TCP
Verteilungsvolumen im steady-state; V_{ss} [ml×kg ⁻¹]	825	761
Clearance; CL [ml×min ⁻¹ ×kg ⁻¹]	43	31
Halbwertszeit; $t_{1/2}$ [min]	106	137
Bioverfügbarkeit nasal [%]	43	66

Vergleicht man nach i.n.-Applikation die Blutspitzenkonzentrationen der beiden TCP-Enantiomere, die bei diesen Kinetik-Studien ermittelt wurden, mit den „punktuell“ vorhandenen, d.h. von verschiedenen Ratten verfügbaren Blutkonzentrationen, die bei der Durchführung der Versuche zur Bestimmung der Hirngewebe- bzw. CSF/Blut-Quotienten

¹ Die Konzentrationswerte zur individuellen Kinetik bei der Ratte stammen aus einer früheren Arbeit von Langguth und Spahn-Langguth [1995].

² Die Extrapolation zwischen t = 0 und dem ersten Meßpunkt erfolgte im Fall der i.v.-Applikation nach Methode E3; nach Gabe auf die Nasalmucosa nach Methode E1 (TOPFIT-Software; s. Abschnitt 8.3.).

(Verteilungsstudien) gefunden wurden, so fällt auf, daß die punktuell bestimmten C_{\max} -Werte generell höher lagen, obwohl die äußeren experimentellen Bedingungen jeweils identisch waren. Wie auch bei den Kinetikstudien konnte im Blut sowohl nach i.p.- als auch nach i.n.-Applikation innerhalb der ersten 20 Minuten nach Gabe eine höhere Konzentrationen von (+)-TCP als von (-)-TCP nachgewiesen werden (Abb. 4.2.4.A-B).

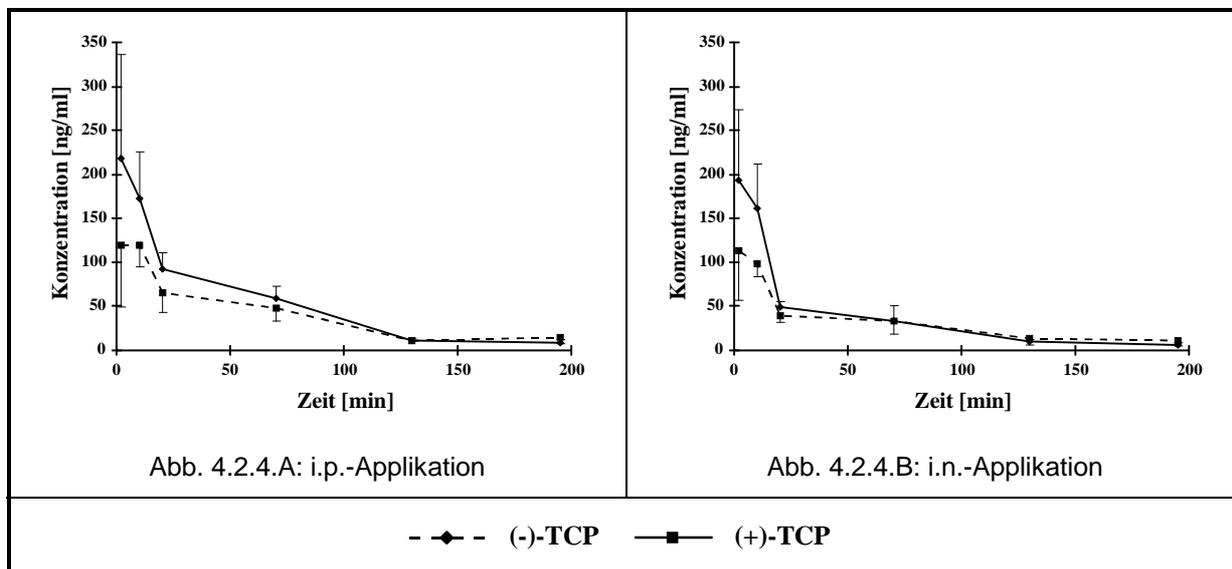


Abb. 4.2.4.A-B: Blutkonzentrations-Zeit-Verläufe der TCP-Enantiomere aus den Versuchen zur Gewebe/Blut- bzw. Liquor/Blut-Quotienten-Bestimmung nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg rac-TCP (n = 3-5).

Es ist auch zu beachten, daß bei den ZNS-Verteilungsstudien - insbesondere initial - im Mittel deutlich größere Konzentrationsunterschiede zwischen den TCP-Enantiomeren auftraten als bei den Individualkinetik-Studien, ebenso ist eine deutlich größere Streuung der Einzelwerte feststellbar. Signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Applikationsarten ($p < 0,05$ im t-Test nach Student) konnten nicht nachgewiesen werden. Aus den in Abbildung 4.2.4.A-B dargestellten Daten wurden die terminalen Halbwertszeiten und die terminalen Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten für beide TCP-Enantiomere in Abhängigkeit der Applikationsart abgeschätzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2.2. zusammengefaßt.

Tab. 4.2.2.: Abgeschätzte pharmakokinetische Parameter beider TCP-Enantiomere in Rattenblut aus den Daten der Untersuchung zur Gewebeverteilung von Tranylcypromin.				
Enantiomer	i.p.-Applikation		i.n.-Applikation	
	terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min^{-1}]	terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min^{-1}]
(-)-TCP	76	0,009	80	0,009
(+)-TCP	47	0,015	51	0,014

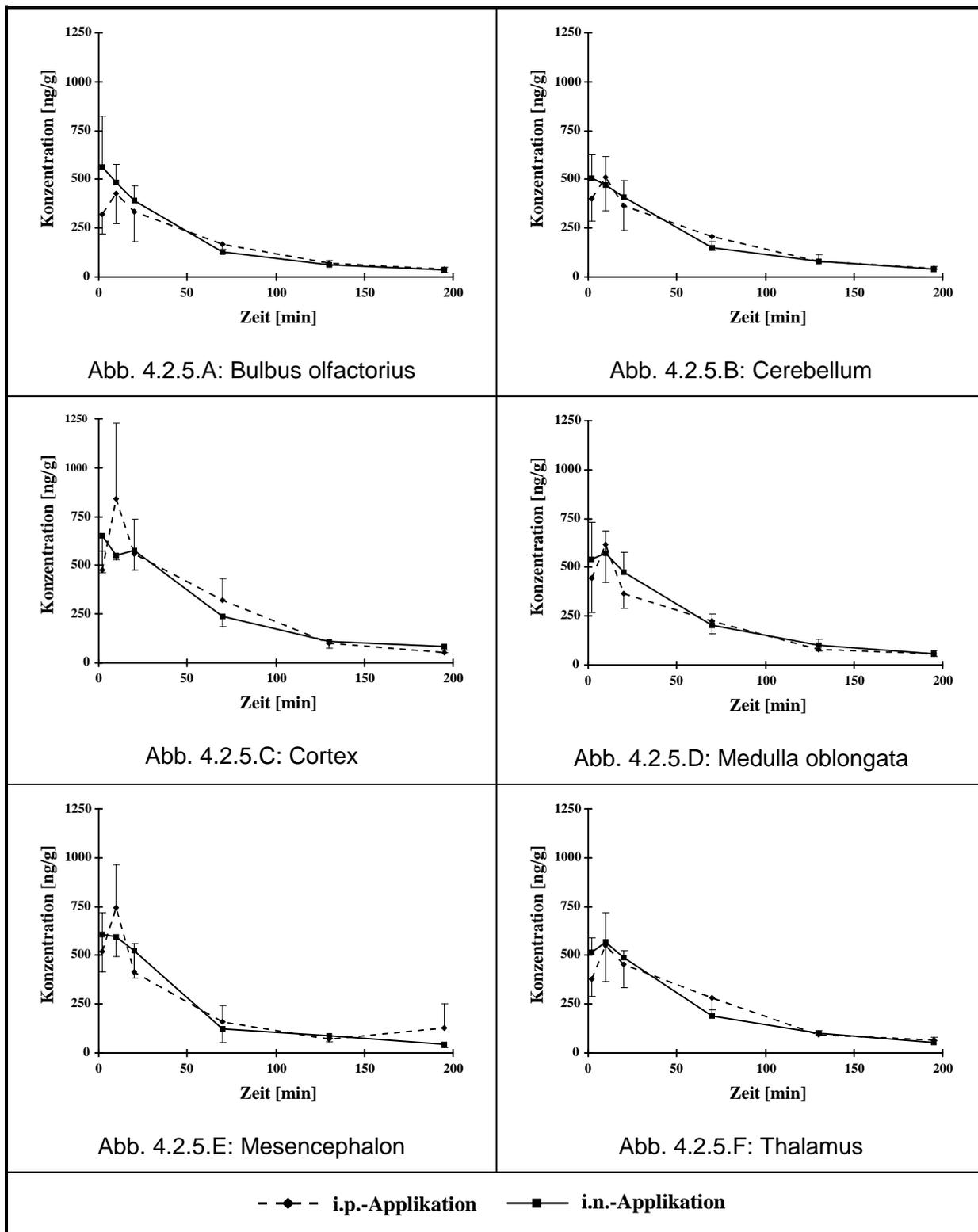


Abb. 4.2.5.A-F: Konzentrations-Zeit-Verläufe von (-)-TCP in verschiedenen anatomischen Untereinheiten des Ratten-ZNS nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP (n = 3-5).

4.2.3. TCP-Hirn- und -Liquor-Konzentrationen

Innerhalb der verschiedenen Gehirnareale war bei den Gewebekonzentrationen des (-)-TCP kein signifikanter Unterschied zwischen den Applikationswegen festzustellen. Für alle betrachteten Organteile konnten Spitzenkonzentrationen von im Mittel zwischen 500 und 700 ng/g Gewebe nachgewiesen werden. In Abbildung 4.2.5.A-F sind die mittleren Konzentrations-Zeit-Verläufe in den Gehirnarealen dargestellt. Tendenziell ist zu beobachten, daß nach Applikation des TCP in die Nasenhöhle im Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex und Mesencephalon bereits zwei Minuten nach Applikation die höchsten mittleren Konzentrationen erreicht wurden. In der Medulla oblongata und Thalamus kam es zwischen 2 und 10 Minuten nach der Applikation in die Nasenhöhle zu einem Konzentrationsanstieg, der jedoch schwächer ausgeprägt war als nach i.p.-Applikation.

Im Gegensatz hierzu war in allen untersuchten Hirnarealen nach i.p.-Gabe bei den Mittelwerten ein deutlicher Anstieg der (-)-TCP-Konzentration innerhalb der ersten 10 Minuten feststellbar; ein statistisch signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den untersuchten Applikationsarten lag jedoch nicht vor. Für die verschiedenen Gehirnareale war für das (-)-TCP die Berechnung der terminalen Halbwertszeit und der terminalen Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten möglich. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 4.2.3. dargestellt. Sichere Konzentrationswerte für das (+)-TCP konnten nur für die Meßzeiten 2 und 10 Minuten bestimmt werden. Obwohl aufgrund der Datenmenge eine statistische Signifikanz nicht nachgewiesen werden konnte, war auch für das (+)-TCP eine gegenüber dem (-)-TCP gleichsinnige Tendenz erkennbar.

Während nach i.n.-Gabe die höchste Konzentration des (+)-TCP in allen Hirnteilen bereits nach zwei Minuten erreicht ist, kam es nach i.p.-Gabe im Verlauf der ersten zehn Minuten nach Applikation noch zu einem Konzentrationsanstieg. Die entsprechenden Mittelwerte sind in Tabelle 4.2.2. aufgelistet.

In Abbildung 4.2.6.A-B sind die Konzentrationen der (-)-TCP- und (+)-TCP-Bestimmungen im Rattenliquor dargestellt. Obwohl für diese Matrix nur wenige Datenpunkte vorlagen, ist ebenfalls - vor allem initial - tendenziell ein Vorteil für die nasale Applikation zu vermuten. Zwei Minuten nach Applikation in die Nasenhöhle konnte für beide Enantiomere im Mittel die vierfache TCP-Konzentration im Vergleich zur i.p.-Gabe ermittelt werden (Signifikanzniveau im t-Test nach Student: $p < 0,05$).

Nach i.p.-Applikation konnte weder für die Zeitpunkte 10 noch 20 Minuten CSF isoliert werden, so daß ein Vergleich der beiden Applikationswege für diesen Zeitraum nicht möglich ist. Siebzig Minuten nach der Applikation schließlich zeigen sich für beide Wege vergleichbare mittlere Konzentrationen.

Organteil	i.p.-Applikation		i.n.-Applikation	
	terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min^{-1}]	terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min^{-1}]
Bulbus olfactorius	70	0,010	67	0,010
Cerebellum	58	0,012	64	0,011
Cortex	49	0,014	83	0,008
Medulla oblongata	56	0,012	69	0,010
Mesencephalon	94	0,007	86	0,008
Thalamus	59	0,012	69	0,010

Tab. 4.2.2.: Mittlere (+)-TCP-Konzentrationen [ng/g] in verschiedenen Hirnarealen der Ratte in Abhängigkeit von der Zeit und der Applikationsart (n = 3).

Untersuchtes Gehirnareal	i.n.-Applikation		i.p.-Applikation	
	2 min	10 min	2 min	10 min
Bulbus olfactorius	325	244	162	190
Cerebellum	273	217	187	220
Cortex	315	232	220	361
Medulla oblongata	303	259	222	290
Mesencephalon	314	273	250	343
Thalamus	250	238	176	228

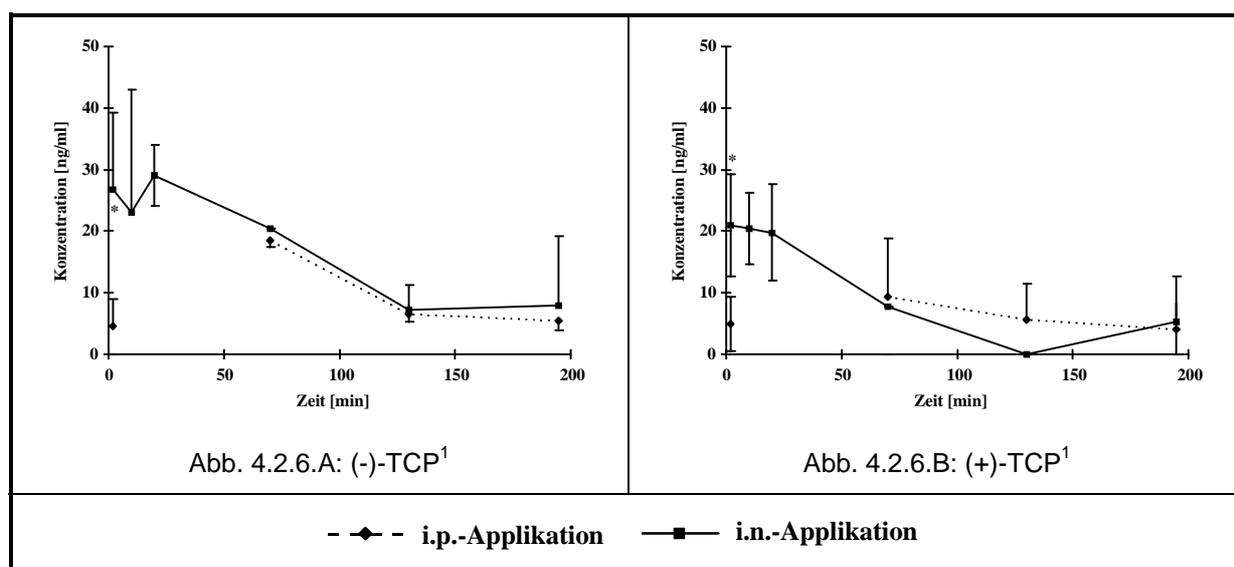


Abb. 4.2.6.A-B: Konzentrations-Zeit-Verläufe von (-)-TCP bzw. (+)-TCP in Ratten-CSF nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP (n = 3-5).

4.2.4. Gehirn/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten als Maß für die Gewebeselektivität

Die sich ergebenden Gewebe/Blut-Quotienten der einzelnen untersuchten Gehirnareale für das im Rattenhirngewebe ausreichend stabile (-)-TCP sind in Abbildung 4.2.7. A-F dargestellt. Bei dieser Untersuchung war zu beobachten, daß sich nach Injektion in den Peritonealraum die Gewebe/Blut-Quotienten nur relativ wenig verändern. Ein kleines Maximum dieses Quotienten tritt 20 Minuten nach Applikation auf, ein zweiter Anstieg kann nach 130 Minuten beobachtet werden. Die maximal berechneten Hirngewebe/Blut-Quotienten für das (-)-TCP nach i.p.-Applikation lagen im Mittel bei 9 (Cortex), in allen anderen untersuchten Arealen jedoch deutlich niedriger. Im Gegensatz hierzu kam es nach Gabe auf die Nasalmukosa 20 Minuten nach Applikation in allen untersuchten Hirnregionen zu einem massiven Anstieg der Quotienten. Es wurden Hirngewebe/Blut-Verhältnisse von im Mittel 10-15 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist in allen untersuchten Gehirnareale von einem signifikanten Unterschied der Gewebe/Blut-Quotienten auszugehen. Die ermittelten Signifikanzniveaus sind in Abbildung 4.2.7.A-F angegeben.

¹ * = Signifikanzniveau im Student's t-Test p < 0,05.

Tab. 4.2.3.: Mittlere Liquor/Blut-Quotienten von (+)-TCP nach i.p.- bzw. i.n.-Gabe von 0,5 mg/kg KG rac-TCP (n = 3).

Untersuchtes Gehirnareal	i.n.-Applikation			i.p.-Applikation		
	2 min	10 min	Tendenz	2 min	10 min	Tendenz
Bulbus olfactorius	1,6	1,6	⇒	0,9	1,1	↗
Cerebellum	1,4	1,3	⇒	1,0	1,3	↗
Cortex	1,6	1,5	⇒	1,2	2,0	↑
Medulla oblongata	1,5	1,7	↗	1,1	1,7	↑
Mesencephalon	1,6	1,6	⇒	1,3	2,0	↑
Thalamus	1,3	1,5	↗	1,0	1,3	↗

Für die Meßpunkte der untersuchten Gehirnareale unter 20 Minuten für die eine Stabilisierung mit Ascorbinsäure erfolgt war, konnten die Gewebe/Blut-Quotienten auch für das (+)-TCP bestimmt werden. In Tabelle 4.2.3. sind die berechneten Gewebe- bzw. CSF/Blut-Quotienten dargestellt. Es zeigte sich hierbei ein dem (-)-Enantiomer ähnliches Bild: Bei nasaler Applikation wurden nach zwei Minuten höhere Gewebe/Blut-Quotienten gefunden als nach i.p.-Gabe; (10 Minuten nach Applikation) war für die Quotienten aller Gehirnareale nach i.p.-Gabe ein Anstieg festzustellen, während die entsprechenden Quotienten nach Applikation auf die Nasalmucosa im Vergleich zum 2-Minuten-Wert stagnierten bzw. nur noch leicht anstiegen.

Eine statistische Signifikanz der Unterschiede war mit Hilfe des t-Test nach Student jedoch nicht nachweisbar. Die gefundenen Gewebe/Blut-Quotienten des (+)-Enantiomers lagen im Vergleich zum (-)-TCP zu den entsprechenden Zeitpunkten um den Faktor 3-5 niedriger. In Abbildung 4.2.8.A-B sind die berechneten Liquor/Blut-Quotienten für beide TCP-Enantiomere dargestellt. Es ist hierbei zu beachten, daß nach i.p.-Gabe nicht bei allen Versuchstieren eine CSF-Probengewinnung geglückt war, so daß lückenhafte Daten vorlagen, bzw. die Angabe einer Standardabweichung nicht immer möglich war.

Zu allen Zeitpunkten, an denen ein Vergleich zwischen den beiden Applikationsvarianten möglich war, konnten für das (-)-TCP nach Gabe in die Nasenhöhle höhere CSF/Blut-Quotienten berechnet werden. Für das (+)-TCP ist eine Aussage aufgrund der ausgeprägteren Streuung der Meßwerte nicht möglich. Wie auch beim Kokain ist ersichtlich, daß die für die CSF/Blut-Quotienten erhaltenen Werte für beide TCP-Enantiomere um eine Zehnerpotenz niedriger lagen als die vergleichbaren Hirngewebe/Blut-Quotienten. Signifikante Quotientenunterschiede zwischen den Applikationsarten waren mit Hilfe des t-Test nach Student nicht nachweisbar.

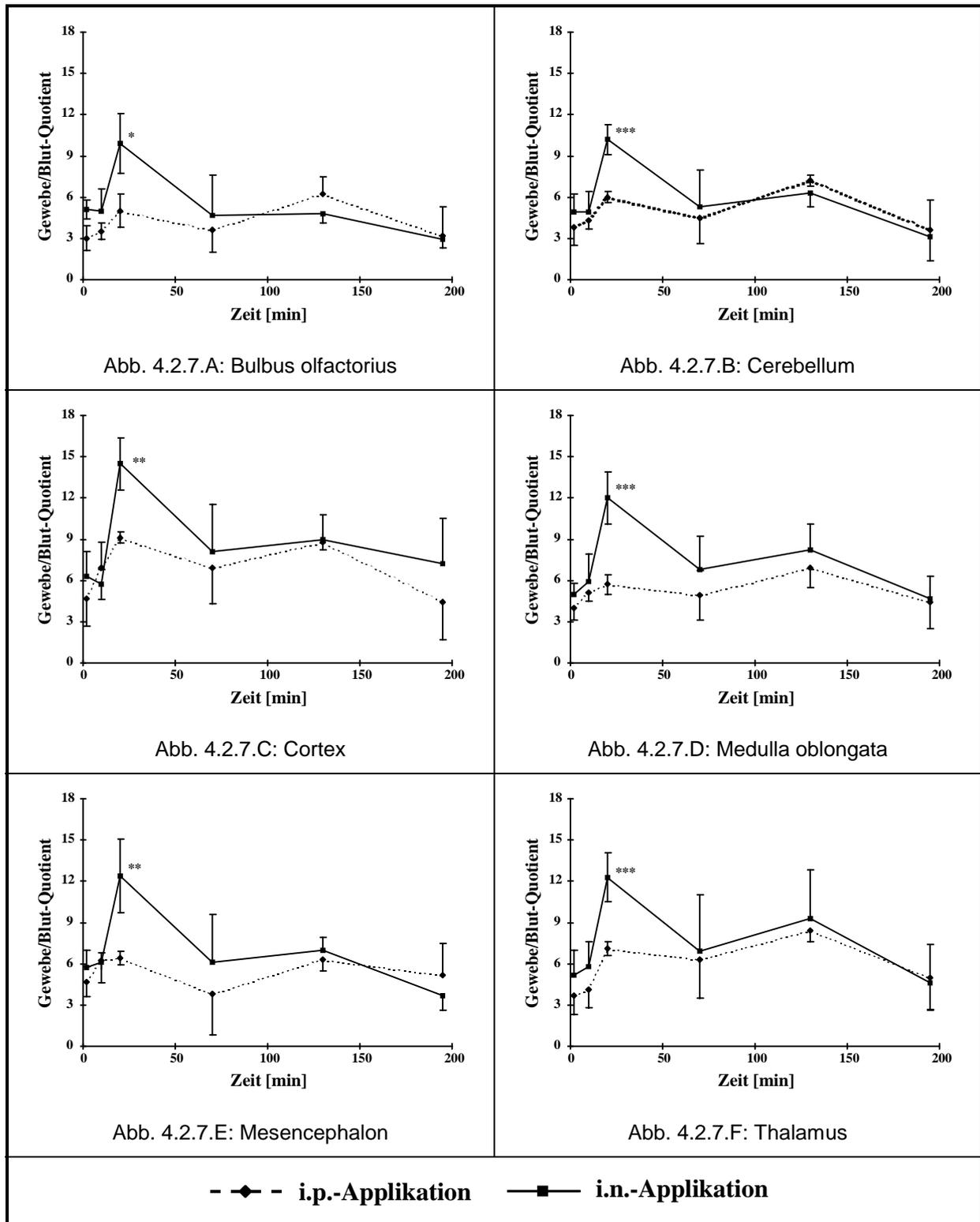


Abb. 4.2.7.A-F: Gewebe/Blut-Quotienten in verschiedenen anatomischen Untereinheiten des RattenzNS nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg rac-TCP (n = 3-5)¹.

¹ Signifikanzniveaus der Quotienten: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,005

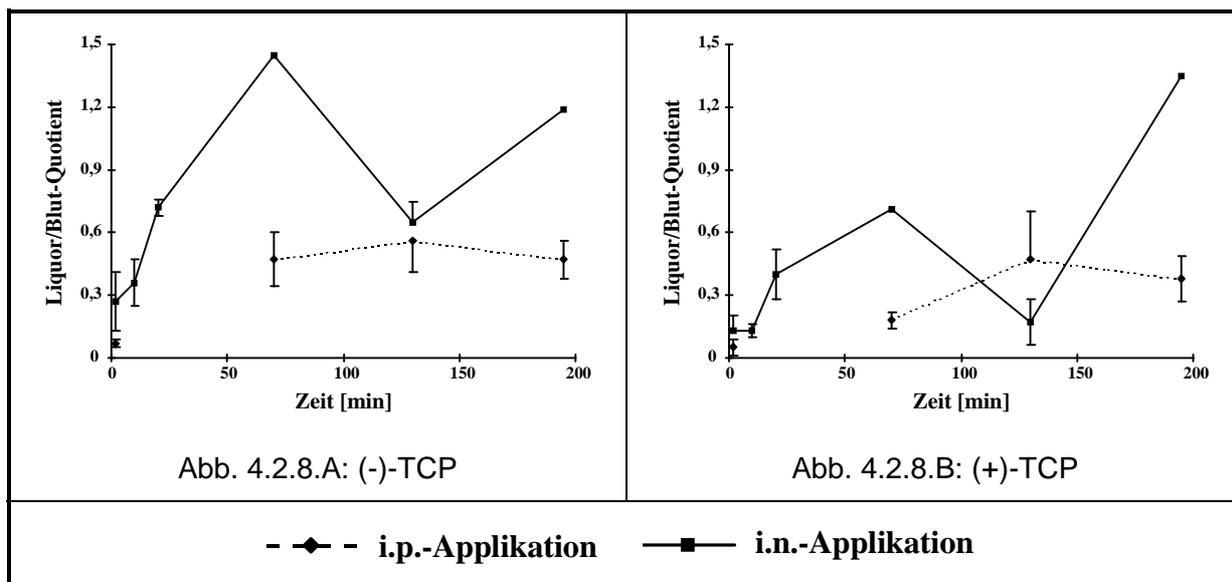


Abb. 4.2.8.A-B: Liquor/Blut-Quotienten nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg rac-TCP bei der Ratte (n = 3-5).

4.2.5. Untersuchungen an Caco-2-Zell-Monolayern

Ausgehend von der ausgeprägten und offenbar Lipophilie-bedingten Permeation in das ZNS wurde postuliert, dass TCP generell gut durch biologische Barrieren permeiert, und dies in vitro am System der Caco-2-Zellmonolayer verifiziert. Man ging davon aus, dass auch hier die Permeabilität sehr hoch sein würde. Zur Charakterisierung des TCP-Transportes sollten die effektiven Permeabilitäten (P_{eff}) berechnet und geprüft werden, ob eine Diskriminierung der beiden TCP-Enantiomere beim Durchgang durch die intestinale Zellschicht erfolgt. In Abbildung 4.2.9. sind die ermittelten Daten dargestellt.

Es zeigte sich eine starke Anreicherung beider TCP-Enantiomere auf der Akzeptorseite des Systems. Bereits nach 20 Minuten waren dort mit 0,8 $\mu\text{g/ml}$ mehr als 25% der Endkonzentration erreicht. Wie aus der Darstellung 4.2.9. deutlich wird, scheint sich nach 120 Minuten Versuchsdauer ein Gleichgewicht zwischen Akzeptor und Donorseite einzustellen, wobei die Konzentration auf der Donorseite bei ca. 14 $\mu\text{g/ml}$ und auf der Akzeptorseite bei ca. 3 $\mu\text{g/ml}$ lag.

Signifikante Unterschiede der Enantiomerenkonzentrationen waren weder auf der Donor- noch der Akzeptorseite festzustellen. Aus dem linearen Anteil der Konzentrations-Zeit-Verläufe (Zeitpunkte 0 bis 80 Minuten) wurde die effektiven Permeabilitäten (P_{eff}) für beide Enantiomere nach Gleichung 4.2.1. berechnet.

$$P_{\text{eff}} = \frac{dc}{dt} \times 60^{-1} \times A^{-1} \times C_0^{-1} \quad (4.2.1.)$$

Hierbei stellt dc/dt die Steigung des Konzentrations-Zeit-Verlaufes dar, während A die Filterfläche [cm^2] und C_0 der Ausgangskonzentration [nmol/l] der Donorseite repräsentiert.

Es ergaben sich als Mittelwerte (n = 3) folgende Daten:

$$P_{\text{eff}} [(-)\text{-TCP}] = 17,8 \times 10^{-6} (\pm 3,2 \times 10^{-6}) \text{ cm} \times \text{s}^{-1},$$

$$P_{\text{eff}} [(+)\text{-TCP}] = 17,9 \times 10^{-6} (\pm 3,2 \times 10^{-6}) \text{ cm} \times \text{s}^{-1},$$

die vergleichsweise hohe Werte für diesen Parameter darstellen und keine Unterschiede zwischen den Enantiomeren erkennen lassen.

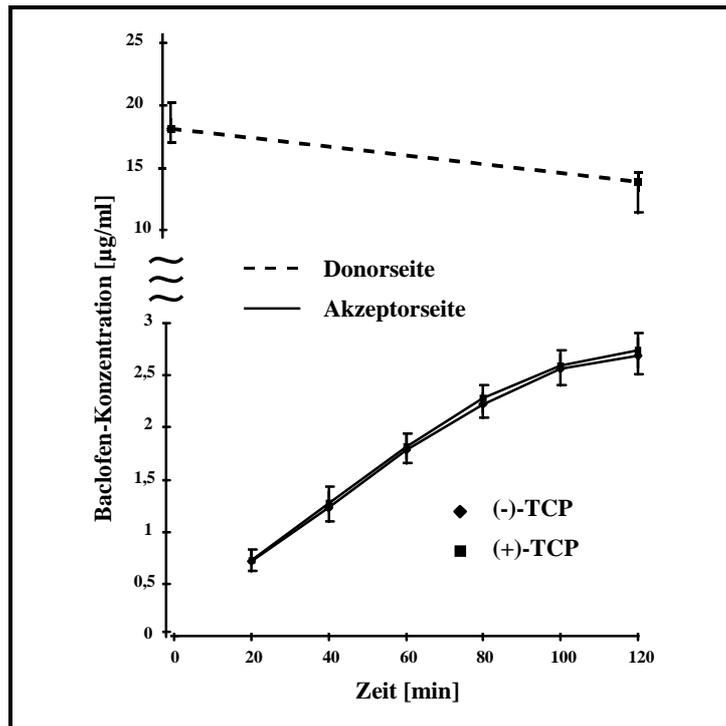


Abb. 4.2.9.: Konzentration der TCP-Enantiomere aus Permeationsversuchen durch Caco-2-Monolayer-Zellschichten.

4.3. Untersuchungen zum Baclofen

4.3.1. Analytische Methode für Baclofen in Blut und Geweben

Da sich Baclofen bereits seit vielen Jahren im klinischen Einsatz befindet, sind für diesen Wirkstoff zahlreiche analytische Methoden publiziert. In der Literatur sind vor allem achirale analytische Methoden beschrieben, wobei gaschromatographische und flüssigchromatographische Verfahren angewendet werden. Beispiele für GC-Methoden sind Arbeiten von Degen und Riess [1976], Anderson et al. [1984], Kochak und Honc [1984] und Fraser et al. [1991], wobei auffällt, daß die Anreicherung des Baclofen aus verschiedenen biologischen Matrices offensichtlich große Probleme bereitet. Noch weiter als GC/MS-Methoden sind flüssigchromatographische Verfahren zur Bestimmung von Baclofen verbreitet. Aus biologischem Material erfolgt die Isolierung entweder mit Hilfe von Festphasenextraktions-Verfahren oder durch Proteinpräzipitation. Die Detektion gelingt durch Messung der UV-Absorption [Harrison et al., 1985; Wuis et al., 1987b; Sallerin-Caute et al., 1988; Rustum, 1989]. Nach Derivatisierung mit Fluorophoren wird eine entsprechende Detektion von Wuis et al. [1987a], Wall und Baker [1989] und Tosunoglu und Ersoy [1995] beschrieben.

Wie beim TCP handelt es sich ja auch beim Baclofen um eine chirale Substanz, die als Razemat im Handel ist und als solches in der Therapie eingesetzt wird. In der Literatur wurden demnach auch verschiedene enantioselektive Methoden beschrieben: Mit Hilfe einer GC-Technik konnten Sioufi et al. [1988] die Baclofenenantiomere in Humanplasma und -urin quantifizieren. Ein direktes flüssigchromatographisches Verfahren wurde von Weatherby et al. [1984] vorgestellt, bei dem die präparative Trennung von razemischem Baclofen aus Lösung mittels einer achiralen C-18 Phase und eines chiralen Eluenten gelang. Darüber hinaus sind weitere indirekte HPLC-Verfahren publiziert, bei denen verschiedene CDA's angewendet wurden und die Trennung der entstehenden diastereomeren Derivate auf achiralen stationären Phasen durchgeführt werden konnte [Wuis et al., 1985; Wuis et al., 1987a; Spahn et al., 1988].

Analytische Methoden zur Bestimmung von Baclofen in Geweben sind selten. Wall und Baker [1989] beschreiben eine Festphasenextraktions-Methode aus Rattenleberhomogenat mit der anschließenden (achiralen) Derivatisierung mit OPA und tert-Butylthiol. In einer Arbeit von Popova et al. [1995] wird die achirale Quantifizierung von Baclofen in Rattenplasma und Rattenhirngewebe beschrieben. Als Aufarbeitungsvorschrift wird eine Proteinpräzipitation mit Acetonitril angegeben, die erreichbare Nachweisgrenze für rac-Bac (UV-Detektion) lag bei 400 ng/g Gewebe. Eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze auf Grundlage dieser Arbeitsvorschrift konnte nicht erreicht werden. Ein ähnliches Verfahren zur Aufbereitung von Hirngewebeproben wird von Deguchi et al. [1995] vorgeschlagen. Zur Proteinpräzipitation erfolgt der Zusatz von wässrigem Methanol, wobei nach Homogenisierung eine Fällungszeit von 8 Stunden bei -20°C angegeben wurde. Nach Zentrifugation erfolgt eine achirale Derivatisierung mit OPA und 2-Mercaptoethanol.

Aufgrund der sehr niedrigen Dosis, die in der vorliegenden Arbeit appliziert wurde (1 mg/kg KG), konnte nur für Rattenvollblut und CSF Proteinpräzipitationen für die Aufreinigung eingesetzt werden. Als gut verwendbar für diesen Zweck erwies sich Methanol, während nach Zugabe von Acetonitril eine Wiederfindung von Baclofen im vorliegenden Konzentrationsbereich nicht möglich war.

Zur Analytik in Rattenhirngewebe mußte ein neues Aufbereitungsverfahren entwickelt werden, um die bei der Blut- und CSF-Matrix notwendige Verdünnung im Rahmen der Proteinpräzipitation zu vermeiden. In Anlehnung an eine Arbeit von Sioufi et al. [1988] erfolgte die Entwicklung einer Festphasenextraktions-Methode, die den Nachweis von 15 ng/g Hirngewebe ermöglichte. Als analytische Methode für die vorgesehene Studie mit

Baclofen wie auch den Esterderivaten (s. Kapitel 4.4.) sollte eine von Wuis beschriebene enantioselektive Methode auf die zu untersuchenden Matrices der Ratte umgearbeitet werden [Wuis et al., 1987a]. Das vorgeschlagene Verfahren zeichnet sich durch - im Vergleich zu anderen Arbeiten mit den Derivatisierungsreagenzien OPA und NAC - außergewöhnliche Derivatisierungsbedingungen aus: Während andere Autoren auf die Labilität und die damit verbundene kurze Quantifizierbarkeit der entstehenden Isoindolderivate hinweisen, schlägt Wuis eine Reaktionszeit von 20 Minuten bei einer Temperatur von 70°C vor.

In der Tat konnten bei der Reproduktion Diastereomeren-artige Signale im Chromatogramm nachgewiesen werden, die jedoch - beide - in gleicher Intensität und bei gleichen Retentionszeiten ebenfalls bei Umsetzung der einzelnen Enantiomere des Baclofens auftraten und sich auch bei der Derivatisierung von Leerproben ergaben (Abb. 4.3.1.B). Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 4.3.1.A-B jeweils ein einzelnes Signal (Retentionszeit ca. 10 Minuten), das nur in Gegenwart von Baclofen zu beobachten war. Eine Trennung der diastereomeren Isoindol-Derivate konnte unter keinen Umständen erzielt werden.

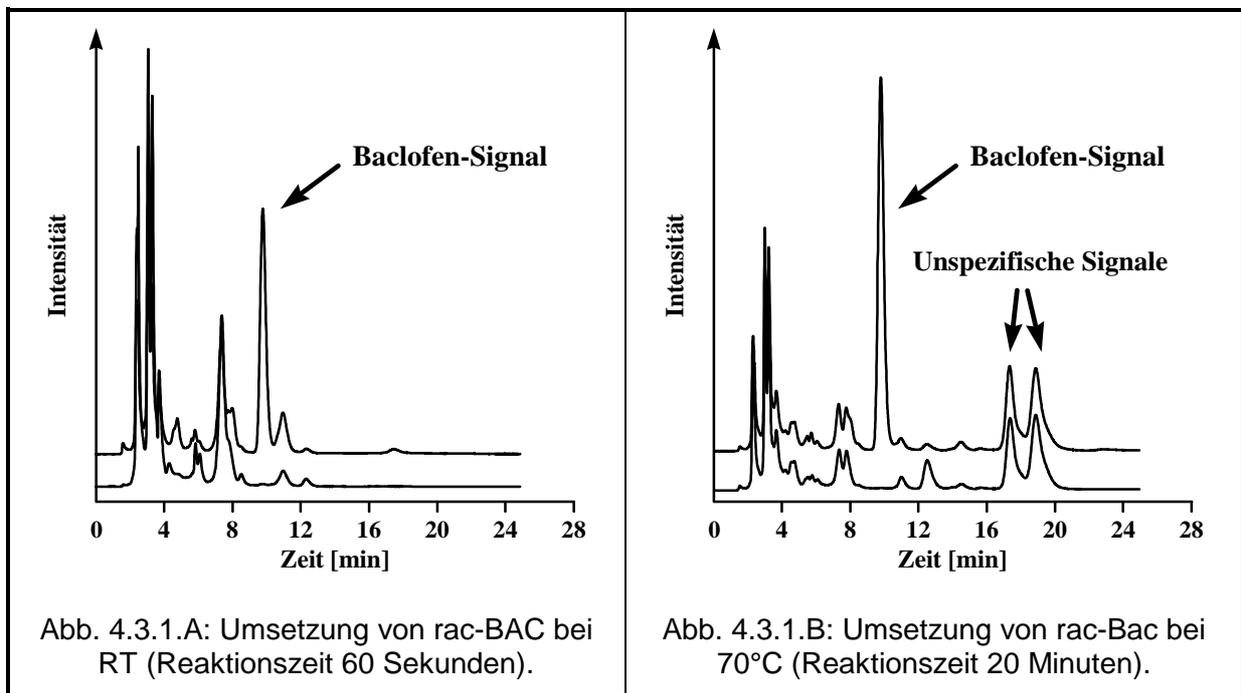


Abb. 4.3.1.A-B: Umsetzung von rac-Baclofen mit OPA und NAC bei verschiedenen Bedingungen.

Obwohl eine enantioselektive analytische Methode wünschenswert gewesen wäre, wurde ein an die Arbeiten von Wuis angelehntes achirales analytisches Verfahren entwickelt. Durch den „Verlust“ der Informationen in Bezug auf die Enantiomerenverteilung konnte eine verbesserte Nachweisgrenze erreicht werden. Als sehr vorteilhaft erwies sich dies bei der Konzentrationsbestimmung von Baclofen im Hirngewebe und bei der Untersuchung von in-vivo rückgespaltenem Baclofen im Rattenvollblut nach Gabe der Baclofenesterderivate (s. Abschnitt 4.4.).

4.3.2. Baclofen-Blut-Konzentrationen

Im Rahmen der kinetischen Charakterisierung der Dispositionsparameter von Baclofen wurde der in Abbildung 4.3.2.A dargestellte mittlere Konzentrations-Zeit-Verlauf erhalten.

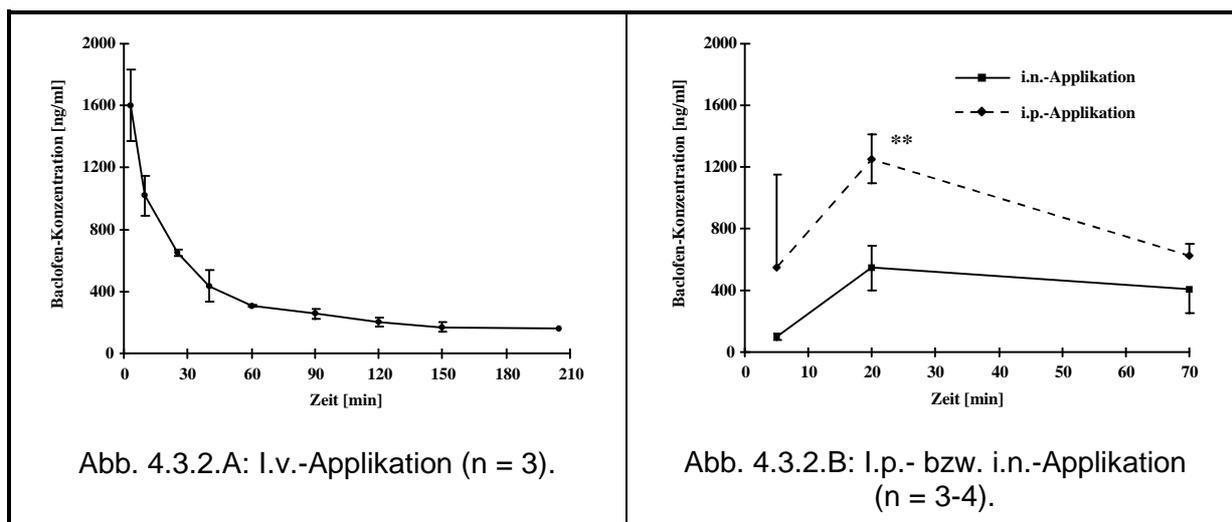


Abb. 4.3.2.A-B: Baclofen-Konzentrations-Zeitverläufe im Blut über 3,5 h nach i.v.- bzw. über 70 Minuten nach i.p.- oder i.n.-Applikation von 1,0 mg/kg KG rac-Baclofen bei der Ratte (** = $p < 0,01$).

Aus den individuellen Konzentrations-Zeit-Profilen (Abb. 4.3.2.A) wurden die in Tabelle 4.3.1. zusammengefaßten pharmakokinetischen Daten berechnet.

Tab. 4.3.1.: Berechnete pharmakokinetische Parameter zur i.v.-Applikation von 1,0 mg/kg rac-Baclofen (n =3).

Parameter	Mittelwert	Parameter	Mittelwert
C_{max} [ng/ml]	1733	AUMC [$\mu\text{g} \times \text{min}^2 \times \text{ml}^{-1}$]	16067
k [min^{-1}]	$5,33 \times 10^{-3}$	MRT [min]	158
$t_{1/2}$ [min]	133	CL [$\text{ml} \times \text{min}^{-1}$]	10,13
AUC [$\mu\text{g} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$]	99,80	V_{ss} [l]	1,57

Aus den Untersuchungen zur Bestimmung der Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten wurden ebenfalls punktuell Blutkonzentrationen (für jedes verwendete Tier ein Meßpunkt) erhalten (s. Abb. 4.3.2.B). Sowohl für die i.p.- wie für die i.n.-Gabe wurden 20 Minuten nach Applikation die höchsten mittleren Konzentrationen bestimmt, zu diesem Zeitpunkt liegt ein signifikanter Konzentrationsunterschied zugunsten der i.p.-Gabe vor (Student's t-Test: $p < 0,01$).

Nach i.v.-Gabe konnte eine C_{max} von um 1700 ng/ml nach einer Versuchszeit von weniger als 3 Minuten abgeschätzt werden, während nach Applikation in das Peritoneum nach 20 Minuten ein Mittelwert von 1250 ng/ml Vollblut gemessen wurde. Die mittlere Spitzenkonzentration nach Applikation auf die Nasalmukosa lag im Blut mit 550 ng/ml bei 45% im Vergleich zur mittleren Maximalkonzentration nach i.p.-Gabe bzw. bei 1/3 der Spitzenkonzentration nach i.v.-Applikation.

4.3.3. Baclofen-Gehirn- und -Liquor-Konzentrationen und hieraus berechnete Gewebe/Blut-Quotienten

In Abbildung 4.3.3.A-B sind die mittleren Hirngewebe- bzw. CSF-Konzentrations-Zeitprofile nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von rac-Baclofen dargestellt. Es zeigten sich im Student's t-

Test ($p > 0,05$) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Applikationswegen. Qualitativ läßt sich jedoch ableiten, daß initial (5 Minuten nach der Applikation) nach i.p.-Gabe im Gegensatz zur Applikation auf die Nasalmucosa der Nachweis höherer Baclofenkonzentrationen im Hirngewebe möglich war. Im weiteren Verlauf (20 Minuten nach Applikation) kommt es nach nasaler Gabe zu einem stärkeren Anstieg der Gewebekonzentration im ZNS als nach Injektion ins Peritoneum.

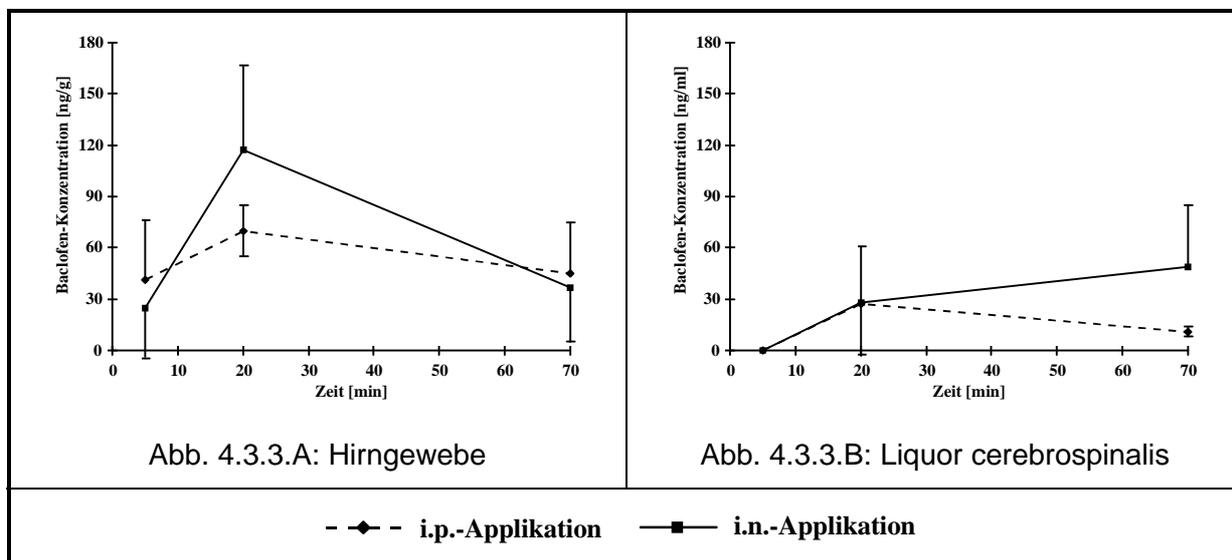


Abb. 4.3.3.A-B: Baclofen-Konzentration im Gesamthirn bzw. in der CSF der Ratte nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 1,0 mg/kg KG rac-Baclofen in Abhängigkeit der Zeit ($n = 3-4$).

Baclofen konnte im Liquor der Ratte nur in niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden. Es zeigten sich zudem hohe Variabilitäten in den aufgefundenen Konzentrationen. In Abbildung 4.3.3.B sind die entsprechenden Mittelwerte für die CSF-Konzentrationen dargestellt. Signifikante Konzentrationsunterschiede konnten mit Hilfe des Student's t-Test nicht nachgewiesen werden.

Die aus Blut- und Gewebekonzentrationen berechneten Gewebe/Blut-Quotienten sind in Abbildung 4.3.4. dargestellt.

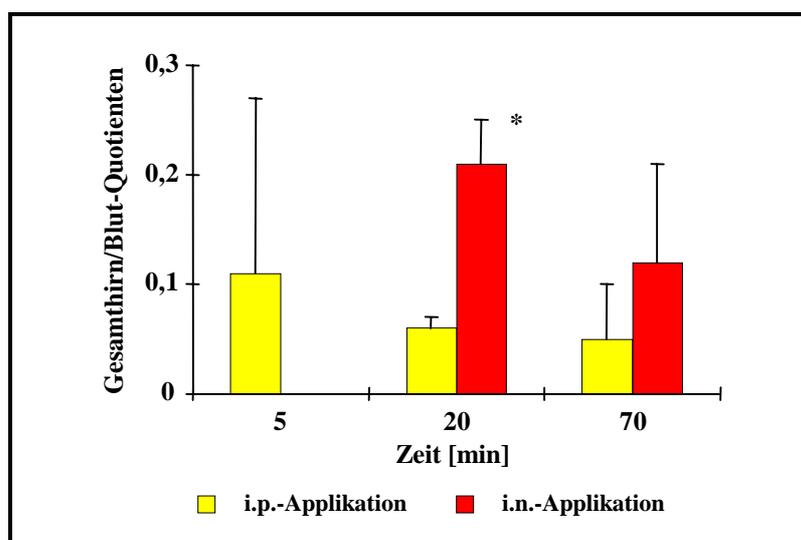


Abb. 4.3.4.: Berechnete Gehirn/Blut-Quotienten nach Applikation von 1,0 mg/kg KG rac-Baclofen in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart ($n = 3-4$; ** = $p < 0,01$).

Da initial nach nasaler Gabe ein Nachweis von Baclofen im Hirngewebe nicht in jedem Fall möglich war, kann für diesen Zeitpunkt kein Quotient angegeben werden. Nach i.p.-Gabe wurde initial ein Quotient von im Mittel 0,11 gefunden, nach 20 Minuten lag der mittlere Quotient bei 0,05. 20 als auch 70 Minuten nach der Applikation auf die Nasalmucosa konnten relativ hohe Hirngewebe/Blut-Quotienten nachgewiesen werden, die in der Größenordnung des initial gefundenen Verhältnisses nach i.p.-Gabe lagen, die aber nur zum Zeitpunkt 20 Minuten nach Applikation einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Applikationsvarianten zeigten (Student's-t-Test; $p < 0,01$). Auf die Berechnung von Liquor/Blut-Quotienten wurde aufgrund der hohen Variabilitäten und der unzureichenden Datenlage verzichtet.

4.3.4. Baclofen-Penetrationsversuche am Everted-sac-Modell der Ratte

Ergänzend zu Untersuchungen, die von Krauss [1988] am „everted-sac-Modell“ der Ratte durchgeführt wurden, wurden weitere Steady-state-Studien und Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Penetration durchgeführt. Die erhaltenen Resultate dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4.3.5.A-B dargestellt.

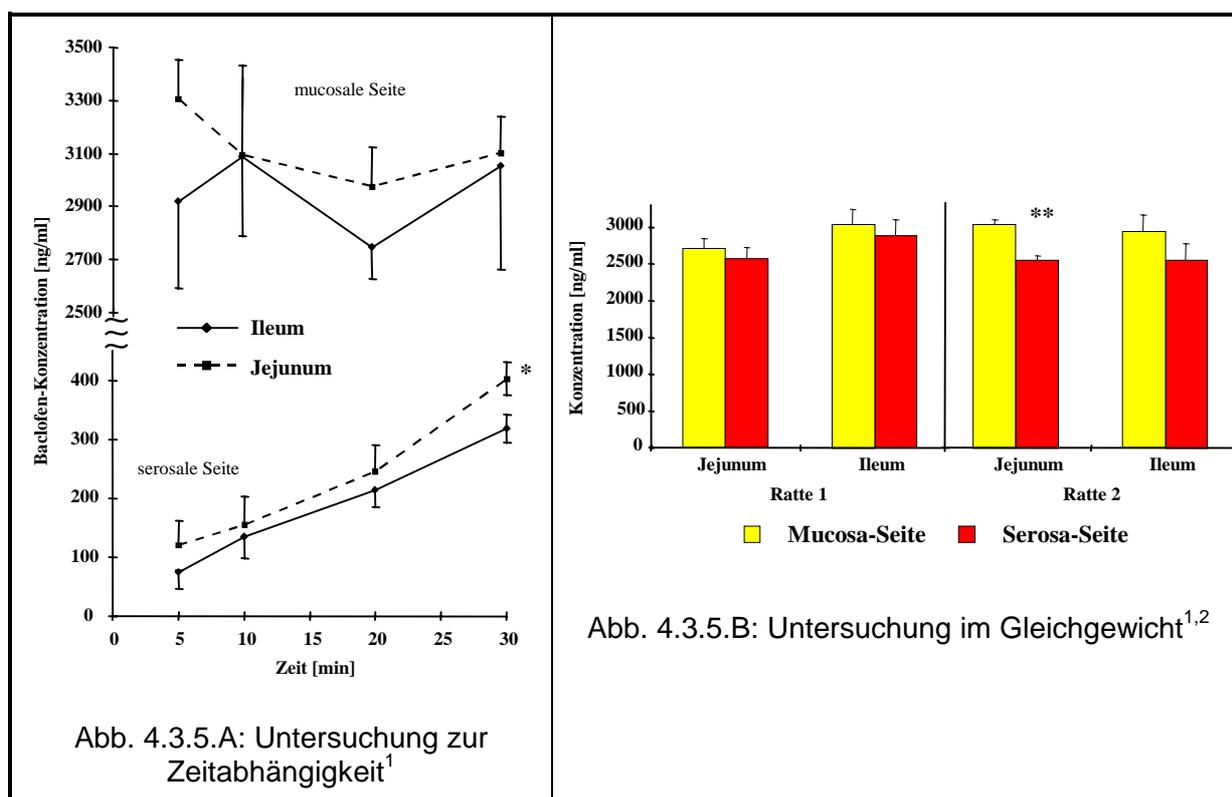


Abb. 4.3.5.A-B: Konzentrationen im Puffer (Permeationsuntersuchungen am Everted-sac-Modell der Ratte)³.

¹ Jeder Mittelwert für Jejunum-Abschnitte wurde aus vier; für Ileum-Abschnitten aus zwei Segmenten derselben Ratte bestimmt.

² Auf serosaler Seite besteht kein signifikanter Unterschied zur eingesetzten Konzentration (2720 ± 20 ng/ml). Nur bei der Serosakonzentration würden signifikante Unterschiede von der eingesetzten Konzentration Hinweise auf aktive Transportphänomene in resorptiver Richtung geben.

³ Signifikanzniveaux im Student's t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Bei der Untersuchung der Zeitabhängigkeit (4.3.5.A) des Baclofen-Transportes konnte eine Konzentrationszunahme auf der serosalen Darmseite sowohl bei den Jejunum- als auch den Ileumpräparaten nachgewiesen werden. Zu allen Zeitpunkten lag die mittlere Konzentration auf der Serosaseite der Jejunumpräparate über dem in den Ileumabschnitten; eine statistische Signifikanz im Student's t-Test ließ sich jedoch nur zum Zeitpunkt 30 Minuten nachweisen ($p < 0,05$).

Die Konzentrationen der Mucosaseite zeichnen sich durch auffallend hohe Variabilitäten aus. Der Konzentrations-Zeit-Verlauf auf dieser Seite der Darm-Präparate nahm für die Jejunumabschnitte im Mittel zunächst ab, um nach 30 Minuten einen leichten Anstieg zu zeigen. Die Konzentrationswerte der Ileumpräparate waren vergleichsweise variabel, so daß eine Tendenz nicht erkennbar war. Mittels des Student's t-Testes konnte auf der Mucosaseite zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen Jejunum- und Ileumabschnitten festgestellt werden.

Beim Vergleich der Baclofen-Konzentrationen auf mucosaler und auf serosaler Seite im Rahmen der Gleichgewichts-Untersuchungen (Abb. 4.3.5.B) zeigte sich sowohl für die Jejunum- als auch die Ileumabschnitte eine höhere Konzentration auf der Mucosaseite. Ein signifikanter Konzentrationsunterschied war jedoch nur für die Jejunum-Abschnitte der Ratte 2 nachweisbar ($p < 0,01$). Signifikante Differenzen zwischen den Jejunum- und Ileum-Abschnitten waren bei diesem Versuchsansatz nicht nachzuweisen.

4.4. Untersuchungen zu den Baclofen-Esterderivaten

4.4.1. Synthese der Baclofen-Esterderivate und Versuch der Entwicklung einer analytischen Methode

Ausgehend vom Baclofen-Reinsubstanz erfolgte die Synthese einer homologen Reihe von Esterderivaten. Insgesamt wurden fünf Abkömmlinge des Baclofens dargestellt (Methyl-, Ethyl-, 1-Propyl-, 2-Propyl- und n-Butylester). Die Synthese gelang ohne Schwierigkeiten nach einem von Fuson und Wojcik [1943] publizierten Verfahren. Alle Umsetzungen erfolgen nahezu quantitativ, der noch nachzuweisende Gehalt an nicht umgesetztem Baclofen lag nach der Umsetzung bei maximal 1%, nach Umkristallisation unter 0,1 %. Ohne Probleme konnte für alle synthetisierten Derivate, die als Hydrochloride anfielen, eine physikochemische Charakterisierung erfolgen (MS-, IR-, NMR-Spektroskopie), wobei auch die Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten bestimmt wurden. Wie zu erwarten war, zeigte sich in der homologen Reihe vom Methylester zum n-Butylester eine deutliche Zunahme der Lipophilie [$\log D_s$ (Verteilungskoeffizienten): Baclofen -0,96 (0,11); Methylester 0,47 (3,0); Ethylester 0,77 (5,9); 1-Propylester 1,31 (20,2); 2-Propylester 1,27 (18,6); Butylester 1,42 (26,4)].

Wie für die Muttersubstanz wurden auch für die Baclofenesterderivate vergleichende i.p.- bzw. i.n.-Untersuchungen an Ratten durchgeführt. Ziel war es hierbei, die Gewebe/Blut- bzw. Liquor/Blut-Quotienten sowohl der Esterderivate als auch des rückgespaltenen Baclofens zu bestimmen. Als analytische Methode sollte ein Verfahren in Anlehnung an die analytische Methode für die Muttersubstanz Baclofen entwickelt werden. Während die Bestimmung des rückgespaltenen Baclofens nach der in Abschnitt 4.3. beschriebenen Methode ohne Schwierigkeiten gelang, war eine Derivatisierung der Esterderivate von Baclofen mit OPA und NAC nicht möglich, obwohl in zahlreichen Publikationen die Anwendung dieser Reagenzien für die selektive Umsetzung von primären Aminen beschrieben ist (s. Abschnitt 4.2.).

Um eine Quantifizierung der Esterderivate dennoch zu erreichen, wurden Versuche mit S-Naproxen-Säurechlorid in Anlehnung an eine Arbeit von Spahn [Spahn et al., 1988] sowie mit den alternativen chiralen Reagenzien Carprofenisocyanat bzw. N-Methyl-Carprofenisocyanat [Herber, 1994] durchgeführt, die jedoch aufgrund von Problemen in Bezug auf Ausbeute und Selektivität der Ester-Extraktion nicht zum Erreichen von akzeptablen Nachweisgrenzen führten. Auch der Versuch, die Esterderivate indirekt nach Hydrolyse und unter Anwendung der Baclofen-Methode zu quantifizieren, führte nicht zum Erfolg: Weder durch saure noch durch alkalische Hydrolyse - auch bei erhöhter Temperatur - konnte im analytischen Maßstab eine reproduzierbare Spaltungsausbeute erreicht werden (die Ausbeuten lagen jeweils nur zwischen 35 und 70%).

4.4.2. In-vivo-Spaltung der Baclofenester-Derivate im Rattenvollblut und Rattenhirngewebe

Da für die Baclofen-Esterderivate - analog zur Muttersubstanz - Untersuchungen zur Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten durchgeführt wurden, lagen ausreichend große Mengen an Untersuchungsmaterialien (Blut, Hirngewebe) vor. Daher konnte nach dem für die Muttersubstanz validierten Verfahren die Blutkonzentration des in vivo entstandenem Baclofen bestimmt werden konnte. Es wurden dabei die in Abbildung 4.4.1. dargestellten Konzentrations-Zeitverläufe erhalten.

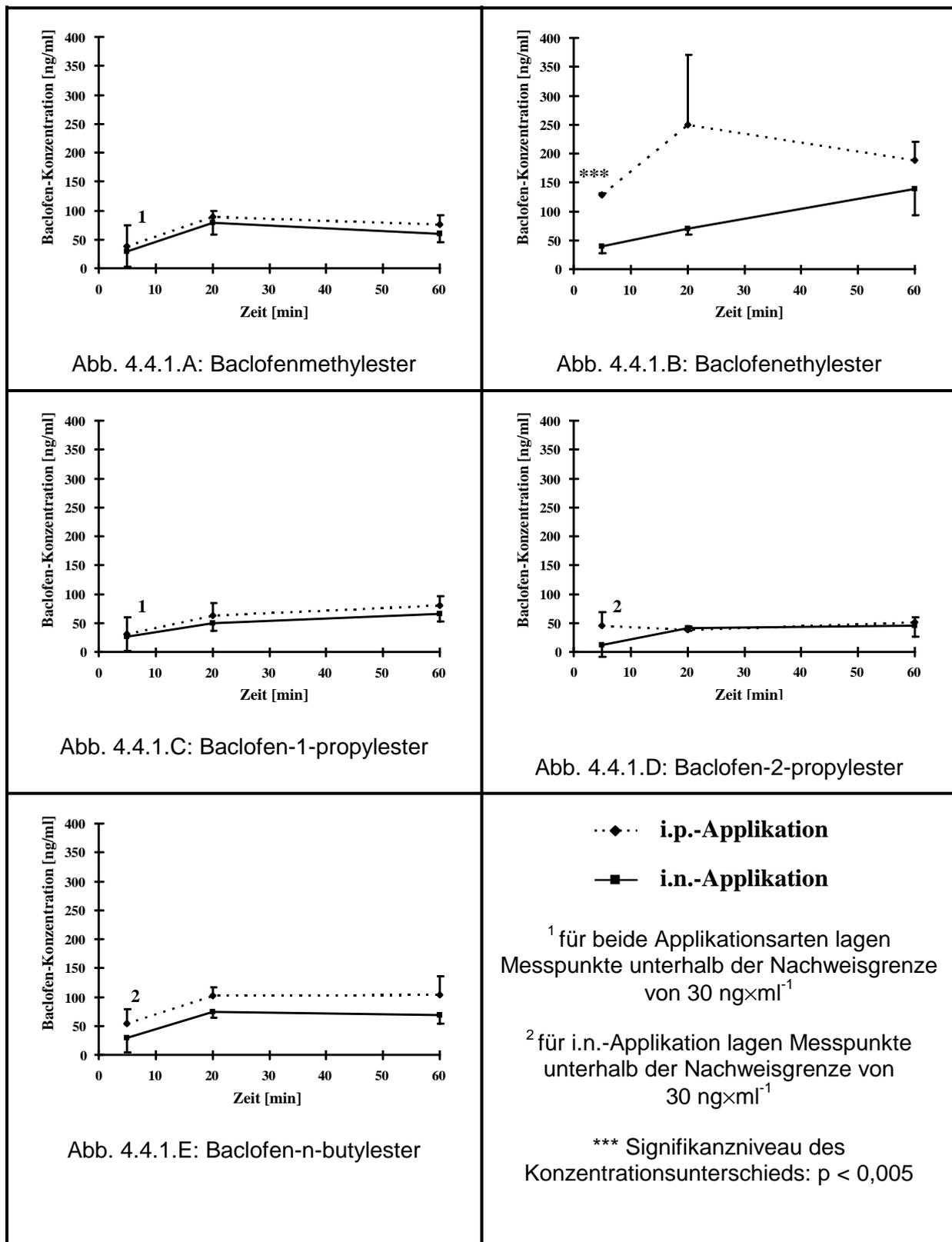


Abb. 4.4.1.A-E: Konzentrationen an rückgespaltenem Baclofen in Rattenblut nach Applikation der verschiedenen Baclofen-Esterderivate.

Es wurden - unabhängig von der Applikationsart - nach Gabe des Methylesters und der beiden Propylester Baclofen-Konzentrationen detektiert, die im Blut deutlich unter 100 ng/ml

lagen. Nach Gabe des Butylesters konnte - ebenfalls unabhängig von der Applikationsvariante - eine maximale Baclofen-Blutkonzentration von ca. 100 ng/ml gefunden werden.

Eine auffallende Abweichung zeigt der Baclofenethylester. Für dieses Derivat konnten nicht nur auffallend hohe Baclofen-Konzentrationen im Blut, sondern auch ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Applikationsvarianten festgestellt werden. Bereits 5 Minuten nach i.p.-Gabe wurden im Mittel 130 ng/ml Baclofen nachgewiesen, 20 Minuten nach der Applikation lagen die mittleren Konzentrationen an rac-Baclofen sogar bei 250 ng/ml, wobei jedoch relativ hohe Schwankungen zwischen den Tieren zu beobachten waren [aufgrund der interindividuellen Schwankungen lag das Signifikanzniveau zu diesem Zeitpunkt (20 Minuten) mit $p = 0,06$ knapp über der festgesetzten Signifikanzschwelle von $p < 0,05$].

Im Gegensatz zu den anderen Verbindungen und der i.p.-Applikation konnte nach nasaler Applikation für den Baclofenethylester eine annähernd lineare Zunahme der Baclofen-Konzentration im Meßzeitraum (5 – 60 min) beobachtet werden, wobei nach 60 Minuten ein mittlerer Spiegel von um 140 ng/ml erreicht wurde. Dies entspricht im Vergleich der höchsten gemessenen Baclofen-Konzentration, die nach i.n.-Gabe der Esterderivate gefunden wurde.

Bei der Überprüfung der eingesetzten Ester-Reinsubstanz ergab sich im Falle von Baclofen-Ethylester kein nachweisbarer Baclofen-Restgehalt, so dass von einer Substanzreinheit von >99,9 % auszugehen ist. Hier unterschied sich der Baclofen-Ethylester nicht von allen anderen Estern.

Aufgrund der ausreichend großen Hirngewebe-Probenmengen, die bei den Untersuchungen zur Gewebe/Blut-Verteilung der Baclofen-Esterderivate entnommen worden waren, konnte auch in dieser Matrix problemlos eine Quantifizierung von Baclofen erfolgen. Bei Analysen des Rattenhirngewebes konnte für keinen Ester der eindeutige Nachweis bzw. gar eine Quantifizierung von freiem Baclofen erfolgen. Selbst im Fall des Baclofen-Ethylesters 20 Minuten nach der Applikation, d.h. zum Zeitpunkt der höchsten nachgewiesenen Blutkonzentration, lag die Hirngewebe-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze von 15 ng/g.

Aufgrund der nur geringen verfügbaren Probenvolumina bei Rattenliquor (80-150 µl) konnte bei diesen Proben lediglich eine Analyse durchgeführt werden, eine Wiederholung wäre nicht möglich gewesen. Aus diesem Grund wurden die bei den Untersuchungen gewonnenen CSF-Proben nicht analysiert. Es sollte vielmehr im Rahmen eines anderen Projektes eine Analysenmethode entwickelt werden, die möglichst eine simultane Quantifizierung sowohl der noch vorhandenen Ester-Derivate wie auch des rückgespaltenen Baclofens in der Probe ermöglichen würde.

4.4.3. Untersuchungen zur Konformation der Baclofen-Esterderivate

Da sich bei den durchgeführten Untersuchungen sowohl in vivo als auch in vitro (außer beim Baclofen-Ethylester) eine außergewöhnliche Reaktionsträgheit aller Baclofen-Esterderivate gezeigt hatte, sollte mit Hilfe der Molecular Modelling Software MOMO (Prof. Dr. E. Egert, Institut für Organische Chemie, J. W. Goethe-Universität Frankfurt/Main) die energetisch günstigste Konformation sowohl für die Muttersubstanz als auch exemplarisch für den Baclofen-Methylester berechnet werden [Dyrbusch et al., 1991]. Insbesondere sollte geprüft werden, ob anhand der hierbei erhaltenen Konformationsvorschläge eine Erklärung der experimentellen Befunde möglich sein würde.

Bei den Berechnungen ergaben sich die in Abbildung 4.4.2.A-E dargestellten Konformationsvorschläge.

Aufgrund der (bereits vorher bekannten) pKs-Werte für Baclofen von 3,9 (NH₂) und 9,6 (COOH) muß für den physiologischen pH-Bereich eine zwitterionische Struktur postuliert werden, deren wahrscheinlichste Konformation durch eine gestreckte n-Butylkette charakterisiert ist [Pirard et al., 1994]. Eine solche gestreckte Konformation konnte auch im Rahmen der hier mit Hilfe der verwendeten MOMO-Software durchgeführten Berechnungen für die Muttersubstanz ermittelt werden (Abb. 4.4.2.E).

Die gewonnenen analytischen Resultate (s. Experimenteller Teil) sprechen dafür, daß die Esterderivate an der NH₂-Funktion protoniert, d.h. als NH₃⁺ vorliegen. Bei der Ermittlung der wahrscheinlichsten Konformation für den protonierten Baclofen-Methylester konnte in der Tat eine Siebenringstruktur nachgewiesen werden, bei der eine starke Wasserstoffbrückenbildung zwischen einem Proton der NH₃⁺-Gruppe und dem Carbonylsauerstoff der Carboxylgruppe besteht. Der energetische Vorteil einer solchen Konformation zur günstigsten nicht-zyklischen Struktur beträgt mehr als 27 kJ/mol (Abb. 4.4.2.A-B). Hieraus ist eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen dieser ringförmigen Konformation abzuleiten.

In einer weiteren Berechnung wurde die Konformation für den unprotonierten Baclofenmethylester ermittelt (Abb. 4.4.2.C-D). Auch für die neutrale Form der Verbindung konnte als energetisch günstigste Konformation eine zyklische Siebenringstruktur gefunden werden. Erstaunlich ist dabei, daß die Wasserstoffbrücke nicht zum Carbonylsauerstoff, sondern zum Sauerstoff der Methoxygruppe ausgebildet zu werden scheint. Da der energetische Vorteil der günstigsten (= zyklischen) Konformation in diesem Fall nur ca. 2,4 kJ/mol gegenüber der energieärmsten gestreckten Form beträgt, ist das Vorliegen dieser Konformation nur mit geringerer Wahrscheinlichkeit abgesichert.

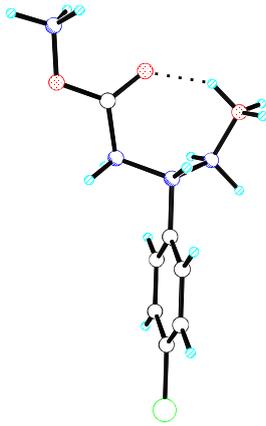


Abb. 4.4.2.A: Protonierter Baclofenmethylester in der günstigsten berechneten cyclischen Konformation

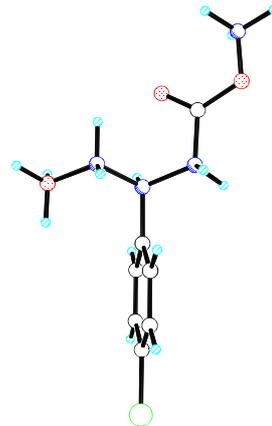


Abb. 4.4.2.B: Protonierter Baclofenmethylester in der günstigsten berechneten gestreckten Konformation

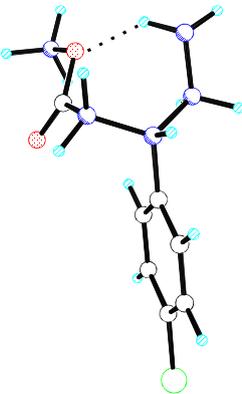


Abb. 4.4.2.C: Unprotonierter Baclofenmethylester in der günstigsten berechneten cyclischen Konformation

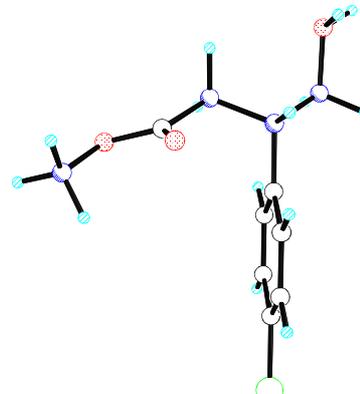


Abb. 4.4.2.D: Unprotonierter Baclofenmethylester in der günstigsten berechneten gestreckten Konformation

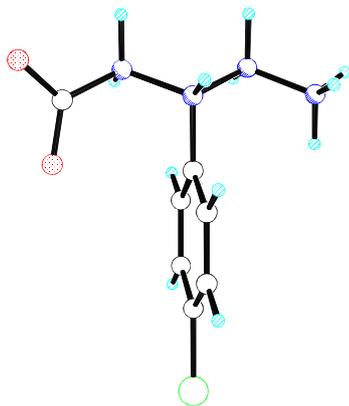


Abb. 4.4.2.E: Baclofen in der günstigsten berechneten Konformation

..... Wasserstoff-Brückenbindung

Abb. 4.4.2.A-E: Darstellung der energetisch günstigsten cyclischen bzw. gestreckten Konformationen des Baclofenmethylester (jeweils in protonierter und neutraler Form) im Vergleich zur Muttersubstanz Baclofen.

4.5. Untersuchungen zum Indometacin

4.5.1. Analytische Methode für Indometacin in Blut und Geweben

Aufgrund der langen Erfahrung im klinischen Einsatz von Indometacin sind auch für diesen Wirkstoff zahlreiche analytische Methoden für biologisches Material publiziert. Beispiele sind GC-Methoden zur Quantifizierung von Indometacin in Serum, Plasma oder Urin [Helleberg, 1976; Arbin, 1977; Jensen, 1978]. Bei allen diesen Verfahren erfolgte vor einer Derivatisierung eine herkömmliche Flüssig/Flüssig-Extraktion. In einer neueren Arbeit wird von Nishioka et al. [1990] eine Aufreinigung und Anreicherung mittels einer Festphasenextraktions-Methode vorgeschlagen. Parallel zur Anwendung der Gaschromatographie wurden dünnschichtchromatographische Verfahren benutzt, um Indometacin in biologischen Matrices zu quantifizieren; Beispiel hierfür ist eine Arbeit von Sondergaard und Steiness [1979].

Zahlenmäßig am stärksten in der Literatur vertreten sind HPLC-Verfahren zur Bioanalytik des Indometacin. Schon zu Beginn der 80er Jahre wurden solche Analysenmethoden beschrieben. Die HPLC-Analytik wird generell im RP-Modus auf C₁₈-Materialien als stationäre Phasen mit UV-Detektion durchgeführt werden. Die Aufarbeitung der biologischen Proben erfolgt überwiegend über Protein-Präzipitation z.B. mit Hilfe von Acetonitril [Terweij-Groen et al., 1980; Schollnhammer et al., 1986; Streete, 1989; Niopas und Mamzoridi, 1994] oder Flüssig/Flüssig-Extraktion im sauren Milieu [Ghosh, 1992]. In einer Studie von Mawatari et al. [1989] erfolgt die Detektion durch Messung der Fluoreszenzemission nach einer Post-column-Derivatisierung, in einer Arbeit von Kazemifard und Moore [1990] wird ein elektrochemischer Nachweis von Indometacin vorgeschlagen.

Neben diesen Analysenverfahren für Indometacin selbst sind zahlreiche analytische Methoden publiziert, bei denen Indometacin als innerer Standard bei der Quantifizierung anderer Wirkstoffe aus biologischem Material eingesetzt wurde, so daß eine Umkehrung denkbar wäre [Tsai und Chen, 1992; Tsai et al., 1992; Avgerinos et al., 1993].

Publizierte analytische Methoden zur Quantifizierung von Indometacin in komplexen Matrices (z.B. Organen) sind selten. In verschiedenen Arbeiten wurde radioaktiv markiertes Indometacin verabreicht und die Gewebekonzentration durch Messung der Radioaktivität in den verschiedenen Geweben bestimmt [Hucker et al., 1966; Brune et al., 1980]. In einer Arbeit von Okuyama und Aihara [1984] wird hingegen eine Flüssig/Flüssig-Extraktion mit anschließender gaschromatographischer Quantifizierung vorgeschlagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein von Streete [1989] publiziertes Verfahren verwendet, das auf die Matrices der Ratte übertragen werden konnte. Die Probenvorbereitung bestand für alle untersuchten Probenmaterialien aus einer Proteinpräzipitation mit Methanol im stark sauren Milieu und anschließender Flüssig/Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan.

4.5.2. Indometacin-Blut-Konzentrationen

In Abbildung 4.5.1. sind die erhaltenen Daten zu den Konzentrations-Zeit-Verläufen nach i.p. und nasaler Applikation von jeweils 3 mg/kg Indometacin an mit Urethan narkotisierten Ratten dargestellt.

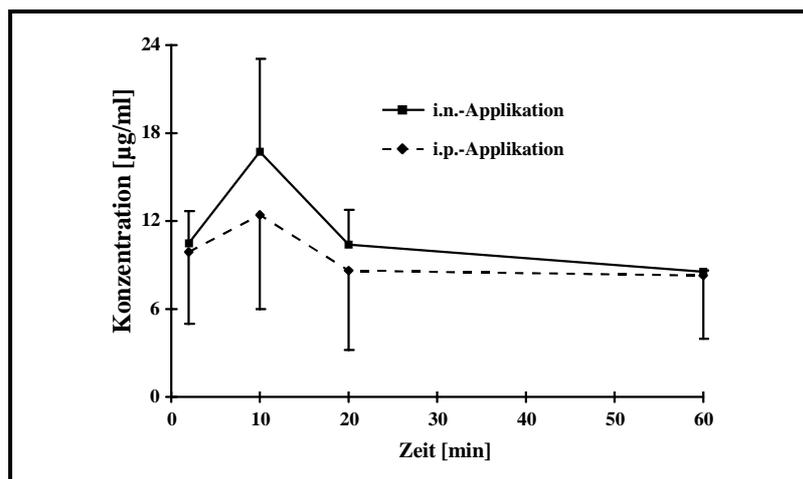


Abb. 4.5.1.: Indometacin-Konzentration in Rattenblut in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart (n = 3).

Die mittleren maximalen Blutkonzentrationen wurden für beide Applikationsarten nach ca. 10 Minuten detektiert. Bemerkenswert ist, daß – allerdings ohne statistische Signifikanz – nach einer Beobachtungszeit von 10 Minuten bei nasaler Gabe mit im Mittel 17 µg/ml Vollblut eine höhere Konzentration als nach i.p.-Applikation (12 µg/ml) gefunden wurde. Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten waren die gemessenen Blutspiegel, unabhängig von der Applikationsart, annähernd gleich.

4.5.3. Indometacin-Hirn- und -Liquor-Konzentrationen

In Abbildung 4.5.2. sind die berechneten Mittelwerte der Gewebekonzentrationen der einzelnen untersuchten Gehirnareale und die Mittelwerte der CSF-Konzentrationen dargestellt. Trotz der Variabilitäten kann anhand der Mittelwerte die Tendenz festgestellt werden, daß in allen untersuchten Gehirnteilen nach Gabe auf die Nasalmukosa im Vergleich zur Gabe in das Peritoneum initial eine höhere Konzentration zu beobachten ist. Bei der statistischen Auswertung der vorliegenden Daten konnte mit Hilfe des t-Tests nach Student nachgewiesen werden, dass die Indometacin-Konzentration im Rattencortex 10 min nach i.n.-Gabe signifikant höher waren als 10 min nach i.p.-Gabe ($p < 0,05$). Noch höhere Signifikanz war für die Konzentrationsunterschiede im Thalamus 2 bzw. 20 min nach der Applikation nachzuweisen; im Student's t-Test wurde jeweils ein Signifikanz-Niveau von $p < 0,005$ erreicht.

Betrachtet man die Mittelwerte der Konzentrationen nach nasaler Gabe in den anderen untersuchten Gewebestrukturen (Medulla oblongata, Mesencephalon und Thalamus), so zeigte sich im Mittel ein Gleichbleiben der Indometacin-Konzentration über den Versuchszeitraum zwischen 1,5 und 2,0 µg/g Gewebe. Andere Befunde ergaben sich nach i.p.-Gabe: Für Cerebellum, Cortex und Mesencephalon zeigte sich im Lauf der ersten 20 min nach Applikation eine Konzentrationszunahme von initial 0,8 bis 1,3 µg/g auf 1,6 bis 2,2 µg/g. Die erhaltenen Daten lassen eine Abschätzung einer Zeit bis zum Erreichen der Maximalkonzentration (t_{max}) von 15 bis 25 Minuten zu. Im Gegensatz hierzu bleibt die mittlere Gewebekonzentration in der Medulla oblongata während der gesamten Versuchszeit (60 min) konstant.

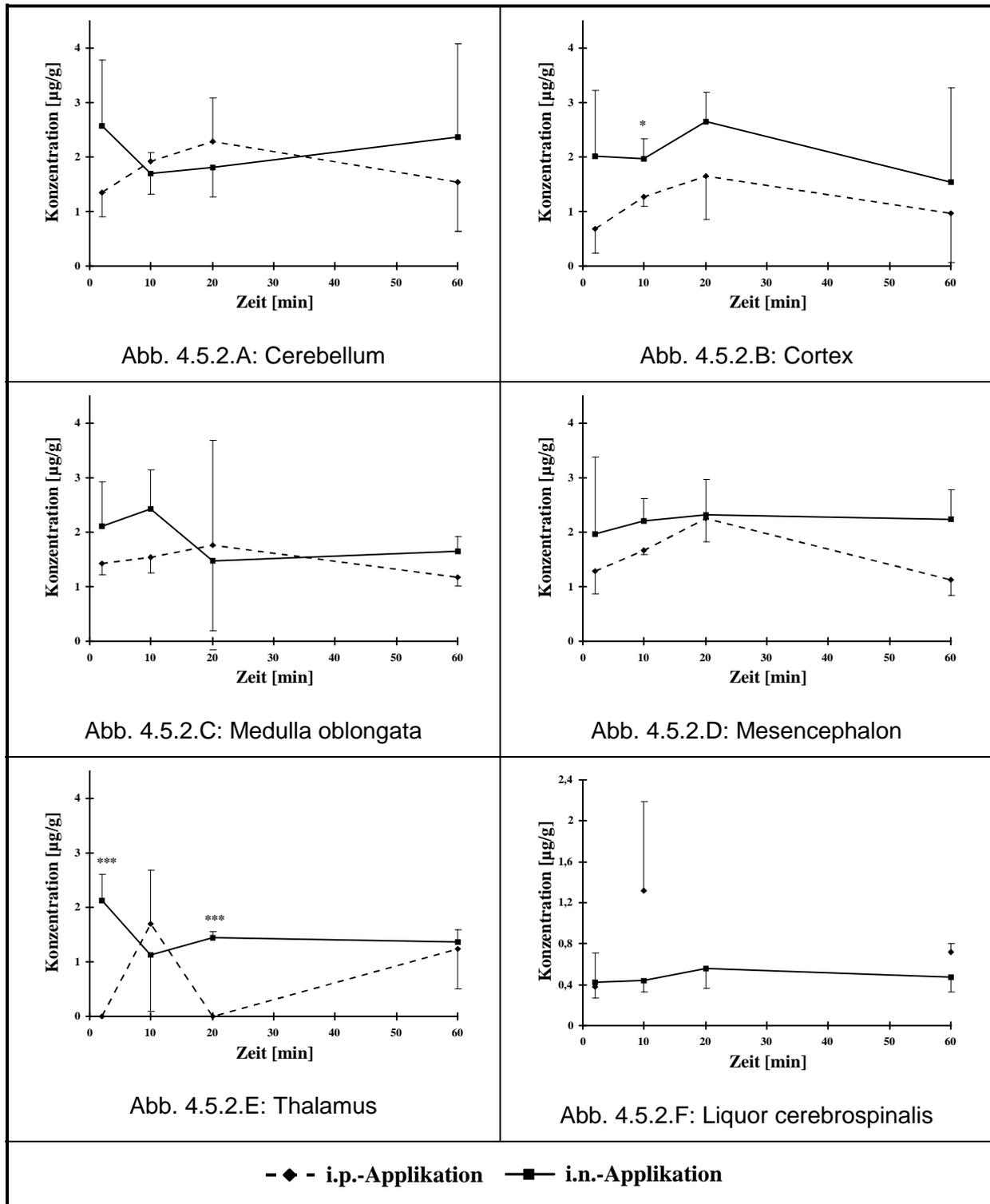


Abb. 4.5.2.A-F: Konzentration von Indometacin in verschiedenen anatomischen Untereinheiten des ZNS bzw. im CSF der Ratte in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart¹.

Eine starke Abweichung von allen anderen untersuchten Gehirnteilen zeigt sich nach i.p.-Gabe im Thalamus. Sowohl initial als auch 20 min nach Applikation lagen die Indometacin-Konzentrationen in diesem Gehirnabschnitt unterhalb der Nachweisgrenze von 0,07 µg/g

¹ Aufgrund eines technischen Defekts waren die Konzentrationswerte für den Bulbus olfactorius nicht auswertbar.

Gewebe. Die 20 und 60 Minuten nach Applikation meßbaren Konzentrationen zeichneten sich durch große Schwankungsbreiten aus; allerdings war nicht bei allen untersuchten Versuchstieren ein Nachweis von Indometacin in diesem Gehirnteil möglich.

Bei der Durchführung der Tierversuche war – möglicherweise aufgrund einer zentralen Nebenwirkung - bei allen nasal, nicht jedoch bei den i.p. behandelten Tieren eine Apnoe zu beobachten. Die Dauer der Atemfunktionsstörung lag bei ca. 60 Sekunden. Nach dieser Zeit setzte eine normale Atmung wieder ein, ohne daß sich im weiteren Verlauf des Versuches (über 60 Minuten) weitere Unregelmäßigkeiten zeigten. Ein derartiger Effekt war von Huang et al. [1995], die ebenfalls Indometacin in gleicher Dosierung nasal an Ratten verabreicht hatten, nicht beschrieben worden.

Im Liquor cerebrospinalis konnte nach i.n.-Gabe über den gesamten Versuchszeitraum ein konstanter mittlerer Indometacingehalt von ca. 0,4 µg/ml nachgewiesen werden. Trotz sehr lückenhafter Datenlage für Konzentrationswerte, die nach i.p.-Gabe erhalten wurden, deuten sich allerdings in diesem Fall höhere CSF-Konzentrationen nach Applikation ins Peritoneum an.

4.5.4. Hirngewebe/Blut- und Liquor/Blut-Quotienten

Aus den erhaltenen Gewebekonzentrationen der unterschiedlichen Gehirnteile bzw. der Liquorkonzentration wurden die entsprechenden Gewebe/Blut- und (sofern möglich) CSF/Blut-Quotienten berechnet. Die sich ergebenden Quotienten sind in Abbildung 4.5.3.A-F dargestellt. Im direkten Vergleich der Quotienten aus Hirngewebe in Abhängigkeit der Applikationsart konnte mit Ausnahme des Thalamus kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Im Mittel jedoch ergaben sich kurze Zeit nach der Applikation (zwei Minuten) für alle untersuchten Gehirnareale höhere oder gleich hohe Quotienten nach Gabe auf die Nasalmukosa. Im weiteren Verlauf (10 - 20 Minuten nach Applikation) kam es - mit Ausnahme vom Thalamus - in allen untersuchten Geweben zu einer Umkehr der Quotienten. Es zeigten sich höhere oder gleich hohe Verhältnisse nach i.p.-Gabe als bei Nasalapplikation. Nach einer Versuchsdauer von 60 Minuten lagen schließlich im Mittel wieder sehr ähnliche Hirngewebe/Blut-Quotienten vor.

Der Thalamus unterscheidet sich auch bei den Gewebe/Blut-Quotienten prinzipiell von allen übrigen untersuchten Arealen, da nach i.p.-Gabe die Wirkstoffkonzentrationen teilweise unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Infolge dessen war eine Bestimmung entsprechender Quotienten für diese Applikationsvariante zu den Meßzeitpunkten 2 bzw. 10 min nicht möglich.

In Abbildung 4.5.3.F sind die berechneten CSF/Blut-Quotienten dargestellt. Die berechneten Quotienten lagen mit maximal 0,1 deutlich niedriger (Faktor 3-10) als die entsprechenden Hirngewebe/Blut-Quotienten. Weiterhin deuten die vorliegenden – allerdings lückenhaften - Daten darauf hin, daß nach i.p.-Applikation im Liquor höhere CSF/Blut-Quotienten auftreten können als nach Gabe in die Nasenhöhle.

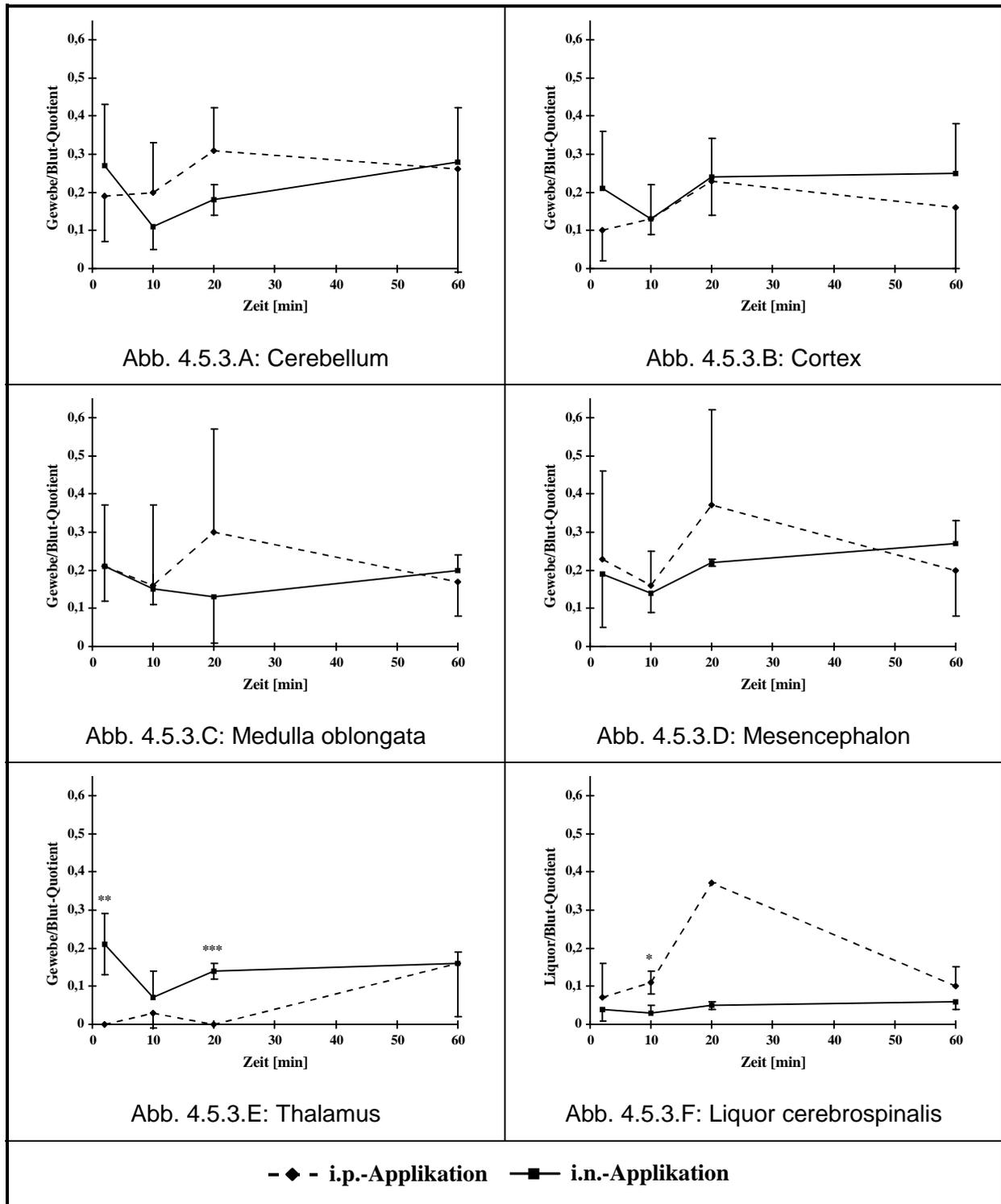


Abb. 4.5.3.A-F: Hirngewebe/Blut bzw. CSF/Blut-Quotienten von Indometacin in verschiedenen anatomischen Untereinheiten des ZNS der Ratte in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart (n = 3)¹

¹ Signifikanzniveaus: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,005

4.6. Korrelation der Gewebe/Blut-Quotienten gegen Lipophilie-Parameter

Für die Substanzen, für die eine Berechnung der Hirngewebe/Blut-Quotienten durchgeführt worden war, konnte eine Korrelationsanalyse gegen die entsprechenden Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden für alle Wirkstoffe die Lipophilie-Parameter verwendet, die von Craig [1990] publiziert worden waren. In Abbildung 9.1.A-D sind die sich ergebenden Korrelationen in Abhängigkeit von der Zeit und der Applikationsart dargestellt.

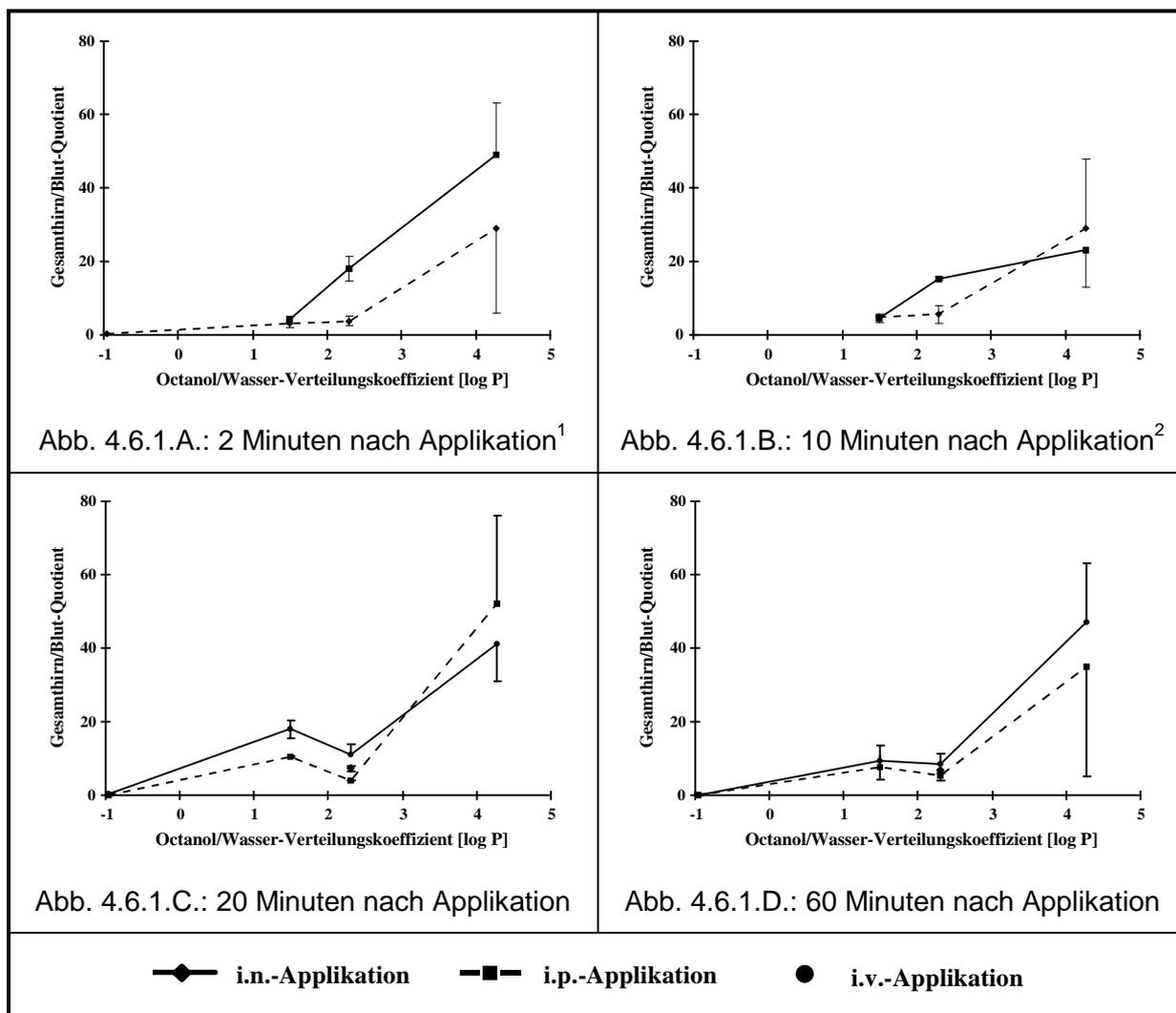


Abb. 4.6.1.A-D: Korrelation der erhaltenen Gesamthirn/Blut-Quotienten mit den Lipophilie-Parametern der untersuchten Wirkstoffe in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart (n = 3-5).³

Bei der angegebenen Darstellung ist zu beachten, daß für TCP innerhalb der ersten 10 Minuten ein mittlerer Hirngewebe/Blut-Quotient berechnet wurde, der sich bei achiraler Analyse des gesamten Organs ergeben hätte, d.h., es wurde ausgegangen von der Konzentration von (-)- und (+)-TCP zusammen. Zu den späteren Zeitpunkten bezieht sich das Gewebe/Blut-Verhältnis nur auf das (-)-TCP. Im Fall des Indometacin repräsentieren die

¹ Für Baclofen war der Zwei-Minuten-Wert nach Applikation nicht berechenbar.

² Aufgrund unzureichender Daten können für Baclofen zehn Minuten nach Applikation keine Angaben gemacht werden.

³ Die Reihenfolge der Substanzen richtet sich nach der Zunahme Lipophilie (logP-Wert), s.a. Tab. 9.1.

angegebenen Daten mittlere Gehirn/Blut-Quotienten (aus Mittelwerten aller Gehirnsegmente ohne Bulbus olfactorius). Als weitere Korrektur wurde die Plasma-Eiweißbindung eingeführt: Da nur der Anteil eines Pharmakons durch die Blut-Hirn-Schranke permeieren kann, der sich ungebunden im Blut befindet, sollten die erhaltenen Blutkonzentrationen, die zur Berechnung der in dieser Darstellung verwendeten Gewebe/Blut-Quotienten verwendet wurden, entsprechend der Plasma-Eiweißbindung der jeweiligen Verbindungen korrigiert werden. In Tabelle 4.6.1. sind die aus der Literatur entnommenen Lipophilie-Parameter, Plasma-Eiweißbindungen und hieraus berechnete Korrekturfaktoren angegeben.

Tab. 9.1.: Zur Korrelationsanalyse verwendete Lipophilie-Parameter, Plasmaeiweißbindungen und Korrekturfaktoren.

Wirkstoff	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient [logP] ¹	Plasmaeiweißbindung	Korrekturfaktor für die Gewebe/Blut-Quotienten	Quelle
Baclofen	- 0,96	ca. 30%	1,4	[Ochs und Reimann, 1995]
Tranlycypromin	1,49	unbekannt	1,2 - 1,6 ²	[Nishihara et al., 1984; Baselt und Cravey, 1989]
Kokain	2,30	„gering“	1	[Iten, 1994]
Indometacin	4,27	> 99%	100	[Bannwarth et al., 1990]

Nach diesen Korrekturen ergaben sich die zuvor in Abbildung 9.1.A-D dargestellten Korrelationen. Wie vermutet, nimmt der gefundene Hirngewebe/Blut-Quotient mit steigender Lipophilie zu; diese Beobachtung ist unabhängig vom Zeitraum nach Applikation. Ebenso verläuft der Anstieg der Kurve/Korrelationsfunktion nicht linear, sondern eher exponentiell. Für die Unterschiede zwischen den Applikationsarten i.n. und i.p. konnte - mit Ausnahme der signifikanten Unterschiede beim Kokain innerhalb der ersten 10 Minuten (s. Kapitel 4.1.1.) - keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

¹ Entnommen aus Craig [1990].

² Für TCP konnten in der Literatur keine Daten zur Plasma-Eiweißbindungen gefunden werden. Da für Amphetamin bzw. Amphetaminderivate von verschiedenen Autoren jeweils Plasmaeiweißbindungen von 15% bis 36% angegeben wurden, wurde für TCP ein Korrekturfaktor ca. 1,4 abgeschätzt.

5. Diskussion

5.1. Kokain

5.1.1. Kokain- und BE-Konzentrationen in Blut, Liquor und Hirngewebe der Ratte

Im Falle von Kokain ist die vergleichende Untersuchung der Nasalapplikation und der systemischen Applikation deshalb von Bedeutung, weil die Aufnahme über die Nase im Rahmen des mißbräuchlichen Einsatzes von Kokain sehr häufig erfolgt. Toxikokinetische Daten liegen zwar aus Human- und Tierstudien vor [z.B. Iten, 1994; Cone, 1995], jedoch war nach Nasalapplikation die Verteilung in das ZNS bisher nicht untersucht worden. Aufgrund der Datenlage in der Literatur und zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit musste im Falle von Kokain neben der i.p.- auch eine i.v.-Applikation durchgeführt werden.

Betrachtet man die ermittelten Konzentrations-Zeit-Verläufe nach Nasalapplikation, so ergeben sich im Vergleich zur Untersuchung am Menschen deutlich verlängerte t_{max} . Diese kann – außer über Speziesunterschiede¹ - dadurch erklärt werden, daß zu toxikokinetischen Studien von Suchtstoffen nur solche Personen als Probanden zugelassen werden, die gewohnheitsmäßig Drogen konsumieren [Van Dyke et al., 1978; Iten, 1994; Cone, 1995; Julien, 1997]. Im Fall von Kokain kann es dabei durch die vasokonstriktorische Wirkung bereits zu Veränderungen an der Nasalmukosa gekommen sein. Darüber hinaus wurde in verschiedenen Studien an Ratten und Mäusen nachgewiesen, daß früherer Kontakt zu Kokain (sogar eine einzige Aufnahme) das kinetische Verhalten und auch die Verteilung des Wirkstoffs in hohem Ausmaß verändert [Reith et al., 1987; Pettit et al., 1990; Pan et al., 1991; Pettit und Pettit, 1994].

Im Rahmen der durchgeführten Studien wurde vor allem auf eine Vergleichbarkeit zwischen den Substanzen geachtet und dementsprechend ein einheitliches Versuchsdesign gewählt.

Will man im Falle von Kokain die Literaturdaten mit den hier erhobenen vergleichen, so ist zunächst zu berücksichtigen, daß von anderen Autoren in der Regel Plasma analysiert wurde. Allerdings wurde beim Menschen ein „blood-to-plasma ratio“ von 1 gefunden, so daß dies nicht von Bedeutung zu sein scheint [Iten, 1994]. Außerdem wurde eine deutliche Abhängigkeit der kinetischen Parameter vom Entnahmeort [z.B. Konz. (arteriell) > Konz. (venös); hier: Punktion der Vena cava inferior] gefunden [Lau et al., 1991; Evans et al., 1996]. Auch Abweichungen bei Gewebe/Blut-Quotienten sind so zu erklären. Insgesamt findet man bei Kokain keine wirklich vergleichbaren Studien, da entweder die Applikationswege, die Vorbehandlung der Tiere, die Spezies oder die Dosis bzw. das Dosisregime abweichend waren [Devane et al., 1989; Lau et al., 1991; Reith et al., 1987]. Ein direkter Vergleich der Blut- bzw. Liquorkonzentrationen ist nur mit den Daten einer von Barbieri et al. [1992] publizierten Studie möglich, dessen Angaben zum Konzentrations-Zeit-Verlauf nach i.v.- Applikation in der eigenen Arbeit bestätigt werden konnten.

Die im Blut und Hirngewebe bestimmbaren Konzentrationen des Metaboliten Benzoyllecgonin (BE) lagen in der eigenen Arbeit an der Nachweisgrenze der analytischen Methode. Die BE-Konzentrationen in den untersuchten CSF-Proben waren nicht mehr eindeutig meßbar. Aus diesem Befund kann abgeleitet werden, daß die Stabilisierung mit Oxalsäure und NaF einen In-vitro-Abbau des Kokains verhindert hat. Die niedrigen BE-Spiegel stehen jedoch im Widerspruch sowohl zu Humanstudien [Iten, 1994; Cone, 1995] als auch zu Untersuchungen am Tier [Spear et al., 1989; Barbieri et al., 1992; Pettit und Pettit, 1994; Robinson et al., 1994], in denen 30 bis 60 Minuten nach Applikation deutliche BE-Spiegel im Blutplasma ermittelt werden konnten.

¹ Von Wiener und Reith [1990] konnten sogar signifikante Unterschiede pharmakokinetischer Parameter schon innerhalb einer Spezies (Maus) in Abhängigkeit der Rasse nachgewiesen werden.

Vergleichsweise hohe Konzentrationen des Metaboliten BE wurden bei den vorher erwähnten Humanstudien gefunden. Mögliche Ursachen sind eine Enzyminduktion bei den Humanstudien [Van Dyke et al., 1979; Van Dyke et al., 1982; Fischman et al., 1983; Iten, 1994; Cone, 1995; Julien, 1997] oder aber eine Biotransformationsbeeinflussung durch das Anästhetikum Urethan (Carbaminsäureethylester) aufgrund der Esterase-hemmenden Wirkung bei den Rattenstudien. Auch andere Biotransformationswege können durch Urethan beeinflusst werden [Giri und Bhide, 1969; Grogan et al., 1970; Glazer, 1973].

Weiterhin sind unspezifische Einflüsse der Narkose auf Stoffwechselprozesse denkbar, z.B. in der Leber, dem Hauptbiotransformationsorgan für Kokain [Estevez et al., 1977; Kambam et al., 1992; Kambam et al., 1994].

5.1.2. Gehirn/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals nachgewiesen werden, daß die größten Hirngewebe/Blut-Quotienten bereits initial nach Applikation auf die Nasalmukosa erreicht wurden. Ein Vergleich von Literaturdaten mit den eigenen Ergebnissen ist aufgrund der differierenden Blutentnahmetechniken und des großen Einflusses dieser auf die in die Quotienten-Berechnung einbezogenen Blutkonzentrationen nur mit Einschränkung möglich. In allen bisher publizierten Arbeiten ergaben sich Hirngewebe/Blut- bzw. -/Plasma-Quotienten, die mit zwischen 1,0 und 7,0 deutlich unter den eigenen Daten lagen [Estevez et al., 1977; Benuck et al., 1987; Devane et al., 1989; Spear et al., 1989; Lau et al., 1991; Patrick et al., 1993; Robinson et al., 1994]. In der Literatur sind jedoch einzelne Fallbeispiele mit Humandaten publiziert, in denen nach tödlichen Kokain-Intoxikationen oder anderen Todesfällen nach Genuß von Kokain die Hirngewebe/Blut-Verhältnisse bestimmt wurden. Die Hirngewebe/Blut-Quotienten liegen zwischen 4 zum Zeitpunkt des Plasmakonzentrations-Maximums, für den Zeitraum 60-120 Minuten nach Ingestion werden Verhältnisse bis zu 20 angegeben [Iten, 1994].

Die sehr hohen initialen Gewebe/Blut-Verhältnisse nach i.n.-Gabe können als Indiz dafür angesehen werden, daß ein direkter Zugang von der Nasenhöhle zum ZNS besteht. Von anderen Autoren [Benuck et al., 1987; Silva et al., 1997; Lau et al., 1991] wurde selbst nach i.v.-Gabe initial deutlich niedrigere Hirngewebe/Blut-Quotienten als 10 Minuten nach der Applikation gefunden.

In der Literatur war nur eine einzige Studie zu finden, in der CSF/Plasma-Quotienten angegeben waren: Die eigenen Ergebnisse konnten die Daten von Barbieri et al. [1992] bestätigen. Die zu beobachtenden CSF/Blut-Quotienten sprechen im Gegensatz zu den Hirngewebe/Blut-Verhältnissen nicht für eine selektive Anreicherung im Liquor cerebrospinalis nach Nasalapplikation: Es zeigten sich unabhängig von der Applikationsart um den Faktor 10 kleinere Quotienten, die sich aus dem hydrophilen Charakter der CSF-Matrix und der Lipophilie des Kokain leicht erklären lassen. Eine signifikante Unterscheidung der CSF/Blut-Quotienten war 10 Minuten nach Applikation zwischen i.n.- und i.v.- bzw. i.p.-Gabe mit unterschiedlicher Signifikanz nachweisbar. Diese zu beobachtende Zeitverschiebung spricht für eine sekundäre Umverteilung vom Gewebe oder aus dem Blutkompartiment zur CSF.

5.2. Tranylcypromin

5.2.1. Bioanalytische Methode

Erste orientierende Untersuchungen mit TCP waren unter Vermeidung einer Lagerperiode über sofortige Konzentrationsbestimmung durchgeführt worden. Für ausgedehntere Studien war allerdings eine Einlagerung der Proben notwendig. Wie im Ergebnisteil beschrieben, war bei Inkubationsversuchen mit rac-TCP in Rattenhirnhomogenat bereits nach 60 Minuten das

(+)-TCP-Enantiomer nur noch in Spuren nachweisbar. Alle die bei Inkubationsversuchen erhobenen Befunde sprechen für den für (+)-TCP postulierten Wirkungsmechanismus: Als „suicide-inhibitor“ reagiert TCP irreversibel über die Ausbildung einer kovalenten Bindung mit beiden Subtypen der MAO [Paech et al., 1980; Penning, 1983; Silverman, 1983; Fagervall und Ross, 1986].

Von Yu [1984] wurde gezeigt, daß in den Endothelien der Kapillaren des Rattenhirns hohe Mengen des Enzyms MAO vorliegen. Da dieses Enzym nicht kälteempfindlich ist, kommt es nach Zugabe von racemischem TCP zur In-vitro-Abreaktion des MAO-hemmenden (+)-TCP. Aufgrund der reaktionskinetischen Charakteristika ist von einer kovalenten Bindung an dieses Enzym auszugehen. Die sich aus dieser Reaktivität ergebende Problematik für die Herstellung von Kalibrierproben aus dieser biologischen Matrix wurde umgangen durch kurze Hitzebehandlung der Matrix (und Enzymdeaktivierung) vor Zugabe von TCP.

Vergleichbare Beobachtungen waren auch von anderen Autoren gemacht worden. Von Yonemitsu und Pounder [1993] konnte nach Inkubation von humanem Vollblut (48 h; 37°C) nur noch 58% der eingesetzten TCP-Menge wiedergefunden werden. Crifasi und Long [1997] berichten, daß nach mehrwöchiger Lagerung (-20°C) von Gewebe-, Urin- bzw. Blutproben humanen Ursprungs bei der Wiederholungsbestimmung in den Geweben, nicht jedoch Urin und Blut ein Konzentrationsverlust zu beobachten war. Die Methodvalidierung der hier verwendeten Methoden ergab eine gute Substanzstabilität bei Einhaltung der angegebenen Versuchsbedingungen.

5.2.2. TCP-Blutkonzentrationen

In ausgedehnten früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde eine deutliche Nichtlinearität in der Kinetik von TCP gefunden, die sowohl einen sättigbaren First-pass-Effekt [Baker und Coutts, 1989] als auch eine nichtlineare Clearance beinhaltet. Die für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählte Dosis lag im - in kinetischer Hinsicht - linearen Bereich.

Im Allgemeinen waren – trotz der hohen Clearance von TCP - die Daten vergleichbar mit denjenigen, die in vorherigen Studien erhalten worden waren. Auffällig ist, daß - unabhängig von der Applikationsart - an der Ratte deutlich höhere Blut-Konzentrationen des (+)-TCP zu detektieren waren, die im Laufe der Zeit noch anstiegen. Auffällig ist die gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse nach Applikation in die Nasenhöhle zwischen verschiedenen Studien. Dabei ergab sich bei der Ratte für jeden Applikationsmodus eine höhere Bioverfügbarkeit für das (+)- im Vergleich zum (-)-TCP [Langguth und Spahn-Langguth, 1995; Langguth et al., 1997, 1998].

Es kann im Falle von TCP aufgrund der allgemeinen Datenlage davon ausgegangen werden, daß eine Spezies-abhängige Metabolisierung vorliegt [Saura et al., 1996; Henriot et al., 1994]. Es ist davon auszugehen, daß auch beim Durchtritt durch Endothelien ein Abbau stattfindet; dies scheint nicht nur z.B. den GI-Trakt, sondern auch die Endothelien der Gehirnkapillaren („metabolische Blut-Hirn-Schranke“) zu betreffen [Aigner et al., 1997]. In Bezug auf die Verträglichkeit und den therapeutischen Nutzen der Enantiomere [Escobar et al., 1974; Fuentes et al., 1976] und des Razemates sind die Ansichten immer noch gegensätzlich. Auch aus den kinetischen Daten der vorliegenden Studie konnten hier keine weiterführenden Erkenntnisse gewonnen werden. Wie von verschiedenen Autoren bereits vor einiger Zeit diskutiert [Snyder, 1974; Aboul-Enein und Serignese, 1995], ist es durchaus denkbar, daß die antidepressive Wirkung bei oral verabreichtem rac-TCP beim Menschen nicht vom MAO-hemmenden (+)-TCP, sondern vom Monoamin-aufnahmehemmenden (-)-TCP getragen wird.

5.2.3 Gewebe-Konzentrationen und Membranpermeation

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Konzentrationen von TCP-Enantiomeren in verschiedenen anatomisch differenzierten Gehirnarealen und in CSF nach Applikation des razemischen Wirkstoffs in Abhängigkeit des Applikationsmodus untersucht. Die erreichten mittleren Gewebekonzentrationen des (-)-TCP zeigten sich weitgehend unabhängig von der Applikationsvariante. Erkennbar war, daß in vier der sechs untersuchten Gehirnareale nach Nasalapplikation bereits initial die höchsten Gewebekonzentrationen detektiert werden konnten, während nach Injektion ins Peritoneum erst nach 10 Minuten der C_{max} -Wert erreicht wurde. Für das (+)-TCP lagen sogar in allen untersuchten Gehirnarealen bereits initial nach i.n.-Gabe die höchsten Konzentrationswerte vor, während nach i.p.-Applikation in allen untersuchten Gehirnregionen ein Anstieg zu verzeichnen war. Diese Befunde sind als Indiz für einen selektiven Zugang des TCP über die Nasenhöhle zum ZNS anzusehen.

Ein Vergleich der Daten mit Literaturdaten ist deshalb probematisch, weil in der Literatur beschriebene Studien höhere TCP-Dosen oder den Einsatz von TCP-freisetzenden Prodrugs beinhalteten [Calverley et al., 1981; Baker et al., 1985].

Innerhalb der ersten zehn Minuten nach der Applikation konnten in der eigenen Arbeit Daten zur Gewebekonzentration für beide Enantiomere des TCP erhalten werden. Erstaunlicher Weise können im Wirkkompartiment an der Ratte deutlich höhere Konzentrationen an (-)-TCP als für das (+)-Enantiomer bestimmt werden, obwohl gerade zu diesen Zeitpunkten im Blut inverse Verhältnisse vorliegen. Diese Befunde werden von anderen Autoren bestätigt: In der Arbeit von Langguth und Spahn-Langguth [1995] ergeben sich im Gesamthirngewebe annähernd gleich (-)/(+)-TCP-Verhältnisse wie in der eigenen Arbeit. Auch die Daten aus Studien von Fuentes et al. [1975; 1976] und Hampson et al. [1986], von denen die Enantiomere separat appliziert worden waren, widersprechen insgesamt den vorliegenden Daten nicht. Hierbei wurden verschiedene Dosen an TCP-Enantiomeren an Ratten verabreicht. Nach jeweils der gleichen Versuchsdauer war nachweisbar, daß die (-)/(+)-TCP-Quotienten mit Zunahme der verabreichten Dosis abnahmen, um sich nach Gabe von 20 mg/kg KG TCP-Enantiomer dem Wert 1,0 anzunähern.

Das im Vergleich mit dem Blut-Kompartiment umgekehrte Enantiomerenverhältnis im ZNS könnte durch selektive Transportmechanismen in der Blut-Hirn-Schranke oder aber auch Kompartiment-selektive metabolische Prozesse erklärt werden. Welche Rolle dabei die hohen von Yu [1984] gefundenen MAO-Konzentrationen im ZNS spielen, ist bislang ungeklärt.

Für TCP ergaben sich vergleichsweise hohe CSF-Konzentrationen, die bei i.n.-Applikation höher waren als nach i.p.-Applikation. Die im Vergleich zu Blut und Hirngewebe anderen Enantiomerenquotienten können nicht auf Blutkontaminationen zurückzuführen sein, da die Verhältnisse im Blut zu denen in der CSF invers sind.

Ähnlich wie beim Kokain liegen die nachgewiesenen CSF/Blut-Quotienten um mindestens eine Zehnerpotenz niedriger als die Hirngewebe/Blut-Quotienten, was mit dem hydrophilen Charakter dieser Matrix begründet werden kann. Es wurde deutlich, daß es - ähnlich wie beim Kokain - auch beim TCP zu einer verstärkten Anreicherung im ZNS kam, wenn die Applikation in die Nasenhöhle erfolgte. Im Gegensatz zum Kokain jedoch tritt diese maximale Anreicherung im Gewebe nicht initial, sondern mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung auf. Als Erklärungsmöglichkeit hierfür kommt die ausgeprägtere Lipophilie des Kokains im Vergleich zu TCP in Frage. Darüber hinaus ist zu beachten, daß die Plasmaeiweißbindung des Kokains mit 1% vernachlässigbar ist. Die Proteinbindung von Strukturverwandten von TCP liegen zwischen 15 und 36% [Nishihara et al., 1984; Baselt und Cravey, 1989], so daß für TCP eine Plasmaeiweißbindung in ähnlicher Größenordnung anzunehmen sein sollte. Die freie TCP-Konzentration und auch der Konzentrationsgradient sind dementsprechend geringer als für die totale Konzentration. Welchen therapeutischen Vorteil eine

Nasalapplikation neben der Umgehung des First-pass-Effektes haben könnte, ist anhand der Effekte beider Enantiomere zu prüfen.

Es gibt aus den durchgeführten Studien – auch den Permeabilitätsstudien am Caco-2-Modell, bei denen keine Stereoselektivität, keine Richtungsabhängigkeit und keine Sättigbarkeit gefunden wurden, - keinen Hinweis darauf, daß TCP durch kinetisch relevante Transporter aktiv durch biologische Membranen transportiert wird. Weder die unter Standardbedingungen durchgeführten Transportstudien noch weiterführende Bindungsstudien ergaben Hinweise auf einen aktiven Transport [Voigt, 1995; Döppenschmitt et al., 1998]. Die von Saura et al. [1996] gefundenen hohen Konzentration von MAO in intestinalem Gewebe scheinen bei Caco-2-Zellen nicht von Bedeutung. Die Permeabilitätsdaten für TCP passen in die von Artursson und Karlsson [1991] vorgeschlagene Korrelation zwischen Substanzpermeabilität und Absorption.

5.3. Baclofen

5.3.1 Baclofen-Blut-Konzentrationen

Die im Rahmen der vorliegenden Studien erhobenen kinetischen Daten für die Ratte entsprechen den von Mandema et al. [1992] publizierten Daten. Die bei Nasalapplikation der unter Verwendung von Cyclodextrin hergestellten Zubereitung erreichten Maximalkonzentrationen waren höher als erwartet. In Hinblick darauf, daß sich ca. 30% aller Patienten unter p.o.-Baclofen-Therapie als therapierefraktär erweisen, könnte die nasale Gabe einen alternativen Zugang zum systemischen Kreislauf darstellen.

Daten, die von anderen Autoren beschrieben worden sind [van Bree et al., 1991; Mandema et al., 1992], beinhalteten lediglich eine i.v.-Applikation und wahrscheinlich demzufolge höhere Konzentrationen im ZNS und Liquor.

5.3.2. Gewebe-Konzentrationen und berechnete Gewebe/Blut-Quotienten

Im Gegensatz zu den absoluten Konzentrationswerten in Hirngewebe und Liquor, sind die sich ergebenden Gewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten trotz der teilweise stark abweichenden Versuchsdesigns und Dosisbereiche überraschend gut mit den eigenen Ergebnissen vergleichbar.

Der Gewebe/Blut-Quotient und somit die ZNS-Selektivität waren nach Applikation auf die Nasenschleimhaut höher als nach i.p.-Gabe. Die nach systemischer Applikation erhaltenen Gewebe/Blut-Quotienten lagen in einem ähnlichen Bereich, wie von anderen Autoren beschrieben [Popova et al., 1995; Deguchi et al., 1995; Mandema et al., 1992; van Bree et al., 1991].

5.3.3. Baclofen-Penetrationsversuche am Everted-sac-Modell der Ratte

Da es sich beim Baclofen um ein Wirkstoff mit Aminosäurestruktur handelt, bei dem spezifische Transportmechanismen für den Transport vom GIT ins Blut vermutet werden, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen zu deren Aufklärung durchgeführt.

Allerdings erfolgte die Analyse der erhaltenen Proben von den meisten Autoren mit achiralen Methoden, so daß eine Stereoselektivität nicht endgültig nachweisbar war [Beall et al., 1985; Polache et al., 1991; Nacher et al., 1994; Cercos-Forteza et al., 1995; Cejudo-Ferragud et al., 1996; Moll-Navarro et al., 1996]. Im Gegensatz hierzu konnten von Krauss [1988] bei enantioselektiven Messungen Hinweise auf Enantiomerenunterschiede beim Transport im Rahmen der Untersuchungen am Everted-sac-Modell der Ratte nachgewiesen werden:

Hierbei wurde auf der mucosalen Seite ein R/S-Baclofen-Verhältnis¹ von unter 1,0 bestimmt, während der R/S-Quotient auf der serosalen Seite über 1,0 lag.

Da von Krauss [1988] mit dem Ziel, eine Enantioselektivität in der Absorption nachzuweisen, nur die Enantiomerenverhältnisse analysiert worden waren, nicht jedoch die absoluten Konzentrationen bestimmt wurden, waren keine Aussagen über das Verhältnis zwischen aktivem und passivem Prozess und die Relevanz des aktiven Transportes möglich. Dies war Ziel der vorliegenden Untersuchungen, bei denen nicht nur eine gute Aufnahme aus dem mucosalen Kompartiment in das serosale sondern auch ein aktiver Transport nachgewiesen werden konnten. Nichtsdestoweniger sollten in nachfolgenden Untersuchungen auch noch einmal die Enantiomere quantifiziert werden.

Weder die Permeabilitätsdaten aus den Everted-sac-Versuchen oder Daten aus den Studien an Caco-2-Zell-Monolayern noch die vorliegenden Literaturdaten [Nácher et al., 1994; Balerio und Rubio, 1996] geben einen Hinweis auf geringe Membranpermeabilität, die Schlussfolgerungen auf eine geringe Permeation durch die Blut-Hirn-Schranke deuten würden.

5.4. Baclofen-Esterderivate

5.4.1. In-vivo- und In-vitro-Stabilität der Baclofen-Esterderivate

Beim Versuch der Methodenentwicklung zur Bestimmung der Esterderivate zeigte sich eine außergewöhnliche Stabilität dieser Verbindungen. Aufgrund der mit Hilfe der MOMO-Software berechneten wahrscheinlichsten Konformation (s.u.), ist davon auszugehen, daß die Esterderivate als quasi sekundäre Amine aufzufassen sind, die somit nicht mit der OPA/NAC zu den fluoreszierenden Isoindolderivaten reagieren. Die Umsetzung mit für primäre und sekundäre Amine geeigneten CDA's z.B. S-Naproxen-Säurechlorid [Spahn et al., 1988] oder N-Methylcarprofenisocyanat [Herber, 1994] war dagegen aus Lösung prinzipiell möglich.

Browne et al. [1991] hatten eine geringe Esterase-Aktivität im Gehirn festgestellt. Dies schien sich indirekt in den vorliegenden Studien zu bestätigen. Jedoch erwiesen sich die Ester weder in vitro noch in vivo als gut hydrolysierbar. Abschließend kann festgestellt werden, daß - da eine Metabolisierung der Baclofenester im Hirngewebe nicht in ausreichendem Maße stattfindet - selbst durch eine verbesserte Penetration der Derivate in das ZNS kaum mit einem besseren klinischen Effekt zu rechnen ist. Ergänzende Molecular-Modelling-Berechnungen anhand von Literaturdaten ergaben eine geringe Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Esterderivate selbst über eine eigene biologische Aktivität verfügen (s.u.).

5.4.2. Untersuchungen zur Konformation der Baclofen-Esterderivate

Aufgrund der beobachteten Stabilität der Baclofenester-Derivate, die sowohl mit In-vivo- als auch In-vitro-Untersuchungen nachgewiesen werden konnten, und auch der vorliegenden außergewöhnlichen Reaktionsträgheit der im Molekül vorhandenen primären Aminofunktion wurde eine von der der Muttersubstanz stark abweichende Konformation der Esterderivate vermutet. Mit Hilfe der Computersoftware MOMO konnte diese Annahme exemplarisch bestätigt werden. Eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung scheint zu einer Stabilisierung der Struktur zu führen.

Für GABA war in Konformationsberechnungen eine gestreckte Konformation ähnlich der Struktur des freien Baclofens berechnet worden (Abb. 4.4.2.E). Da Baclofen als Agonist an

¹ In der Literatur besteht Unklarheit über die korrekte stereochemische Nomenklatur des Baclofen (Korrelation zwischen der absoluten Konfiguration im CIP-System und dem Drehsinn der Enantiomere). Es ist daher zu beachten, daß die von zitierten Autoren verwendete Notation übernommen wurde.

GABA_B-Rezeptoren angreift, kann vermutet werden, daß die biologische Aktivität an eine gestreckte Konformation der n-Butylgruppe im Baclofen gebunden ist. In der Tat konnten in einer Arbeit von Pirard et al. [1995] für die Bindung¹ an GABA_B-Rezeptoren die folgenden essentiellen strukturellen Voraussetzungen ermittelt werden:

- ◆ Vorliegen einer Carboxylatgruppe
- ◆ Vorliegen einer primären Aminofunktion
- ◆ Mittlerer Abstand dieser beiden ionisierten Gruppen von 460 pm
- ◆ Vorliegen einer aromatischen Gruppe (Thienyl, Phenyl, Benzo[b]furan) am β-Kohlenstoffatom
- ◆ Vorliegen eines lipophilen Substituenten in para (Phenyl) oder 5-Position (Thienyl, Benzo[b]furan) der aromatischen Gruppe
- ◆ Vorliegen einer weiteren lipophilen Funktion in Position 7 im Fall der Substitution mit Benzo[b]furan

Für die synthetisierten Esterderivate des Baclofens sind mindestens zwei der Forderungen nicht erfüllt: Durch die Esterbildung liegt in den Molekülen keine freie Carboxylgruppe mehr vor, darüber hinaus führen die Konformationsberechnungen der Esterderivate zu einer eher cyclischen Struktur, bei denen der Abstand zwischen Esterfunktion und Aminogruppe stark reduziert ist. Es kann ferner nicht ausgeschlossen werden, daß aufgrund der sehr starken Wasserstoffbrücke zwischen der Aminofunktion und dem Carbonylsauerstoff die Aminofunktion quasi als sekundäres Amin zu betrachten ist, so daß die Forderung nach Vorliegen einer primären Aminofunktion ebenfalls nicht erfüllt ist. Aufgrund dieser Befunde ist eine Affinität der Baclofenester zu GABA_B-Rezeptoren eher auszuschließen.

Insgesamt steht mit den Esterderivaten von Baclofen aber eine Reihe von Substanzen zur Verfügung, die – unabhängig von einer Rückspaltung zum wirksamen Baclofen – als Modellsubstanzen dienen können, um Struktur-Kinetik-Korrelationen in unterschiedlicher Hinsicht systematisch zu untersuchen, dies beinhaltet vor allem die Verteilung in Gewebekompartimente und deren Abhängigkeit von einer potentiellen Affinität zu Transportern [Leisen, in Vorbereitung].

5.5. Indometacin

5.5.1. Indometacin-Blut-Konzentrationen

Die ermittelten Blut-Konzentrations-Zeit-Profile bei der Ratte, ergaben eine höhere Bioverfügbarkeit nach Applikation auf die Nasalmucosa als bei der i.p.-Gabe. Dieser Befund ist vergleichbar mit dem aus einer Arbeit von Huang et al. [1995], die ebenfalls an Ratten im vergleichbaren Dosisbereich die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach p.o.-, i.n.- bzw. i.v.-Applikation untersuchten. Es ist zu beachten, daß in dieser wie in allen anderen zitierten Arbeiten nicht Blut sondern Plasma oder Serum als zu untersuchende Matrix verwendet wurde. Das Konzentrationsverhältnis zwischen Rattenplasma und -blut beträgt ca. 1,7 [Hucker et al., 1966]. Es zeigte sich, daß sowohl die C_{max}-, als auch die t_{max}-Werte nach i.n.-Gabe ähnlich waren. Weiterhin wurde deutlich, daß der gefundene Konzentrations-Zeit-Verlauf nach i.p.-Gabe nicht mit einer i.v.-Applikation vergleichbar ist. Ähnliche Daten wurden auch von anderen Autoren erhoben [Yoshida et al., 1991; Ogiso et al., 1989]; zur i.p.-Applikation von Indometacin konnten in der publizierten Literatur keine Vergleichsdaten gefunden werden.

¹ Ob nach Bindung an den GABA_B-Rezeptor einer Verbindung die diese Bedingungen erfüllt eine agonistische oder antagonistische Wirkung zu erwarten ist, bleibt unbestimmt.

Da Indometacin bereits seit vielen Jahren in der Therapie eingesetzt wird, ist eine große Zahl an Studien verfügbar, die sich mit Konzentrations-Zeit-Profilen dieses Wirkstoffs am Menschen auseinandersetzen. Infolgedessen sind zahlreiche Daten über die Kinetik von peroral und rektal verabreichtem Indometacin in der Literatur verfügbar [Helleberg, 1981], die mit den entsprechenden Ratten-Daten vergleichbar sind. Somit ist auch von einer – zumindest teilweisen - Übertragbarkeit der Nasalbefunde auf den Menschen auszugehen. Hinweise auf Speziesunterschiede ergeben sich z.T. aus Literaturdaten [Hucker et al., 1966].

5.5.2. Indometacin-Gewebe-Konzentrationen und Gewebe/Blut-Quotienten

Im Hirngewebe waren nach Nasalapplikation meist höhere Konzentrationen von Indometacin nachzuweisen als nach i.p.-Gabe. Durch Quantifizierung der Konzentration in verschiedenen anatomischen Untereinheiten konnte festgestellt werden, daß sowohl im Cortex als auch im Thalamus der Ratte diese Konzentrationsunterschiede als ausgeprägt anzusehen sind. Die Tatsache, daß nach i.n.-Applikation meist initial die höchsten Gewebekonzentrationen bestimmt werden konnten, während nach i.p.-Gabe in allen Gehirnarealen innerhalb der ersten 10 bis 20 Minuten eine Konzentrationszunahme zu beobachten war, spricht auch beim Indometacin für einen direkten Zugang von der Nasenhöhle zum ZNS. Auffällig ist hierbei insbesondere die starke Anreicherung des Indometacin im Thalamus nach Nasalapplikation, während nach i.p.-Gabe der sichere Nachweis des Wirkstoffs in diesem Areal nicht immer möglich war.

In der Literatur waren nur wenige Arbeit verfügbar, in denen Hirngewebekonzentrationen von Indometacin angegeben wurden, so daß ein Vergleich mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit nur eingeschränkt möglich ist [Brune et al., 1980; Hucker et al., 1966]. Insgesamt gibt es keine Literaturbefunde, die den ermittelten Daten widersprechen.

Im Gegensatz zum Hirngewebe scheinen sich im Liquor cerebrospinalis nach i.p.-Gabe höhere Konzentrationen an Indometacin aufzubauen, als dies nach Nasalapplikation zu beobachten ist. Während initial annähernd gleiche CSF-Konzentrationen nachweisbar waren, stieg die Konzentration in dieser Matrix nach i.p.-Gabe innerhalb der ersten 10 Minuten nach Applikation deutlich über die i.n.-Konzentrationswerte an. Dieser Befund stützt die Vermutung, daß für den Transport in das ZNS nach Applikation in die Nasenhöhle andere Mechanismen verantwortlich sind als nach parenteraler Gabe.

Im Gegensatz hierzu liegen jedoch einige Studien vor, in denen die Indometacinkonzentration im Liquor cerebrospinalis des Menschen nach verschiedenen Applikationsvarianten beschrieben werden. In allen diesen Arbeiten wird darauf hingewiesen, daß Indometacin nur in geringen bzw. geringsten Mengen in den Liquor übertritt [Hucker et al., 1966; Rothermich, 1971; Bannwarth et al., 1990]. Die bei den Ratten nachgewiesenen CSF-Konzentrationen lagen um ein Vielfaches über den an Menschen ermittelten Konzentrationen.

Nach Applikation in die Nasenhöhle ergab sich initial in den meisten der untersuchten Gehirnteilen ein Gewebe/Blut-Quotient, der das entsprechende i.p.-Verhältnis meist überstieg. Für den Thalamus der Ratte war diesbezüglich eine ausgesprochene Signifikanz der Selektivitätsunterschiede festzustellen. Insbesondere die Applikations-bedingte Selektivität für den Thalamus ist hier hervorzuheben.

Im Vergleich zu den (wenigen) Arbeiten, in denen entsprechende Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten angegeben sind, fällt auf, daß die in den vorliegenden Studien ermittelten Quotienten deutlich - und unabhängig von der Applikationsart – immer über den Quotienten (20fach und mehr) liegen, die in der Literatur für **Ratten** beschrieben wurden. Die eigenen Daten sind vielmehr mit den Quotienten vergleichbar, die beim **Meerschweinchen** gefunden wurden [Hucker et al., 1966]. In Bezug auf CSF/Blut-Quotienten werden bei der Ratte offensichtlich mehr als 25-fach höheren Quotienten erreicht als beim Menschen nach

i.m.-Injektion von Indometacin [Bannwarth et al., 1990]. Welche Rolle in dieser Hinsicht chronobiologische Effekte spielen [Boggio et al., 2001], ist noch abzuklären.

5.6. Korrelation der Gewebe/Blut-Quotienten und der Lipophilie-Parameter

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen starken Anstieg der zu erwartenden Hirngewebe/Blut-Quotienten mit der Zunahme der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten. Es sollte hierbei beachtet werden, daß sich diese Korrelation nur dann in eindeutiger Weise ergibt, wenn bei der Berechnung der Gewebe/Blut-Quotienten die jeweilige Plasmaeiweißbindung berücksichtigt wird. Dies erscheint sinnvoll, da nur der im Blut in ungebundener Form vorhandene Anteil durch biologische Membranen penetriert. Da für Indometacin die Plasmaeiweißbindung mit um 99% angegeben wird, zeigt sich für diese Substanz der größte Einfluß der Korrektur. Im Falle von TCP konnte dieser Parameter aus dem Vergleich mit strukturverwandten Amphetaminderivaten abgeschätzt werden.

Aus der im Ergebnisteil dargestellten Korrelation von Octanol/Wasser-Verteilungsquotienten und den Gewebe/Blut-Quotienten könnte auch für unbekannte Substanzen eine Verteilung in das Hirngewebe abgeschätzt werden, allerdings nur unter der Annahme, daß aktive nach Innen oder nach Außen gerichtete Prozesse keine Rolle spielen. Für die Baclofen-Ester würden sich als Gewebe/Blut-Quotienten Werte ca. 3 für Methyl (logP 0,47), ca. 4 für Ethyl (logP 0,77) und ca. 5 für die anderen Ester (logP 1,31; 1,27; 1,42) ergeben.

5.7. Die potentielle Relevanz der Nasalapplikation

In den vorliegenden Untersuchungen wurde in der Regel davon ausgegangen, daß das Wirkkompartiment ZNS durch passive Diffusion erreicht wird. Allerdings werden – auch bei älteren etablierten Pharmaka – immer mehr Substanzen identifiziert, die Substrate für absorptive oder exsorptive Transporter sind. Dazu gehören nicht nur basische, sondern auch Arzneistoffe mit sauren Funktionen [Spahn-Langguth et al., im Druck; Flanagan et al., 2002; Hassel et al., 2002; Christians et al., 2002; Takeda et al., 2002]. Bei der Interpretation von Verteilungsdaten sind ggf. auch derartige Aspekte zu berücksichtigen.

Ob der Mechanismus der Aufnahme, der auch nach den neuen Untersuchungen von Chow et al. [2001] direkt zu sein scheint, und somit die Verfügbarkeitsdaten auf den Menschen übertragbar sind, ist meist noch abzuklären. Da direkte Konzentrationsmessungen im Wirkkompartiment hier nicht möglich sind, sind ausgedehnte Kinetik-Dynamik-Korrelationsstudien durchzuführen und auf der Basis des Effekts eine Aussage über die Wirkkonzentration in der Biophase zu machen. Das die Nasalmukosa unlängst als neuer – möglicherweise ZNS-selektiverer - Applikationsweg für eine Reihe von Substanzen entdeckt worden ist, zeigen eine Reihe von neuen Literaturstellen, die tierexperimentelle Studien und Humanstudien beinhalten [Larsson und Tjalve, 2000; Quadir et al., 2000; Illum et al., 2002; Bechgaard et al., 1997; Li et al., 2000; Lindhardt et al., 2002; Dahlin et al., 2001].

Auch technologische Aspekte scheinen hier von Bedeutung und sind Ziel weiterer Untersuchungen, so z.B. die Wahl von Matrices, die die Nasalabsorption noch erhöhen [Nakamura et al., 2002; Gudmundsdottir et al., 2001]. Ob die Nasalapplikation ein Teil des vielschichtigen Repertoires zur Verfügbarkeitserhöhung in dem nach „außen“ gut abgeschirmten ZNS werden wird und so Transportvektoren [Pardridge, 2002] zu ergänzen vermag, erfordert die systematische Untersuchung eines größeren Substanzkollektivs.

6. Experimenteller Teil

6.1. Synthesen

6.1.1. Geräte

Schmelzpunkte (Fp): Schmelzpunktmeßgerät Büchi SMP 20 (Flawil, Schweiz).

Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (IR): Perkin-Elmer-Spektrometer 1600 Series (Überlingen, BRD). Zur Aufnahme der Spektren wurden ausschließlich KBr-Preßlinge verwendet [Zusammensetzung ca. 1 mg Substanz (Baclofen bzw. Baclofenester-Derivat) pro 300 mg KBr].

UV/VIS-Spektroskopie: Hitachi U-2000 Spectrometer (Colora Meßtechnik GmbH, Frankfurt, BRD).

Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$): Bruker AC 300 bzw. AC 270 (Rheinstetten, BRD), [Institut für Pharmazeutische Chemie der J. W. Goethe-Universität (Prof. Dr. Linde) bzw. Institut für Organische Chemie der Technischen Universität, Berlin (Prof. Dr. Schmalz)]. Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgte in ppm. Als interner Standard wurde Tetramethylsilan (TMS) verwendet, das die Nulllinie definiert (0,00 ppm). Die Kopplungskonstanten (J) wurden in Hertz [Hz] angegeben; die Feinstruktur der Signale mit s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett und m = Multiplet bezeichnet. Pseudomultiplizitäten wurden durch ein vorangestelltes Ψ gekennzeichnet. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 300 K. Es ist zu beachten, daß bei Aufnahme von $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in MeOD vorhandene Protonen von Aminofunktionen aufgrund von Austauschphänomenen zwischen MeOD und primärer Aminofunktion nicht detektierbar sind. Wurde MeOD als Lösungsmittel verwendet, ist außerdem eine vollständige Integration der Spektren infolge von Wasserspuren (Hygroskopie) aus dem Lösungsmittel nicht möglich.

Massenspektroskopie (MS): Finnigan MAT 212- bzw. MAT 95- SQ Massenspektrometer (Bremen, BRD), [Institut für Pharmazeutische Chemie der J. W. Goethe-Universität (Prof. Dr. Linde) bzw. Institut für Organische Chemie der Technischen Universität Berlin (Prof. Dr. Schmalz)], die Analysen wurden bei 70 eV durchgeführt. Die relativen Intensitäten in Prozent wurden jeweils in Klammern angegeben.

6.1.2. Chemikalien

Das rac-Baclofen wurde von der Firma Ciba-Geigy GmbH (Wehr/Baden, BRD) zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Alkohole hatten mindestens p.a.-Qualität; die benutzten Trocknungsmittel stammten wie auch die verwendeten Lösungsmittel von der Firma Merck (Darmstadt, BRD). Das Chlorwasserstoffgas (technische Qualität) wurde von Messer Griesheim (Frankfurt/Main, BRD) bezogen.

6.1.3. Synthese der Baclofen-Esterderivate

Wasserfreie Lösungsmittel: Methanol wurde in Gegenwart von Magnesium refluxiert und anschließend vom entstandenen $\text{Mg}(\text{OMe})_2$ abdestilliert. Ethanol und 2-Propanol wurden

durch Zusatz von Molekularsieb (3 Å) getrocknet. Die Trocknung von 1-Propanol erfolgte über CaO, die von 1-Butanol über K₂CO₃ [Küster und Thiel, 1982].

Allgemeine Arbeitsvorschrift [Fuson und Wojcik, 1943]:

- ◆ Herstellung der HCl-gesättigten Alkohollösungen:

In einem ausgeheizten 500 ml-Zweihalskolben mit Gaseinleitungsrohr und Rückflußkühler (verschlossen mit Trockenrohr, CaCl₂-Füllung) wurden 300 ml des entsprechenden wasserfreien Alkohols vorgelegt. Danach wurde HCl-Gas eingeleitet, bis mindestens eine HCl-Konzentration von 2,0 mol/l erreicht war (Kontrolle der Massenänderung).

- ◆ Synthese der Baclofenester-Derivate:

1,5 g (7,0 mmol) Baclofen wurden in einem ausgeheizten 100 ml-Einhalskolben vorgelegt und mit 70 ml der entsprechenden alkoholischen Salzsäure versetzt. Der Kolben wurde mit einem Hg-gefüllten Blasenähler verschlossen und die Reaktionsmischung für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluß wurde der Blasenähler durch ein Trockenrohr (CaCl₂) ersetzt und das Reaktionsgemisch für weitere 24 h bei RT gerührt. Nach dieser Zeit wurde die Reaktionslösung für 1 h unter Rückfluß erwärmt, um überschüssiges HCl-Gas zu entfernen. Die Reaktionsmischung wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Im Fall des **Baclofen-n-butyl-Esters** mußte zur vollständigen Entfernung des n-Butanols vor der Trocknung eine azeotrope Destillation unter Cyclohexenzusatz durchgeführt werden. Die so erhaltenen Verbindungen wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet, die Ausbeute lag in allen Fällen über 97% (Restgehalt an R/S-Baclofen ca. 1%).

- ◆ Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (k) [Küster und Thiel, 1982]:

Zur Bestimmung des Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten wurde eine Lösung von Baclofen bzw. der Ester-Derivate des Baclofens (jeweils ca. 2 mg/l entsprechend 7,5 µmol/l) hergestellt. Als Lösungsmittel diente ein 0,1 M KH₂PO₄-Puffer der mit NaOH (0,1 M) auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt war. Vier Milliliter der Wirkstofflösung wurden in Sovirel-Gläsern (Fa. Fischer, Frankfurt/Main, BRD) mit 4 ml n-Octanol versetzt und für 30 Minuten mithilfe eines Horizontalschüttlers geschüttelt. Im Anschluß wurden alle Proben zentrifugiert (10 min; 0°C; 4000 U×min⁻¹). Die organische Phase wurde verworfen und die Extinktion der wäßrigen Phase mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrometers bei einer Wellenlänge von 220 nm jeweils gegen eine (n-Octanol-gesättigte) Pufferleerprobe gemessen. Es erfolgte außerdem die Messung der Extinktion der jeweiligen Ausgangslösung der Wirkstoffe (n = 5).

Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient k ergibt sich nach Gleichung (6.1.1.), da nach dem Lambert-Beer-Gesetz die Extinktion E proportional der Konzentration ist.

$$k = \frac{E(\text{Octanol})}{E(\text{ausgeschüttelter Wirkstoffpuffer})} \quad (6.1.1.)$$

Da nur die Konzentrationen in der wäßrigen Phase bestimmt wurden, ergab sich die Konzentration des Wirkstoffs im n-Octanol als Differenz der Konzentration im eingesetzten (n-Octanol-gesättigten) Wirkstoffpuffer und der in der wäßrigen Phasen nach dem Ausschütteln mit Octanol wiedergefundenen Konzentration (Gleichung 6.1.2.)

$$E(\text{Octanol}) = E(\text{n-Octanol-gesättigter Wirkstoffpuffer}) - E(\text{ausgeschüttelter Wirkstoffpuffer}) \quad (6.1.2.)$$

Aus Gleichung (6.1.1.) ergibt sich unter Verwendung der Gleichung (6.1.2.)

$$k = \frac{E(\text{n-Octanol-gesättigter Wirkstoffpuffer})-E(\text{ausgeschüttelter Wirkstoffpuffer})}{E(\text{ausgeschüttelter Wirkstoffpuffer})} \quad (6.1.3.)$$

In Tabelle 6.1.1. sind die Charakteristika der Baclofen-Esterderivate dargestellt.

6.2. In-vivo-, Ex-vivo/In-vitro- und In-vitro-Untersuchungen

Die In-vivo-Untersuchungen am Ganztier wie auch die Permeationsuntersuchungen durch Caco-2-Monolayer wurden unter Anleitung bzw. durch Herrn PD Dr. Peter Langguth am Departement Pharmazie der ETH Zürich (Schweiz) durchgeführt. Die tierexperimentellen Untersuchungen waren vom Veterinäramt des Kantons Zürich genehmigt worden. Somit entsprachen Sie den in der Schweiz gültigen gesetzlichen Vorschriften für die Durchführung von Tierversuchen. Die Ex-vivo/In-vitro-Untersuchungen am Modell des „everted sac“ für Baclofen wurden von Herrn Dr. Peter Ader am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität (Halle-Wittenberg) bearbeitet. Die entsprechenden Meldungen für diese Tierstudien waren bei der dafür zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Dessau, Dezernat 43) erfolgt.

Für die In-vivo-Studien am Ganztier wurden männliche Wistar-Ratten (Lebendgewicht: 200-330 g) verwendet. Die Tiere (n=3-5 pro Entnahmezeitpunkt) wurden bis zum Tag des Versuchs in für die Versuchstierhaltung vorgesehenen Räumen gehalten, die auf 23°C thermostatisiert waren. Der Tag/Nacht-Rhythmus betrug konstant 12:12 Stunden, wobei die Tageslicht-Periode um 6:00 Uhr begann. Die Tiere erhielten bis zum Versuch Futter und Wasser ad libitum.

Für die Everted-sac-Untersuchungen wurden ebenfalls männliche Wistar-Ratten (Lebendgewicht: 170-250 g) verwendet. Die Haltung der Tiere entsprach denen der Arbeiten am Ganztier, jedoch erhielten die Tiere nur bis 18 Stunden vor dem Versuch Futter. Wasser war für sie bis unmittelbar vor Versuchsbeginn verfügbar.

6.2.1. Geräte und Materialien

Für die Applikation von Narkosemittel bzw. zu untersuchenden Wirkstoffe (i.p.- bzw. i.v.-Applikation) und zur Probenentnahme wurden Einmalkanülen von Terumo (Leuven, Belgien) mit unterschiedlichem Kaliber und 1 ml-Einmalspritzen von Primo (Asik, Dänemark) bzw. 2 ml-Einmalspritzen von Becton Dickinson (Braunschweig, BRD) verwendet. Die Applikation auf die Nasalmucosa wurde mit „Tips for pipetman“ (max. Volumen 20 µl/Nasenloch) von Gilson Medical Electronics (Villiers-le Bel, Frankreich) und einem Pipetman® (Volumenbereich 0-20 µl) von Pipetman Symedic AG (Zürich, Schweiz) durchgeführt.

Proben von Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) wurden in „Treff Lab-Gefäßen“ (1,5 ml) der Firma Treff-Lab AG (Degersheim, Schweiz) oder - wie auch die erhaltenen Blutproben - in Minigrip-Sammelröhrchen (1 ml; Beschichtung mit unterschiedlichen Stabilisatoren; s. Tab. 6.2.3.) (Firma Milan, Genf, Schweiz) überführt und tiefgefroren gelagert. Die Homogenisierung der Gehirnproben erfolgte mit Hilfe eines Polytron-Homogenizers der Kinematica AG (Littau, Schweiz). Die Gehirnabschnitte wurden ebenfalls in „Treff Lab-Gefäßen“ (1,5 ml) der Firma Treff AG (s.o.) gelagert. Präparationen des gesamten Gehirn ohne Aufteilung in die verschiedenen Abschnitte, d.h. mit höherem Probenvolumen, wurden in Flacon 2096-

Tab. 6.1.1.: Physikalisch-chemische Charakterisierung der Baclofenester-Derivate.

Substanz	(R/S)-Baclofenmethyl- ester-Hydrochlorid	(R/S)-Baclofenethylester- Hydrochlorid	(R/S)-Baclofen-1- propylester-Hydrochlorid	(R/S)-Baclofen-2- propylester-Hydrochlorid	(R/S)-Baclofen-n-butylester- Hydrochlorid
Strukturformel					
Summenformel	C ₁₁ H ₁₅ Cl ₂ NO ₂	C ₁₂ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂	C ₁₃ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	C ₁₃ H ₁₉ Cl ₂ NO ₂	C ₁₄ H ₂₁ Cl ₂ NO ₂
Molare Masse [g/mol]	264,2	278,2	292,2	292,2	306,3
Schmelzpunkt [°C]	149	149	145	162	125
¹ H-NMR ¹	δ = 2,84 [dd, J {H'-C(2), H-C(2)}=16,3 Hz, J {H'-C(2), H-C(3)}=6,3 Hz H'-C(2)], 2,69 [dd, J {H'-C(2), H'-C(2)}=16,3 Hz, J {H-C(2), H-C(3)}=7,8 Hz H-C(2)], 3,12-3,50 [m, 2H-C(4), H-C(3)], 3,58 [s, 3H-C(1')], 7,29-7,41 [m, 4H, arom.]	δ = 0,83 [t, J {H-C(2''), H-C(1'')}=7,1 Hz, 3H-C(2'')], 2,37 [dd, J {H-C(2), H'-C(2)}=16,1 Hz, J {H-C(2), H-C(3)}=8,1 Hz, H-C(2)], 2,53 [dd, J {H'-C(2), H-C(2)}=16,1 Hz, J {H-C(2), H-C(3)}=6,2 Hz, H'-C(2)], 2,82-3,16 [m, 2H-C(4), H-C(3)], 3,73 [q, J {H-C(1''), H-C(2'')}=7,1 Hz, 2 H-C(1'')], 7,00-7,12 [m, 4H, arom.]	δ = 0,93 [t, J {H-C(3''), H-C(2'')}=7,4 Hz, 3H-C(3'')], 1,53 [m, 2H-C(2'')], 2,69 [dd, J {H-C(2), H'-C(2)}=16,0 Hz, J {H-C(2), H-C(3)}=8,2 Hz, H-C(2)], 2,83 [dd, J {H'-C(2), H-C(2)}=16,0 Hz, J {H'-C(2), H-C(3)}=6,1 Hz, H'-C(2)], 3,12-3,42 [m, 2H-C(4), H-C(3)], 3,94 [t, J {H-C(1''), H-C(2'')}=6,6 Hz, H-C(1'')], 7,30-7,42 [m, 4H, arom.]	δ = 1,04 [d, J {H-C(2''), H-C(1'')}=6,2 Hz, 3H-C(2'')], 1,11 [d, J {H-C(3''), H-C(1'')}=6,2 Hz, 3H-C(3'')], 2,62 [dd, J {H-C(4), H'-C(4)}=15,7 Hz, J {H-C(4), H-C(3)}=8,6 Hz, H-C(4)], 2,86 [dd, J {H'-C(4), H-C(4)}=15,7 Hz, J {H'-C(4), H-C(3)}=5,3 Hz, H'-C(4)], 3,07-3,36 [m, 2H-C(2)], 3,56 [m, H-C(3)], 4,84 [m, H-C(1'')], 7,20-7,32 [m, 4H, arom.], 8,17 [s, breit, 3H, NH ₃ ⁺]	δ=0,85 [t, J {H-C(4''), H-C(3'')}=7,2 Hz, 3H-C(4'')], 1,15-1,26 [Ψ sext., 2H-C(3'')], J=7,2 Hz, 1,38-1,49 [m, 2H-C(2'')], 2,7 [dd, J {H-C(2), H-C(3)}=5,8 Hz, J {H-C(2), H'-C(2)} = 14,4 Hz], 2,9 [dd, J {H'-C(2), H-C(3)}=5,8 Hz, J {H'-C(2), H-C(2)}=14,4 Hz], 3,1 [dd, J {H-C(4), H-C(3)}=5,8 Hz, J {H-C(4), H'-C(4)}=14,4 Hz], 3,3 [dd, J {H'-C(4), H-C(3)}=5,8 Hz, J {H'-C(4), H'-C(4)}=14,4 Hz], 3,6 [Ψt, J [H-C(3)], J=8,7 Hz, 3,94 [t, J {H-C(1''), H-C(2'')}=6,5, 2H-C(1'')], 7,20-7,32 m, 4H, arom.], 8,19 [s, breit, 3H, NH ₃ ⁺]
IR-Spektrum [cm ⁻¹]	2000 (NH ₃ ⁺), 1734 (RCO ₂ R'), 1492 (NH ₃ ⁺)	1999 (NH ₃ ⁺), 1731 (RCO ₂ R'), 1490 (NH ₃ ⁺)	2022 (NH ₃ ⁺), 1709 (RCO ₂ R'), 1490 (NH ₃ ⁺)	2029 (NH ₃ ⁺), 1704 (RCO ₂ R'), 1489 (NH ₃ ⁺)	2024 (NH ₃ ⁺), 1708 (RCO ₂ R'), 1490 (NH ₃ ⁺)
MS (m/z) [%]	227 (12), 196 (14), 138 (100), 103 (52), 77 (20)	241 (28), 196 (60), 138 (100), 103 (42), 77 (20)	255 (18), 196 (68), 138 (100), 77 (21)	255 (18), 196 (60), 138 (88), 77 (30), 43 (100)	270 (94), 253 (8), 197 (96), 138 (88), 77 (32), 57 (100)
Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient k (n = 5)	3,0 ± 0,3	5,9 ± 0,2	20,2 ± 1,6	18,6 ± 0,8	26,4 ± 1,1

¹ Als Lösungsmittel wurde für die Methyl-, Ethyl- und 1-Propylester-Derivate MeOD; für die 2-Propyl- und n-Butylester-Derivate aufgrund der besseren Löslichkeit CDCl₃ verwendet.

Gefäßen (Fassungsvermögen: 14 ml) von Becton Dickinson (Lincoln Park, USA) bis zur Analyse aufbewahrt.

Für die Untersuchung der individuellen Konzentrations-Zeit-Profile an der Ratte nach Applikation von TCP, Baclofen und von Baclofenester-Derivaten wurden im Rahmen des operativen Eingriffs als Kathetermaterial PP 30-Schlauch 800/110/160/100 (Portex, England) sowie als Befestigungsmaterial Seide [schwarz, USP 3/0 von Serag-Wiesner (Naila, Schweiz)] verwendet.

6.2.2. Chemikalien

Diethylether wurde von Romil Chemicals Limited (Leics, Großbritannien) bezogen, Urethan (Carbaminsäureethylester) von Aldrich (Milwaukee, USA), physiologische Kochsalzlösung von Braun Medical AG (Emmenbrücke, Schweiz), Tranylcypromin von Procter & Gamble GmbH (Weiterstadt, BRD), Baclofen von Ciba-Geigy GmbH (Wehr/Baden, BRD) und Gamma-Cyclodextrin (W8HP 0,6) von Wacker-Chemie (Liestal, Schweiz), Heparin vom Labor Dr. G. Bichsel AG (Interlaken, Schweiz). Kokain, Ascorbinsäure, Natriumfluorid und Oxalsäure wurden von Merck (Darmstadt, BRD), Indometacin von der Firma Aldrich (Milwaukee, USA) bezogen. Alle verwendeten technischen Gase [Carbogen, Stickstoff (technische Qualität)] stammten von der Firma Messer Griesheim (Frankfurt/Main, BRD).

Vorschrift zur Herstellung der für die Permeationsuntersuchung an Caco-2-Monolayern verwendeten Pufferlösung [nach Wetterich, 1995]:

Die Permeationsuntersuchungen wurden in Hanks Balanced Sodium Salt Pufferlösung (HBSS, Firma Gibco BRL-Life, Paisley, UK) durchgeführt, die 10 mM 2-Morpholinoethan-Sulfonsäure-Monohydrat (MES, Firma Fluka, Buchs, Schweiz) beinhaltet und mit NaOH (0,1 M) auf pH 6,5 eingestellt worden war.

Pufferlösungen:

Vorschrift zur Herstellung des für die Untersuchung am umgestülpten Darmsäckchen („Everted sac“) der Ratte verwendeten Pufferlösung [Krauß, 1988]:

Tab. 6.2.1.: Zusammensetzung der Tyrodepuffer-Lösung [g/l]

NaCl	8,00
KCl	0,20
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,20
MgCl ₂ × H ₂ O	0,10
NaHCO ₃	1,00
NaH ₂ PO ₄	0,04
Glucose × H ₂ O	3,00

6.2.3. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kinetik in Hirngewebe und Blut¹

Zunächst wurden die Ratten mit Diethylether narkotisiert (s. Abschnitt 6.2.). Im Anschluß erfolgte die Applikation des Narkosemittels Urethan [50% (g/g) in steriler physiologischer Kochsalzlösung] in einer Dosis von 1500 mg/kg KG intramuskulär. Nach 60 Minuten erfolgte die Applikation der zu untersuchenden Wirkstoffe (s. Tab. 6.2.2.), die in physiologischer Kochsalzlösung gelöst waren. Die Applikationen wurden so durchgeführt, daß im Falle einer intraperitonealen (i.p.) bzw. intravenösen (i.v.) Gabe ein maximales Volumen von 400 µl, im Falle der intranasalen (i.n.) Gabe maximal ein Volumen von 20 µl (pro Nasenöffnung) appliziert werden mußte. Bei der Zubereitung der Applikationslösung für Baclofen wurde zur Lösungsvermittlung Gamma-Cyclodextrin in einer Konzentration von 10 mg/kg KG zugesetzt. Die Herstellung der Applikationslösung für Indometacin erfolgte durch Lösen von 50 mg Indometacin in 3,5 ml einer Na₂CO₃-Lösung (2,5%; w/w) und anschließender Zugabe von 1,5 ml HCl (0,5 M) [Huang et al., 1995].

Tab. 6.2.2.: Verabreichte Wirkstoffdosen und Entnahmezeitpunkte.

Wirkstoff	Applikationsart						Entnahmezeitpunkte ² [min]
	i.p. [mg/kg]		i.n. [mg/kg]		i.v. [mg/kg]		
	Salz	freier Wirkstoff	Salz	freier Wirkstoff	Salz	freier Wirkstoff	
Baclofen ³	--	1,000	--	1,000	--	1,000 ⁴	5, 20, 70
Bac-M×HCl ⁵	1,236	1,065	1,236	1,065	--	--	5, 20, 60
Bac-E×HCl ⁶	1,320	1,149	1,320	1,149	--	--	5, 20, 60
Bac-1P×HCl ⁷	1,385	1,214	1,385	1,214	--	--	5, 20, 60
Bac-2P×HCl ⁸	1,385	1,214	1,385	1,214	--	--	5, 20, 60
Bac-B×HCl ⁹	1,451	1,280	1,451	1,280	--	--	5, 20, 60
Indometacin	--	3,000	--	3,000	--	--	2, 10, 20, 60
Kokain×HCl	0,564	0,500	0,564	0,500	0,564	0,500	2, 10, 20, 60
TCP-Sulfat	0,685	0,500	0,685 ¹⁰	0,500 ⁹	0,685 ³	0,500 ³	2, 10, 20, 70, 130, 195

Zu den für die verschiedenen untersuchten Substanzen angegebenen Zeitpunkten (Tab. 6.2.2.) wurde zunächst versucht, Cerebrospinalflüssigkeit durch Punktion der Cisterna cerebellomedullaris nach einem von Hudson et al. [1994] beschriebenen Verfahren zu entnehmen. Die Gewinnung von CSF gelang nicht in jedem Fall problemlos, d.h. ohne Beimischung nennenswerter Blutmengen, so daß nicht für alle untersuchten Tiere diese Matrix in reiner Form zur Verfügung stand (s. Abschnitt 9.4.). Gelang die Punktion der Cisterna cerebellomedullaris konnte in der Regel ein Probenvolumen von 80 - 120 µl Liquor erhalten werden. Im Anschluß an die Gewinnung einer Probe von venösem Blut (4 ml) durch Punktion der Vena cava inferior und nach Dekapitierung des Tieres erfolgte die Präparation

¹ Diese tierexperimentellen Untersuchungen wurden zusammen mit bzw. unter Anleitung von PD Dr. P. Langguth (ETH Zürich) durchgeführt.

² Zur Bestimmung der Gewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten. Die Entnahmezeitpunkte für die untersuchten individuellen Konzentrations-Zeit-Profile sind im Abschnitt 6.2.4. angegeben.

³ Für Baclofen und alle Baclofenester-Derivate wurde eine Dosis von 4,68 µmol/kg KG eingesetzt.

⁴ Nur als individuelle Konzentrations-Zeit-Profile untersucht.

⁵ rac-Baclofenmethylester×HCl

⁶ rac-Baclofenethylester×HCl

⁷ rac-Baclofen-1-propylester×HCl

⁸ rac-Baclofen-2-propylester×HCl

⁹ rac-Baclofen-n-butylester×HCl

¹⁰ Sowohl zur Bestimmung der Gewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten, als auch als individuelle Konzentrations-Zeit-Profile untersucht.

(ggf. Segmentierung) des Gehirns. Im Falle von TCP und Indometacin wurde (bei 0°C) eine Feinpräparation in die anatomischen Untereinheiten Bulbus olfactorius, Cerebellum, Cortex, Medulla oblongata, Mesencephalon und Thalamus durchgeführt.

Die für die Stabilisierung der verschiedenen Substanzen und Matrices eingesetzten Reagenzien sind in Tabelle 6.2.3. wiedergegeben. Die Homogenisierung des Gehirngewebes erfolgte im Fall von Gesamthirnpräparationen nach Zugabe einer der des Gehirngewebes äquivalenten Menge an Kochsalzlösung (s. Tab. 6.2.3.). Im Fall der Segmentierung in die verschiedenen Gehirnareale wurde immer 1 g der entsprechenden Kochsalzlösung vor der Homogenisierung zugegeben. Die Lagerung aller Proben erfolgte bei -18°C, jeder Transport auf Trockeneis.

Da zum Zeitpunkt der tierexperimentellen Untersuchungen die In-vivo- und In-vitro-Stabilität der Baclofenester-Derivate noch nicht abschließend geklärt war, wurden die erhaltenen Proben durch Zusatz von NaF (10 g/l) und Oxalsäure (2 g/l) stabilisiert. Dies stellt eine für Ester übliche Methode dar [Baselt et al., 1993].

Tab. 6.2.3.: Verwendete Stabilisatoren bzw. zugesetzte Reagenzien für die verschiedenen Matrices und untersuchten Wirkstoffe.

Wirkstoff	Zugesetzte Stabilisatoren bzw. Reagenzien		
	CSF	Blut	Gehirngewebe ¹
Baclofen	--	EDTA	--
Baclofen-Esterderivate	NaF	NaF	NaF (10 g/l) + Oxalsäure (2 g/l) ²
Indometacin ³	5 µl H ₃ PO ₄ (85%)/Probe	7,5 µl H ₃ PO ₄ (85%)/ml	7,5 µl H ₃ PO ₄ (85%)/g Homogenat
Kokain	NaF	NaF	NaF (10 g/l) + Oxalsäure (2 g/l) ²
TCP	--	EDTA	Ascorbinsäure (18 g/l)

6.2.4. Studien zu individuellen Konzentrations-Zeit-Profilen⁴

Nach Narkoseeinleitung (s. Abschnitt 6.2.3.) erfolgten die stumpfe Präparation der Vena jugularis, deren Abbindung cranial und die Einführung des Polypropylen-Katheters. Nach Fixierung wurde mit einer Heparin-haltigen, sterilen physiologischen Kochsalzlösung (1:10 v/v) gespült. Die Applikation der zu untersuchenden Substanz wurde in die ebenfalls stumpf freipräparierte Vena femoralis durchgeführt. Als Zeitpunkte der Probenentnahme wurden 3, 10, 25, 40, 60, 90, 120, 150 und 205 Minuten nach Applikation von Baclofen bzw. dessen Ester-Derivaten festgesetzt (auf der Basis des kinetischen Verhaltens von Baclofen bei der Ratte in früheren Studien). Im Fall des TCP wurden - ebenfalls anhand von früher erhaltenen Daten - als Entnahmezeitpunkte 5, 10, 25, 40, 60, 120 180 und 240 Minuten nach Applikation gewählt. Die Probenentnahme erfolgte aus dem in die Vena jugularis eingebrachten Dauerkatheter, nach jeder Entnahme wurde der Katheter mit einer sterilen Heparin-haltigen physiologischen Kochsalzlösung (1:10 v/v) gespült und das entnommene Blutvolumen (max. 300 µl/Zeitpunkt) durch sterile physiologische Kochsalzlösung ersetzt.

¹ Die Stabilisatoren bzw. Reagenzien wurden jeweils in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

² nach Baselt et al. [1993].

³ Da in weitergehenden Untersuchungen auch u. U. entstandene Glucuronid-Metabolite bestimmt werden sollen, wurde - um eine Hydrolyse dieser Metabolite zu vermeiden - eine entsprechende Stabilisierung mit H₃PO₄ durchgeführt [Spahn-Langguth und Benet, 1992].

⁴ Diese tierexperimentellen Untersuchungen wurden zusammen mit bzw. unter Anleitung von PD Dr. P. Langguth (ETH Zürich) durchgeführt.

6.2.5. Untersuchungen am umgestülpten Darmsäckchen („Everted sac“¹) der Ratte¹

Die Versuchsdurchführung erfolgte in Anlehnung an ein von Krauß [1988] beschriebenen Verfahren. Es wurden dabei Geräte und Chemikalien derselben Hersteller verwendet. Nach Tötung der Tiere durch Genickbruch und Öffnung der Bauchhöhle wurde der Dünndarm entnommen, mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gespült und umgestülpt. Aus einem Darmpräparat konnten jeweils vier Jejunum- und zwei Ileum-Abschnitte mit einer jeweiligen Länge von 5 cm gewonnen werden. Jede Zwischenlagerung der Organe erfolgte in eisgekühltem Tyrode-Puffer (zur Zusammensetzung s. Abschnitt 6.2.2.) unter Carbogenbegasung. Die Präparation sowie die Vorbereitung der Darmsegmente mußten so schnell wie möglich erfolgen, um eine ausreichende Viabilität zu gewährleisten. Nach dem Abbinden eines Endes jedes Darmsegmentes wurden 0,8 ml der Inkubationslösung und eine Carbogenblase in das Innere des Segments (= Serosaseite) injiziert und nach dem Verschluss in Glaskolben überführt, die mit 20 ml Inkubationslösung gefüllt waren. Während der Inkubation (37°C, 30 min) erfolgte eine Begasung mit Carbogen. Zudem wurden die Probengefäße mit einer Frequenz von 150 min⁻¹ geschüttelt, um einen „Unstirred-layer“-Effekt zu vermeiden [Scharrer et al., 1992].

Die Baclofenkonzentration der verwendeten Lösung lag bei $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$. Die rac-Baclofenkonzentrationen waren entweder zu Beginn des Versuches auf beiden Seiten des Darmpräparates gleich (Gleichgewichtsuntersuchung), oder wurden nur dem äußeren Medium (Mukosa-Seite) zugesetzt (Untersuchung zur Zeitabhängigkeit des Baclofen-Transports von apikal nach basolateral). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Inhalt der Darmsäckchen (Serosal-Lösung) sowie ein Aliquot der äußeren Inkubationsflüssigkeit (Mukosal-Lösung) entnommen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Als Vergleiche wurden unter gleichen Bedingungen Aliquote des Baclofen-freien Tyrode-Puffers sowie der Ausgangslösung (Baclofen-haltiger Tyrode-Puffer) zur Analyse aufbewahrt. Als Maß für die Funktionsfähigkeit der Darmabschnitte diente im Rahmen dieser Untersuchung der Glucosetransport, der über eine Glukosebestimmung (nach GOD-Perid-Methode) quantifiziert wurde [Krauß, 1988].

6.2.6. Permeation von Tranlycypromin durch Caco-2-Monolayer²

Die entsprechenden Versuche wurden nach einem u.a. von Wetterich et al. [1996] beschriebenen Standardverfahren durchgeführt; die verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien und der Versuchsaufbau entsprachen den in der Referenz beschriebenen Bedingungen. Für die Transportuntersuchungen wurden Caco-2-Zellen (14 tägige Wachstumsphase, Passagen 70-75) einer Dichte von $1 \times 10^5 \text{ Zellen} \times \text{cm}^{-2}$ auf Polycarbonatfilter ausgesät, es wurden Filter mit einem Durchmesser von 12 mm und einem Porendurchmesser von 0,4 µm verwendet. Die Zusammensetzung des Transportpuffers ist in Abschnitt 6.2.2. angegeben. Die als Träger der Zellmonolayer verwendeten Polycarbonatfilter wurden mit den Caco-2-Zellen zwischen zwei auf 37°C temperierten und N₂-durchströmten Diffusionskammern montiert. Jeweils 5 ml der auf 37°C temperierten TCP-Lösung [1 mmol in HBSS + 10 mM MES-Lösung (pH 6,5)] wurde in den Probenraum der apikalen Seite der Zellmonolayerschicht gegeben. Wirkstofffreier Puffer von 37°C wurde der basolateralen Seite zugeführt. In jeweils 20 minütigen Abständen (20, 40, 60, 100, 120 min)

¹ Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. P. Ader am Institut für Pharmazeutische Chemie der Martin-Luther-Universität (Halle-Wittenberg) durchgeführt.

² Die Permeationsuntersuchungen wurden zusammen mit Herrn PD Dr. Peter Langguth am Departement Pharmazie der ETH Zürich (Schweiz) durchgeführt.

wurde auf der Akzeptorseite ein Probenvolumen von 600 µl entnommen und dieses Volumen durch wirkstofffreien Transportpuffer (37°C) ersetzt, während auf der Donorseite nur zu Beginn und Ende des Versuchs eine Kontrollprobe entnommen wurde. Die Untersuchungen wurden in drei parallelen Versuchsreihen durchgeführt. Zur Testung der Integrität der Monolayer wurde ³H-Mannitol zugesetzt. Sowohl die Mannitolfluxe als auch die transepithelialen elektrischen Widerstände (TEER) zeigten dabei, daß das Testsystem intakt war.

6.2.7. Ex-vivo/In-vitro-Untersuchungen zur Stabilität der Tranlycypromin-Enantiomere

Zur Untersuchung der Stabilität der TCP-Enantiomere wurden Inkubationsversuche mit Hirngewebe-Homogenat der Ratte, bzw. Liquor cerebrospinalis humanen Ursprungs¹ durchgeführt. Als Methode zur Probenvorbereitung und Analyse wurde das unter 6.4.4. beschriebene Verfahren verwendet.

A. Zeitabhängigkeit der Degradation: In 200 mg Hirngewebehomogenat (1:1 g/g, d.h. 100 mg Hirngewebe) bzw. 100 µl CSF wurden 1,07 µg razemisches TCP (in 50 µl wäßriger Lösung) gegeben. Die Proben wurden intensiv gemischt und bei 4°C inkubiert. Nach Inkubationszeiten von 5, 15, 30, 45 oder 60 Minuten wurden die Proben aufgearbeitet und analysiert. Als Referenz dienten TCP-Proben, die mit 200 µl Wasser (Gehirn) bzw. 100 µl Wasser (CSF) in entsprechender Konzentration hergestellt worden waren.

B. Temperaturabhängigkeit der Degradation von TCP²: Aufgrund der beobachteten Instabilität von TCP in Gewebehomogenat wurden weitere Stabilitätsprüfungen durchgeführt mit dem Ziel, ggf. involvierte Enzyme zur Herstellung stabilerer analytischer Standards zu deaktivieren. Um zu prüfen, ob eine Thermodeaktivierung der Gewebematrix vor der Zugabe des TCP einen Einfluß auf die Wiederfindung der Substanz hat, wurden jeweils 200 mg Hirngewebehomogenat (1:1 g/g, d.h. 100 mg Hirngewebe) vor der Zugabe des TCP im Wasserbad für 15 Minuten auf verschiedene Temperaturen erhitzt (40, 60, 80, 100°C). Nach dem Abkühlen folgten die Zugabe von jeweils 1,07 µg razemischem TCP (in 50 µl Wasser), eine intensive Mischung und eine Inkubation für 15 Minuten bei 4°C. Eine Vergleichsprobe wurde ohne vorheriges Erhitzen ebenfalls mit einer entsprechenden Menge TCP für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden alle Proben gemeinsam aufgearbeitet. Die Peakhöhen wurden jeweils miteinander verglichen.

In einer weiteren Untersuchung wurde geprüft, ob eine kurzzeitige Hitzebehandlung eines TCP-haltigen Hirngewebehomogenates die Gesamtkonzentration sowie das Enantiomerenverhältnis von zugegebenem TCP beeinflusst oder ob dieses Verfahren geeignet wäre, um instabile Gewebeproben zu stabilisieren. Hierzu wurden wiederum entweder zu 200 mg Hirngewebehomogenat (1:1 g/g, d.h. 100 mg Hirngewebe) oder 200 µl Wasser 1,07 µg razemisches TCP (in 50 µl wäßriger Lösung) zugegeben. Nach intensivem Mischen und einer ca. 15 minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Proben im Wasserbad für 15 Minuten auf 80°C erhitzt, nach dem Abkühlen auf RT gemeinsam aufgearbeitet und die Peakhöhen miteinander verglichen.

C. Abhängigkeit der Degradation von der Proteinkonzentration: Um zu prüfen, ob die Wiederfindung der TCP-Enantiomere eine Abhängigkeit von der Proteinmenge, d.h. der Menge an vorhandenem Hirngewebe zeigt, erfolgte eine Einwaage von 0, 50, 100, 200 mg

¹ Die Cerebrospinalflüssigkeit wurde von Frau Dr. Dierksen-Kauerz (Klinik für Neurochirurgie, Christian-Albrechts-Universität Kiel) zur Methodenentwicklung und -validierung zur Verfügung gestellt.

² Nur für Hirngewebe untersucht.

Rattenhirnhomogenat (1:1 g/g, d.h. 0, 25, 50, 100 mg Hirngewebe). Die unterschiedlichen Gewebemengen wurden durch Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung auf ein Probengewicht von insgesamt jeweils 200 mg ergänzt. Im Anschluß folgte wiederum die Zugabe von 1,07 µg TCP in 50 µl wäßriger Lösung, eine intensives Mischen und eine Inkubation für 15 Minuten bei 4°C. Die Aufarbeitung und Analyse erfolgte für jede Serie gemeinsam, die Peakhöhen der Proben ohne Gewebeanteil dienten dabei als Kontrollwerte (100%).

6.2.8. Versuche zur Bestimmung der Konzentration der Baclofenester-Derivate

6.2.8.1. Direkte Bestimmung

Da sich eine Quantifizierung der Baclofenester-Derivate mit Hilfe der OPA/NAC-Derivatisierung als nicht möglich erwiesen hatte (s. Abschnitt 4.4.1.), sollte versucht werden, diese Bestimmung mit Hilfe eines anderen Derivatisierungsreagenzes und Trennsystems zu erreichen. Als Derivatisierungsreagenz wurde Carprofenisocyanat ausgewählt und aufgrund der besseren Verfügbarkeit im Rahmen der Vorversuche zunächst als Razemat eingesetzt [Herber et al., 1994]. Im Folgenden sollen die untersuchten Derivatisierungsbedingungen und das chromatographische System zusammengefasst werden (Schema 6.1.):

Schema 6.1.

- ◆ 200 ng Baclofenester-Derivat × HCl in 100 µl H₂O
- ◆ im Vakuum zur Trockne eindampfen
- ◆ + 50 µl Triethylamin (1,0 vol% in CHCl₃)
- ◆ + 20 µl Carprofenisocyanat (0,1 % in Toluol)
- ◆ Vortexen
- ◆ Reaktionszeit 30 min (RT), unter Lichtausschluß
- ◆ + 50 µl Ethanolamin (1,0 vol% in CHCl₃)
- ◆ 15 min Stehen bei RT, unter Lichtausschluß
- ◆ im Vakuum zur Trockne eindampfen
- ◆ + 100 µl mobile Phase
- ◆ Vortexen
- ◆ 80 µl injizieren

Chromatographisches System

Stationäre Phase:	Hauptsäule:	Zorbax Sil; 5 µm; 250×4,6 mm ID; PN (Firma Bischoff, Leonberg, BRD)
Mobile Phase:		n-Hexan/THF/2-Propanol/TEA 100:25:10:2 (v/v/v/v)
Fluß:		1,0 ml×min ⁻¹
Fluoreszenzdetektion	Exzitation:	300 nm
	Emission:	364 nm

Das hier angegebene Trennsystem stellt bereits eine optimierte Zusammenstellung dar, um Baclofenester-Derivate aus wäßriger Lösung nachzuweisen. Bei maximaler Verstärkung über das Borwin-Auswertesystem (Fa. Jasco) waren allerdings nur vergleichsweise geringe Peakhöhen bzw. -flächen zu erhalten (angenommene Nachweisgrenze ca. 100 ng Baclofenester-Derivat, entsprechend 50 ng pro Peak). Bei eingesetzten Probenvolumina von z.B. 100 µl CSF oder 500 µl Blut oder 1000 mg Hirnhomogenat (1:1, g/g) ergäbe sich hierbei eine Nachweisgrenze von zwischen 200 und 1000 ng×ml⁻¹ CSF oder Blut bzw.

200 ng×g⁻¹ Hirngewebe. In dieser Abschätzung sind noch keine Substanzverluste berücksichtigt, die bei nicht quantitativer Extraktion entstehen. Aufgrund dieser Befunde wurde auf eine Weiterentwicklung dieser Analyseverfahren verzichtet.

Tab. 6.2.4.: Retentionszeiten der Baclofenester-Carprofenisocyanat-Derivate

Baclofenester-Derivat		Retentionszeiten [min]
Methylester	1. Peak	5,8
	2. Peak	6,4
Ethylester	1. Peak	7,2
	2. Peak	8,0
n-Propylester	1. Peak	9,2
	2. Peak	10,1
Isopropylester	1. Peak	8,7
	2. Peak	9,2
n-Butylester	1. Peak	13,4
	2. Peak	14,7

6.2.8.2. Indirekte Bestimmung (= Rückspaltung zu Baclofen)

In weiteren Untersuchungen sollte versucht werden, die Bestimmung der Baclofen-Esterderivate auf indirektem Wege zu ermöglichen. Hierzu sollte zunächst eine Methode optimiert werden, mit deren Hilfe eine reproduzierbare hydrolytische Spaltung der Baclofenester-Derivate erreicht werden sollte. Hieran anschließend sollte eine Quantifizierung des dann vorliegenden Baclofen mit der analytischen Methode für die Muttersubstanz (s. Abschnitt 6.4.5.) erfolgen. Die Optimierung möglicher Spaltungsbedingungen wurde zunächst für den Baclofenbutylester untersucht. In verschließbaren Sovirel-Gläsern wurden hierzu 103 ng (in 50 µl Wasser) des Derivates eingebracht und zur Trockne eingedampft. Diese Menge an Baclofenbutylester entspricht 72 ng an freiem Baclofen. Im Schema 6.2. sind die untersuchten Spaltungsbedingungen zusammengefasst.

Die Abschätzung der Spaltungsausbeute erfolgte durch den Vergleich mit den Peakhöhen, die nach Derivatisierung und Injektion einer bekannten Menge Baclofen erhalten worden waren und die den gleichen Verdünnungsschritten (mit Wasser, wie in Schema 6.2. angegeben) unterworfen worden waren.

Schema 6.2.

- ◆ 103 ng Baclofenbutylester × HCl in 50 µl H₂O
- ◆ im Vakuum zur Trockne eindampfen
- ◆ + **W** (Tab. 6.2.4)
- ◆ Vortexen
- ◆ Inkubation bei **X**°C für **Y** min
- ◆ + **Z**
- ◆ Vortexen
- ◆ 10 min Zentrifugieren zum Abscheiden von Salz (0°C, 4000 U×min⁻¹)
- ◆ + 89 ng Cl-Phe (in 20 µl H₂O)
- ◆ weiter nach der Analysenvorschrift zur Bestimmung von Baclofen (s. Abschnitt 6.4.5.)

Tab. 6.2.5.: Untersuchte Spaltungsbedingungen.

W	X [°C]	Y [min]	Z	Ausbeute [%]
50 µl NaOH (1 M) + 50 µl MeOH	90	10	--	9
		20		14
		40		19
		60		21
		90		44
		900		55
50 µl NaOH (1 M) + 50 µl MeOH	105	10	--	14
		20		31
50 µl NaOH (0,1 M)	90	10	--	19
50 µl HCl (0,1 M)	90	20	--	6
100 µl NaOH (1 M)	105	10	--	nicht auswertbar
		20		nicht auswertbar
		40		nicht auswertbar
		60		nicht auswertbar
		90		nicht auswertbar
		120		nicht auswertbar
100 µl NaOH (0,1 M)	105	10	--	18
		20		44
		40		57
		60		65; 68; 71
		90		57
		120		68
100 µl KOH (0,1 M)	105	60	--	48
55 µl NaOH (1 M)	105	60	45 µl HCl (1 M)	70
55 µl KOH (1 M)	105	60	45 µl HCl (1 M)	79; 59; 74; 84; 70; 79

Wie der Tabelle 6.2.4. zu entnehmen ist, konnten die besten Spaltungsausbeuten erreicht werden, wenn KOH (1 M) eingesetzt wurde und die Reaktionsmischung nach der Inkubationszeit mit HCl (1 M) abgestoppt wurde. Es ist jedoch an dieser Stelle schon deutlich erkennbar, daß die Spaltungsausbeute bereits bei Versuchen aus Lösung vergleichsweise großen Schwankungen unterlag. Dennoch wurde versucht, die der Esterspaltung vorgeschaltete Extraktionsmethode zu optimieren. Das Vorgehen bei dieser Untersuchung ist im Schema 6.3. dargestellt.

Tab. 6.2.6.: Untersuchte Extraktionsbedingungen.

Extraktionsmittel	pH-Wert
Essigsäureethylester	1-11
Diethylether	9-11
Chloroform	9-11
n-Hexan/Aceton 50:1 (v/v) [Kochak und Honc, 1984]	9-11

Die besten Ausbeuten (Extraktion in Verbindung mit Hydrolyse) ergaben sich bei der Verwendung von Chloroform bei einem pH-Wert von 10. Bei vier innerhalb eines Tages durchgeführten Untersuchungen ergaben sich Spaltungsausbeuten zwischen 64 und 93% ($76 \pm 14\%$). Aufgrund dieser hohen Variabilitäten bei Extraktion und Spaltung bereits aus wäßriger Lösung wurde auf die Durchführung weiterer Untersuchungen und Optimierungsversuche eines solchen indirekten Analysenverfahrens verzichtet.

Schema 6.3.

- ◆ 103 ng Baclofenbutylester × HCl in 250 µl H₂O
- ◆ + 2000 µl Merck-Fertigpuffer (s. Tab. 6.2.5.)
- ◆ + 2×2500 µl Extraktionsmittel (s. Tab. 6.2.5.)
- ◆ Vortexen
- ◆ Zentrifugieren (10 min, 0°C, 4000 U×min⁻¹)
- ◆ Abnehmen von 2×2000 µl der organischen Phase (Vollpipette)
- ◆ Abziehen im Vakuum
- ◆ + 100 µl Toluol (zum Herunterspülen des an der Glaswand haftenden Wirkstoffs)
- ◆ Abziehen im Vakuum
- ◆ + 55 ml KOH (1 M)
- ◆ Vortexen
- ◆ Spaltung, für 60 min bei 105°C
- ◆ + 45 µl HCl (1 M)
- ◆ + 89 ng Cl-Phe (in 20 µl H₂O)
- ◆ Zentrifugieren (10 min, 0°C, 4000 U×min⁻¹) zum Abscheiden von Salzen
- ◆ weiter nach der Analysenvorschrift zur Bestimmung von Baclofen (s. Abschnitt 6.4.5.)

6.2.9. Ex-vivo/In-vitro-Untersuchungen zur Stabilität der Baclofenester-Derivate bei der Probengewinnung bzw. in Proben; Esterhydrolyse in Proben

Zur Untersuchung der Stabilitäten der Baclofenester-Derivate wurden Inkubationsversuche mit den verschiedenen relevanten Matrices der Ratte, bzw. im Fall von Liquor cerebrospinalis mit Material humanen Ursprungs (s. Abschnitt 6.2.7.) durchgeführt. Von allen Baclofenester-Derivaten und von der Muttersubstanz wurden wässrige Lösungen mit einer Konzentration von ca. 10 µg/ml hergestellt. Das Vorgehen bei dieser Untersuchung ist in Schema 6.4. zusammengefaßt.

Schema 6.4.

- ◆ 1000 ng Baclofenester-Derivat (in 100 µl H₂O) oder 100 µl H₂O oder 105 ng Bac (in 100 µl H₂O)
- ◆ Eindampfen zur Trockne im Vakuum (40°C)
- ◆ + 250 µl EDTA-Rattenblut oder EDTA-Humanblut oder Human-CSF oder H₂O oder 500 mg Rattenhirnhomogenat [1:1 (g/g), d.h. 250 mg Hirngewebe]
- ◆ Vortexen
- ◆ Inkubation bei 37°C im Wasserbad für 0,5; 1; 2; 4; 8; 12 und 24 h
- ◆ Stabilisierung entsprechend Abschnitt 6.2.3.
- ◆ Lagerung bis zur Analyse bei -18°C
- ◆ Probenvorbereitung und Analyse entsprechend Abschnitt 6.4.4.

Für keine der untersuchten Matrices war unter den oben angegebenen Bedingungen ein Nachweis von aus den Esterderivaten rückgespaltenem Baclofen [Nachweisgrenze (Blut) ≈ 30 ng/ml; Nachweisgrenze (Hirngewebe) ≈ 15 ng/g] möglich, während im Fall von Baclofen unter den gewählten Bedingungen selbst nach einer Inkubationsdauer von 24 h ein Nachweis möglich war.

Im weiteren Verlauf wurden 100 µl aufgearbeitetes Probenmaterial [methanolischer Überstand (Blut, CSF), methanolisches Eluat (Hirngewebe) oder Wasser; ca. 1/4-1/6 der ursprünglichen Probe] mit jeweils 100 µl KOH (1 M) versetzt und nach intensivem Mischen (Vortexen) 60 Minuten bei 105°C in verschlossenen Sovirel-Gläsern hydrolysiert und die

Hydrolyse zur Standardisierung anschließend mit 45 µl HCl (1 M) abgestoppt. Nach Zentrifugation zum Abscheiden von Salzen (10 min, 4000 min⁻¹, 0°C) wurden jeweils 100 µl des Überstands entsprechend Abschnitt 6.4.5. aufgearbeitet und analysiert. Hierbei konnte für alle Baclofenester-Derivate und für alle Matrices ein positiver qualitativer Nachweis für rückgespaltenes Baclofen geführt werden, während in den Baclofenester-freien Matrices kein entsprechendes Signal in den Chromatogrammen zu beobachten war. Eine exakte Quantifizierung konnte nicht durchgeführt werden, da trotz zahlreicher Versuche keine reproduzierbare Esterspaltung zu erreichen war (s. Abschnitt 6.2.8.2.).

6.3. Allgemeine Berechnungsverfahren; Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter

Alle angegebenen kinetischen Parameter aus den individuellen Konzentrations-Zeit-Profilen (i.v.- bzw. i.n.-Applikation von rac-TCP; i.v.-Applikation von rac-BAC) wurden über nicht-kompartimentelle Analyse erhalten. Die Berechnung der Daten erfolgte mit Hilfe der Computersoftware TOPFIT (Version 2.0) [Heinzel et al., 1994]. Die maximalen Blutkonzentrationen (C_{max}) sowie die dazugehörigen Zeitpunkte t_{max} konnten direkt aus den individuellen Blutkonzentrations-Zeit-Profilen bestimmt werden. Mit Hilfe einer logarithmisch-linearen Regression wurde aus den letzten drei Datenpunkten die terminale Geschwindigkeitskonstante λ_z ermittelt. Für die i.v.-Gaben wurde die Anfangskonzentrationen C_0 mit Hilfe des Abschälverfahrens aus den individuellen Blutkonzentrations-Zeit-Profilen berechnet. Die Umrechnung in die terminale Eliminationshalbwertszeit erfolgte nach folgender Formel (Gleichung 6.3.1.):

$$t_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z \quad (6.3.1)$$

Die Berechnung der Fläche unter der Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) erfolgte für den ansteigenden Kurventeil (i.n.-Gabe von TCP) nach der linearen, für den absteigenden Teil nach der logarithmischen Trapezregel. Nach i.v.-Applikation wurde dabei so vorgegangen, daß aus den beiden ersten Datenpunkten linear auf die Zeit $t = 0$ extrapoliert wurde (TOPFIT-Methode E3). Die Extrapolation bis Unendlich erfolgte auf Basis des letzten Datenpunktes (C_{last}) und der terminalen Geschwindigkeitskonstante λ_z (Gleichung 6.3.2.).

$$AUC_{t_{last} \rightarrow \infty} = C_{last} / \lambda_z \quad (6.3.2.)$$

Die mittlere Verweilzeit (mean residence time, MRT) wurde berechnet aus der AUMC (area under the first moment curve), d.h. der Fläche unter der Kurve des Produkts aus Blutkonzentration und Zeit (aufgetragen gegen die Zeit), und der AUC (Gleichung 6.3.3.):

$$MRT = AUMC / AUC \quad (6.3.3.)$$

Das Verteilungsvolumen im Steady-state (V_{ss}) nach i.v.-Gabe wurde nach Gleichung 6.3.4. berechnet.

$$V_{ss} = D \times AUMC / AUC^2 \quad (6.3.4.)$$

Im Gegensatz hierzu ergab sich das initiale Verteilungsvolumen (V_i) nach Gleichung 6.3.5., wobei als C_0 die Initialkonzentration nach i.v.-Bolusgabe (ermittelt über das Abschälverfahren) eingesetzt wird. Da als Dosis (D) immer die eingesetzte Dosis (bezogen auf 1 kg KG) zur Berechnung verwendet wurde, beziehen sich die erhaltenen initialen Verteilungsvolumina (V_i) ebenfalls jeweils auf 1 kg KG.

$$V_i = D/C_0 \quad (6.3.5.)$$

Die Clearance (CL) beschreibt das virtuelle Volumen (angegeben z.B. in ml), das pro Zeiteinheit (z.B. Minuten) von der betreffenden Substanz befreit wird. Die Berechnung erfolgte nach Gleichung 6.3.6.A. Für die nichtsystemische Applikation gilt Gleichung 6.3.6.B (F = Bioverfügbarkeit¹; s.u.).

$$CL = D/AUC \quad (6.3.6.A)$$

$$CL/F = D/AUC \quad (6.3.6.B)$$

Die absolute Bioverfügbarkeit (F) definiert den Anteil der Dosis, der den systemischen Kreislauf erreicht und beinhaltet den AUC-Vergleich bei Applikation über einen beliebigen nichtsystemischen Weg (hier: nasale Gabe, i.n.) und einer i.v.-Applikation. Für die nasale Applikation wurde die Bioverfügbarkeit nach Gleichung 6.3.7. berechnet.

$$F_{i.n.} = AUC_{0 \rightarrow \infty, i.n.} / AUC_{0 \rightarrow \infty, i.v.} \quad (6.3.7.)$$

Bei ungleicher Dosis erfolgt eine Dosiskorrektur nach Gleichung 6.3.8.

$$F_{i.n.} = (AUC_{i.n.} \times D_{i.v.}) / (AUC_{i.v.} \times D_{i.n.}) \quad (6.3.8.)$$

◆ Berechnung der Gewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten

Die Berechnung der individuellen CSF/Blut- bzw. Hirngewebe/Blut-Quotienten erfolgte durch Quotientenbildung der entsprechenden Konzentrationen in [ng/ml] bzw. [ng/g]² für einen Entnahmezeitpunkt von Blut und Gewebe und für ein Tier, nach Gleichung 6.3.9.A bzw. 6.3.9.B

$$\text{Gewebe/Blut-Quotient} = C[\text{Gewebe}] / C[\text{Blut}] \quad (6.3.9.A)$$

$$\text{CSF/Blut-Quotient} = C[\text{CSF}] / C[\text{Blut}] \quad (6.3.9.A)$$

◆ Berechnung der effektiven Permeabilitäten (aus Permeationsuntersuchungen an Caco-2-Monolayer)

Die Berechnung der effektiven Permeabilität, P_{eff} [$\text{cm} \times \text{min}^{-1}$] durch Caco-2-Monolayer wurde nach Gleichung 6.3.10. durchgeführt [Artursson et al., 1996].

$$P_{\text{eff}} = \frac{\frac{\delta C}{\delta t} \times V}{A \times C_0} \quad (6.3.10.)$$

In dieser Gleichung stellt $\delta C / \delta t$ die Änderung der Konzentration mit der Zeit auf der Akzeptorseite des Versuchssystems dar. V , in [cm^3], gibt das Probenvolumen der Akzeptorseite der Ussing-Kammer an, während A die zur Permeation zur Verfügung stehende Fläche in [cm^2] und C_0 die eingesetzte Wirkstoffkonzentration im Transportpuffer der Donorseite beschreibt.

◆ Berechnung der Absorptionsraten bzw. Absorptionsclearance aus Everted-sac-Untersuchungen [Mizuma et al., 1993]

¹ Bei systemischer Gabe beträgt die Bioverfügbarkeit per definitionem 1.

² Die Konzentrationsangaben der Gewebe beziehen sich immer auf die Masseneinheit Gewebe, nicht auf Gewebemolgenat.

Zur Bestimmung der Absorptionsrate, AR [$\text{ng} \times \text{min}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$], wurde aus den Einzelwerten die in Abhängigkeit von der Zeit transportierte Baclofenmenge nach Gleichung 6.3.11. bestimmt und jeweils auf ein Zentimeter Darmlänge bezogen. Die sich ergebende Steigung entspricht der Absorptionsrate AR.

$$\text{Absorptionsrate} = \frac{\delta \text{ Transportierte Wirkstoffmenge pro cm Darm}}{\delta \text{ Zeit}} \quad (6.3.11.)$$

Aus der Absorptionsrate läßt sich die Absorptionsclearance, AC [$\mu\text{l} \times \text{min}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$], nach Gleichung 6.3.12. bestimmen:

$$\text{Absorptionsclearance} = \frac{\text{Absorptionsrate}}{\text{Endkonzentration auf der Mucosaseite}} \quad (6.3.12.)$$

Die Berechnungen zur Statistik erfolgten mit der Software SigmaPlot® Scientific Graphing Software (Version 2.01) und einem Personal Computer (PC).

6.4. Analytischer Teil

6.4.1. Geräte

Festphasen-Extraktion: Die Analysenvorbereitung erfolgte für Kokain-haltige Proben sowie für die Baclofen-Gewebeproben mit Festphasen-Extraktionssäulen von Bakerbond speTM Octadecyl 3 ml (Firma J. T. Baker, Deventer, Holland) und dem Elutionsgestell Varian Vac Elut SPS 24 (Varian, Darmstadt, BRD). Im Rahmen der Probenvorbereitung wurden folgende weitere Geräte verwendet:

- ◆ Reax: REAX 2000 Vortexer; Firma Heidolph, Kehlheim, BRD
- ◆ Schüttler: SM; Firma E. Bühler, Tübingen, BRD
- ◆ Zentrifuge: Heraeus Minifuge GL; Firma Heraeus Christ, Hanau, BRD
- ◆ Entfernung von Lösungsmitteln: Speed Vac Concentrator 200 H; Firma Bachhofer; Reutlingen, BRD
- ◆ Heizblock: Tecam Heizblock; Firma Bachhofer; Reutlingen, BRD
- ◆ Analytische Waage: AT 261; Firma Mettler-Toledo AG, Greifensee, Schweiz
- ◆ Ultraschallbad: Sonorex RK 510 H; Firma Baudelin Elektronik, Berlin, BRD
- ◆ Wasseraufbereitung: Destamat Bi 18E; Firma Heraeus, Hanau, BRD
- ◆ pH-Meter: CG 825; Firma Schott, Mainz, BRD

GC-gekoppelte Massenspektroskopie (GC/MS): Hewlett Packard Gaschromatograph HP 5890 II (Kapillarsäule: Hewlett Packard HP-5 MS, 30 m, 0,25 mm ID; 0,25 μm Filmdicke), Massenspektrometer HP 5972 mit Massen-selektivem Detektor und automatischem Probengeber HP 7673 GC/SFC (Hewlett Packard, Waldbronn, BRD).

High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC): Pumpe: Jasco PU-980; Probenaufgabe: 100 μl Rheodyne-Einlaßventil (Rheodyne, Berkeley, USA) bzw. AS 4000/Merck Hitachi Autosampler mit 100 μl Probenschleife (Merck, Darmstadt, BRD); Detektion: für die Isoindolderivate (TCP, Baclofen) wurde ein Shimadzu RF-585

Fluoreszenzdetektor (Shimadzu, Kyoto, Japan) verwendet. Indometacin-Proben wurden mit Hilfe eines Jasco UV-975-Detektors (Jasco, Groß-Umstadt, BRD) analysiert.

Datensicherung und -auswertung: Die Datenaufzeichnung und -auswertung wurde für die GC/MS-Analysen mit Hilfe des Data Analysis Programm der HP ChemStation Software (Hewlett Packard, Waldbronn, BRD) bzw. im Fall der HPLC-Methoden mit der Chromatographie-Steuerungssoftware Borwin 2.1b (Jasco, Groß-Umstadt, BRD) und einem PC durchgeführt.

6.4.2. Chemikalien, Reagenzlösungen und Puffer für mobile Phasen

Als analytische Referenzsubstanzen wurden dieselben Wirkstoffe verwendet, die auch für die Zubereitung der verwendeten Wirkstofflösungen der In-vivo-, Ex-vivo/In-vitro- bzw. In-vitro-Untersuchungen dienen (s. Abschnitt 6.2.2.). Lagen die Substanzen in Salzform vor, erfolgte eine Berechnung der verabreichten Dosen auf den **freien Wirkstoff (Base)**¹, alle Konzentrationsangaben beziehen sich ebenfalls auf den Gehalt an **freiem Wirkstoff (Base)**. Ebenso wurden zu den Berechnungen aller abgeleiteten Größen jeweils die Konzentrationen an **freiem Wirkstoff (Base)** eingesetzt.

D-Amphetamin, das als innerer Standard (IS) für die TCP-Bestimmung verwendet wurde, sowie das für die Derivatisierung verwendete o-Phthaldialdehyd (OPA) wurden von der Firma Merck (Darmstadt, BRD) zur Verfügung gestellt bzw. bezogen. Der IS zur Bestimmung des Baclofen (R/S-Chlorphenylalanin), das zur Derivatisierung notwendige N-Acetyl-L-Cystein (NAC) wie auch die fertig zubereiteten Eichlösungen (deuteriert und undeuteriert) für die GC/MS-Bestimmung von Kokain und Benzoyllecgonin sowie das hierfür benötigte N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) und die als IS für die Bestimmung von Indometacin verwendete Nifluminsäure stammten von der Firma Aldrich (Steinheim, BRD). Für die Verwendung der o.a. Betäubungsmittel lag eine Umgangserlaubnis der Bundesopiumstelle für das Pharmakologische Institut für Naturwissenschaftler sowie für das Zentrum der Rechtsmedizin (beides Einrichtungen der J.W. Goethe-Universität, Frankfurt) vor.

Alle weiteren im Rahmen der Probenvorbereitung benutzten Chemikalien waren mindestens von p.a.-Qualität und wurden entweder von der Firma Aldrich (Steinheim, BRD) oder Merck (Darmstadt, BRD) bezogen. Alle verwendeten Lösungsmittel für die Herstellung der mobilen Phasen (HPLC) hatten HPLC-Qualität. Das für die GC/MS-Analysen verwendete Helium (GC/MS-Qualität) wurde von der Firma Messer Griesheim (Frankfurt am Main, BRD) bezogen.

Vorschrift zur Herstellung der verwendeten Pufferlösung zur Analyse von Kokain und BE [Röhrich et al., 1996]:

KH₂PO₄-Puffer (1/10 M; pH 6,0): 1/10 mol (= 13,61 g) Kaliumdihydrogenphosphat p.a. mit dest. H₂O auf 1000 ml auffüllen, einstellen auf pH 6,0 mit Phosphorsäure (85%).

Allgemeine Vorschriften zur Herstellung verwendeter Puffer- und Reagenzlösungen zur Analyse von TCP und Baclofen [Buck und Krummen, 1987; Wuis et al., 1987a; Hisaka et al., 1989; Spahn-Langguth et al., 1992]:

Na-Borat-Puffer (0,4 M Na-Borat-Puffer; pH 10):

A = 3,7 g Borsäure + 30 ml NaOH (1 M) + 150 ml H₂O

¹ s. Abschnitt 6.2.3.

B = NaOH (1 M)
59,6 Teile A + 40,4 Teile B.

OPA-Reagenz: 5 mg o-Phthaldialdehyd wurden in 250 µl EtOH gelöst und die Lösung mit 2,5 ml Na-Borat-Puffer (0,4 M) verdünnt. Das Reagenz wurde täglich frisch hergestellt und bis zur Verwendung lichtgeschützt aufbewahrt.

NAC-Reagenz: N-Acetyl-L-Cystein (20 mg) wurden in 2,5 ml Na-Borat-Puffer (0,4 M) gelöst.

Alkalische Methanol-Lösung: MeOH:NaOH (1 M) 10:1 (v/v)

KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer(1/15 M; pH 6,6):

A = 1/15 mol (= 9,07 g) Kaliumdihydrogenphosphat p.a. mit dest. H₂O auf 1000 ml auffüllen

B = 1/15 mol (= 11,87 g) Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.a. mit dest. H₂O auf 1000 ml auffüllen

65,3 Teile A + 34,7 Teile B.

Tab. 6.4.1.: Zusammensetzung der bei den HPLC-Analyseverfahren verwendeten mobilen Phasen.

Zu bestimmende Substanz	Mobile Phase
Tranylcypromin	1/15 M KH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ -Puffer:MeOH:THF (100:150:3,75; v/v/v)
Baclofen	1/15 M KH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ -Puffer:MeOH:THF (47,5:50:2,5; v/v/v)
Indometacin	Acetonitril:Wasser (4,5:5,5; v/v) + 0,5 ml Phosphorsäure (85%) pro 1000 ml Fließmittel

6.4.3. Quantifizierung von Kokain und Benzoylecgonin via GC/MS

6.4.3.1. Probenvorbereitung für die Bestimmung von Kokain und Benzoylecgonin [Herber et al., 1997]

- ◆ 1000 µl Blut oder 100 µl CSF oder 1000 mg Hirnhomogenat (1:1; g/g)
- ◆ + 6 ml 0,1 M KH₂PO₄-Puffer (pH 6,0)
- ◆ + IS (D₃-Benzoylecgonin, D₃-BE) in 50 µl H₂O (für Blut: 50 ng; CSF: 5,0 ng; Hirnhomogenat: 250 ng)
- ◆ Vortexen (30 s)
- ◆ Schütteln (10 min)
- ◆ Zentrifugieren (0°C; 5500 U×min⁻¹; 10 min)
- ◆ Festphasenextraktion (s. Tab. 6.4.2.)
- ◆ Abziehen des Lösungsmittels bei 60° C im Vakuum
- ◆ Derivatisieren mit 50 µl N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (70°C, 1 h)
- ◆ Überführung der Probe in Probengefäße für GC/MS

Tab. 6.4.2.: Festphasenextraktion zur Isolierung von Kokain und Benzoylecgonin aus verschiedenen biologischen Matrices der Ratte.

Extraktionsschritt	Durchführung	Flußgeschwindigkeit [$\text{ml} \times \text{min}^{-1}$]
1. Säulenkonditionierung	2×3 ml Methanol	1,0
	2×3 ml dest. Wasser	1,0
2. Probenaufgabe	2×3 ml Probe (s. Probenvorbereitung)	0,5
3. Säulenwäsche I	2×3 ml dest. Wasser	1,0
	2×3 ml dest. Wasser/ Methanol (80:20, v/v)	1,0
	1 ml Essigsäure (0,1 M)	1,0
4. Säulentrocknung	10 min Durchsaugen von Luft; Zentrifugieren (10 min; $5500 \text{ U} \times \text{min}^{-1}$; 0°C)	
5. Säulenwäsche II	1×3 ml CH_2Cl_2 /Aceton (1:1, v/v)	1,0
6. Elution	1×3 ml CH_2Cl_2 / 2-Propanol/Ammoniak (69:29:2, v/v/v)	0,5

6.4.3.2. Chromatographisches System für die Bestimmung von Kokain und Benzoylecgonin (GC/MS)¹

Im folgenden ist die verwendete Analysenmethode zusammengefaßt:

Stationäre Phase:	HP-5 MS (30 m Länge, 0,25 mm ID; 0,25 μm Filmdicke)
Trägergas:	Helium, $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$, 21 kPa
Injektortemperatur:	250°C
Ofen-Programm:	2 min bei 60°C (isotherm) Anstieg um $40^\circ\text{C} \times \text{min}^{-1}$ auf 170°C Anstieg um $8^\circ\text{C} \times \text{min}^{-1}$ auf 270°C 20 min isotherm bei 270°C
Transferline-Temperatur:	280°C
Ionisierungs-Energie (EI):	70 eV

Tab. 6.4.3: Zur Identifizierung und Quantifizierung des Kokains und Benzoylecgonins verwendete Ionen (TMS = Trimethylsilyl-Derivate der entsprechenden Substanzen).

Untersuchte Substanz	m/z	Retentionszeit [min]
D_3 -Benzoylecgonin-TMS (IS)	85 (Target), 243, 364	14,7
Kokain-TMS	82, 182 (Target), 303	14,0
Benzoylecgonin-TMS	82 (Target), 240, 361	14,8

Die Messung erfolgte im Selected Ion-Modus (SIM), die Bestimmung erfolgte anhand der in Tabelle 6.4.3. aufgeführten Ionen ($\text{Dwell Time} \times \text{Ion}^{-1} = 30 \text{ ms}$). Die Quantifizierung basiert auf

¹ Die GC/MS-Analysen wurden von Herrn Dr. J. Röhrich (Zentrum der Rechtsmedizin; Universitätsklinikum Frankfurt/Main) nach einem von ihm publizierten Verfahren [Röhrich et al., 1996] durchgeführt.

den Peakflächenverhältnissen der Targetionen bezogen auf den IS. Die relativen Peak-Intensitäten von Qualifier-Ionen wurden zur automatischen Peakerkennung herangezogen. Gleichmaßen wurde die Retentionszeit bei der Peakerkennung berücksichtigt. Als Retentionszeit-Referenz diente der IS.

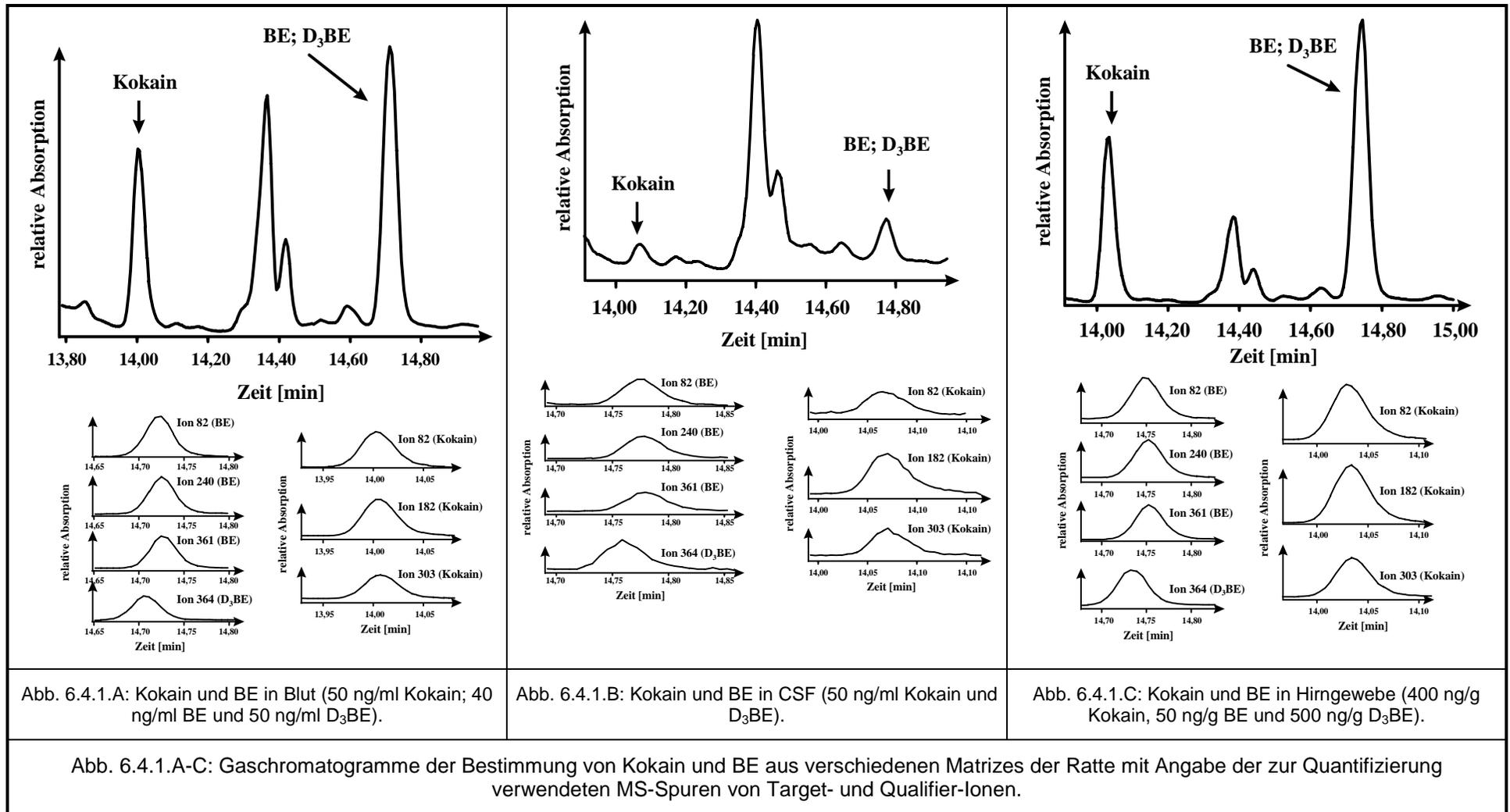
In Voruntersuchungen war nachgewiesen worden, daß in keiner der untersuchten Matrices (Rattenblut, -CSF, -Hirngewebe) endogene Bestandteile mit den Analyten Kokain und BE interferierten. Die Spezifität wurde hierbei über die Retentionszeit im Gaschromatogramm sowie über die Masse des Moleküls und das Fragmentierungsschema im Massenspektroskop abgesichert. In Abbildung 6.4.1.A-C sind typische Gaschromatogramme einschließlich der zur Quantifizierung verwendeten MS-Spuren der Target- und Qualifier-Ionen für alle untersuchten Matrices abgebildet.

Zur Kalibrierung wurden mit den zu untersuchenden Substanzen versetzte Leerproben, jeweils 1 ml Blut oder 100 µl Humanliquor¹ oder 1000 mg Hirnhomogenat [(1:1, g/g); stabilisierte Matrices; s. Abschnitt 6.2.3.] verwendet. Es wurde eine Dreipunkt-Kalibrierung mit jeweiliger Doppelbestimmung durchgeführt. In Tabelle 6.4.4. sind die untersuchten linearen Konzentrationsbereiche für Kokain und BE in den verschiedenen Matrices der Ratte sowie die jeweils zugesetzten Mengen des inneren Standards (D₃BE) angegeben. Für die Bestimmung von Kokain lagen die Kalibrierungskonzentrationen oberhalb der möglichen Nachweisgrenze. Diese beträgt für Kokain und auch für BE 1 ng des Wirkstoffs auf der GC-Säule, d.h. bei Verwendung von 1 ml bzw. 1 g Probenmaterial ergibt sich eine Nachweisgrenze von 1ng/ml bzw. 1ng/g. Da im Fall der Cerebrospinalflüssigkeit jeweils nur 100 µl Probenvolumen zur Verfügung standen, verschlechterte sich für diese Matrix die Nachweisgrenze auf 10 ng/ml. Im Fall der Quantifizierung von BE wurden Liquorkonzentrationen nachgewiesen, die unterhalb der Nachweisgrenze von 10 ng/ml lagen. Die Ergebnisse der im Rahmen der Methodenentwicklung durchgeführten Vorstudienvalidierung sind in der zugrunde liegenden Publikation angegeben [Röhrich et al., 1996].

Tab. 6.4.4.: Kalibrierbereich von Kokain und BE in verschiedenen Matrices der Ratte.

Matrix	Kokain			BE			IS (D ₃ -BE)
	[ng/ml bzw. ng/g]						
Vollblut (i.p., i.n.)	10	50	200	5	40	200	50
Vollblut (i.v.)	25	100	500	5	40	200	50
CSF (i.p., i.n.)	10	50	200	--	--	--	50
CSF (i.v.)	25	100	500	--	--	--	50
Hirngewebe (i.p., i.n.)	200	400	1000	10	50	200	500
Hirngewebe (i.v.)	400	800	2000	10	50	200	500

¹ Zur Herkunft s. Abschnitt 6.2.7.



6.4.4. Analytische Methode zur Quantifizierung von Tranlycypromin

6.4.4.1. Probenvorbereitung für die Tranlycypromin-Bestimmung

Blut, CSF und Hirngewebehomogenat als Probenmaterial:

- ◆ 100 µl oder 500 µl Blut¹ oder 100 µl CSF oder 100 mg Hirngewebe als Hirngewebehomogenat²
- ◆ + IS (D-Amphetamin): 42 ng in 40 µl H₂O (Blut)
21 ng in 20 µl H₂O (CSF)
8,4 ng in 40 µl H₂O (Hirngewebehomogenat)
- ◆ + 4 ml Fertigpuffer pH 11 (Merck, Darmstadt, BRD)
- ◆ + 2×4 ml Ether/Ethanol (200:3, v/v)
- ◆ Schütteln bei RT (10 min, Lichtausschluß)
- ◆ Zentrifugieren (10 min, 0°C, 4000 U×min⁻¹)
- ◆ Abnehmen der organische Phase
- ◆ + 20 µl wäßrige Ascorbinsäurelösung (18 g Ascorbinsäure×l⁻¹; 0,1 M)
- ◆ Eindampfen der vereinigten organischen Phasen im Vakuum
- ◆ + 50 µl alkalisches Methanol [MeOH:NaOH (1 N) 10:1, v/v]
- ◆ + jeweils 50 µl OPA- und NAC-Reagenz (s. Abschnitt 6.4.2.)
- ◆ Injektion von 100 µl
- ◆ Erstellen der Kalibrierfunktionen durch Auftragen der **Höhenverhältnisse** zwischen Substanz und innerem Standard gegen die eingespikete Konzentration.

Puffermedium als Probenmaterial³:

- ◆ 50 µl Puffermedium
- ◆ + IS (D-Amphetamin): 510 ng in 250 µl H₂O
- ◆ + 250 µl Methanol
- ◆ Vortexen für 30 Sekunden
- ◆ Zentrifugieren (10 min, 0°C, 4000 U×min⁻¹)
- ◆ Entnahme von 90 µl
- ◆ + 50 µl alkalisches Methanol [MeOH:NaOH (1 N) 10:1, v/v]
- ◆ + jeweils 50 µl OPA- und NAC-Reagenz
- ◆ Injektion von 100 µl
- ◆ Erstellen der Kalibrierfunktionen durch Auftragen der **Höhenverhältnisse** zwischen Substanz und innerem Standard gegen die eingespikete Konzentration.

¹ Zur Analyse der Proben aus den individuellen Konzentrations-Zeit-Profilen wurde ein Blutvolumen von 100 µl eingesetzt.

² Um für alle Gehirnareale ein gleiches Probevolumen zu erhalten, wurde die wäßrige Phase auf ein Volumen von 1 ml mit destilliertem Wasser ergänzt.

³ Aus den Permeationsuntersuchungen durch Caco-2-Monolayer-Zellschichten, zur Zusammensetzung des Puffermediums s. Abschnitt 6.2.2.

6.4.4.2. Chromatographisches System

Stationäre Phase:	Vorsäule:	LiChrocart C ₈ -Vorsäulenkartuschen, 5 µm (Merck, Darmstadt, BRD)
	Hauptsäule:	Zorbax C ₈ ; 5 µm; 250×4,6 mm ID (Firma Bischoff, Leonberg, BRD)
Mobile Phase:		s. Tab. 6.4.1.
Fluß:		0,65 ml×min ⁻¹
Fluoreszenzdetektion	Exzitation:	345 nm
	Emission:	443 nm

6.4.5. Analytische Methode zur Quantifizierung von Baclofen

6.4.5.1. Probenvorbereitung für die Baclofen-Bestimmung¹

Blut und CSF:

- ◆ 100 µl Blut oder 100 µl CSF
- ◆ + IS (R/S- 25 ng in 50 µl H₂O Chlorphenylalanin):
- ◆ + 750 µl MeOH (Blut) oder 100 µl MeOH (CSF)
- ◆ Vortexen für 30 Sekunden
- ◆ 10 min zentrifugieren (0°C, 4000 U×min⁻¹)
- ◆ 90 µl entnehmen
- ◆ + 50 µl alkalisches Methanol [MeOH:NaOH (1 N) 10:1, v/v]
- ◆ + jeweils 50 µl OPA- und NAC-Reagenz
- ◆ 100 µl injizieren
- ◆ Erstellen der Kalibrierfunktionen durch Auftragen der **Höhenverhältnisse** zwischen Substanz und innerem Standard gegen die eingespikte Konzentration.

Hirngewebehomogenat:

- ◆ 1000 mg Hirngewebehomogenat (= 500 mg Hirngewebe)
- ◆ + IS (R/S-Chlorphenyl- 8,8 ng in 35 µl H₂O alanin):
- ◆ + 1 ml H₂O
- ◆ Vortexen für 30 Sekunden
- ◆ 10 min zentrifugieren (0°C, 4000 U×min⁻¹)
- ◆ Festphasenextraktion des Überstands (s. Tab. 6.4.5.)
- ◆ 90 µl entnehmen
- ◆ + 50 µl alkalisches Methanol [MeOH:NaOH (1 N) 10:1, v/v]
- ◆ + jeweils 50 µl OPA- und NAC-Reagenz
- ◆ 100 µl injizieren
- ◆ Erstellen der Kalibrierfunktionen durch Auftragen der **Höhenverhältnisse** zwischen Substanz und innerem Standard gegen die eingespikte Konzentration.

¹ Im Fall der wässrigen Matrix aus den Untersuchungen zur Ev-vivo/In-vitro-Stabilität der Baclofenester-Derivate (s. Abschnitt 6.2.9.) konnte auf eine Aufarbeitung verzichtet und 100 µl der Probe direkt zur Derivatisierung mit OPA/NAC eingesetzt werden.

Tab. 6.4.5.: Festphasenextraktion zur Isolierung von Baclofen aus dem Hirngewebehomogenat der Ratte.

Extraktionsschritt	Durchführung	Flußgeschwindigkeit [ml×min ⁻¹]
Säulenkonditionierung	3×3 ml Methanol	1,0
	2×3 ml Wasser	1,0
Probenaufgabe	1×1,5 ml Zentrifugenüberstand	0,5
Säulenwäsche I	1 ml Wasser	1,0
	3 ml Wasser	1,0
Säulentrocknung	10 min Durchsaugen von Luft; zentrifugieren (10 min; 5500 U×min ⁻¹ ; 0°C)	
Säulenwäsche II	1×0,25 ml Methanol	1,0
Elution	1×0,5 ml Methanol	0,5

Puffermedium¹:

- ◆ 100 µl Puffer
- ◆ + 100 µl MeOH
- ◆ Vortexen für 30 Sekunden
- ◆ Zentrifugieren (10 min, 0°C, 4000 U×min⁻¹)
- ◆ Entnahme von 50 µl
- ◆ + 50 µl alkalisches Methanol [MeOH:NaOH (1 N) 10:1, v/v]
- ◆ + jeweils 50 µl OPA- und NAC-Reagenz
- ◆ Injektion von 100 µl
- ◆ Erstellen der Kalibrierfunktionen durch Auftragen der **Peakflächen** der Substanz gegen die eingespikte Konzentration.

6.4.5.2. Chromatographisches System für Baclofen

Stationäre Phase	Vorsäule:	LiChrocart C ₈ -Vorsäulenkartuschen, 5 µm (Merck, Darmstadt, BRD)
	Hauptsäule:	Zorbax C ₈ ; 5 µm; 250×4,6 mm ID (Firma Bischoff, Leonberg, BRD)
Mobile Phase:		s. Tab. 6.4.1.
Fluß:		0,50 ml×min ⁻¹
Fluoreszenzdetektion	Exzitation:	345 nm
	Emission:	443 nm

6.4.5.3. Methodvalidierung bei Tranlycypromin und Baclofen

Die Validierung für eine bioanalytische Methode erfolgt häufig auf Basis der Arbeit von Karnes et al. [1991] in Verbindung des Konferenzreport „Analytical Methods Validation“ [Shah et al., 1992]. Die hierbei für TCP und Baclofen erhaltenen Daten sind im folgenden dargestellt.

¹ Aus everted-sac-Untersuchungen; zur Zusammensetzung des Puffermediums s. Abschnitt 6.2.2.

◆ **Retentionszeiten, Selektivität und Auflösung [Aced und Möckel, 1991]:**

In Tabelle 6.4.6.A sind die Retentionszeiten und die auf die Totzeit (t_0) normierten Retentionszeiten (k_n) der zur Detektion verwendeten Isoindolderivate von TCP, Baclofen und den jeweilig verwendeten inneren Standards angegeben. Die Berechnung von k_n erfolgte nach Gleichung 6.4.1.; t_n stellt hierbei die Retentionszeit der Substanz n dar.

$$k_n = (t_n - t_0) / t_0 \quad (6.4.1.)$$

Tab. 6.4.6.A: Mittlere Retentionszeiten und Kapazitätsfaktoren (k_n) bei der Bestimmung von TCP und Baclofen ($n = 4$).

Substanz	Totzeit (t_0) [min]	t_n [min]	k_n
D-Amphetamin (IS)	2,5 ± 0,2	20,5 ± 0,4	7,1 ± 0,1
(-)-TCP		23,2 ± 0,4	8,2 ± 0,2
(+)-TCP		24,9 ± 0,4	8,8 ± 0,1
Baclofen	1,9 ± 0,1	10,7 ± 0,2	4,6 ± 0,1
1. Enantiomer des Cl-Phe		17,6 ± 0,1	8,2 ± 0,1
2. Enantiomer des Cl-Phe (IS)		20,0 ± 0,1	9,5 ± 0,0

Das Verhältnis zweier Netto-retentionszeiten (k_n -Werte) wird als Selektivität α des Trennsystems bezüglich der Komponenten n und n+1 bezeichnet (Gleichung 6.4.2.):

$$\alpha = k_{n+1} / k_n \quad (6.4.2.)$$

Hierbei soll n+1 die Komponente mit der größeren Retention sein. Dies impliziert ein größeres α , je weiter die Peaks von n+1 und n auseinander liegen, d.h. je besser die Trennung ist. Die Trennung zweier Komponenten wird jedoch nicht nur vom Peakabstand, sondern auch von der Peakbreite beeinflusst. Der kombinierte Einfluß dieser beiden Parameter wird im Begriff der Auflösung (Res) zusammengefaßt (Gleichung 6.4.3.).

$$Res = 2 \times \Delta t / (w_n + w_{n+1}) \quad (6.4.3.)$$

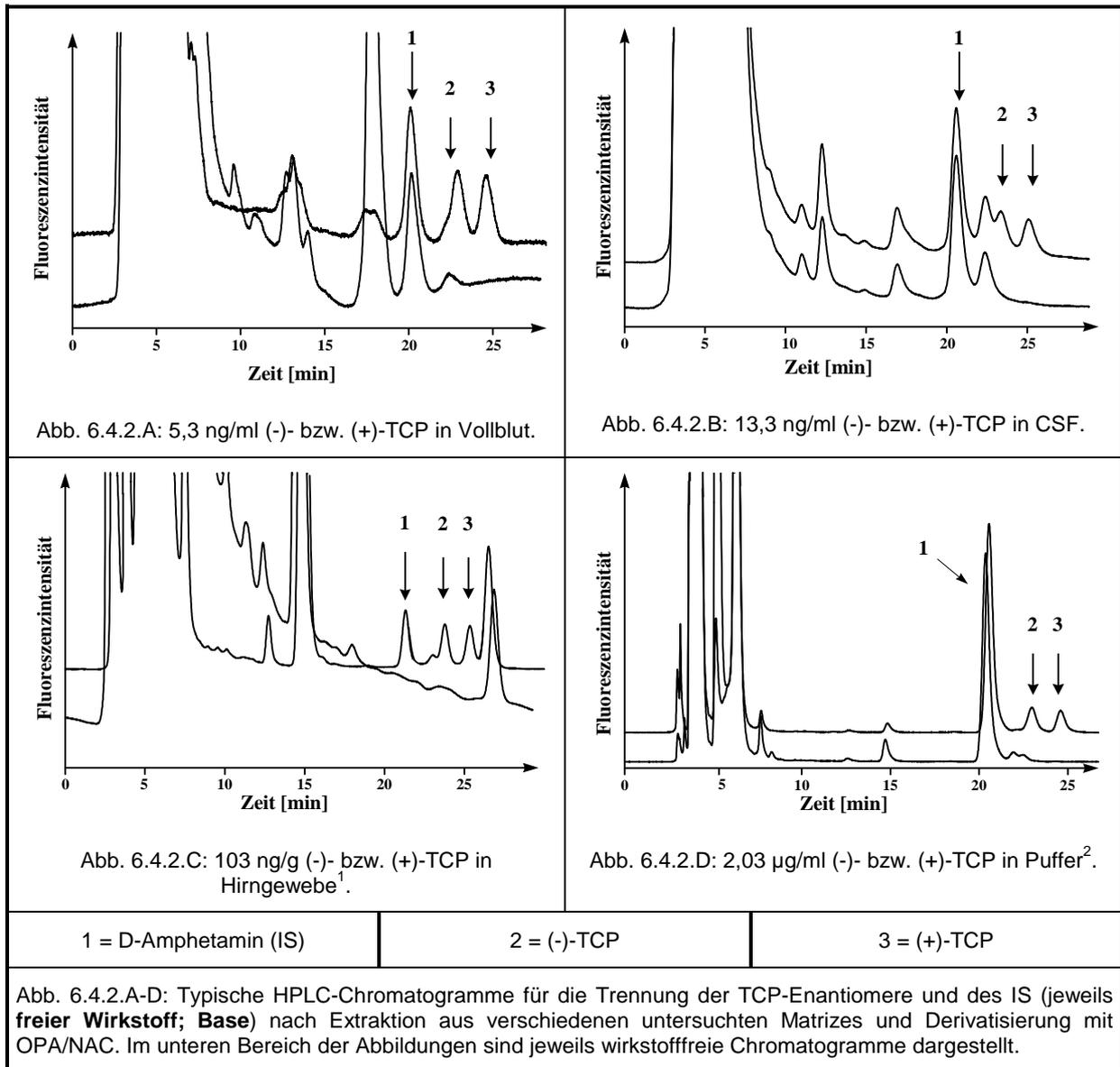
Hierbei beschreibt w die Basisbreite [min] des jeweils betrachteten Peaks, während Δt den Abstand der entsprechenden Peakmaxima [min] beschreibt.

Tab. 6.4.6.B: Mittlere Selektivität (α) und Auflösung (Res) bei der Bestimmung von TCP und Baclofen ($n = 4$).

Substanz	Selektivität (α)	Auflösung (Res)
(+)-TCP/(-)-TCP	1,08 ± 0,01	1,38 ± 0,13
2. Enantiomer des Cl-Phe (IS)/1. Enantiomer des Cl-Phe	1,15 ± 0,01	2,27 ± 0,16

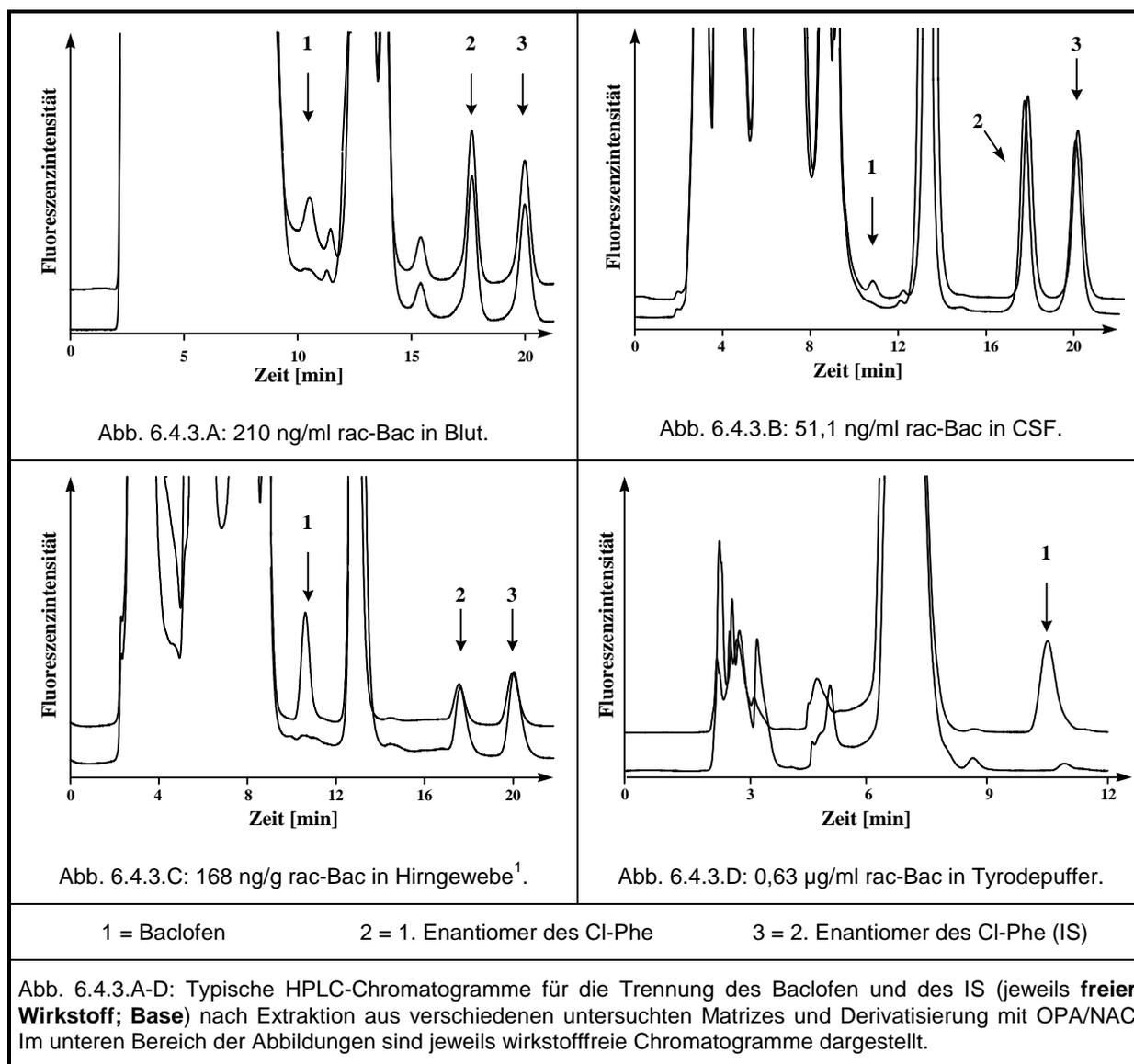
Die Abbildungen 6.4.2.A-D bzw. 6.4.3.A-D geben repräsentative Chromatogramme zur Bestimmung von TCP und Baclofen aus verschiedenen Matrices wieder.

Aufgrund der geringen Menge an zur Verfügung stehender CSF-Leermatrix von Ratten wurden alle Untersuchungen zu Validierungsparametern mit Human-CSF durchgeführt (Prof. Dr. Dirksen-Kauerz, Klinik für Neurochirurgie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel). Zuvor war durch Vergleich mit Ratten-Leermatrix sichergestellt worden, daß bei der entsprechenden Matrix unter den verwendeten chromatographischen Bedingungen keine Unterschiede zwischen den Spezies Ratte und Mensch erkennbar waren.



¹ bezogen auf die Masseneinheit Hirngewebe, nicht auf Hirngewebehomogenat.

² zur Zusammensetzung s. Abschnitt 8.2.2.



◆ Linearität:

Die Linearität wurde über den relevanten Konzentrationsbereich mit Hilfe gespikter Proben von Rattenblut und -hirnhomogenat, Human-CSF sowie Puffer nachgewiesen. In Tabelle 6.4.7. sind die hierbei verwendeten Konzentrationspunkte für alle Matrices angegeben. Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf Konzentration an **freiem Wirkstoff**. Die angegebenen Hirngewebekonzentrationen beziehen sich in allen Fällen auf die angegebene Masseneinheit an Hirngewebe, nicht auf daraus hergestelltes Hirngewebehomogenat. Die Kalibrierfunktionen wurden durch Auftragen der **Höhenverhältnisse** zwischen Substanz und innerem Standard gegen die eingespikte Konzentration gewonnen. Einzige Ausnahme ist die Erstellung der Kalibrierfunktion für die Quantifizierung von rac-Baclofen aus Puffer, bei der eine direkte Korrelation zwischen der **Peakfläche** des Detektorsignals und der eingespikten Konzentration erfolgte, da kein IS verwendet wurde.

Alle Kalibrierfunktionen für TCP wurden nach der Geradengleichung $y = mx + b$ ohne Einbeziehung des Nullpunktes mit einer Wichtung $1/C$ berechnet. Die Kalibrierfunktionen für Baclofen wurden mit der entsprechenden Geradengleichung ohne Berücksichtigung des Nullpunktes und ohne Wichtung erhalten. Als Nachweis der Linearität gilt außer dem

¹ bezogen auf die Masseneinheit Hirngewebe, nicht auf Hirngewebehomogenat.

Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden auch die Steigung der partiellen Regressionsgeraden, die nicht mehr als 5% von der Steigung der gesamten Regressionsgeraden abweichen sollte. In Tabelle 6.4.8. sind die sich ergebenden Geradengleichungen für die untersuchten Substanzen angegeben. In allen Fällen, in denen die Kalibrierfunktion fünf oder mehr Datenpunkte beinhaltet wurden die partiellen Regressionsgeraden zusätzlich angegeben. Exemplarische Kalibrierfunktionen sind im Anhang (Abschnitt 9.5.) dargestellt.

Tab. 6.4.7.: Verwendete Kalibrierkonzentrationen¹ für die Erstellung der Kalibrierfunktionen bei TCP und Baclofen.

	Vollblut [ng/ml]	CSF [ng/ml]	Hirngewebe [ng/g]	Puffer ² [µg/ml]
(-)- bzw. (+)-TCP	5,3	13,3	103	1,01
	13,3	26,6	310	2,03
	26,6	53,1	1030	4,05
	53,1	133		6,08
	103			8,10
	207			12,2
	531			20,3
rac-Baclofen	68,1	5,1	84	0,63
	136	10,2	168	1,26
	340	25,5	336	2,10
	681	51,1		3,14
	1360	102		
	3400	255		

◆ Bestimmungsgrenzen; Nachweisgrenzen bei der Bestimmung von TCP und Baclofen

Während als Bestimmungsgrenze der niedrigste eingespikte Wert der Kalibrierfunktion definiert ist (s. Tabelle 6.4.7.), versteht man unter der Nachweisgrenze die Konzentration, die ein Detektorsignal hervorruft, welches größer ist als das Dreifache des „Grundrauschens“ im Leerwert. Die ermittelten Nachweisgrenzen sind in Tabelle 6.4.9. angegeben.

Tab. 6.4.9.: Nachweisgrenzen in den verschiedenen Matrices.

	Blut [ng/ml]	CSF [ng/ml]	Hirngewebe [ng/g] ³
(-)- bzw. (+)-TCP	2	5	25
rac-Baclofen	30	3	15

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden auch solche Konzentrationswerte mit in die weitergehenden Berechnungen aufgenommen, die zwischen der Bestimmungs- und Nachweisgrenze lagen, wenn die Analysenserie und die Chromatographie eine entsprechende gute Qualität aufwiesen.

¹ Alle Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentration an „freiem“ Wirkstoff (Base).

² Zur Zusammensetzung siehe Abschnitt 8.2.2.

³ bezogen auf die Masseneinheit Hirngewebe, nicht auf Hirngewebehomogenat.

Tab. 6.4.8.: Linearität: Korrelationskoeffizient (r), Steigung (m), Achsenabschnitt (b) bei der Bestimmung von TCP und Baclofen.

Substanz	Blut				CSF				Hirngewebe				Puffer ¹			
	Bereich [ng/ml]	r	m	b	Bereich [ng/ml]	r	m	b	Bereich [ng/g]	r	m	b	Bereich [µg/ml]	r	m	b
(-)-TCP	5,3-53,1 ± 0,0010	0,9984 ± 0,0037	0,0659 ± 0,139	0,125 ± 0,139									1,01-6,08 ± 0,0001	0,9998 ± 0,0001	0,0496 ± 0,0042	0,033 ± 0,020
	53,1-531 ± 0,0007	0,9990 ± 0,0007	0,0672 ± 0,0043	0,201 ± 0,154									6,08-20,3 ± 0,0005	0,9991 ± 0,0005	0,532 ± 0,0037	0,028 ± 0,028
	5,3-531 ± 0,0003	0,9993 ± 0,0003	0,0688 ± 0,0038	0,129 ± 0,050	13,3-133 ± 0,0006	0,9994 ± 0,0019	0,0217 ± 0,0019	0,059 ± 0,052	103-1030 ± 0,0002	0,9996 ± 0,0002	0,0646 ± 0,0032	-0,039 ± 0,053	1,01-20,3 ± 0,0003	0,9995 ± 0,0003	0,0530 ± 0,024	0,031 ± 0,023
(+) -TCP	5,3-53,1 ± 0,0004	0,9992 ± 0,0004	0,0609 ± 0,0038	0,086 ± 0,053									1,01-6,08 ± 0,0005	0,9992 ± 0,0005	0,0510 ± 0,0050	0,011 ± 0,013
	53,1-531 ± 0,0007	0,9989 ± 0,0007	0,0638 ± 0,0029	0,098 ± 0,021									6,08-20,3 ± 0,0005	0,9993 ± 0,0005	0,0498 ± 0,0023	0,009 ± 0,012
	5,3-531 ± 0,0008	0,9990 ± 0,0008	0,0634 ± 0,0034	0,092 ± 0,018	13,3-133 ± 0,0002	0,9996 ± 0,0018	0,0232 ± 0,0018	0,010 ± 0,007	103-1030 ± 0,0003	0,9995 ± 0,0003	0,0633 ± 0,0028	-0,050 ± 0,042	1,01-20,3 ± 0,0003	0,9996 ± 0,0003	0,0509 ± 0,0025	0,013 ± 0,009
rac-Baclofen	68,1-340 ± 0,0008	0,9990 ± 0,0008	0,0015 ± 0,0001	0,012 ± 0,012	5,1-25,5 ± 0,0007	0,9981 ± 0,0007	0,0016 ± 0,0001	-0,002 ± 0,003								
	681-3400 ± 0,0008	0,9984 ± 0,0008	0,0015 ± 0,0001	0,003 ± 0,010	51,1-255 ± 0,0010	0,9978 ± 0,0010	0,0016 ± 0,0001	-0,001 ± 0,003								
	68,1-3400 ± 0,0005	0,9992 ± 0,0005	0,0015 ± 0,0001	0,008 ± 0,006	5,1-255 ± 0,0009	0,9990 ± 0,0009	0,0016 ± 0,0002	-0,002 ± 0,003	84-336 ± 0,0004	0,9990 ± 0,0004	0,0122 ± 0,0014	-0,091 ± 0,0037	0,63-3,14 ± 0,0001	0,9998 ± 0,0001	962 ± 49	3293 ± 617

¹ zur Zusammensetzung s. Abschnitt 8.2.2.

◆ **Präzision:**

Daten zur Wiederholpräzision (intra-day reproducibility) und zur Vergleichspräzision (inter-day reproducibility) sind in Tab. 6.4.10.A-B angegeben.

Tab. 6.4.10A: Wiederholpräzision (intra-day reproducibility) für TCP und Baclofen bei allen untersuchten Matrices (n = 2).

Substanz	Vollblut			CSF			Hirngewebe			Puffer ¹		
	Konz. [ng/ml]	RSD [%]	RE [%]	Konz. [ng/ml]	RSD [%]	RE [%]	Konz. [ng/g] ¹	RSD [%]	RE [%]	Konz. [µg/ml]	RSD [%]	RE [%]
(-)-TCP	13,3	6,5	-3,8	13,3	4,0	-8,1	310	1,8	-1,9	2,03	3,7	-3,7
	53,1	2,2	-1,1	53,1	1,0	-3,6				6,08	1,0	-1,9
	206,5	0,5	-1,2							12,15	1,7	-2,4
(+)TCP	13,3	2,7	1,5	13,3	4,1	5,3	310	5,4	-4,0	2,03	5,5	5,7
	53,1	2,5	-0,3	53,1	1,5	1,9				6,08	2,1	1,1
	206,5	3,0	-1,6							12,15	2,6	-1,3
rac-Bac	136	6,5	-2,2	10,2	7,7	2,2	168	4,1	2,4	1,26	7,7	3,0
	1361	2,3	1,8	102	4,2	4,7				3,14	4,2	-4,7

Tab. 6.4.10.B: Vergleichspräzision (inter-day reproducibility) für TCP und Baclofen bei allen untersuchten Matrices (n = 2-4).

Substanz	Vollblut			CSF			Hirngewebe			Puffer ²		
	Konz. [ng/ml]	RSD [%]	RE [%]	Konz. [ng/ml]	RSD [%]	RE [%]	Konz. [ng/g] ³	RSD [%]	RE [%]	Konz. [µg/ml]	RSD [%]	RE [%]
(-)-TCP	26,6	3,4	-6,8	13,3	7,7	-9,8	310	3,6	-5,4	1,01	1,1	7,6
	53,1	9,6	-0,9	53,1	6,2	0,3				6,08	2,4	1,0
	206,5	2,0	-2,2							12,15	1,9	-1,9
(+)TCP	13,3	2,8	0,5	13,3	5,3	6,8	310	6,4	-4,8	1,01	3,5	7,6
	53,1	3,0	-7,5	53,1	3,1	4,3				6,08	2,4	1,0
	206,5	0,9	-3,8							12,15	2,7	-0,5
rac-Bac	210	5,7	-2,1	10,2	7,8	-2,0	105	2,0	-2,4	1,26	1,4	5,2
	1677	0,2	-4,1	204	5,4	-5,9				2,10	4,7	4,0

◆ **Relative Wiederfindung bei der Bestimmung von TCP und Baclofen**

Unter der relativen Wiederfindung versteht man den nach Extraktion und Chromatographie im Vergleich zur nominellen Konzentration detektierbaren Anteil der Substanz. Zur Bestimmung der relativen Wiederfindung wurden die nach Aufarbeitung erhaltenen Peakhöhen bzw. -flächen mit den Peakhöhen bzw. -flächen einer Substanzlösung der Soll-Konzentration verglichen. In Tabelle 6.4.11. sind die abgeschätzten relativen Wiederfindungen für alle untersuchten Substanzen und alle Matrices angegeben.

Tab. 6.4.11: Relative Wiederfindung der verschiedenen Wirkstoffe in den untersuchten Matrices (n = 2).

Substanz	Relative Wiederfindung [%]			
	Blut	CSF	Hirngewebe	Puffer ¹
(-)-TCP	80	80	65	95
(+)-TCP	80	80	62	95
rac-Baclofen	85	85	60	95

¹ zur Zusammensetzung siehe Abschnitt 8.2.2.

² zur Zusammensetzung siehe Abschnitt 8.2.2.

³ bezogen auf die Masseneinheit Hirngewebe, nicht auf Hirngewebehomogenat.

◆ Probenstabilität bei der Bestimmung von TCP und Baclofen

Daten zur Stabilität von TCP und Baclofen in „üblichen“ Matizes (Blut, Puffer) und für Baclofen auch in CSF waren bereits von anderen Autoren erhoben worden [Spahn et al., 1988; Krauss, 1988; Spahn-Langguth et al., 1992; Weber-Gandke et al., 1993; Spahn-Langguth, unveröffentlichte Ergebnisse]. Lagerungsinstabilitäten oder Razemisierungsreaktionen konnten hierbei bei Lagerung bei -20 °C über Zeiträume von 12 Monaten nicht nachgewiesen werden. Auch in den Matizes Hirngewebe und Liquor konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen für TCP und Baclofen eine ausreichende Stabilität über mindestens vier Monate bei einer Lagerungstemperatur von -20 °C gezeigt werden, wobei im Hirngewebe im Fall des TCP eine Stabilisierung mit Ascorbinsäure notwendig war (s. Abschnitt 6.2.3.), deren Zusatz sich auch während der Aufarbeitung von Proben als wichtig erwiesen hatte [Spahn-Langguth, unveröffentlichte Ergebnisse].

◆ In-Prozeß-Kontrolle bei der Bestimmung von TCP und Baclofen

Alle bisher beschriebenen Parameter wurden im Rahmen der Vorstudienvalidierung erhoben und zeigten die Eignung der verwendeten Methoden für den quantitativen Nachweis der untersuchten Substanzen in den unterschiedlichen Matizes. Im Rahmen der In-Prozeß-Kontrolle wurde sichergestellt, daß die in der Vorstudienvalidierung erhobenen Bedingungen den im Meßverlauf herrschenden Bedingungen entsprechen und die Ergebnisse vergleichbar sind. Neben den Verumproben wurden in einem „Run“ (gemeinsam aufgearbeitete und quantifizierte Proben) auch Qualitätskontrollen (QKs) vermessen. In der Regel betrug die Anzahl der QKs 20% (jedoch mindestens zwei pro Run), wobei ein Run nur dann gewertet wurde, wenn mindestens 2/3 der über die Kalibrierfunktion rückkalkulierten QK-Konzentrationen den eingespikten Konzentrationen entsprachen. Als noch der Nominalkonzentration entsprechend galten Abweichungen von 15%; an der Bestimmungsgrenze wurden Abweichungen bis zu max. 20% akzeptiert.

Tab. 6.4.11: Verwendete Konzentrationen für QK-Proben.

Substanz	Vollblut [ng/ml]	CSF [ng/ml]	Hirngewebe [ng/g] ¹	Puffer [μ g/ml] ²
(-)-TCP	26,6	13,3	310	1,01
	53,1	53,1		6,08
	206,5			12,15
rac-Bac	210	10,2	105	1,26
	1677	204		2,10

¹ bezogen auf die Masseneinheit Hirngewebe, nicht auf Hirngewebehomogenat.

² zur Zusammensetzung siehe Abschnitt 8.2.2.

6.4.6. Analytische Methode zur Quantifizierung von Indometacin¹

6.4.6.1. Probenvorbereitung für die Indometacin-Bestimmung

- ◆ 100 µl Blut oder 100 µl CSF 100 mg Hirngewebe als Hirngewebehomogenat²
- ◆ + 20 µl HCl (1 M)
- ◆ + IS (Nifluminsäure): 0,5 µg in 50 µl H₂O (Blut, CSF) bzw. 0,1 µg in 50 µl H₂O (Hirngewebe)
- ◆ + 100 µl MeOH
- ◆ + 2,0 ml Dichlormethan
- ◆ Schütteln (10 min)
- ◆ Zentrifugieren (5 min, 4°C; 4000 U×min⁻¹)
- ◆ Verdampfen von 1,8 ml CH₂Cl₂ im Heizblock bei 30°C im N₂-Strom
- ◆ Rekonstitution des Rückstands in 75 µl mobiler Phase

6.4.6.2. Chromatographisches System für Indometacin

Stationäre Phase	Vorsäule:	Spherisorb RP C ₁₈ ; 5 µm (Merck, Darmstadt, BRD)
	Hauptsäule:	Waters Partisil RP C ₁₈ ; 5 µm; 120×4 mm ID (Waters, Eschborn, BRD)
Mobile Phase:		s. Tab. 6.4.1.
Fluß:		1,6 ml×min ⁻¹
UV-Detektion:		254 nm

6.4.6.3. Erhobene Validierungsparameter für Indometacin

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach einem von Streete [1989] publizierten Verfahren. Da alle Konzentrationsbestimmungen an einem Tag durchgeführt wurden, wurden nur für diese Bedingungen notwendige Validierungsparameter erhoben. Im folgenden sind die erhaltenen Validierungsparameter zusammengefaßt¹. Die Spezifität der analytischen Methode wurde für Blut und Hirnhomogenat durch Untersuchung von sechs unabhängigen Leermatrizes überprüft. Wie bei allen anderen bearbeiteten Substanzen wurde die Validierung sowie die Zubereitung der Kalibrier- und Qualitätskontrollproben für Liquor cerebrospinalis mit Humanliquor durchgeführt, nachdem bei einem Vergleich von entsprechenden Leerproben zwischen Material humanen Ursprungs und CSF der Ratte in keinem Fall interferierende Signale im Chromatogramm nachweisbar und auch ansonsten die Ergebnisse vergleichbar waren. Im Rahmen der Methodenentwicklung konnten weder Instabilitäten der Eichlösungen noch ein In-vitro-Abbau von Indometacin bzw. Nifluminsäure in den Matrizes beobachtet werden. Der lineare Bereich der Kalibrierfunktion wie auch die erreichten Nachweisgrenzen sind in Tabelle 6.4.12. angegeben. Die hier angegebenen Gewebekonzentrationen (in µg×g⁻¹) beziehen sich auf Gehirngewebe, nicht auf Gewebehomogenat. Die Erstellung der Eichgerade erfolgte über die erhaltenen **Flächenverhältnisse** zwischen Indometacin und IS gegen die jeweils zugegebene Konzentration an Indometacin.

¹ Die analytischen Arbeiten zum Indometacin wurden freundlicherweise von Herrn Dr. S. Döppenschmitt am Institut für Pharmazeutische Chemie (Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) durchgeführt.

² Um für alle Gehirnareale ein gleiches Probenvolumen zu erhalten, wurde jede Probe auf ein Volumen von 1 ml mit Wasser ergänzt, die Organsegmentgewichte aber bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigt.

Tab. 6.4.12: Kalibrierbereich für Indometacin in Blut, Liquor cerebrospinalis bzw. Hirngewebe der Ratte.

Matrix	Niedrigste Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] bzw. [$\mu\text{g/g}$]	Höchste Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] bzw. [$\mu\text{g/g}$]	Nachweisgrenze [$\mu\text{g/ml}$] bzw. [$\mu\text{g/g}$]
Blut	0,70	20,0	0,25
CSF	0,25	5,0	0,15
Hirngewebe ¹	0,20	4,0	0,07

¹ Konzentrationsangaben bezogen auf die Masseneinheit Hirngewebe, nicht auf Hirngewebehomogenat.

7. Zusammenfassung

Die Beeinflussung der Arzneistoffmengen bzw. Dosisfraktionen, die in das Zentralnervensystem gelangen, ist seit langer Zeit Thema von Forschungsprojekten. Dabei spielt sowohl die Erhöhung der Aufnahme in das ZNS als auch deren Reduktion eine Rolle, da man vielfach durch eine Selektivität der Verteilung in das ZNS die peripheren Nebenwirkungen ZNS-aktiver Substanzen reduzieren als auch bei peripher wirkenden Substanzen die zentralen Nebenwirkungen vermindern will. Die Blut-Hirn-Schranke, eine Permeationsbarriere, die sich sowohl morphologisch als auch in Bezug auf die Dichte von nach innen und nach außen gerichteten Transportern unterscheidet, ist ein spezifisches Charakteristikum dieses Kompartimentes. Die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke erfordert aufgrund der fehlenden Fenestrierung der Blutkapillaren bestimmte physikochemische Eigenschaften für den Fall, daß ein Arzneistoff durch passive Diffusion in das ZNS gelangen soll.

Generell ist bei passiver Permeation davon auszugehen, daß das Ausmaß der Aufnahme mit der Lipophilie der Substanz korreliert. Die ZNS-Konzentration ist aber z.B. auch abhängig von der applizierten Dosis.

Vor einiger Zeit hat man bei Ratten festgestellt, daß bei Nasalapplikation nicht nur der First-pass-Effekt deutlich niedriger ist als bei peroraler Gabe, es wurde auch gefunden, daß die Selektivität des Transportes in das ZNS erhöht ist. Bei ersten orientierenden Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe, die mit Tranlylcypromin durchgeführt worden waren, resultierten bei Nasalapplikation ausgesprochen hohe ZNS-Konzentrationen sowie stärkere Nebenwirkungen als bei intravenöser Gabe.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Aspekte der Permeation in das ZNS, des Einflusses physikochemischer Charakteristika sowie des Applikationsweges untersucht werden. **Ziele** waren es,

- **anhand von ausgewählten Substanzen mit unterschiedlicher Struktur und Lipophilie die Abhängigkeit des Ausmaßes der Verteilung in das ZNS (Hirngewebe, Cerebrospinalflüssigkeit=CSF) zu bestätigen,**

Dazu wurden pharmakokinetische Untersuchungen an der Ratte durchgeführt, bei denen das Spasmolytikum Baclofen als sehr wenig ZNS-gängige Substanz, die ZNS-gängigen und ZNS-aktiven Substanzen Kokain und Tranlylcypromin sowie das antiinflammatorisch wirksame und auch in der Therapie des Morbus Alzheimer eingesetzte Indometacin in der Regel intraperitoneal appliziert wurden und bei der Ratte in Blut und ZNS quantifiziert wurden. Der Gewebe/Blut-Quotient diente als Maß für die ZNS-Selektivität der Verteilung. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde für jede der Verbindungen ein Analysenverfahren für Blut und Hirngewebe entweder neu entwickelt oder etabliert.

- **zu untersuchen, ob die ZNS-Selektivität bei Applikation auf die Nasalmukosa erhöht ist, ob dabei eine Abhängigkeit von der Lipophilie der jeweils untersuchten Verbindung besteht und ob bei dem sehr gut in das ZNS permeierenden Tranlylcypromin und dem weniger gut permeierenden Indometacin Lipophilie-spezifische oder Applikations-spezifische Unterschiede im Verteilungsmuster in den verschiedenen Hirnsegmenten auffindbar sind,**

Aufgrund des limitierten auf die Nasalmukosa applizierbaren Volumens musste im Falle des schwerlöslichen Baclofens zu diesem Zweck zunächst eine geeignete Formulierung hergestellt werden, bevor die tierexperimentellen Studien durchgeführt werden konnten.

- **ausgehend von dem hydrophilen und schlecht ZNS-gängigen Baclofen potentielle Ester-Prodrugs zu synthetisieren und zu charakterisieren, die im ZNS Baclofen freisetzen – und vielleicht eine Alternative zu intrathekal appliziertem Baclofen darstellen – sollten, und**

Die Baclofen-Ester sollten aus Baclofen in reiner Form hergestellt werden. Zudem war neben der chemischen auch eine physikochemische Charakterisierung erforderlich. Für die Quantifizierung der Ester in biologischem Material war es notwendig, neue Bestimmungsmethoden zu entwickeln. Da die Probenmengen z.T. sehr gering waren und die Methode sensitiv sein sollte, wurden als Versuchsansätze Derivatisierungsmethoden mit chiralen Fluoreszenzmarkern ausgewählt.

- **bei zwei der Verbindungen (Baclofen als schlecht ZNS-gängige und Tranlycypromin als gut ZNS-gängige Substanz) an Permeationsmodellen die prinzipielle Membrangängigkeit (P_{eff} -Werte) und ihre Abhängigkeit von der Lipophilie zu untersuchen.**

Als Modellsystem wurde hier zunächst das für Permeationsuntersuchungen häufig eingesetzte Caco-2-Modell ausgewählt, von dessen Ergebnissen – obwohl es ein intestinales Modell ist - eine Extrapolation auf die Blut-Hirn-Schranke möglich ist. Es sollte auch untersucht werden, ob sich Hinweise auf aktive Transportprozesse ergeben.

Bioanalytische Verfahren:

Die Entwicklung bzw. Optimierung der Analysenverfahren für die Bestimmung der applizierten Substanzen bzw. ihrer Metaboliten resultierte in Analysenverfahren, die reproduzierbar und ausreichend sensitiv waren, um sowohl im Blut als auch im Gehirn und in den kleinvolumigen CSF-Proben zuverlässige Gehaltsbestimmungen durchzuführen. Es war bei der Gewinnung der Proben darauf Wert gelegt worden, daß potentielle Instabilitäten von jeweiliger Muttersubstanz oder von Metaboliten durch Stabilisierungsmaßnahmen ex vivo weitgehend verhindert wurden. In der Regel wurden HPLC-Verfahren eingesetzt, lediglich im Falle von Kokain und seinem Metaboliten Benzoyllecgonin wurde eine GC/MS-Methode verwendet. Im Falle des Baclofen gelang zwar die sensitive Bestimmung des Gesamtgehaltes, nicht aber diejenige der beiden Enantiomere. Baclofen-Ester waren mit chiralen Derivatisierungsreagenzien vom Typ der Säurechloride und Isocyanate prinzipiell gut derivatisierbar, die Derivatisierung mit o-Phthaldialdehyd/N-Acetylcystein gelang jedoch in keinem Fall. Insgesamt konnte für keinen der Ester auf Basis der angegebenen Reagenzien in einem angemessenen Zeitraum ein ausreichend sensitives und in der Routineanalytik zuverlässiges Bestimmungsverfahren entwickelt werden. Diese Problematik wurde Gegenstand eines anderen Projekts.

Kinetik und ZNS-Verteilung der Modellsubstanzen:

Neben den Verteilungsstudien waren für Tranlycypromin (TCP) und Baclofen pharmakokinetische Studien durchgeführt worden, die zum Ziel hatten, die kinetischen Basisparameter bei der Ratte zu ermitteln. Im Falle von Baclofen wurde ein mittleres initiales Verteilungsvolumen (V) von 1,5 l/kg, eine systemische Clearance (CL) von 10 ml/min und eine terminale Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 133 min berechnet. Die entsprechenden Parameter für (-)-TCP betragen 0,83 l/kg (V), 43 ml/min (CL) und 106 min ($t_{1/2}$), für (+)-TCP 0,76 l/kg (V), 31 ml/min (CL) und 137 min ($t_{1/2}$). Für TCP wurde zudem die systemische Verfügbarkeit nach nasaler Applikation mit 43 (-) und 66 % (+) bestimmt.

Alle Modellverbindungen waren im Hirngewebe nachweisbar. Die Hirngewebe/Blut-Quotienten, die ein Maß für die Organselektivität darstellen, betragen zum Zeitpunkt der Maximalkonzentration bei Baclofen 0,05-0,1; bei (-)-TCP 6-9; (+)-TCP 1-2; bei Kokain 9 und bei Indometacin 0,1-0,3. Ordnet man die Substanzen nach steigender Lipophilie so ergibt sich folgende Reihenfolge

Baclofen < Tranylcypromin < Kokain < Indometacin.

Somit differiert die Reihenfolge der Lipophilie von der der Gewebe/Blut-Quotienten, d.h., die In-vitro- von den In-vivo-Verteilungsquotienten, im Falle von Indometacin sehr stark. Berücksichtigt man allerdings noch die sehr hohe Plasmaproteinbindung von Indometacin – die der anderen Verbindungen ist vergleichsweise gering – so ergibt sich durch diese Korrektur eine wesentlich bessere Korrelation.

CSF-Konzentrationen waren generell niedrig, die maximalen CSF/Blut-Quotienten betragen bei Baclofen <0,05; (-)-TCP 0,5; (+)-TCP 0,5; Kokain 1,0; Indometacin 0,4.

Vergleich von intraperitonealer und nasaler Applikation – ZNS-Kinetik und Verteilung in die Hirnareale:

Die Hirngewebe/Blut-Quotienten, die ein Maß für die Organselektivität darstellen, betragen zum Zeitpunkt der Maximalkonzentration bei Baclofen 0,2; bei (-)-TCP 10-15; (+)-TCP 1-2; bei Kokain 18 und bei Indometacin 0,3-0,4.

CSF-Konzentrationen waren bei Nasalapplikation nur geringfügig anders als bei i.p.-Gabe, die maximalen CSF/Blut-Quotienten betragen bei Baclofen <0,05; (-)-TCP 0,7; (+)-TCP 0,7; Kokain 1,8; Indometacin 0,05.

Somit ergab sich bei Nasalapplikation für Kokain und TCP in der Regel eine signifikant höhere Gehirnselektivität und etwas bessere CSF-Verfügbarkeit, für Baclofen zwar eine etwas bessere Verfügbarkeit im Hirngewebe, jedoch keine erhöhte CSF-Selektivität. Unerwartet war auch der Befund, daß die CSF-Konzentration bei nasal appliziertem Indometacin geringer war als bei intraperitoneal appliziertem Indometacin.

Die Verteilung in die verschiedenen Hirnsegmente verlief im Falle von TCP sehr schnell, daß schon beim ersten Entnahmezeitpunkt (2 min nach i.n. Applikation) in allen untersuchten Hirnarealen signifikante Konzentrationen gefunden wurden. Die Tatsache, daß die Konzentrationen im Cortex am höchsten (Gewebe/Blut-Quotient 15) und im Bulbus olfactorius (Gewebe/Blut-Quotient 10) am geringsten waren, bestätigten nicht die ursprüngliche Hypothese einer direkten Aufnahme von der Nasalmucosa über den Riechnerv in das Gehirn. Weiteren, hier nicht beschriebenen Untersuchungen zufolge ist TCP kein Substrat für Multidrug-Transporter, so daß dieser Aspekt nicht in die Interpretation der Daten mit einbezogen werden muß.

Im Falle von Indometacin, von dem angenommen wurde, daß man aufgrund der langsameren Aufnahme in das ZNS eine bessere Diskriminierung zwischen den Arealen – bei gleicher relativer Verteilung – finden könnte, ergab sich ein völlig anderes Profil. Hier lagen die Gewebe/Blut-Quotienten bei i.n.-Gabe initial teilweise signifikant über denen der nach i.p.-Applikation. Nach i.n.-Gabe wurden signifikante Konzentrationen im Thalamus gefunden, während die Substanz bei i.p.-Gabe aufgrund der geringen Spiegel dort meist überhaupt nicht quantifizierbar war. Möglicherweise spielt in Bezug auf das intracerebrale Verteilungsmuster der Substanz die Tatsache eine Rolle, daß Indometacin Affinität zu Transportern (wie dem organischen Anionen-Transporter) besitzt.

Synthese von Estern als potentielle Baclofen-Prodrugs:

Die Herstellung der homologen Ester gelang in hohen Ausbeute und in reiner Form, so daß für die physikochemischen und kinetischen Untersuchungen ausreichend Material zur Verfügung stand.

Bei den In-vitro-Untersuchungen zur Stabilität in Puffer, Blut und Hirnhomogenat und auch bei den In-vivo-Untersuchungen wurde eine überraschend hohe Stabilität der Ester gefunden. Zudem waren die Ester in hydrophilen Medien nicht derivatisierbar (z.B. mit o-Phthaldialdehyd/N-Acetylcystein), lediglich eine Umsetzung in lipophilen Medien unter Verwendung von Säurechloriden und Isocyanaten war möglich. Daher wurde mithilfe des Molecular Modelling-Programmes MOMO eine Konformationsanalyse durchgeführt, die ergab, daß unter physiologischen Bedingungen - wahrscheinlich aufgrund der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Carbonylsauerstoff und Aminofunktion – bei den Estern eine stabile ringartige Struktur vorliegt.

Bei den Untersuchungen zur In-vivo-Stabilität der Baclofen-Ester-Derivate war nachweisbar, daß das Ausmaß der Esterspaltung sowohl von der Kettenlänge des beteiligten Alkohols als auch der Applikationsweise abhängig ist, während die Lipophilie eine eher untergeordnete Rolle spielt. Sowohl diese Ergebnisse, wie auch weitere Ex-vivo/in-vitro-Untersuchungen sprechen dafür, daß die Esterspaltung nicht im Blut oder Gehirn sondern wahrscheinlich in der Leber stattfindet.

Wie zu erwarten zeigte sich bei den Estern von Baclofen im Rahmen der Bestimmung der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten eine deutliche Abhängigkeit von der Kettenlänge.

Das Ausmaß der Baclofen-Entstehung war bei den Estern unerwartet gering. Zwar konnte in allen Meßkompartimenten Baclofen gefunden werden, allerdings war das Ausmaß zu gering, als daß man von einer ZNS-Vehikelfunktion der Prodrugs sprechen könnte.

Studien zum Membranpermeationsverhalten von Baclofen und Tranylcypromin:

In In-vitro-Untersuchungen zum TCP an Caco-2-Zellkulturen konnten die effektiven Permeabilitäten (P_{eff}) für beide Enantiomere bestimmt werden. Es zeigte sich, daß beide Stereoisomere vergleichbar rasch durch die Enterozyten-Monolayer permeieren. Wie erwartet überstieg die Permeabilität von TCP die von Baclofen deutlich. Es war möglich, die erhaltenen Daten in bestehende Korrelationen zwischen P_{eff} und Absorptionsverhalten einzufügen.

Die Untersuchungen ergaben im Falle von Tranylcypromin keinen Hinweis auf einen aktiven Transportprozess. Allerdings würde das Ausmaß des Permeabilitätsunterschiedes zwischen den Substanzen im Caco-2-Modell die Unterschiede in der ZNS-Verteilung nicht in ausreichendem Maße erklären.

Zudem wurden bei den für Baclofen durchgeführten Studien am Everted-sac-Modell – wie erwartet - Hinweise darauf gefunden, daß ein aktiver nach innen gerichteter Transport stattfindet.

Schlußfolgerung und Ausblick:

- Für die vier ausgewählten Modellsubstanzen konnte eine Korrelation von Lipophilie und ZNS-Verteilung dann eindeutig nachgewiesen werden, wenn – das war sehr wichtig für Indometacin – die Plasmaeiweißbindung in die Berechnungen mit einbezogen wurde.
- Die Nasalapplikation zeigte in Bezug auf die Erhöhung der ZNS-Selektivität in der Regel einen größeren Effekt beim Hirngewebe als bei der CSF.
- Ein allgemein valider spezieller Weg von der Nasenschleimhaut in das ZNS konnte bei den vorliegenden Untersuchungen trotz genauer Analyse verschiedener Hirnareale in Abhängigkeit von der Zeit nicht gefunden werden. Hier ist sicherlich zu berücksichtigen, daß bei bestimmten Substanzen auch aktive Transportprozesse für das Ausmaß und die Art der Kompartimentierung relevant sind.
- Die synthetisierten Baclofen-Ester zeigten eine hohe Stabilität in vitro und in vivo. Zudem waren sie in analytischen Studien vergleichsweise reaktionsträge, was möglicherweise auf intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung zurückzuführen ist. In Form der homologen Reihe von Baclofen-Estern steht eine Gruppe von Modellsubstanzen zur Verfügung, die unabhängig von ihrer Funktion als potentielle Prodrugs als Modellsubstanzen für Struktur-Kinetik-Beziehungen verwendet werden können.

8. Literaturverzeichnis

- Aboul-Enein H.Y. und Abou-Basha L.I.: Determination of tranlycypromine in urine and pharmaceutical formulation by HPLC using symmetry column. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*; 1996, 19: 925-932
- Aboul-Enein H.Y. und Serignese V.: Direct separation of tranlycypromine enantiomers and their profile in an atypical depressive patient. *Biomedical Chromatography*; 1995, 9: 98-101
- Aced G. und Möckel H.J.: *Liquidchromatographie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim; 1991
- Aggarwal S.K., Williams V., Levine S.R., Cassin B.J. und Garcia J.H.: Cocaine-associated intracranial hemorrhage: Absence of vasculitis in 14 cases. *Neurology*; 1996, 46: 1741-1743
- Ahn B.N., Kim S.K. und Shim C.K.: Proliposomes as an intranasal dosage form for the sustained delivery of propranolol. *Journal of Controlled Release*; 1995, 34: 203-210
- Aigner A., Wolf S. und Gassen H.G.: Transport and detoxication: Principles, approaches, and perspectives for research on the blood-brain barrier. *Angewandte Chemie - International Edition*; 1997, 36(1-2): 25-41
- Albertsson-Wikland K., Hedin L., Jansson P., Rosberg S. und Wikstrom C.: Intranasal delivery of human growth hormone: Optimization of formulation. *Drug Development Research*; 1995, 34: 353-360
- Ammon H.P.T.: *Phytotherapeutika in der Kneipp-Therapie*. *Therapiewoche*; 1989, 39: 117-127
- Anderson P., Noher H. und Swahn C.G.: Pharmacokinetics in baclofen overdose. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*; 1984, 22: 11-20
- Arbin A.: Three alkylation methods for the determination of indometacin in plasma by electron capture gas chromatography. *Journal of Chromatography*; 1977, 144: 85-92
- Ariens E.J.: Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *European Journal of Clinical Pharmacology*; 1984, 26(6): 663-668
- Artursson P. und Karlsson J.: Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications*; 1991, 175(3): 880-885
- Artursson P., Karlsson J. und Ocklind G.: Studying transport processes in absorptive epithelia. Enthalten in *Epithelial Cell Culture: A Practical Approach*. Editor: A.J. Shaw, Oxford University Press, New York, 1996
- Ashchi M., Wiedemann H.P. und James K.B.: Cardiac complication from use of cocaine and phenylephrine in nasal septoplasty. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*; 1995, 121: 681-684
- Avgerinos A., Karidas T. und Malamataris S.: Extractionless high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma and urine. *Journal of Chromatography*; 1993, 619: 324-329
- Avioli L.V.: Salmon calcitonin nasal spray - an effective alternative to estrogen therapy in select postmenopausal women. *Endocrine*; 1996, 5: 115-127
- Awaad Y. und Fish I.: Baclofen in the treatment of polymyoclonus in a patient with Unverricht-Lundborg disease. *Journal of Child Neurology*; 1995, 10(1): 68-70
- Bailey E. und Barron E.J.: Determination of tranlycypromine in human plasma and urine using high-resolution gas-liquid chromatography with nitrogen-sensitive detection. *Journal of Chromatography*; 1980, 183: 25-31
- Baker G.B. und Coutts R.T.: Metabolism of monoamine oxidase inhibitors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*; 1989, 13(3-4): 395-403
- Baker G.B., Coutts R.T. und Holt A.: Metabolism and chirality in psychopharmacology. *Biol Psychiatry*; 1994, 36: 211-213
- Baker G.B., Urichuk L.J., McKenna K.F. und Kennedy S.H.: Metabolism of monoamine oxidase inhibitors. *Cellular and Molecular Neurobiology*; 1999, 19: 411-426

- Baker G.B., Hampson D.R., Coutts R.T., Micetich R.G., Hall T.W. und Rao T.S.: Detection and quantitation of a ring-hydroxylated metabolite of the antidepressant drug tranylcypromine. *Journal of Neural Transmission*; 1986, 65: 233-243
- Baker G.B., Nazarali A.J. und Coutts R.T.: A rapid and sensitive procedure for the simultaneous analysis of beta-phenylethylamine and tranylcypromine in rat brain using trichloroacetylation and gas chromatography. *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology*; 1985, 49: 471-474
- Balerio G.N. und Rubio M.C.: Baclofen: Intestinal absorption mechanism in mice. *General Pharmacology*; 1996, 27: 1269-1271
- Baliková M. und Vecerková J.: High-performance liquid chromatographic confirmation of cocaine and benzoylecgonine in biological samples using photodiode-array detection after toxicological screening. *Journal of Chromatography B - Biomedical Applications*; 1994, 656: 267-273
- Bannwarth B., Netter P., Lopicque F., Pere P., Thomas P. und Gaucher A.: Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of indometacin in humans. Relationship to analgesic activity. *European Journal of Clinical Pharmacology*; 1990, 38: 343-346
- Barbieri E.J., Ferko A.P., DiGregorio G.J. und Ruch E.K.: The presence of cocaine and benzoylecgonine in rat cerebrospinal fluid after the intravenous administration of cocaine. *Life Sciences*; 1992, 51: 1739-1746
- Baselt R.C. und Cravey R.H.: Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Year Book Medical Publishers, Chicago; 1989
- Baselt R.C., Yoshikawa D., Chang J. und Li J.: Improved long-term stability of blood cocaine in evacuated collection tubes. *Journal of Forensic Sciences*; 1993, 38: 935-937
- Baumann P.A., Wicki P., Stierlin C. und Waldmeier P.C.: Investigations on GABA_B receptor-mediated autoinhibition of GABA release. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; 1990, 341(1-2): 88-93
- Beales P.E., Hawa M., Williams A.J.K., Albertini M.C., Giorgini A. und Pozzilli P.: Baclofen, a gamma-aminobutyric acid-B receptor agonist, delays diabetes onset in the non-obese diabetic mouse. *Acta Diabetologica*; 1995, 32: 53-56
- Beall P.T., Bond J., Cassidy J., Rosenzweig K. und Clarke F.H.: Active transport of baclofen, a GABA agonist, by rat jejunum. *Federation Proceedings*; 1985, 44(3): Abstract 199
- Bechgaard E., Gizurason S., Hjortkjaer und Hjortkjaer R.K.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic response after intranasal administration of diazepam to rabbits. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 1997, 49: 747-750
- Benders M.J., Dorrepaal C.A., van de Bor M. und van Bel F.: Acute effects of indometacin on cerebral hemodynamics and oxygenation. *Biology of the Neonate*; 1995, 68: 91-99
- Benuck M., Lajtha A. und Reith M.E.: Pharmacokinetics of systemically administered cocaine and locomotor stimulation in mice. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1987, 243: 144-149
- Bergquist C., Nillius S.J. und Wide L.: Intranasal gonadotropin-releasing hormone agonist as a contraceptive agent. *Lancet*; 1979, 2: 215-217
- Berlin I. und Lecrubier Y.: Food and drug interactions with monoamine oxidase inhibitors: How safe are the newer agents? *CNS Drugs*; 1996, 5: 403-413
- Billman G.E.: Cocaine: A review of its toxic actions on cardiac function. *Critical Reviews in Toxicology*; 1995, 25: 113-132
- Bjerre C., Bjork E. und Camber O.: Bioavailability of the sedative propiomazine after nasal administration in rats. *International Journal of Pharmaceutics*; 1996, 144: 217-224
- Boggio J.C., Valtorta S.E., Sanchez S. und McKellar Q.: Chronobiological variations of indomethacin pharmacokinetic parameters in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*; 2001, 24: 261-265
- Bonanno G., Gemignani A., Fedele E., Fontana G. und Raiteri M.: GABA_B receptors mediate inhibition of somatostatin release from cerebrocortex nerve terminals. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1991, 259(3): 1153-1157

- Bowery N., Hill D.R., Hudson A.L., Doble A., Middlemiss D.N.X., Shaw J und Turnbull M.: (-)-Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*; 1980, 283(5742): 92-94
- Bowyer J.F., Clausing P. und Newport G.D.: Determination of d-amphetamine in biological samples using high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid. *Journal of Chromatography B - Biomedical Applications*; 1995, 666: 241-250
- Braak H. und Braak E.: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*; 1991, 82(4): 239-259
- Breitner J.C., Gau B.A., Welsh K.A., Plassman B.L., McDonald W.M., Helms M.J. und Anthony J.C.: Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: Initial results of a co-twin control study. *Neurology*; 1994, 44: 227-232
- Browne S.P., Moore C.M., Scheurer J., Tebbett I.R. und Logan B.K.: A rapid method for the determination of cocaine in brain tissue. *Journal of Forensic Sciences*; 1991, 36(6): 1662-1665
- Bruce-Jones P.N., Crome P. und Kalra L.: Indometacin and cognitive function in healthy elderly volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*; 1994, 38(1): 45-51
- Brune K., Rainsford K.D. und Schweitzer A.: Biodistribution of mild analgetics. *British Journal of Clinical Pharmacology*; 1980, 10(Suppl 2): 279S-284S
- Buchbauer G.: Aromatherapie. *Deutsche Apotheker Zeitung*; 1996, 136: 21-26
- Büschges R., Aboul-Enein H., Martin E., Langguth P., Spahn-Langguth H.: Chiral derivatization with chromophor-based detection in the bioanalysis of chiral drugs and their metabolites. In: Aboul-Enein H, Wainer IW (Eds.) 'Stereochemistry in Drug Development and Use' John Wiley & Sons New York, 1997: 437-492
- Burbaud P., Wiart L., Dubos J.L., Gaujard E., Debelleix X., Joseph P.A., Mazaux J.M., Bioulac B., Barat M. und Laguëny A.: A randomised, double blind, placebo controlled trial of botulinum toxin in the treatment of spastic foot in hemiparetic patients. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*; 1996, 61: 265-269
- Calverley D.G., Baker G.B., Coutts R.T. und Dewhurst W.G.: A method for measurement of tranylcypromine in rat brain regions using gas chromatography with electron capture detection. *Biochemical Pharmacology*; 1981, 30: 861-867
- Carter A.C. und Shorr E.: The intranasal use of posterior pituitary powder in the treatment of diabetes insipidus: A reminder. *Journal of Clinical Endocrinology*; 1947, 7: 828-830
- Cejudo-Ferragud E., Nacher A., Polache A., Cercosfortea T., Merino M. und Casabo V.G.: Evidence of competitive inhibition for the intestinal absorption of baclofen by phenylalanine. *International Journal of Pharmaceutics*; 1996, 132: 63-69
- Cercos-Forte T., Polache A., Nacher A., Cejudo-Ferragud E., Casabo V.G. und Merino M.: Influence of leucine on intestinal baclofen absorption as a model compound of neutral alpha-aminoacids. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*; 1995, 16: 563-577
- Chang C.H., Yang D.S.C., Yoo C.S., Wang B.C., Pletcher J., Sax M. und Terrence C.F.: Structure and absolute configuration of (R)-baclofen monohydrochloride. *Acta Crystallographica*; 1982, B38: 2065-2067
- Chatterjee A. und Tosyali M.C.: Thrombocytopenia and delirium associated with tranylcypromine overdose. *Journal of Clinical Psychopharmacology*; 1995, 15: 143-144
- Chenevert R. und Desjardins M.: Chemoenzymatic enantioselective synthesis of baclofen. *Canadian Journal of Chemistry*; 1994, 72: 2312-2317
- Cheshire W.P.: Trigeminal neuralgia: A guide to drug choice. *CNS Drugs*; 1997, 7: 98-110
- Choay A. und Choay L.: Vingt ans de traitement du diabète insipide par prises nasales de poudre de lobe postérieur de hypophyse. *Presse Médicinale*; 1946, 54: 500-502
- Chow H.H., Anavy N. und Villalobos A.: Direct nose-brain transport of benzoylcegonine following intranasal administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2001, 90: 1729-1735
- Christians U., Jacobsen W., Benet L.Z. und Lampen A.: Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clinical Pharmacokinetics*; 2002, 41: 813-851

- Cicinelli E., Cignarelli M., Petruzzi D., Matteo M.G., Ruccia C. und Schonauer L.M.: Nasal spray vs oral administration of bromocriptine: Pharmacology and effect on serum prolactin in puerperal women. *Journal of Endocrinological Investigation*; 1996, 19: 427-432
- Cicinelli E., Nahoul K., Petruzzi D., Galantino P. und Santoro G.: Nasal spray administration of unmodified progesterone: Evaluation of progesterone serum levels with three different radioimmunoassay techniques. *Maturitas*; 1994, 19: 43-52
- Clauwaert K.M., Van Bocxlaer J.F., Lambert W.E. und De Leenheer A.P.: Analysis of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in urine by HPLC with diode array detection. *Analytical Chemistry*; 1996, 68: 3021-3028
- Cone E.J.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *Journal of Analytical Toxicology*; 1995, 19: 459-478
- Coutts R.T. und Baker G.B.: Implications of chirality and geometric isomerism in some psychoactive drugs and their metabolites. *Chirality*; 1989, 1: 99-120
- Craig P.N.: Cumulative subject index & drug compendium. Drayton C.J., editor, Pergamon Press Oxford, New York, Beijing, Frankfurt, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto, 1990
- Cremaschi D., Porta C. und Ghirardelli R.: The active transport of polypeptides in the rabbit nasal mucosa is supported by a specific vesicular transport inhibited by cytochalasin D. *Bba-Biomembranes*; 1996a, 1283: 101-105
- Cremaschi D., Porta C., Ghirardelli R., Manzoni C. und Caremi I.: Endocytosis inhibitors abolish the active transport of polypeptides in the mucosa of the nasal upper concha of the rabbit. *Bba-Biomembranes*; 1996b, 1280: 27-33
- Cremaschi D., Rossetti C., Draghetti M.T. und Manzoni C.X., Aliverti V.: Active transport of polypeptides in rabbit nasal mucosa: Possible role in the sampling of potential antigens. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*; 1991, 419(5): 425-432
- Crifasi J. und Long C.: The GCMS analysis of tranylcypromine (Parnate) in a suspected overdose. *Forensic Science International*; 1997, 86(1-2): 103-108
- Cruaud O., Benita S. und Benoit J.P.: The characterization and release kinetics evaluation of baclofen microspheres designed for intrathecal injection. *International Journal of Pharmacology*; 1999, 177: 247-257
- Dahlin M., Jansson B. und Bjork E.: Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2001, 14: 75-80
- Däppen R., Arm H. und Meyer V.R.: Applications and limitations of commercially available chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Chromatographic Reviews*; 1986, 201: 1-20
- Davis G.G. und Swalwell C.I.: The incidence of acute cocaine or methamphetamine intoxication in deaths due to ruptured cerebral (berry) aneurysms. *Journal of Forensic Sciences*; 1996, 41: 626-628
- De Camp W.H.: Chiral drugs: The FDA perspective on manufacturing and control. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*; 1993, 11(11-12): 1167-1172
- De Camp W.H.: The FDA perspective on the development of stereoisomers. *Chirality*; 1989, 1(1): 2-6
- de la Torre R., Domingo-Salvany A., Badia R., Gonzalez G., McFarlane D., San, L. und Torrens M.: Clinical evaluation of the triage analytic device for drugs-of-abuse testing. *Clinical Chemistry*; 1996, 42: 1433-1438
- De Lange E.C. und Danhof M.: Considerations in the use of cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target concentrations in the clinical setting: implications of the barriers between blood and brain. *Clinical Pharmacokinetics*; 2002, 41: 691-703.
- De Smet P.A. und Lipp F.J., Jr.: Supplementary data on ritual enemas and snuffs in the western hemisphere. *Journal of Ethnopharmacology*; 1987, 19: 327-331
- De Smet P.A. und Rivier L.: Intoxicating snuffs of the venezuelan Piaroa indians. *Journal of Psychoactive Drugs*; 1985, 17: 93-103
- De Smet P.A.: A multidisciplinary overview of intoxicating snuff rituals in the western hemisphere. *Journal of Ethnopharmacology*; 1985, 13: 3-49

- Degen P.H. und Riess W.: The determination of gamma-amino- β -(p-chlorophenyl) butyric acid (baclofen) in biological material by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*; 1976, 117: 399-405
- Deguchi Y., Inabe K., Tomiyasu K., Nozawa K., Yamada S. und Kimura R.: Study on brain interstitial fluid distribution and blood-brain barrier transport of baclofen in rats by microdialysis. *Pharmaceutical Research*; 1995, 12: 1838-1844
- DeSousa N.J., Beninger R.J., Jhamandas K. und Boegman R.J.: Stimulation of GABA_B receptors in the basal forebrain selectively impairs working memory of rats in the double Y-maze. *Brain Research*; 1994, 641(1): 29-38
- Devane C.L., Simpkins J.W., Miller R.L. und Braun S.B.: Tissue distribution of cocaine in the pregnant rat. *Life Sciences*; 1989, 45: 1271-1276
- Dondeti P., Zia H. und Needham T.E.: Bioadhesive and formulation parameters affecting nasal absorption. *International Journal of Pharmaceutics*; 1996, 127: 115-133
- Dondeti P., Zia H.S. und Needham T.E.: In-vivo evaluation of spray formulations of human insulin for nasal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*; 1995, 122: 91-105
- Donnelly A., Kellaway I.W., Farr S.J., Taylor G., Tudball N. und Gibson M.: The influence of lipophilicity upon the nasal absorption of a series of hexapeptides. *International Journal of Pharmaceutics*; 1996, 135: 191-197
- Doods H.N., Quirion R., Mihm G., Engel W., Rudolf K.X., Entzeroth M., Schiavi G.B., Ladinsky H., Bechtel W.D., Ensinger H.A. et al.: Therapeutic potential of CNS-active M₂ antagonists: Novel structures and pharmacology. *Life Sciences*; 1993, 52(5-6): 497-503
- Döppenschmitt S., Spahn-Langguth H., Regardh C.G. und Langguth P.: Radioligand-binding assay employing P-glycoprotein-overexpressing cells: Testing drug affinities to the secretory intestinal multidrug transporter. *Pharmaceutical Research*; 1998, 15: 1001-1006
- Dressnandt J., Weinzierl F.X., Tölle T.R., Konstanzer A. und Conrad B.: Acute overdose of intrathecal baclofen. *Journal of Neurology*; 1996, 243: 482-483
- Dunlap K.: Two types of gamma-aminobutyric acid receptor on embryonic sensory neurones. *British Journal of Pharmacology*; 1981, 74: 579-585
- Dyas A.M.: The chiral chromatographic separation of β -adrenoceptor blocking drugs. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*; 1992, 10(6): 383-404
- Dyrbusch M., Beck H. und Eger E.: Molecular Modelling Programm (MOMO). Software; (1.0), Institut für Organische Chemie, J. W. Goethe-Universität Frankfurt/Main, 1991
- Eckart W.: *Geschichte der Medizin*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; 1990
- Eglen R.M. und Watson N.: Selective muscarinic receptor agonists and antagonists. *Pharmacology & Toxicology*; 1996, 78(2): 59-68
- Eisenblätter T. und Galla H.J.: A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 2002, 293: 1273-1278.
- Elbert T. und Rockstroh B.: *Psychopharmakologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg; 1990
- Eriksson C., Busk L. und Brittebo E.B.: 3-aminobenzamide: Effects on cytochrome P450-dependent metabolism of chemicals and on the toxicity of dichlobenil in the olfactory mucosa. *Toxicology & Applied Pharmacology*; 1996, 136: 324-331
- Escobar J.I. und Karno M.: Chronic hallucinosis from nasal drops. *Journal of the American Medical Association*; 1982, 247: 1859-1860
- Escobar J.I., Schiele B.C. und Zimmermann R.: The tranlylcypromine isomers: A controlled clinical trial. *American Journal of Psychiatry*; 1974, 131(9): 1025-1026
- Estevez V.S., Ho B.T. und Englert L.F.: Inhibition of the metabolism of cocaine by SKF-525A. *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology*; 1977, 17(1): 179-182
- Evans S.M., Cone E.J. und Henningfield J.E.: Arterial and venous cocaine plasma concentrations in humans: relationship to route of administration, cardiovascular effects and subjective effects. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1996, 279(3): 1345-1356
- Fachinformation Baclofen-ratiopharm®; Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Aulendorf; 1995

- Fachinformation Indorektal[®]; Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Aulendorf; 1996
- Fachinformation Jatrosom[®]N; Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Aulendorf; 1994
- Fagervall I. und Ross S.B.: Inhibition of monoamine oxidase in monoaminergic neurones in the rat brain by irreversible inhibitors. *Biochemical Pharmacology*; 1986, 35: 1381-1387
- Falch E., Hedegaard A., Nielsen L., Jensen B.R. und Hjeds H.X., Krogsgaard-Larsen P.: Comparative stereostructure-activity studies on GABA_A and GABA_B receptor sites and GABA uptake using rat brain membrane preparations. *Journal of Neurochemistry*; 1986, 47(3): 898-903
- Fernandez P., Lafuente N., Bermejo A.M., Lopez-Rivadulla M. und Cruz A.: HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers. *Journal of Analytical Toxicology*; 1996, 20: 224-228
- Fischman M.W., Schuster C.R. und Hatano Y.: A comparison of the subjective and cardiovascular effects of cocaine and lidocaine in humans. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*; 1983, 18(1): 123-127
- Flanagan S.D., Takahashi L.H., Liu X. und Benet L.Z.: Contributions of saturable active secretion, passive transcellular, and paracellular diffusion to the overall transport of furosemide across adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2002, 91: 1169-1177
- Foti R., Martorana U. und Brogгинi M.: Long-term tolerability of nasal spray formulation of salmon calcitonin. *Current Therapeutic Research*; 1995, 56: 429-435
- Fowler J.S., Volkow N.D., Wang G.J., Gatley S.J. und Logan J.: [(11)]Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. *Nucl Med Biol*; 2001, 28: 561-572
- Fraser A.D., MacNeil W. und Isner A.F.: Toxicological analysis of a fatal baclofen (Iioresal) ingestion. *Journal of Forensic Sciences*; 1991, 36: 1596-1602
- Fredrikson S.: Nasal spray desmopressin treatment of bladder dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*; 1996, 94: 31-34
- Fromm G.H. und Terrence C.F.: Comparison of L-baclofen and racemic baclofen in trigeminal neuralgia. *Neurology*; 1987, 37(11): 1725-1728
- Fromm G.H.: Baclofen as an adjuvant analgesic. *Journal of Pain & Symptom Management*; 1994, 9: 500-509
- Fuentes J.A., Oleshansky M.A. und Neff N.H.: A sensitive enzymatic assay for dextro- or levotranlylcypromine in brain. *Biochemical Pharmacology*; 1975, 24: 1971-1973
- Fuentes J.A., Oleshansky M.A. und Neff N.H.: Comparison of the apparent antidepressant activity of (-)- and (+)-tranlylcypromine in an animal model. *Biochemical Pharmacology*; 1976, 25(7): 801-804
- Fuson R.C. und Wojcik B.H.: Ethoxyacetic acid and ethyl ethoxyacetate. *Organic Syntheses Collective Volume*; 1943, 2: 260-262
- Gernaat H.B.P.E., Haffmans P.F.J., Knegtering H. und Birkenhager T.K.: Tranlylcypromine in narcolepsy. *Pharmacopsychiatry*; 1995, 28: 98-100
- Ghosh M.K.: HPLC methods on drug analysis. Springer-Verlag; Heidelberg 1992
- Giralt M.T., Bonanno G. und Raiteri M.: GABA terminal autoreceptors in the pars compacta and in the pars reticulata of the rat substantia nigra are GABA_B. *European Journal of Pharmacology*; 1990, 175(2): 137-144
- Giri C.P. und Bhide S.V.: Metabolic studies on mechanism of urethan action: IV. Influence of urethan on nucleic acid metabolism in rapidly proliferating tissues in-vivo. *Journal of the National Cancer Institute*; 1969, 43: 1103-1107
- Gizurason S., Georgsson G., Aggerbeck H., Thorarinsdottir H. und Heron I.: Evaluation of local toxicity after repeated intranasal vaccination of guinea-pigs. *Toxicology*; 1996, 107: 61-68
- Glazer R.I.: Inhibition of the synthesis of nuclear RNA by urethan in regenerating liver. *Biochemical & Biophysical Research Communications*; 1973, 53: 780-786
- Görög S. und Gazdag M.: Enantiomeric derivatization for biomedical chromatography. *Journal of Chromatography B - Biomedical Applications*; 1994, 659: 51-84
- Grogan D.E., Lane M., Liebelt R.A. und Smith F.E.: The effect of partial hepatectomy on the metabolism of urethan in young adult mice. *Cancer Research*; 1970, 30: 1806-1811

- Gudmundsdottir H., Sigurjonsdottir J.F., Masson M., Fjalldal O., Stefansson E. und Loftsson T.: Intranasal administration of midazolam in a cyclodextrin based formulation: bioavailability and clinical evaluation in humans. *Pharmazie*; 2001, 56: 963-966
- Guelaud C., Similowski T., Bizec J.L., Cabane J., Whitelaw W.A. und Derenne J.P.: Baclofen therapy for chronic hiccup. *European Respiratory Journal*; 1995, 8: 235-237
- Haim D.Y., Lippmann M.L., Goldberg S.K. und Walkenstein M.D.: Pulmonary complications of crack cocaine: A comprehensive review. *Chest*; 1995, 107: 233-240
- Hampson D.R., Baker G.B. und Coutts R.T.: A comparison of the neurochemical properties of the stereoisomers of tranlycypromine in the central nervous system. *Cellular & Molecular Biology*; 1986, 32: 593-599
- Hardy M., Kirk-Smith M.D. und Stretch D.D.: Replacement of drug treatment for insomnia by ambient odour. *Lancet*; 1995, 346: 701
- Harrison P.M., Tonkin A.M. und McLean A.J.: Determination of 4-amino-3-(p-chlorophenyl)butyric acid (baclofen) in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*; 1985, 339: 424-428
- Hashigucci K., Ogawa H., Ishidate T., Yamashita R., Kamiya H., Watanabe K., Hattori N., Sato T., Suzuki Y., Nagamine T., et al.: Antibody responses in volunteers induced by nasal influenza vaccine combined with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit containing a trace amount of the holotoxin. *Vaccine*; 1996, 14: 113-119
- Hassel B., Brathe A. und Petersen D.: Cerebral dicarboxylate transport and metabolism studied with isotopically labelled fumarate, malate and malonate. *Journal of Neurochemistry*; 2002, 82: 410-419
- Havemann D.: Antiphlogistic drugs. Studies on the pharmacokinetics of anti-inflammatory agents. *Fortschritte der Medizin*; 1977, 95(3): 177-181
- He G.Q., Zhang A., Altura B.T. und Altura B.M.: Cocaine-induced cerebrovasospasm and its possible mechanism of action. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1994, 268: 1532-1539
- Heinzel G., Woloszczak R. und Thomann P.: TopFit: Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system for the PC. Software; (2.0.1.), Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart, 1994
- Helleberg I.: Determination of indometacin in serum and urine by electron-capture gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*; 1976, 117: 167-173
- Helleberg L.: Clinical Pharmacokinetics of indometacin. *Clinical Pharmacokinetics*; 1981, 6(4): 245-258
- Henriot S., Kuhn C., Kettler R. und Daprada M.: Lazabemide (Ro 19-6327), a reversible and highly sensitive MAO-B inhibitor: Preclinical and clinical findings. *Journal of Neural Transmission*; 1994, 41(Suppl): 321-325
- Henry J.L.: Effects of intravenously administered enantiomers of baclofen on functionally identified units in lumbar dorsal horn of the spinal cat. *Neuropharmacology*; 1982, 21(11): 1073-1083
- Herber B., Büschges R., Spahn-Langguth H.: Fluorescent carbazoles as chiral derivatizing agents in the analysis of drug enantiomer: Isocyanates deriving from carprofen and N-methylcarprofen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 1994, 2: 155
- Herber B., Hanses A., Röhrich J., Spahn-Langguth H., Kauert G. und Langguth P.: Anwendung einer Festphasenextraktionsmethode für pharmakologische und toxikologische Problemstellungen in komplexen biologischen Matrices. GTFCh-Symposium: Moderne Messverfahren im Rahmen der Toxikologisch-Forensischen Begutachtung; 1997, 226-231
- Herber B.: Derivate chiraler 2-Arylpropionsäuren in der enantiospezifischen Wirkstoffanalytik. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main; 1994
- Herdeis C. und Hubmann H.P.: Synthesis of homochiral R-baclofen from glutamic acid. *Tetrahedron: Asymmetry*; 1992, 3(9): 1213-1221
- Hill A.B., Bowley C.J., Nahrwold M.L., Knight P.R. und Kirsh M.M.X.D.: Intranasal administration of nitroglycerin. *Anesthesiology*; 1981, 54: 346-348
- Hill D.R. und Bowery N.G.: [³H]-baclofen and [³H]-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature*; 1981, 290: 149-152
- Hong Y. und Henry J.L.: Cardiovascular responses to intrathecal administration of L- and D-baclofen in the rat. *European Journal of Pharmacology*; 1991a, 192(1): 55-62

- Hong Y. und Henry J.L.: NMDA receptor antagonists block cardiovascular responses to intrathecal administration of D-baclofen in the rat. *European Journal of Pharmacology*; 1992, 216(2): 257-263
- Hong Y.G. und Henry J.L.: Effects of phaclofen and the enantiomers of baclofen on cardiovascular responses to intrathecal administration of L- and D-baclofen in the rat. *European Journal of Pharmacology*; 1991b, 196(3): 267-275
- Huang Z.L., Kagoshima M., Kagawa E. und Shimada H.: Absorption of indometacin from nasal cavity in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*; 1995, 16: 117-120
- Hucker H.B., Zacchei A.G., Cox S.V., Brodie D.A. und Cantwell N.H.R.: Studies on the absorption, distribution and excretion of indometacin in various species. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1966, 153(2): 237-249
- Hudson L.C., Hughes C.S., Boldfletcher N.O. und Vaden S.L.: Cerebrospinal fluid collection in rats: Modification of a previous technique. *Laboratory Animal Science*; 1994, 44: 358-361
- Hulinder B. und Ostman O.: Baclofen-a new agent used by addicts. *Lakartidningen*; 1987, 84: 3726
- Humbert H., Cabiac M.D., Dubray C. und Lavene D.: Human pharmacokinetics of dihydroergotamine administered by nasal spray. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*; 1996, 60: 265-275
- Hussain A.A., Hirai S. und Bawarshi R.: Nasal absorption of natural contraceptive steroids in rats-progesterone absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 1981, 70(4): 466-467
- Hussain A.A., Hirai S. und Bawarshi R.: Nasal absorption of propranolol in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 1979, 68(9): 1196
- Ibuka T., Schoenfelder A., Bildstein P. und Mann A.: An efficient synthesis of (\pm)-4-amino-3-(4-chlorophenyl)-butyric acid (baclofen). *Synthetic Communications*; 1995, 25(12): 1777-1782
- Illum L., Davis S.S., Pawula M., Fisher A.N., Barrett D.A., Farraj N.F. und Shaw P.N.: Nasal administration of morphine-6-glucuronide in sheep - a pharmacokinetic study. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*; 1996, 17: 717-724
- Illum L., Watts P., Fisher A.N., Hinchcliffe M., Norbury H., Jabbal-Gill I., Nankervis R. und Davis S.S.: Intranasal delivery of morphine. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 2002, 301: 391-400
- Iten P.X.: *Fahren unter Drogen- oder Medikamenteneinfluss*. Institut für Rechtsmedizin der Universität Zürich, Zürich; 1994
- Jatlow P.: Cocaine: Analysis, pharmacokinetics, and metabolic disposition. *Yale Journal of Biology & Medicine*; 1988, 61: 105-113
- Jensen K.M.: Determination of indometacin in serum by an extractive alkylation technique and gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*; 1978, 153: 195-202
- Joffe R.T.: Tranylcypromine in recurrent brief depression: Two case reports. *International Clinical Psychopharmacology*; 1996, 11: 287-288
- Johannsen P., Christensen J.E. und Mai J.: The prevalence of dementia in Down syndrome. *Dementia*; 1996, 7(4): 221-225
- Johnson B.R. und Kriel R.L.: Baclofen for chronic hiccups. *Pediatric Neurology*; 1996, 15: 66-67
- Jorgensen L. und Bechgaard E.: Intranasal permeation of thyrotropin-releasing hormone: In-vitro study of permeation and enzymatic degradation. *International Journal of Pharmaceutics*; 1994, 107: 231-237
- Julien R.M.: *Drogen und Psychopharmaka*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford; 1997
- Kambam J., Franks J.J., Mets B., Janicki P., Hickman R. und van der Watt M.: The effect of hepatectomy and plasma cholinesterase inhibition on cocaine metabolism and cardiovascular responses in pigs. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*; 1994, 124: 715-722
- Kambam J., Mets B., Hickman R., Janicki P., James M.F., Fuller B. und Kirsch R.E.: The effects of inhibition of plasma cholinesterase and hepatic microsomal enzyme activity on cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, and norcocaine blood levels in pigs. *Journal of Laboratory & Clinical Medicine*; 1992, 120(2): 323-328
- Karnes H.T., Shiu G. und Shah V.P.: Validation of bioanalytical methods. *Pharmaceutical Research*; 1991, 8(4): 421-426

- Kazemifard A.G. und Moore D.E.: Liquid chromatography with amperometric detection for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma. *Journal of Chromatography*; 1990, 533: 125-132
- Kochak G. und Honc F.: Improved gas-liquid chromatographic method for the determination of baclofen in plasma and urine. *Journal of Chromatography*; 1984, 310: 319-326
- Köhler G.: Distribution of non-steroidal anti-inflammatory agents in human tissues. *Fortschritte der Medizin*; 1982, 100(37): 1723-1727
- Komori T., Fujiwara R., Tanida M. und Nomura J.: Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. *European Neuropsychopharmacology*; 1995, 5: 477-480
- Kovar K.A., Gropper B., Friess D. und Ammon H.P.: Blood levels of 1,8-cineole and locomotor activity of mice after inhalation and oral administration of rosemary oil. *Planta Medica*; 1987, 53: 315-318
- Krauss D.: Untersuchungen zur Razemat- und Enantiomerenkinetik von Baclofen und seines Fluoranalogs. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main; 1988
- Kriel R.L., Krach L.E., Hoff D.S., Gormley M. und Jonessaete C.: Failure of absorption of baclofen after rectal administration. *Pediatric Neurology*; 1997, 16(4): 351-352
- Krugers-Dagneaux P.G., Loohuis C.P., Klein Elhorst J.T. und Van der Veer T.S.: Liquid chromatographic estimation of tranlycypromine in human plasma. *Pharmaceutisch Weekblad - Scientific Edition*; 1992, 14: 46-49
- Küster F.W. und Thiel A.: Organische Lösungsmittel; Eigenschaften und Trocknung. Rechentafeln für die chemische Analytik, 102 Auflage; 1982
- Lacroix J.S., Ricchetti A.P., Morel D., Mossimann B., Waeber B. und Grouzmann E.: Intranasal administration of neuropeptide Y in man: Systemic absorption and functional effects. *British Journal Pharmacology*; 1996, 118: 2079-2084
- Lal S., Shuaib A. und Ijaz S.: Baclofen is cytoprotective to cerebral ischemia in gerbils. *Neurochemical Research*; 1995, 20: 115-119
- Lalley P.M.: Biphasic effects of baclofen on phrenic motoneurons: Possible involvement of two types of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1983, 226(2): 616-624
- Landry D.W., Zhao K., Yang G.X., Glickman M. und Georgiadis T.M.: Antibody-catalyzed degradation of cocaine. *Science*; 1993, 259(5103): 1899-1901
- Langguth P. und Spahn-Langguth H.: Brain targeting of drugs: Better access to the CNS via the nasal mucosa? *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology Supplement*; 1995, 351: R48
- Langguth P., Möhrke W., Möhler H. und Spahn-Langguth H.: Drug absorption via intestinal vs. nasal mucosae: Dependence of rate and extent of systemic availability of tranlycypromine enantiomers upon the application site. 1998, in Vorbereitung
- Langlois N., Dahuron N. und Wang H.S.: Enantioselective syntheses of (R)-3-phenyl GABA, (R)-baclofen and 4-arylpyrrolidin-2-ones. *Tetrahedron*; 1996, 52: 15117-15126
- Larson J.L., Templin M.V., Wolf D.C., Jamison K.C., Leininger J.R., Mery S., Morgan K.T., Wong B.A., Conolly R.B. und Butterworth B.E.: A 90-day chloroform inhalation study in female and male B6C3F(1) mice: Implications for cancer risk assessment. *Fundamental and Applied Toxicology*; 1996, 30: 118-137
- Larsson P. und Tjalve H.: Intranasal instillation of aflatoxin B(1) in rats: bioactivation in the nasal mucosa and neuronal transport to the olfactory bulb. *Toxicological Science*; 2000, 55: 383-391
- Lau C.E. und Sun L.: The pharmacokinetic determinants of the frequency and pattern of intravenous cocaine self-administration in rats by pharmacokinetic modeling. *Drug Metabolism and Disposition*; 2002, 30: 254-261
- Lau C.E., Imam A., Ma F. und Falk J.L.: Acute effects of cocaine on spontaneous and discriminative motor functions: relation to route of administration and pharmacokinetics. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1991, 257: 444-456
- Laursen T., Grandjean B., Jorgensen J.O.L. und Christiansen J.S.: Bioavailability and bioactivity of three different doses of nasal growth hormone (GH) administered to GH-deficient patients: Comparison with intravenous and subcutaneous administration. *European Journal of Endocrinology*; 1996, 135: 309-315

- Leduc P.A. und Mittleman G.: Schizophrenia and psychostimulant abuse: A review and re-analysis of clinical evidence. *Psychopharmacology*; 1995, 121: 407-427
- Legarda J.J. und Gossop M.: A 24-h inpatient detoxification treatment for heroin addicts: A preliminary investigation. *Drug & Alcohol Dependence*; 1994, 35(2): 91-93
- Li L., Gorukanti S., Choi Y.M. und Kim K.H.: Rapid-onset intranasal delivery of anticonvulsants: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*; 2000, 199: 65-76
- Liebman M.: *Basiswissen Neuroanatomie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1993
- Lindhardt K., Olafsson D.R., Gizurarson S. und Bechgaard E.: Intranasal bioavailability of diazepam in sheep correlated to rabbit and man. *International Journal of Pharmaceutics*; 2002, 231: 67-72
- Liu X.Q., Ren Y.L., Qian Z.Y. und Wang G.J.: Enzyme kinetics and inhibition of nimodipine metabolism in human liver microsomes. *Acta Pharmaceutica Sinica*; 2000, 21: 690-694
- Maizels M., Scott B., Cohen W. und Chen W.: Intranasal lidocaine for treatment of migraine. *Journal of the American Medical Association*; 1996, 276: 319-321
- Malcangio M. und Bowery N.G.: Possible therapeutic application of GABA_B receptor agonists and antagonists. *Clinical Neuropharmacology*; 1995, 18: 285-305
- Malinovsky J.M., Servin F., Cozian A., Lepage J.Y. und Pinaud M.: Ketamine and norketamine plasma concentrations after iv, nasal and rectal administration in children. *British Journal of Anaesthesia*; 1996, 77: 203-207
- Mallinger A.G. und Smith E.: Pharmacokinetics of monoamine oxidase inhibitors. *Psychopharmacology Bulletin*; 1991, 27: 493-502
- Mallinger A.G., Edwards D.J., Himmelhoch J.M., Knopf S. und Ehler J.: Pharmacokinetics of tranlycypromine in patients who are depressed: Relationship to cardiovascular effects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*; 1986, 40: 444-450
- Mallinger A.G., Himmelhoch J.M., Thase M.E., Edwards D.J. und Knopf S.: Plasma tranlycypromine: Relationship to pharmacokinetic variables and clinical antidepressant actions. *Journal of Clinical Psychopharmacology*; 1990, 10: 176-183
- Mandema J.W., Heijligers-Feijen C.D., Tukker E., De Boer A.G.X. und Danhof M.: Modeling of the effect site equilibration kinetics and pharmacodynamics of racemic baclofen and its enantiomers using quantitative EEG effect measures. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1992, 261(1): 88-95
- Mash D.C., Flynn D.D. und Potter L.T.: Loss of M₂ muscarine receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and experimental cholinergic denervation. *Science*; 1985, 228(4703): 1115-1117
- Mathew R.J., Wilson W.H., Lowe J.V. und Humphries D.: Acute changes in cranial blood flow after cocaine hydrochloride. *Biological Psychiatry*; 1996, 40: 609-616
- Maurin Y.: Paradoxical antagonism by bicuculline of the inhibition by baclofen of the electrically evoked release of [³H]GABA from rat cerebral cortex slices. *European Journal of Pharmacology*; 1988, 155(3): 219-227
- Mawatari K., Iinuma F. und Watanabe M.: Fluorimetric determination of indometacin in human serum by high-performance liquid chromatography coupled with post-column photochemical reaction with hydrogen peroxide. *Journal of Chromatography*; 1989, 491: 389-396
- Mazzini C., Lebreton J., Alphand V. und Furstoss R.: A chemoenzymatic strategy for the synthesis of enantiopure (R)-(-)-baclofen. *Tetrahedron Letters*; 1997, 38(7): 1195-1196
- McCormick D.C., Edwards A.D., Brown G.C., Wyatt J.S., Potter A., Cope M., Delpy, D.T. und Reynolds E.O.: Effect of indometacin on cerebral oxidized cytochrome oxidase in preterm infants. *Pediatric Research*; 1993, 33: 603-608
- McGeer P.L., Schulzer M. und McGeer E.G.: Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: A review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*; 1996, 47: 425-432
- Mendelson J. und Mello N.K.: Drug therapy. Management of cocaine abuse and dependence. *New England Journal of Medicine*; 1996, 334: 963-972

- Merkus F.W.H.M., Schipper N.G.M. und Verhoef J.C.: The influence of absorption enhancers on intranasal insulin absorption in normal and diabetic subjects. *Journal of Controlled Release*; 1996, 41: 69-75
- Millerioux L., Brault M., Gualano V. und Mignot A.: High-performance liquid chromatographic determination of baclofen in human plasma. *Journal of Chromatography A*; 1996, 729: 309-314
- Molitero D.J., Lange R.A., Gerard R.D., Willard J.E., Lackner C. und Hillis L.D.: Influence of intranasal cocaine on plasma constituents associated with endogenous thrombosis and thrombolysis. *American Journal of Medicine*; 1994, 96: 492-496
- Moll-Navarro M.J., Merino M., Casabo V.G., Nacher A. und Polache A.: Interaction of taurine on baclofen intestinal absorption: A nonlinear mathematical treatment using differential equations to describe kinetic inhibition models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 1996, 85: 1248-1254
- Morishima H.O., Okutomi T., Ishizaki A., Zhang Y. und Cooper T.B.: The disposition of benzoylcegonine in maternal and fetal rats. *Neurotoxicology and Teratology*; 2001, 23: 247-253
- Morris J.B.: Uptake of acetaldehyde vapor and aldehyde dehydrogenase levels in the upper respiratory tracts of the mouse, rat, hamster, and guinea pig. *Fundamental and Applied Toxicology*; 1997, 35: 91-100
- Morris J.B.: Uptake of acrolein in the upper respiratory tract of the F344 rat. *Inhalation Toxicology*; 1996, 8: 387-403
- Müller H., Borner U., Zierski J. und Hempelmann G.: Intrathecal baclofen in tetanus. *Lancet*; 1986, 1: 317-318
- Müller W.E., Mutschler E. und Riederer P.: Noncompetitive NMDA receptor antagonists with fast open-channel blocking kinetics and strong voltage-dependency as potential therapeutic agents for Alzheimer's dementia. *Pharmacopsychiatry*; 1995, 28: 113-124
- Mumenthaler M.: *Neurologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1990
- Munjack D.J. und Adler M.: Thrombocytopenia and delirium associated with tranlycypromine overdose. *Journal of Clinical Psychopharmacology*; 1996, 16: 264-265
- Mutschler E.: *Arzneimittelwirkungen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart; 1996
- Nacher A., Polache A., Moll-Navarro M.J., Pla-Delfina J.M. und Merino M.: Influence of gamma-aminobutyric acid on baclofen intestinal absorption. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*; 1994, 15: 373-382
- Nakamura K., Maitani Y. und Takayama K.: The enhancing effect of nasal absorption of FITC-dextran 4,400 by beta-sitosterol beta-D-glucoside in rabbits. *Journal of Controlled Release*; 2002, 79: 147-155
- Nazarali A.J., Baker G.B., Coutts R.T. und Wong T.F.J.: N-(2-cyanoethyl)-tranlycypromine, a potential prodrug of tranlycypromine: Its disposition and interaction with catecholamine neurotransmitters in brain. *Pharmaceutical Research*; 1987, 4(1): 16-20
- Neander G., Eriksson L.O., Wallin-Boll E., Ersmark H.X. und Grahnen A.: Pharmacokinetics of intraarticular indometacin in patients with osteoarthritis. *European Journal of Clinical Pharmacology*; 1992, 42(3): 301-305
- Nelson L., Lott I., Touchette P., Satz P. und D'Elia L.: Detection of Alzheimer's disease in individuals with Down-syndrome. *American Journal of Mental Retardation*; 1995, 99(6): 616-622
- Nightingale S.L.: Nicotine nasal spray approved for smoking cessation. *Journal of the American Medical Association*; 1996, 275: 1224
- Niopas I. und Mamzori K.: Determination of indometacin and mefenamic acid in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B - Biomedical Applications*; 1994, 656: 447-450
- Nishihara K., Kohda Y., Saitoh Y., Nakagawa F. und Honda Y.: Determination of pemoline in plasma, plasma water, mixed saliva, and urine by high-performance liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*; 1984, 6(2): 232-237
- Nishioka R., Harimoto T., Umeda I., Yamamoto S. und Oi N.: Improved procedure for determination of indometacin in plasma by capillary gas chromatography after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography*; 1990, 526: 210-214
- O'Brien C.F., Seeberger L.C. und Smith D.B.: Spasticity after stroke: Epidemiology and optimal treatment. *Drugs & Aging*; 1996, 9: 332-340

- Ochs G.A. und Reimann I.W.: Baclofen Intrathekal: Leitfaden für die praktische Anwendung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1995
- Odwyer N.J., Ada L. und Neilson P.D.: Spasticity and muscle contracture following stroke. *Brain*; 1996, 119: 1737-1749
- Ogiso T., Ito Y., Iwaki M. und Atago H.: A pharmacokinetic model for the percutaneous absorption of indometacin and the prediction of drug disposition kinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 1989, 78(4): 319-323
- Okuyama S. und Aihara H.: The mode of action of analgesic drugs in adjuvant arthritic rats as an experimental model of chronic inflammatory pain: Possible central analgesic action of acidic nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Japanese Journal of Pharmacology*; 1984, 35: 95-103
- Olpe H.R., Demieville H., Baltzer V., Bencze W.L., Koella W.P.X.W. und Haas H.L.: The biological activity of d- and l-baclofen (lioresal). *European Journal of Pharmacology*; 1978, 52: 133-136
- Ooms F., Weber P., Carrupt P.A. und Testa B.: A simple model to predict blood-brain barrier permeation from 3D molecular fields. *Biochimica and Biophysica Acta*; 2002, 1587: 118-125
- Paech C., Salach J.I. und Singer T.P.: Suicide inactivation of monoamine oxidase by trans-phenylcyclopropylamine. *Journal of Biological Chemistry*; 1980, 255: 2700-2704
- Palmer A.M.: Neurochemical studies of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration*; 1996, 5: 381-391
- Pan H.T., Menacherry S. und Justice J.B.: Differences in the pharmacokinetics of cocaine in naive and cocaine-experienced rats. *Journal of Neurochemistry*; 1991, 56(4): 1299-1306
- Pardridge W.M.: Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov*; 2002, 1: 131-139
- Patrick K.S., Boggan W.O., Miller S.R. und Middaugh L.D.: Gas chromatographic-mass spectrometric determination of plasma and brain cocaine in mice. *Journal of Chromatography B - Biomedical Applications*; 1993, 621: 89-94
- Penning T.M.: Design of suicide substrates: An approach to the development of highly selective enzyme inhibitors as drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*; 1983, 212-217
- Pettit H.O. und Pettit A.J.: Disposition of cocaine in blood and brain after a single pretreatment. *Brain Research*; 1994, 651: 261-268
- Pettit H.O., Pan H.T., Parsons L.H. und Justice J.B.: Extracellular concentrations of cocaine and dopamine are enhanced during chronic cocaine administration. *Journal of Neurochemistry*; 1990, 55(3): 798-804
- Pharmazeutische Stoffliste, Hempel L., Schroer C., Eisenhauer H. et al. editors. 10. Auflage ABDA Eschborn; 1996
- Pietrowsky R., Struben C., Molle M., Fehm H.L. und Born J.: Brain potential changes after intranasal vs. intravenous administration of vasopressin: Evidence for a direct nose-brain pathway for peptide effects in humans. *Biological Psychiatry*; 1996a, 39: 332-340
- Pietrowsky R., Thiemann A., Kern W., Fehm H.L. und Born J.: A nose-brain pathway for psychotropic peptides: Evidence from a brain evoked potential study with cholecystokinin. *Psychoneuroendocrinology*; 1996b, 21: 559-572
- Pirard B., Baudoux G. und Durant F.: Electronic properties of GABA_B agonists and antagonists. *European Journal of Medical Chemistry*; 1994, 29: 513-517
- Pirard B., Paquet B., Evrard G., Berthelot P., Vaccher C., Ansard M.H., Debaert M. und Durant F.: GABA_B pharmacophoric pattern based on conformational analysis of 3-heteroaromatic baclofen analogues. *European Journal of Medical Chemistry*; 1995, 30: 851-857
- Pirkle W.H. und Murray P.G.: Chiral stationary phase design - use of intercalative effects to enhance enantioselectivity. *Journal of Chromatography*; 1993, 641: 11-19
- Pittaluga A., Asaro D., Pellegrini G. und Raiteri M.: Studies on [³H]GABA and endogenous GABA release in rat cerebral cortex suggest the presence of autoreceptors of the GABA_B type. *European Journal of Pharmacology*; 1987, 144(1): 45-52
- Plosker G.L. und Mctavish D.: Intranasal calcitonin (salmon calcitonin): A review of its pharmacological properties and role in the management of postmenopausal osteoporosis. *Drugs & Aging*; 1996, 8: 378-400

- Polache A., Munck L.K. und Munck B.G.: Baclofen (β -p-chlorophenyl-gamma-aminobutyric acid) transport across rat jejunum. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1993, 1147(2): 267-272
- Polache A., Pla-Delfina J.M. und Merino M.: Partially competitive inhibition of intestinal baclofen absorption by β -alanine, a nonessential dietary amino-acid. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*; 1991, 12(9): 647-660
- Popova E.D., Puzin M.N., Kolyvanov G.B. und Litvin A.A.: Baclofen pharmacokinetics in rats. *Eksperimentalnaia i Klinicheskaia Farmakologija*; 1995, 58: 53-54
- Pranzatelli M.R.: Oral pharmacotherapy for the movement disorders of cerebral palsy. *Journal of Child Neurology*; 1996, 11: S13-S22
- Prasad K. und Laxdal V.A.: Hydroxyl radical-scavenging property of indometacin. *Molecular & Cellular Biochemistry*; 1994, 136: 139-144
- Quadir M., Zia H. und Needham T.E.: Development and evaluation of nasal formulations of ketorolac. *Drug Deliv*; 2000, 7: 223-229
- Rajewski R.A. und Stella V.J.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In-vivo drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 1996, 85: 1142-1169
- Ravindranath V. und Boyd M.R.: Xenobiotic metabolism in brain. *Drug Metabolism Reviews*; 1995, 27: 419-448
- Reginster J.Y., Deroisy R., Lecart M.P., Sarlet N., Zegels B., Jupsin I., Delongueville M. und Franchimont P.: A double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial of intermittent nasal salmon calcitonin for prevention of postmenopausal lumbar spine bone loss. *American Journal of Medicine*; 1995, 98: 452-458
- Reginster J.Y., Meurmans L., Deroisy R., Jupsin I., Biquet I., Albert A. und Franchimont P.: A 5-year controlled randomized study of prevention of postmenopausal trabecular bone loss with nasal salmon calcitonin and calcium. *European Journal of Clinical Investigation*; 1994, 24: 565-569
- Reith M.E., Benuck M. und Lajtha A.: Cocaine disposition in the brain after continuous or intermittent treatment and locomotor stimulation in mice. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1987, 243(1): 281-287
- Reynolds G.P., Rausch W.D. und Riederer P.: Effects of tranlycypromine stereoisomers on monamine oxidation in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*; 1980, 9: 521-523
- Rich J.B., Rasmusson D.X., Folstein M.F., Carson K.A. und Kawas C.X., Brandt J.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurology*; 1995, 45(1): 51-55
- Riddick L.: Physical and chemical injury as causes of sudden cardiac death: The forensic forum. *Cardiovascular Pathology*; 1994, 3: 147-153
- Riederer P., Laux G. und Pöldinger W.: *Allgemeine Grundlagen der Pharmakopsychiatrie*. Springer-Verlag, Wien, New York; 1992
- Riesz M. und Erdo S.L.: GABA_B receptors in the rabbit uterus may mediate contractile responses. *European Journal of Pharmacology*; 1985, 119(3): 199-204
- Robinson S.E., Enters E.K., Jackson G.F., Chinchilli V.M., Maher, J.R., McDowell K.P., Allen H.M. und Guo H.: Maternal and fetal brain and plasma levels of cocaine and benzoylecgonine after acute or chronic maternal intravenous administration of cocaine. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1994, 271: 1234-1239
- Rofael H.Z. und Abdel-Rahman M.S.: The role of ketamine on plasma cocaine pharmacokinetics in rat. *Toxicology Letters*; 2002, 129: 167-176
- Rogers J., Kirby L.C., Hempelman S.R., Berry D.L., McGeer P.L.X.K., Zalinski J., Cofield M., Mansukhani L. und Willson P.: Clinical trial of indometacin in Alzheimer's disease. *Neurology*; 1993, 43: 1609-1611
- Röhrich J., Schmidt K. und Bratzke H.: Application of the novel immunoassay TRIAGE to a rapid detection of antemortem drug abuse. *Journal of Analytical Toxicology*; 1994, 18: 407-414
- Röhrich J., Schmidt K. und Kauert G.: Bestimmung von Amphetaminen, Cannabinoiden, Cocain und Opiaten im Serum. *Workshop der GTFCh, Frankfurt/Main*; 1996
- Römpp H. und Schurz J.: *Chemische Zaubertränke*. Kosmos Gesellschaft der Naturfreunde Franckhsche Verlagshandlung, Stuttgart; 1972

- Rose K., Hall L.H. und Kier L.B.: Modeling blood-brain barrier partitioning using the electrotopological state. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*; 2002, 42: 651-666
- Rote Liste 1996, Bundesverband der Deutschen Industrie e.V. und Verband Forschender Arzneimittelhersteller e.V., Aulendorf/Württ., ECV - Editio Cantor; 1996
- Rothermich N.O.: The fate of rectally administered radioactive indometacin in human subjects: A preliminary report. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*; 1971, 12(2): 300-301
- Rustum A.M.: Simple and rapid reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of baclofen in human plasma with ultraviolet detection. Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography*; 1989, 487: 107-115
- Sakane T., Akizuki M., Taki Y., Yamashita S., Sezaki H. und Nadai T.: Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: The relation to the molecular weight of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 1995, 47: 379-381
- Sakane T., Akizuki M., Yamashita S., Nadai T., Hashida M. und Sezaki H.: The transport of a drug to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity: The relation to the lipophilicity of the drug. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*; 1991a, 39: 2456-2458
- Sakane T., Akizuki M., Yamashita S., Sezaki H. und Nadai T.: Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid - the relation to the dissociation of the drug. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 1994, 46: 378-379
- Sakane T., Akizuki M., Yoshida M., Yamashita S., Nadai T., Hashida M. und Sezaki H.: Transport of cephalixin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 1991b, 43: 449-451
- Sallerin-Caute B., Monsarrat B., Lazorthes Y., Cros J. und Bastide R.: A sensitive method for the determination of baclofen in human CSF by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*; 1988, 11: 1753-1761
- Saura J., Nadal E., Vandenberg B., Vila M., Bombi J.A. und Mahy N.: Localization of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sciences*; 1996, 59: 1341-1349
- Sawynok J. und Dickson C.: D-baclofen: Is it an antagonist at baclofen receptors? *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*; 1984, 8(4-6): 729-731
- Sayani A.P. und Chien Y.W.: Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*; 1996, 13: 85-184
- Scharrer E., Senn E. und Wolfram S.: Stimulation of mucosal uptake of selenium from selenite by some thiols at various sites of rat intestine. *Biological Trace Element Research*; 1992, 33: 109-120
- Schenck E.: *Neurologische Untersuchungsmethoden*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1992
- Schmidbauer und vom Scheidt J.: *Handbuch der Rauschdrogen*. Fischer Taschenbuch Verlag GmbH, Frankfurt; 1989
- Schnabel J.: New Alzheimer's therapy suggested. *Science*; 1993, 260: 1719-1720
- Schneider N.G., Lunell E., Olmstead R.E. und Fagerstrom K.O.: Clinical pharmacokinetics of nasal nicotine delivery: A review and comparison to other nicotine systems. *Clinical Pharmacokinetics*; 1996, 31: 65-80
- Schneider N.G., Olmstead R., Mody F.V., Doan K., Franzon M.X.J. und Steinberg C.: Efficacy of a nicotine nasal spray in smoking cessation: A placebo-controlled, double-blind trial. *Addiction*; 1995, 90: 1671-1682
- Schoenfelder A., Mann A. und Le Coz S.: Enantioselective Synthesis of (R)-(-)-baclofen. *Synlett*; 1993, 1: 63-64
- Schollhammer G., Dell H.D., Doering K. und Kamp R.: Quantitative determination of acemetacin and its metabolite indometacin in blood and plasma by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography*; 1986, 375: 331-338
- Schworer H., Racke K. und Kilbinger H.: GABA receptors are involved in the modulation of the release of 5-hydroxytryptamine from the vascularly perfused small intestine of the guinea-pig. *European Journal of Pharmacology*; 1989, 165(1): 29-37
- Seitz R.J., Blank B., Kiwit J.C.W. und Benecke R.: Stiff-person syndrome with anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies: Complete remission of symptoms after intrathecal baclofen administration. *Journal of Neurology*; 1995, 242: 618-622

- Seki T., Sato N., Hasegawa T., Kawaguchi T. und Juni K.: Nasal absorption of zidovudine and its transport to cerebrospinal fluid in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 1994, 17: 1135-1137
- Shah V.P., Midha K.K., Dighe S., McGilveray I.J., Skelly J.P., Yacobi A., Layloff T., Viswanathan C.T., Cook C.E., McDowall R.D., et al.: Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Pharmaceutical Research*; 1992, 9: 588-592
- Sherry R.L., Rauw G., McKenna K.F., Paetsch P.R., Coutts R.T. und Baker G.B.: Failure to detect amphetamine or 1-amino-3-phenylpropane in humans or rats receiving the MAO inhibitor tranlycypromine. *Journal of Affective Disorders*; 2000, 61: 23-29
- Shimoda N., Maitani Y., Machida Y. und Nagai T.: Effects of dose, pH and osmolarity on intranasal absorption of recombinant human erythropoietin in rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 1995, 18: 734-739
- Siegel R.K.: Treatment of cocaine abuse: Historical and contemporary perspectives. *Journal of Psychoactive Drugs*; 1985, 17(1): 1-9
- Siegentaler W.: *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 1987
- Silbert P.L., Matsumoto J.Y., Mcmanis P.G., Stolpsmith K.A., Elliott B.A. und Mcevoy K.M.: Intrathecal baclofen therapy in stiff-man syndrome: A double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*; 1995, 45: 1893-1897
- Silva M.A.D., Mattern C., Hacker R., Nogueira P.J.C., Huston J.P. und Schwarting R.K.W.: Intranasal administration of the dopaminergic agonists L- Dopa, amphetamine and cocaine increases dopamine activity in the neostriatum: A microdialysis study in the rat. *Journal of Neurochemistry*; 1997, 68: 233-239
- Silverman R.B.: Mechanism of inactivation of monoamine oxidase by trans-2-phenylcyclopropylamine and the structure of the enzym-inactivator adduct. *Journal of Biological Chemistry*; 1983, 208: 14766-14769
- Simpson D., Greenwood J., Jarvie D.R. und Moore F.M.: Experience of a laboratory service for drug screening in urine. *Scottish Medical Journal*; 1993, 38: 20-26
- Simpson D.M., Alexander D.N., O'Brien C.F., Tagliati M., Aswad A.S., Leon J.M., Gibson J., Mordaunt J.M. und Monaghan E.P.: Botulinum toxin type A in the treatment of upper extremity spasticity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*; 1996, 46: 1306-1310
- Sioufi A., Kaiser G., Leroux F. und Dubois J.P.: Determination of the S-(+)- and R-(-)-enantiomers of baclofen in plasma and urine by gas chromatography using a chiral fused-silica capillary column and an electron-capture detector. *Journal of Chromatography*; 1988, 450: 221-232
- Smith D.F. und Pirkle W.H.: Stereoselective analysis of racemic psychotropic compounds by HPLC on chiral stationary phase. *Psychopharmacology*; 1986, 89: 392-393
- Smith D.F.: Stereoselectivity of spinal neurotransmission: Effects of baclofen enantiomer on tail-flick reflex in rats. *Journal of Neural Transmission*; 1984, 60(1): 63-67
- Sniegowski L.T. und Welch M.J.: Interlaboratory studies on the analysis of hair for drugs of abuse: Results from the fourth exercise. *Journal of Analytical Toxicology*; 1996, 20: 242-247
- Snow S.S., Logan T.P. und Hollender M.H.: Nasal spray „addiction“ and psychosis: A case report. *British Journal of Psychiatry*; 1980, 136: 297-299
- Snyder S.H.: Mechanism of antidepressant efficacy of monoamine oxidase inhibitors: Inhibition of monoamine oxidase or of catecholamine reuptake. *Journal of Psychiatric Research*; 1974, 10: 153
- Soderman P., Sahlberg D. und Wiholm B.E.: CNS reactions to nose drops in small children. *Lancet*; 1984, 1: 573
- Sondergaard I. und Steiness E.: Determination of indometacin in plasma and urine by direct quantitative thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*; 1979, 162: 485-488
- Song D.M., Zhang S.D. und Kohlhof K.: Determination of a trace amount of cocaine on a bank note by gas chromatography positive-ion chemical-ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*; 1996, 731: 355-360
- Sosnoff C.S., Ann Q., Bernert J.T., Powell M.K., Miller B.B., Henderson L.O.X.H., Fernhoff P. und Sampson E.J.: Analysis of benzoylecgonine in dried blood spots by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*; 1996, 20: 179-184

- Spahn H., Krauss D. und Mutschler E.: Enantiospecific high-performance liquid chromatographic (HPLC) determination of baclofen and its fluoro analogue in biological material. *Pharmaceutical Research*; 1988, 5: 107-112
- Spahn-Langguth H., Hahn G., Mutschler E., Möhrke W. und Langguth P.: Enantiospecific high-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the monoamine oxidase inhibitor tranylcypromine and its applicability in pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography*; 1992, 587: 229-237
- Spahn-Langguth H., Benet L.Z., Zia-Amirhosseini P., Iwakawa S., Langguth P.: Kinetics of reactive phase-II metabolites: Stereochemical aspects of formation of epimeric acyl glucuronides and their reactivity. In: Aboul-Enein H, Wainer I (Eds.) 'Stereochemistry in Drug Development and Use' John Wiley & Sons New York, 1997: 125-170
- Spahn-Langguth H., Benet L.Z., Möhrke W., Langguth P.: First-pass phenomena: Sources of stereoselectivities and variabilities of concentration-time profiles after oral dosage. In: Aboul-Enein H, Wainer IW (Eds.) 'Stereochemistry in Drug Development and Use' John Wiley & Sons New York, 1997: 573-610
- Spahn-Langguth H., Dressler C., Leisen C.: Intestinal transport: Stereochemical aspects. In: Somogyi A., Testa B., Eichelbaum M., 'Stereochemical Aspects of Drug Action and Disposition' Adv. Pharmacol. Ser. (im Druck)
- Spear L.P., Frambes N.A. und Kirstein C.L.: Fetal and maternal brain and plasma levels of cocaine and benzoylecgonine following chronic subcutaneous administration of cocaine during gestation in rats. *Psychopharmacology*; 1989, 97: 427-431
- Stafford-Clark D. und Smith A.C.: *Psychiatrie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; 1991
- Stranorossi S., Chiarotti M., Fiori A., Auriti C. und Seganti G.: Cocaine abuse in pregnancy: Its evaluation through hair analysis of pathological new-borns. *Life Sciences*; 1996, 59: 1909-1915
- Streete P.J.: Rapid high-performance liquid chromatographic methods for the determination of overdose concentrations of some non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma or serum. *Journal of Chromatography*; 1989, 495: 179-193
- Subert J.: Progress in the separation of enantiomers of chiral drugs by HPLC without their prior derivatization. *Pharmazie*; 1994, 49(1): 3-13
- Sun L. und Lau C.E.: Simultaneous pharmacokinetic modeling of cocaine and its metabolites, norcocaine and benzoylecgonine, after intravenous and oral administration in rats. *Drug Metabolism and Disposition*; 2001, 29: 1183-1189
- Sutherland G., Stapleton J.A., Russell M.A., Jarvis M.J., Hajek, P, Belcher M. und Feyerabend C.: Randomised controlled trial of nasal nicotine spray in smoking cessation. *Lancet*; 1992, 340: 324-329
- Tagliaro F., Poesi C., Aiello R., Dorizzi R., Ghielmi S. und Marigo M.: Capillary electrophoresis for the investigation of illicit drugs in hair: Determination of cocaine and morphine. *Journal of Chromatography*; 1993, 638: 303-309
- Tagliaro F., Smith F.P., Turrina S., Equisetto V. und Marigo M.: Complementary use of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography for mutual confirmation of results in forensic drug analysis. *Journal of Chromatography A*; 1996, 735: 227-235
- Takeda M., Khamdang S., Narikawa S., Kimura H., Hosoyamada M., Cha S.H., Sekine T. und Endou H.: Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 2002, 302: 666-671
- Terrence C.F., Sax M., Fromm G.H., Chang C.H. und Yoo C.S.: Effect of baclofen enantiomorphs on the spinal trigeminal nucleus and steric similarities of carbamazepine. *Pharmacology*; 1983, 27(2): 85-94
- Terweij-Groen C.P., Heemstra S. und Kraak J.C.: Rapid determination of indometacin and salicylic acid in serum by means of reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography*; 1980, 181: 385-397
- Testa B.: The chromatographic analysis of enantiomers in drug metabolism studies. *Xenobiotica*; 1986, 16(3): 265-279
- Thamsborg G., Jensen J.E.B., Kollerup G., Hauge E.M., Melsen F. und Sorensen O.H.: Effect of nasal salmon calcitonin on bone remodeling and bone mass in postmenopausal osteoporosis. *Bone*; 1996, 18: 207-212

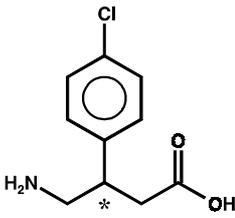
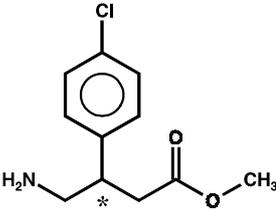
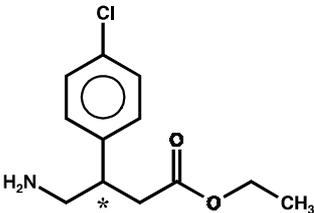
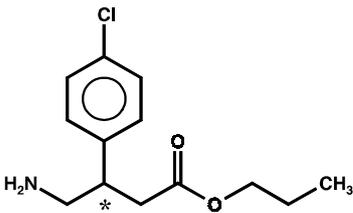
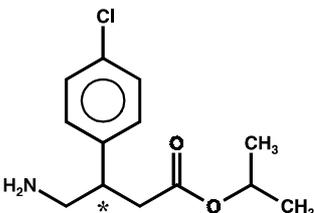
- Tjalve H., Henriksson J., Tallkvist J., Larsson B.S. und Lindquist N.G.: Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacology and Toxicology*; 1996, 79: 347-356
- Tonnesen P., Mikkelsen K., Norregaard J. und Jorgensen S.: Recycling of hard-core smokers with nicotine nasal spray. *European Respiratory Journal*; 1996, 9: 1619-1623
- Tosunoglu S. und Ersoy L.: Determination of baclofen in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analyst*; 1995, 120: 373-375
- Tsai T.H. und Chen C.F.: Determination of glycyrrhizin in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array ultraviolet detection and its pharmacokinetics application. *Journal of Chromatography*; 1992, 576: 170-173
- Tsai T.H., Chen C.M. und Chen C.F.: Disposition of asarone after intravenous administration to rabbits assessed using HPLC. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*; 1992, 44: 620-622
- Tsuji A., Terasaki T., Takabatake Y., Tenda Y., Tamai I.X., Yamashita T., Moritani S., Tsuruo T. und Yamashita J.: P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Life Sciences*; 1992, 51(18): 1427-1437
- Tuomisto J. und Smith D.F.: Effects of tranlycypromine enantiomers on monoamine uptake and release and imipramine binding. *Journal of Neural Transmission*; 1986, 65: 135-145
- Valensi P., Zirinis P., Nicolas P., Perret G., Sandrebanon D. und Attalii J.R.: Effect of insulin concentration on bioavailability during nasal spray administration. *Pathologie Biologie*; 1996, 44: 235-240
- van Bree J.B., Heijligers-Feijen C.D., de Boer A.G., Danhof M. und Breimer D.D.: Stereoselective transport of baclofen across the blood-brain barrier in rats as determined by the unit impulse response methodology. *Pharmaceutical Research*; 1991, 8: 259-262
- Van Dyke C., Jatlow P., Ungerer J., Barash P. und Byck R.: Cocaine and lidocaine have similar psychological effects after intranasal application. *Life Sciences*; 1979, 24: 271-274
- Van Dyke C., Jatlow P., Ungerer J., Barash P. und Byck R.: Oral cocaine: Plasma concentrations and central effects. *Science*; 1978, 200: 211-213
- Van Dyke C., Ungerer J., Jatlow P., Barash P. und Byck R.: Intranasal cocaine: Dose relationships of psychological effects and plasma levels. *International Journal of Psychiatry in Medicine*; 1982, 12(1): 1-13
- Visser F.E., Aldenkamp A.P., van Huffelen A.C., Kuilman M., Overweg J. und van Wijk J.: Prospective study of the prevalence of Alzheimer-type dementia in institutionalized individuals with Down syndrome. *American Journal of Mental Retardation*; 1997, 101(4): 400-412
- Voigt R.: *Pharmazeutische Technologie*. Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden; 1995
- Wall G.M. und Baker J.K.: Determination of baclofen and alpha-baclofen in rat liver homogenate and human urine using solid-phase extraction, o-phthalaldehyde/tert-butyl thiol derivatization and high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography*; 1989, 491: 151-162
- Wallace S.J.: Nasal benzodiazepines for management of acute childhood seizures? *Lancet*; 1997, 349: 222
- Weatherby R.P., Allan R.D. und Johnston G.A.: Resolution of the stereoisomers of baclofen by high performance liquid chromatography. *Journal of Neuroscience Methods*; 1984, 10: 23-28
- Weber H., Spahn H., Mutschler E. und Möhrke W.: Activated alpha-alkyl-alpha-arylacetic acid enantiomers for stereoselective thin-layer chromatographic and high-performance liquid chromatographic determination of chiral amines. *Journal of Chromatography*; 1984, 307: 145-153
- Weber-Grandke H., Hahn G., Mutschler E., Möhrke W., Langguth P. und Spahn-Langguth H.: The pharmacokinetics of tranlycypromine enantiomers in healthy subject after oral administration of racemic drug and the single enantiomers. *British Journal of Clinical Pharmacology*; 1993, 36: 363-365
- Welch M.J., Meltzer E.O. und Simons F.E.: H1-antihistamines and the central nervous system. *Clinical Allergy and Immunology*; 2002, 17: 337-388
- Wetterich U., Spahn-Langguth H., Mutschler E., Terhaag B., Rosch W., Langguth P.: Evidence for intestinal secretion as an additional clearance pathway of talinolol enantiomers: concentration- and dose-dependent absorption in vitro and in vivo. *Pharmaceutical Research*; 1996, 13(4): 514-22

- Wetterich U.: Untersuchungen zur Enantiomerenanalytik und -kinetik des β -Adrenozeptorenblockers Tailinolol Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt; 1995
- Wiener H.L. und Reith M.E.: Correlation between cocaine-induced locomotion and cocaine disposition in the brain among four inbred strains of mice. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*; 1990, 36(3): 699-701
- Wiggins R.C., Rolsten C., Ruiz B. und Davis C.M.: Pharmacokinetics of cocaine: Basic studies of route, dosage, pregnancy and lactation. *Neurotoxicology*; 1989, 10: 367-381
- Witzuk B., Khaunina R.A. und Kupryszewski G.: 3-(p-Chlorophenyl)-4-aminobutanoic acid-resolution into enantiomers and pharmacological activity. *Polish Journal of Pharmacology & Pharmacy*; 1980, 32(2): 187-196
- Wong S.L., van Belle K. und Sawchuk R.J.: Distributional transport kinetics of zidovudine between plasma and brain extracellular fluid/cerebrospinal fluid in the rabbit: Investigation of the inhibitory effect of probenecid utilizing microdialysis. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*; 1993, 264(2): 899-909
- Wu S.Y. und Dun N.J.: Presynaptic GABA_B receptor activation attenuates synaptic transmission to rat sympathetic preganglionic neurons in-vitro. *Brain Research*; 1992, 572(1-2): 94-102
- Wuis E.W., Beneken Kolmer E.W.J., van Beijsterveldt L.E.C., Burgers R.C.M., Vree T.B. und van der Kleyn E.: Enantioselective high-performance liquid chromatographic determination of baclofen after derivatization with a chiral adduct of o-phthalaldehyde. *Journal of Chromatography*; 1987a, 415: 419-422
- Wuis E.W., Dirks M.J., Termond E.F., Vree T.B. und van der Kleijn E.: Comparison of the pharmacokinetics of intravenously administered rac-baclofen and its (-)-(R)- and (+)-(S)-enantiomers in dogs. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*; 1989, 9: 239-246
- Wuis E.W., Dirks R.J.M., Vree T.B. und van der Kleyn E.: High-performance liquid chromatographic analysis of baclofen in plasma and urine of man after precolumn extraction and derivatization with o-phthalaldehyde. *Journal of Chromatography B - Biomedical Applications*; 1985, 337: 341-350
- Wuis E.W., van Beijsterveldt L.E., Dirks R.J., Vree T.B. und van der Kleyn E.: Rapid simultaneous determination of baclofen and its gamma-hydroxy metabolite in urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography*; 1987b, 420: 212-216
- Yamada K., Mimaki Y. und Sashida Y.: Anticonvulsive effects of inhaling lavender oil vapour. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*; 1994, 17: 359-360
- Yazan Y., Ozer A.Y. und Erol K.: Pharmacodynamic comparison of a nasal formulation of verapamil and intravenous and oral dosage forms. *Drug Development and Industrial Pharmacy*; 1996, 22: 281-284
- Yonemitsu K. und Pounder D.J.: Postmortem changes in blood tranlylcypromine concentration: competing redistribution and degradation effects. *Forensic Science International*; 1993, 59(2): 177-184
- Yoshida T., Gomita Y. und Oishi R.: Effect of cigarette smoke on pharmacokinetics of oral, intrarectal, or intravenous indometacin in rats. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*; 1991, 344(4): 500-504
- Yoshifuji S. und Kaname M.: Stereospecific synthesis of (R)- and (S)-baclofen and (R)- and (S)-PCPGABA [4-amino-2-(4-chlorophenyl)butyric acid] via (R)- and (S)-3-(4-chlorophenyl)pyrrolidines. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; 1995, 43: 1302-1306
- Yu P.H.: Monoamine oxidase in young and adult rat brain capillaries. *Journal of Neural Transmission*; 1984, 60(3-4): 239-245
- Zakrzewska J.M. und Patsalos P.N.: Drugs used in the management of trigeminal neuralgia. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*; 1992, 74: 439-450
- Zed P.J., Stiver H.G., Devonshire V., Jewesson P.J. und Marra F.: Continuous intrathecal pump infusion of baclofen with antibiotic drugs for treatment of pump-associated meningitis. Case report. *Journal of Neurosurgery*; 2000, 92: 347-349
- Zigman W.B., Schupf N., Sersen E. und Silverman W.: Prevalence of dementia in adults with and without Down-syndrome. *American Journal of Mental Retardation*; 1996, 100(4): 403-412

9. Anhang

9.1. Untersuchte Wirkstoffe

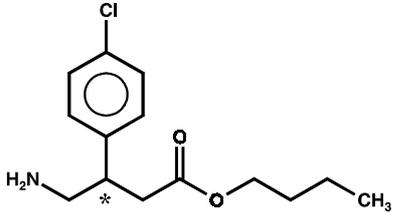
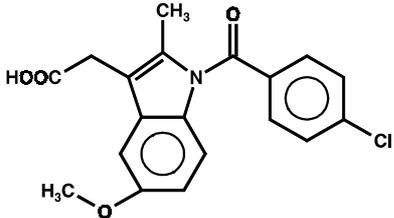
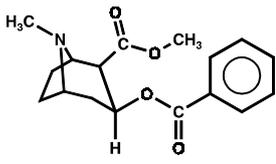
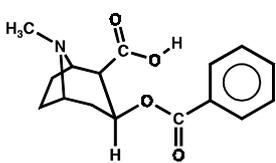
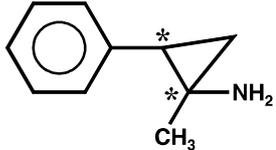
Abb. 9.1.1.: Strukturen und Bezeichnungen der untersuchten Wirkstoffe.

Strukturformel	IUPAC-Bezeichnung	Int. Freiname bzw. davon abgeleitete Bezeichnung	Abkürzung	Molare Masse ¹ [g×mol ⁻¹]
	(R,S)-4-Amino-3-(4-chlorophenyl)-buttersäure	(R,S)-Baclofen	Bac	213,7
	(R,S)-4-Amino-3-(4-chlorophenyl)-buttersäuremethylester	(R,S)-Baclofenmethylester	Bac-M	227,7
	(R,S)-4-Amino-3-(4-chlorophenyl)-buttersäureethylester	(R,S)-Baclofenethylester	Bac-E	241,7
	(R,S)-4-Amino-3-(4-chlorophenyl)-buttersäure-1-propylester	(R,S)-Baclofen-1-propylester	Bac-1P	255,8
	(R,S)-4-Amino-3-(4-chlorophenyl)-buttersäure-2-propylester	(R,S)-Baclofen-2-propylester	Bac-2P	255,8

¹ Des freien Wirkstoffs (Base).

* Stereogenes Zentrum; alle Substanzen wurden als Razemat eingesetzt.

Abb. 9.1.1.: Strukturen und Bezeichnungen der untersuchten Wirkstoffe (Fortsetzung).

Strukturformel	IUPAC-Bezeichnung	Int. Freiname bzw. davon abgeleitete Bezeichnung	Abkürzung	Molare Masse ¹ [g×mol ⁻¹]
	(R,S)-4-Amino-3-(4-chlorphenyl)-buttersäure-n-butylester	(R,S)-Baclofen-n-butylester	Bac-B	269,8
	1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-3-indolessigsäure	Indometacin	Ind	357,8
	[1-R-(exo, exo)]-3-Benzoyloxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-2-carbonsäuremethylester	Kokain	Kok	303,4
	[1-R-(exo, exo)]-3-Benzoyloxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-2-carbonsäure	Benzoylcegonin	BE	289,3
	(±)-trans-2-Phenylcyclopropylamin	(±)-Tranylcypromin	TCP	133,2

¹ Des freien Wirkstoffs (Base).

* Stereogenes Zentrum; alle Substanzen mit Ausnahme des Naturstoffs Kokain (ohne Angabe der stereogenen Zentren dargestellt) und des (achiralen) Indometacin wurden als Razemat eingesetzt.

9.3. Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten

Tab. 9.3.1.: Einzelwerte der Bestimmung der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (k) der Baclofenester-Derivate (n=5).

Bestimmung	Bac-M	Bac-E	Bac-1P	Bac-2P	Bac-B
1	2,6	6,2	18,9	19,0	26,8
2	3,2	5,8	20,9	18,5	28,0
3	2,9	6,0	19,2	17,9	25,4
4	2,9	5,9	19,3	17,9	26,8
5	3,3	5,6	22,7	19,7	25,2
MW ± SD	3,0 ± 0,3	5,9 ± 0,2	20,2 ± 1,6	18,6 ± 0,8	26,4 ± 1,1

9.4. Gewichte von Versuchstieren und entnommenen Organen¹

Tab. 9.4.1.: Tier- und Organgewichte - ZNS-Verteilung von Kokain.

Tiernummer	Gewicht [g]	Zeit [min]	Applikation	CSF	Blut	Hirn [g]
TA	243	2	i.p.	x*	x	1,98
TB	246	2	i.p.	x**	x	1,98
TC	220	2	i.p.	x	x	1,93
T074	260	10	i.p.	x**	x	1,96
T075	263	10	i.p.	x***	x	1,93
T076	309	10	i.p.	x*	x	1,93
T077	229	20	i.p.	x*	x	2,02
T078	237	20	i.p.	x*	x	1,80
T079	275	20	i.p.	x	x	2,06
T080	232	60	i.p.	x***	x	1,85
T081	233	60	i.p.	x**	x	1,96
T082	291	60	i.p.	x***	x	1,92
MW ± SD	253 ± 27					1,94 ± 0,07
T149	291	2	i.n.	--	x	1,98
T150	281	2	i.n.	x**	x	1,94
T151	282	20	i.n.	x**	x	1,94
T152	303	20	i.n.	x***	x	1,99
T153	304	60	i.n.	x*	x	2,04
T154	325	60	i.n.	x*	x	1,96
T155	310	2	i.n.	--	x	1,86
T156	309	20	i.n.	x	x	2,03
T157	317	60	i.n.	x**	x	2,12
T158	314	10	i.n.	x**	x	1,96
T159	317	10	i.n.	x*	x	1,87
T160	303	10	i.n.	x**	x	2,07
MW ± SD	305 ± 14					1,98 ± 0,08

¹ Die Erklärung der in den Tabellen des Abschnitts 9.4. verwendeten Abkürzungen und Symbole folgt am Ende des Kapitels 9.4.

Tab. 9.4.1.: Tier- und Organgewichte - ZNS-Verteilung von Kokain (Fortsetzung).¹

Tiernummer	Gewicht [g]	Zeit [min]	Applikation	CSF	Blut	Hirn [g]
K09	309	10	i.v.	x	x	2,07
K10	303	60	i.v.	x	x	1,94
K11	320	20	i.v.	x	x	1,96
K12	315	2	i.v.	x	x	2,05
K13	304	60	i.v.	x	x	2,14
K14	310	20	i.v.	x	x	2,02
K15	322	20	i.v.	x	x	2,05
K16	325	10	i.v.	x*	x	2,12
K17	303	10	i.v.	x*	x	1,94
K18	301	2	i.v.	x*	x	1,85
K19	311	2	i.v.	x	x	2,10
K22	317	60	i.v.	x*	x	2,00
MW ± SD	312 ± 8					2,02 ± 0,09

Tab. 9.4.2.: Tier- und Organgewichte – Studie zur Verteilung von TCP in verschiedene Hirnareale.¹

Tier ²	Gewicht [g]	Zeit [min]	App.	CSF	Blut	Gehirnteile [mg]					
						Bulbus	Medulla	Cerebellum	Cortex	Mesen- cephalon	Thalamus
A001	270	20	i.p.	--	x	60	270	340	750	420	160
A002	253	20	i.p.	--	--	60	230	350	850	290	170
A004	245	70	i.p.	--	x	70	230	300	800	360	140
A005	270	70	i.p.	x***	x	90	280	320	750	400	190
A006	260	20	i.p.	--	x	70	280	330	880	370	160
A007	260	130	i.p.	x***	x	70	240	260	910	350	120
A008	290	195	i.p.	x***	x	90	210	320	830	430	180
A012	290	70	i.p.	x**	x	110	240	350	860	380	150
A013	275	130	i.p.	--	x	60	250	330	910	430	170
A014	270	195	i.p.	--	x	60	200	320	780	460	170
A015	275	130	i.p.	x***	x	90	240	310	830	390	150
A016	260	195	i.p.	x***	x	80	230	310	800	460	200
A039	255	20	i.p.	--	x	100	200	300	880	390	170
A040	240	20	i.p.	--	x	100	220	330	890	430	180
T001	197	10	i.p.	--	x	70	150	270	780	410	170
T002	203	10	i.p.	--	x	80	170	300	850	440	150
T003	211	10	i.p.	--	--	130	180	270	710	410	240
T004	222	2	i.p.	x***	x	90	230	330	870	390	170
T005	194	2	i.p.	x**	x	90	180	250	770	390	150
T018	209	2	i.p.	x*	x	90	220	300	800	320	170
MW ± SD	247 ± 31					83 ± 19	223 ± 35	310 ± 29	825 ± 57	396 ± 44	168 ± 25

¹ Die Erklärung der in den Tabellen des Abschnitts 9.4. verwendeten Abkürzungen und Symbole folgt am Ende des Kapitels 9.4.

² Alle Hirngewebeproben von Tieren, die mit „A“ bezeichnet sind, wurden nicht mit Ascorbinsäure stabilisiert (s. Abschnitt 6.2.3.). Aufgrund der Instabilität des (+)-TCP bei der Probengewinnung, -homogenisierung und -aufarbeitung ist eine Angabe der (+)-TCP-Konzentration in den Gehirnarealen dieser Versuchstiere deshalb nicht möglich.

Tab. 9.4.2.: Tier- und Organgewichte - Studie zur Verteilung von TCP in verschiedene Hirnareale (Fortsetzung).¹

Tier ²	Gewicht [g]	Zeit [min]	App.	CSF	Blut	Gehirnteile [mg]					
						Bulbus	Medulla	Cerebellum	Cortex	Mesen- cephalon	Thalamus
A009	275	20	i.n.	x**	x	80	230	300	850	420	180
A010	280	20	i.n.	x***	x	90	220	330	930	390	180
A011	275	20	i.n.	x**	x	80	240	290	790	450	160
A017	280	70	i.n.	x***	x	70	230	310	800	410	160
A018	250	70	i.n.	--	x	90	250	320	870	380	160
A019	235	195	i.n.	--	x	70	210	290	720	480	140
A020	290	130	i.n.	x*	x	90	240	320	950	400	140
A021	250	195	i.n.	x**	x	80	170	290	650	390	200
A022	253	70	i.n.	--	x	100	250	320	890	380	170
A023	280	130	i.n.	--	x	100	240	330	820	420	180
A024	325	130	i.n.	--	x	80	230	340	880	410	160
A025	285	195	i.n.	--	x	90	240	320	910	370	160
A041	225	70	i.n.	--	x	90	230	310	840	360	180
A042	245	195	i.n.	x***	x	90	240	310	770	420	170
A043	--	130	i.n.	x*	x	90	220	310	760	420	190
T019	223	2	i.n.	x	x	90	210	270	890	350	150
T020	212	2	i.n.	x*	x	90	210	270	820	330	110
T021	203	2	i.n.	x	x	90	210	320	890	420	110
T022	223	10	i.n.	x***	x	80	200	270	840	370	190
T023	207	10	i.n.	x***	x	80	200	300	880	370	200
T024	221	10	i.n.	--	x	80	210	300	700	420	180
MW ± SD	252 ± 33					86 ± 8	223 ± 20	306 ± 20	831 ± 78	398 ± 35	165 ± 25

Tab. 9.4.3.: Tier- und Organgewichte - ZNS-Verteilung von Baclofen.¹

Tiernummer	Gewicht [g]	Zeit [min]	Applikation	CSF	Blut	Hirn [g]
A026	290	65	i.p.	x*	x	2,13
A027	325	75	i.p.	--	x	2,12
A028	305	15	i.p.	x	x	2,11
A029	330	20	i.p.	x**	x	2,25
A030	320	25	i.p.	--	x	2,18
A031	320	70	i.p.	x*	x	2,23
T117	304	5	i.p.	x*	x	2,03
T118	300	5	i.p.	x	x	2,09
T119	318	5	i.p.	x	x	2,15
MW ± SD	312 ± 13					2,14 ± 0,07

¹ Die Erklärung der in den Tabellen des Abschnitts 9.4. verwendeten Abkürzungen und Symbole folgt am Ende des Kapitels 9.4.

² Alle Hirngewebeproben von Tieren, die mit „A“ bezeichnet sind, wurden nicht mit Ascorbinsäure stabilisiert (s. Abschnitt 6.2.3.). Aufgrund der Instabilität des (+)-TCP bei der Probengewinnung, -homogenisierung und -aufarbeitung ist eine Angabe der (+)-TCP-Konzentration in den Gehirnarealen dieser Versuchstiere deshalb nicht möglich.

Tab. 9.4.3.: Tier- und Organgewichte - ZNS-Verteilung von Baclofen (Fortsetzung).¹

Tiernummer	Gewicht [g]	Zeit [min]	Applikation	CSF	Blut	Hirn [g]
A032	295	75	i.n.	x*	x	2,03
A033	320	20	i.n.	x	x	2,06
A034	325	20	i.n.	x*	x	2,33
A035	280	70	i.n.	--	x	2,19
A036	285	70	i.n.	x***	x	2,06
A037	270	20	i.n.	x**	x	2,10
A038	225	70	i.n.	--	x	2,05
T120	291	5	i.n.	x*	x	1,97
T121	306	5	i.n.	x*	x	2,17
T122	277	5	i.n.	--	x	1,94
MW ± SD	287 ± 28					2,09 ± 0,11

Tab. 9.4.4.: Tier- und Organgewichte - In-vivo-Stabilität der Baclofenester-Derivate.¹

Tiernummer	Derivat	Gewicht [g]	Zeit [min]	Applikation	CSF	Blut	Hirn [g]
T006	Bac-M	233	60	i.p.	x	x	2,04
T007	Bac-M	218	20	i.p.	x	x	1,84
T008	Bac-M	233	20	i.p.	--	x	2,05
T009	Bac-M	198	60	i.p.	x	x	2,00
T010	Bac-M	223	20	i.p.	x	x	1,92
T011	Bac-M	195	60	i.p.	x	x	1,85
T087	Bac-M	255	5	i.p.	x	x	1,99
T088	Bac-M	275	5	i.p.	x	x	2,03
T089	Bac-M	255	5	i.p.	x	x	1,94
MW ± SD		236 ± 29					1,96 ± 0,08
T025	Bac-M	--	60	i.n.	x	x	1,94
T026	Bac-M	222	20	i.n.	x	x	1,95
T027	Bac-M	219	60	i.n.	x	x	1,97
T028	Bac-M	204	60	i.n.	x	x	1,76
T029	Bac-M	219	20	i.n.	x	x	1,94
T030	Bac-M	270	20	i.n.	x	x	2,02
T096	Bac-M	302	5	i.n.	x	x	1,85
T097	Bac-M	288	5	i.n.	x	x	2,03
T098	Bac-M	296	5	i.n.	x	x	2,01
MW ± SD		255 ± 39					1,94 ± 0,08
T012	Bac-E	222	20	i.p.	x	x	1,86
T013	Bac-E	195	60	i.p.	x	x	1,95
T014	Bac-E	214	60	i.p.	x	x	1,89
T015	Bac-E	196	20	i.p.	x	x	1,88
T016	Bac-E	211	20	i.p.	x	x	1,91
T017	Bac-E	211	60	i.p.	x	x	2,01
T090	Bac-E	266	5	i.p.	x	x	1,91
T091	Bac-E	291	5	i.p.	x	x	2,05
T092	Bac-E	305	5	i.p.	x	x	2,04
MW ± SD		239 ± 41					1,94 ± 0,07

¹ Die Erklärung der in den Tabellen des Abschnitts 9.4. verwendeten Abkürzungen und Symbole folgt am Ende des Kapitels 9.4.

Tab. 9.4.4.: Tier- und Organgewichte - In-vivo-Stabilität der Baclofenester-Derivate (Fortsetzung).¹

Tiernummer	Derivat	Gewicht [g]	Zeit [min]	Applikation	CSF	Blut	Hirn [g]
T037	Bac-E	259	20	i.n.	x	x	1,92
T038	Bac-E	271	20	i.n.	x	x	2,02
T039	Bac-E	261	20	i.n.	x	x	2,16
T040	Bac-E	257	60	i.n.	x	x	1,98
T041	Bac-E	260	60	i.n.	x	x	2,03
T042	Bac-E	265	60	i.n.	x	x	2,07
T099	Bac-E	281	5	i.n.	x	x	2,02
T100	Bac-E	257	5	i.n.	x	x	2,09
T101	Bac-E	265	5	i.n.	x	x	1,97
MW ± SD		265 ± 8					2,02 ± 0,07
T031	Bac-1P	229	20	i.p.	x	x	1,89
T032	Bac-1P	216	20	i.p.	x	x	2,01
T033	Bac-1P	230	20	i.p.	x	x	1,98
T034	Bac-1P	235	60	i.p.	x	x	2,08
T035	Bac-1P	221	60	i.p.	x	x	1,97
T036	Bac-1P	232	60	i.p.	x	x	1,98
T093	Bac-1P	286	5	i.p.	--	x	2,14
T094	Bac-1P	257	5	i.p.	x	x	2,06
T095	Bac-1P	265	5	i.p.	x	x	1,97
MW ± SD		245 ± 25					2,00 ± 0,07
T049	Bac-1P	254	20	i.n.	x	x	2,00
T050	Bac-1P	230	20	i.n.	x	x	1,90
T051	Bac-1P	239	20	i.n.	x	x	1,98
T052	Bac-1P	279	60	i.n.	x	x	2,10
T053	Bac-1P	243	60	i.n.	x	x	1,86
T054	Bac-1P	235	60	i.n.	x	x	1,92
T102	Bac-1P	261	5	i.n.	x	x	1,91
T103	Bac-1P	266	5	i.n.	x	x	1,87
T104	Bac-1P	270	5	i.n.	x	x	2,08
MW ± SD		253 ± 17					1,96 ± 0,09
T043	Bac-2P	256	20	i.p.	x	x	1,93
T044	Bac-2P	213	60	i.p.	x	x	1,95
T045	Bac-2P	224	60	i.p.	x	x	1,98
T046	Bac-2P	238	20	i.p.	x	x	2,03
T047	Bac-2P	253	60	i.p.	x	x	2,00
T048	Bac-2P	254	20	i.p.	x	x	1,92
T105	Bac-2P	280	5	i.p.	x	x	1,99
T106	Bac-2P	294	5	i.p.	x	x	2,11
T107	Bac-2P	332	5	i.p.	x	x	2,19
MW ± SD		260 ± 37					2,01 ± 0,09
T055	Bac-2P	258	20	i.n.	x	x	1,91
T056	Bac-2P	267	60	i.n.	x	x	1,99
T057	Bac-2P	284	20	i.n.	x	x	2,10
T058	Bac-2P	249	20	i.n.	x	x	1,97
T059	Bac-2P	277	60	i.n.	x	x	2,05
T060	Bac-2P	197	60	i.n.	x	x	1,97
T108	Bac-2P	297	5	i.n.	x	x	2,10
T109	Bac-2P	319	5	i.n.	x	x	2,06
T110	Bac-2P	286	5	i.n.	x	x	2,00
MW ± SD		270 ± 35					2,02 ± 0,06

¹ Die Erklärung der in den Tabellen des Abschnitts 9.4. verwendeten Abkürzungen und Symbole folgt am Ende des Kapitels 9.4.

Tab. 9.4.4.: Tier- und Organgewichte - In-vivo-Stabilität der Baclofenester-Derivate (Fortsetzung).¹

Tiernummer	Derivat	Gewicht [g]	Zeit [min]	Applikation	CSF	Blut	Hirn [g]
T061	Bac-B	274	20	i.p.	x	x	1,91
T062	Bac-B	280	60	i.p.	x	x	1,85
T063	Bac-B	257	20	i.p.	x	x	2,05
T064	Bac-B	253	60	i.p.	x	x	2,12
T065	Bac-B	245	20	i.p.	x	x	1,91
T066	Bac-B	257	60	i.p.	x	x	2,00
T111	Bac-B	278	5	i.p.	x	x	2,01
T112	Bac-B	285	5	i.p.	x	x	2,07
T113	Bac-B	274	5	i.p.	x	x	1,76
MW ± SD		267 ± 14					1,96 ± 0,12
T067	Bac-B	259	20	i.n.	x	x	1,93
T068	Bac-B	266	60	i.n.	x	x	1,99
T069	Bac-B	231	20	i.n.	x	x	1,98
T070	Bac-B	215	20	i.n.	x	x	1,93
T071	Bac-B	269	60	i.n.	x	x	2,00
T072	Bac-B	208	60	i.n.	x	x	2,08
T114	Bac-B	305	5	i.n.	x	x	1,95
T115	Bac-B	291	5	i.n.	x	x	2,02
T116	Bac-B	296	5	i.n.	x	x	2,07
MW ± SD		260 ± 35					1,99 ± 0,06

Tab. 9.4.5.: Tier- und Organgewichte - Individuelle Konzentrations-Zeit-Profile.¹

Derivat	Tiernummer	Gewicht [g]	CSF	Hirn [g]
Baclofen	A	308	x***	1,97
	B	313	x**	1,93
	C	356	x	2,22
MW ± SD		326 ± 26		2,04 ± 0,16
Bac-M	A	327	x*	2,16
	B	333	--	2,09
	C	309	x*	2,06
MW ± SD		323 ± 12		2,10 ± 0,05
Bac-E	A	307	x	1,89
	B	317	x	1,97
	C	318	x	1,93
MW ± SD		314 ± 6		1,93 ± 0,04
Bac-1P	A	337	x***	2,12
	B	302	x	2,06
	C	304	--	2,06
MW ± SD		314 ± 20		2,08 ± 0,03
Bac-2P	A	374	x	2,01
	B	319	x	2,12
	C	321	--	1,92
MW ± SD		338 ± 31		2,02 ± 0,10
Bac-B	A	306	x	2,02
	B	327	x	2,12
	C	310	x***	1,98
MW ± SD		314 ± 11		2,04 ± 0,07

¹ Die Erklärung der in den Tabellen des Abschnitts 9.4. verwendeten Abkürzungen und Symbole folgt am Ende des Kapitels 9.4.

Tab. 9.4.6.: Tier- und Organgewichte - Verteilung von Indometacin in verschiedene Hirnareale.

Tier	Gewicht [g]	Zeit [min]	App.	CSF	Blut	Gehirnteile					
						Bulbus	Mesen- cephalon	Cortex	Cerebellum	Medulla	Thalamus
T083 ¹	265	2	i.p.	x	x	100	330	890	300	220	180
T084 ¹	251	2	i.p.	x*	x	100	340	860	310	240	170
T085 ¹	255	20	i.p.	x**	x	100	300	890	290	220	170
T086 ¹	262	10	i.p.	x*	x	100	390	850	300	220	150
T141	269	2	i.p.	x*	x	110	350	930	300	210	170
T142	258	10	i.p.	x	x	100	320	930	300	240	170
T143	274	20	i.p.	x*	x	90	300	890	300	260	170
T144	282	10	i.p.	x*	x	120	310	930	320	210	170
T145	282	20	i.p.	x	x	90	340	850	300	210	220
T146	272	60	i.p.	x	x	90	350	830	290	220	170
T147	281	60	i.p.	x	x	90	360	890	290	230	150
T148	294	60	i.p.	x**	x	100	340	960	290	250	160
MW ± SD	270 ± 13					99 ± 9	336 ± 26	892 ± 40	299 ± 9	228 ± 17	171 ± 18
T189	271	2	i.n.	x	x	90	390	910	280	240	90
T190	293	60	i.n.	x*	x	110	350	820	310	230	190
T191	246	60	i.n.	x*	x	90	360	890	300	230	200
T192	270	20	i.n.	x***	x	100	320	940	320	240	150
T193	267	10	i.n.	x**	x	120	340	880	290	200	170
T194	265	20	i.n.	x***	x	90	330	870	280	210	150
T195	267	2	i.n.	x*	x	120	350	890	280	210	160
T196	303	2	i.n.	x*	x	110	430	910	300	220	180
T197	265	10	i.n.	x	x	110	360	910	260	210	160
T198	305	10	i.n.	x	x	140	440	910	340	260	170
T199	252	20	i.n.	x**	x	90	390	820	290	220	130
T200	--	60	i.n.	x*	x	80	400	930	330	210	170
MW ± SD	273 ± 19					104 ± 17	372 ± 38	890 ± 38	298 ± 23	223 ± 17	160 ± 29

i.n. nasale Applikation

i.p. Applikation in das Peritoneum

i.v. intravenöse Applikation

x Probe wurde isoliert

-- Isolierung der Probe war aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung nicht möglich.

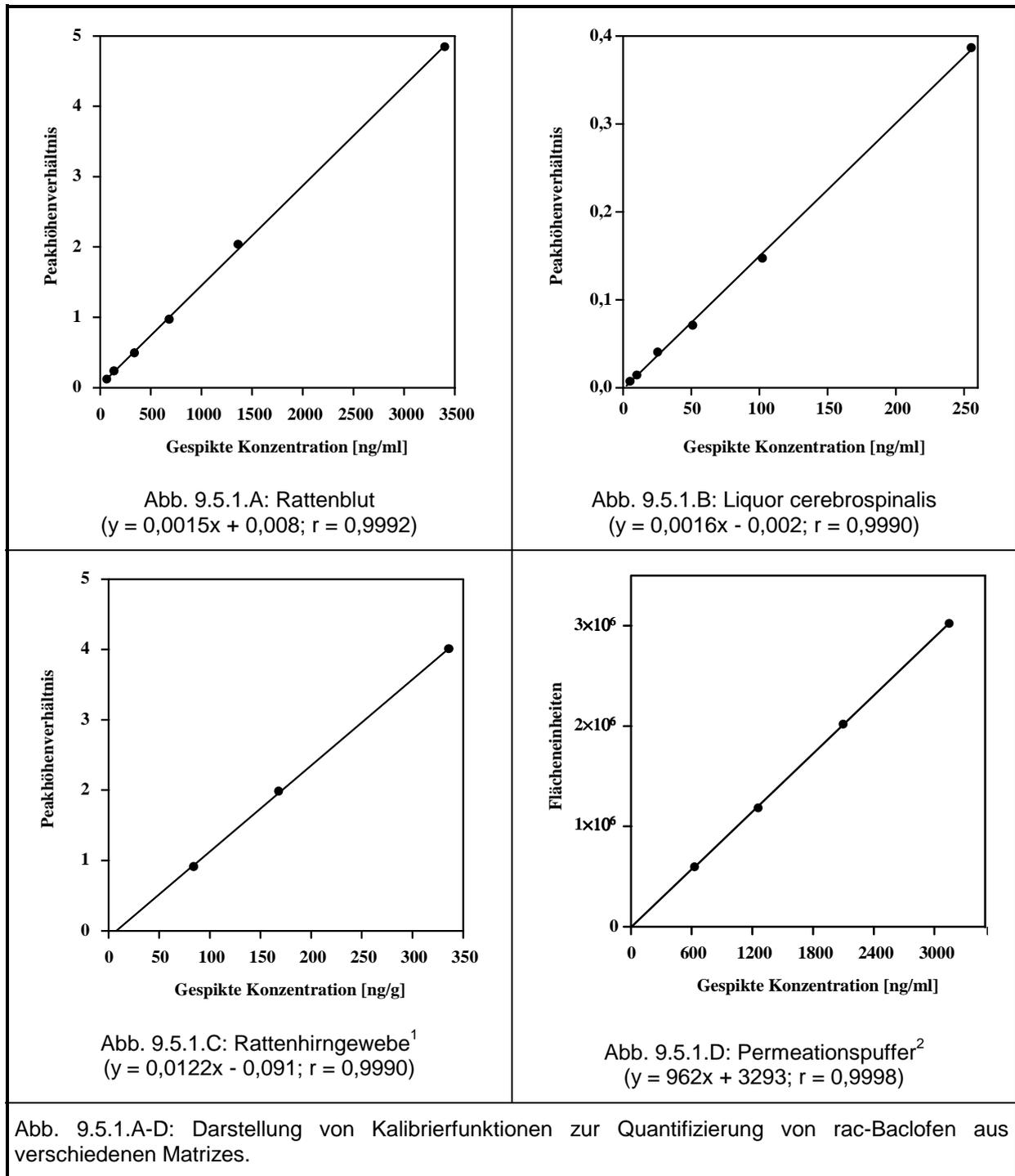
* geringe Blutkontamination im CSF

** mäßige Blutkontamination im CSF

*** deutlich sichtbare Blutkontamination im CSF

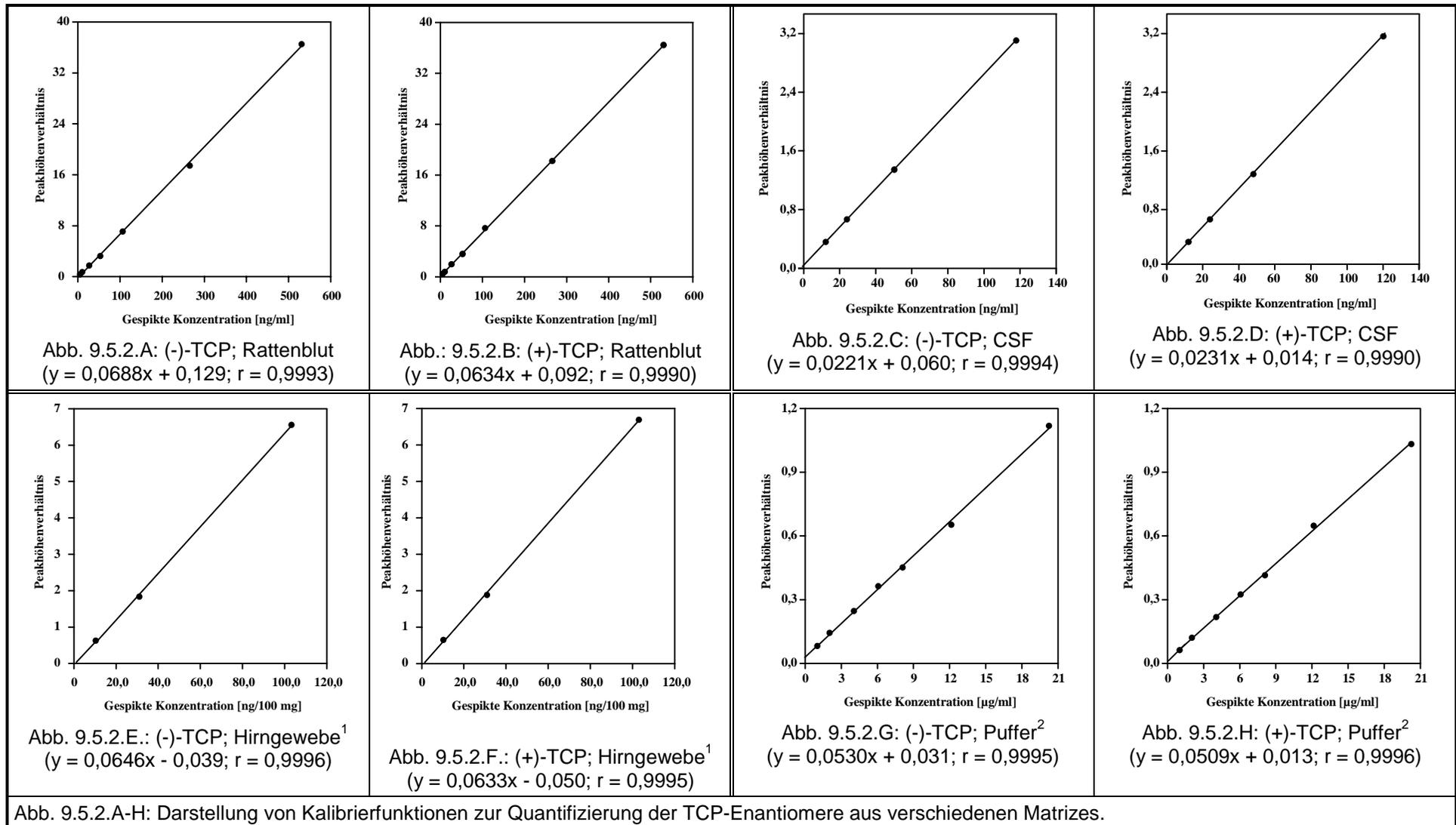
¹ Nicht stabilisiert (s. Abschnitt 6.2.3.).

9.5. Darstellung von Kalibrierfunktionen zur Quantifizierung des rac-Baclofen bzw. der Tranlycypromin-Enantiomere aus verschiedenen Matrices



¹ Die Konzentrationsangaben beziehen sich immer auf den freien Wirkstoff (Base), bezogen auf die Gewichtseinheit an Gewebe, nicht Gewebehomogenat.

² Zur Zusammensetzung siehe Abschnitt 8.2.2.



¹ Die Konzentrationsangaben beziehen sich immer auf den freien Wirkstoff (Base), bezogen auf die Gewichtseinheit an Gewebe, nicht Gewebehomogenat.

² Zur Zusammensetzung siehe Abschnitt 8.2.2.

9.6. Einzelwerte aus den kinetischen Studien zum Kokain und Benzoylecgonin

9.6.1. Konzentrationen in Blut, CSF und Hirngewebe

Tab. 9.6.1.: Kokainkonzentrationen in Blut, CSF (ng/ml) und Gesamthirngewebe (ng/g)¹ der Ratte des entsprechenden Zeitpunkts nach verschiedenen Applikationsvarianten von 0,5 mg/kg KG Kokain bei den Ratten 1-3, sowie Mittelwerte und Standardabweichung.

Entnahmezeit [min]	Blut [ng/ml]				Liquor [ng/ml]				Hirngewebe [ng/g]			
	1	2	3	MW ± SD	1	2	3	MW ± SD	1	2	3	MW ± SD
i.v.-Applikation												
2	305	420	303	343 ± 67	294	219	375	290 ± 69	2568	1993	2071	2211 ± 312
10	123	179	161	154 ± 29	115	175	178	156 ± 36	1192	1645	1457	1431 ± 228
20	93	100	76	90 ± 12	143	93	93	110 ± 29	601	589	759	650 ± 95
60	30	37	24	30 ± 7	31	20	21	24 ± 6	209	212	184	202 ± 15
i.p.-Applikation												
2	35	29	17	27 ± 9	7	15	4	9 ± 6	94	168	49	104 ± 60
10	31	29	104	54 ± 43	31	39	20	30 ± 10	171	244	233	216 ± 39
20	-- ²	28	34	31 ± 4	-- ²	12	14	13 ± 1	-- ²	113	137	125 ± 17
60	14	19	14	16 ± 3	8	15	8	10 ± 4	70	78	93	80 ± 12
i.n.-Applikation												
2	39	44	39	41 ± 3	23	68	-- ³	46 ± 32	615	1004	600	740 ± 229
10	54	67	61	61 ± 6	99	123	109	110 ± 12	801	1022	959	927 ± 114
20	90	109	56	85 ± 27	79	74	98	84 ± 13	810	1018	798	875 ± 124
60	26	20	23	23 ± 3	15	12	7	11 ± 4	212	229	138	193 ± 48

Tab. 9.6.2.: Aus den mittleren Konzentrationen abgeschätzte pharmakokinetische Parameter für Kokain in den verschiedenen untersuchten Matrices.⁴

Matrix	i.v.-Applikation		i.p.-Applikation		i.n.-Applikation	
	terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min ⁻¹]	terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min ⁻¹]	terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min ⁻¹]
Blut	22	0,032	32	0,022	21	0,033
CSF	19	0,037	40	0,017	14	0,050
Gesamthirn	20	0,035	40	0,017	18	0,039

¹ Die Konzentrationsangaben beziehen sich immer auf den freien Wirkstoff (Base), bezogen auf die Gewichtseinheit an Gewebe, nicht Gewebehomogenat.

² Versuchstier während der Untersuchung verstorben.

³ Liquor-Entnahme nicht gelungen.

⁴ Abgeschätzt aus den Mittelwerten der letzten beiden Datenpunkten.

Tab. 9.6.3.: BE-Konzentrationen in Blut, CSF (ng/ml) und Gesamthirngewebe (ng/g)¹ der Ratte des entsprechenden Zeitpunkts nach verschiedenen Applikationsvarianten von 0,5 mg/kg KG Kokain bei den Ratten 1-3, sowie Mittelwerte und Standardabweichung.

Entnahmezeit [min]	Blut [ng/ml]				Liquor [ng/ml]				Hirngewebe [ng/g]			
	1	2	3	MW ± SD	1	2	3	MW ± SD	1	2	3	MW ± SD
i.v.-Applikation												
2	2	2	2	2 ± 0	< 10	< 10	< 10	--	15	14	11	13 ± 2
10	2	3	2	2 ± 1	< 10	< 10	< 10	--	15	15	14	15 ± 1
20	2	3	3	3 ± 1	< 10	< 10	< 10	--	15	15	15	15 ± 0
60	3	2	2	2 ± 1	< 10	< 10	< 10	--	16	16	12	15 ± 2
i.p.-Applikation												
2	2	2	3	2 ± 1	< 10	< 10	< 10	--	7	7	7	7 ± 0
10	3	1	6	3 ± 3	< 10	< 10	< 10	--	7	7	8	7 ± 1
20	-- ²	4	7	4 ± 3	-- ²	< 10	< 10	--	-- ²	6	7	6 ± 1
60	5	4	4	4 ± 1	< 10	< 10	< 10	--	8	8	6	7 ± 1
i.n.-Applikation												
2	2	1	1	1 ± 1	< 10	< 10	-- ³	--	7	7	8	7 ± 1
10	3	3	4	3 ± 1	< 10	< 10	< 10	--	7	8	8	8 ± 1
20	5	5	5	5 ± 0	< 10	< 10	< 10	--	6	7	8	7 ± 1
60	5	6	6	6 ± 1	< 10	< 10	< 10	--	9	10	9	9 ± 1

9.6.2. Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten nach Kokain-Applikation

Tab. 9.6.4.: Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten der Ratte nach der Gabe von 0,5 mg/kg KG Kokain auf verschiedenen Applikationswegen (n = 3).

Zeit [min]	Hirngewebe/Blut-Quotienten				CSF/Blut-Quotienten			
	1	2	3	MW ± SD	1	2	3	MW ± SD
i.v.-Applikation								
2	8,4	4,8	6,8	6,7 ± 1,8	1,0	0,5	1,2	0,9 ± 0,3
10	9,7	9,2	9,1	9,3 ± 0,3	0,9	1,0	1,1	1,0 ± 0,1
20	6,5	7,6	7,8	7,3 ± 0,7	1,5	0,9	1,2	1,2 ± 0,3
60	7,0	5,7	7,7	6,8 ± 1,0	1,0	0,5	0,9	0,8 ± 0,3
i.p.-Applikation								
2	2,7	5,8	2,8	3,8 ± 1,7	0,2	0,5	0,2	0,3 ± 0,2
10	5,9	8,4	2,3	5,5 ± 3,1	1,0	1,3	0,2	0,8 ± 0,6
20	-- ⁴	4,0	4,0	4,0 ± 0	-- ³	0,4	0,4	0,4 ± 0
60	5,0	4,1	6,6	5,3 ± 1,3	0,6	0,8	0,6	0,6 ± 0,1
i.n.-Applikation								
2	15,8	22,8	15,4	18,0 ± 4,2	0,6	1,6	-- ³	1,1 ± 0,7
10	14,8	15,3	15,7	15,3 ± 0,5	1,8	1,8	1,8	1,8 ± 0
20	9,0	9,3	14,3	10,9 ± 2,9	0,9	0,7	1,8	1,1 ± 0,6
60	8,2	11,5	6,0	8,5 ± 2,8	0,6	0,6	0,3	0,5 ± 0,2

¹ Die Konzentrationsangaben beziehen sich immer auf den freien Wirkstoff (Base), bezogen auf die Gewichtseinheit an Gewebe, nicht Gewebehomogenat.

² Versuchstier während der Untersuchung verstorben.

³ Liquor-Entnahme nicht gelungen.

⁴ Aufgrund fehlender Daten (s. Tab. 9.6.1.) ist die Quotienten-Berechnung nicht möglich.

9.7. Daten aus kinetischen Studien zum Tranlycypromin einschließlich der kinetischen Auswertung

9.7.1. Tranlycypromin-Blutkonzentrations-Zeit-Verläufe¹

Tab. 9.7.1.: TCP-Blutkonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP (n = 4) auf verschiedenen Applikationswegen (Konzentration in ng/ml; Mittelwerte ± Standardabweichung).

Zeit [min]	i.v.-Applikation		i.n.-Applikation	
	(-)-TCP	(+)-TCP	(-)-TCP	(+)-TCP
5	890 ± 131	1150 ± 96	38 ± 8	39 ± 10
10	200 ± 17	280 ± 31	92 ± 13	105 ± 14
25	105 ± 20	200 ± 24	58 ± 11	63 ± 15
40	90 ± 15	140 ± 24	40 ± 9	50 ± 8
60	76 ± 11	110 ± 13	42 ± 10	40 ± 7
120	40 ± 7	84 ± 11	10 ± 5	14 ± 5
180	25 ± 5	59 ± 8	11 ± 3	11 ± 2
240	11 ± 4	29 ± 6	7 ± 3	8 ± 3

9.7.2. Untersuchung der Gewebeverteilung nach Applikation von Tranlycypromin A: Verteilung in verschiedene Hirnareale (Gemessene Konzentrationen in Blut, CSF und Geweben)

Tab. 9.7.2.: TCP-Konzentrationen im Rattenblut und Ratten-CSF nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP bei den Ratten Nr. 1-3 bzw. 4 und 5 (n = 3-5).

Zeit [min]	Blut [ng/ml]						CSF [ng/ml]					
	1	2	3	4	5	MW ± SD	1	2	3	4	5	MW ± SD
i.p.-Applikation												
(-)-TCP												
2	110	55	196			120 ± 71	< 5,0	< 5,0	8,9			3 ± 5
10	136	102	-- ²			119 ± 24	-- ³	-- ³	-- ²			
20	98	-- ²	57	47	60	65 ± 22	-- ³	-- ²	-- ³	-- ³	-- ³	
70	64	47	34			48 ± 15	-- ³	17,7	19,3			19 ± 1
130	11	10	13			11 ± 1	7,5	-- ³	5,6			7 ± 1
195	21	16	8			15 ± 7	-- ³	6,4	< 5,0			3 ± 5
(+)-TCP												
2	191	116	348			218 ± 118	< 5,0	8,4	6,3			5 ± 4
10	209	133	-- ²			172 ± 53	-- ³	-- ³	-- ²			
20	119	-- ²	80	82	90	93 ± 18	-- ³	-- ²	-- ³	-- ³	-- ³	
70	75	54	50			59 ± 14	-- ³	11,2	7,6			9 ± 3
130	13	9	11			11 ± 2	8,0	-- ³	< 5,0			4 ± 6
195	6	12	9			9 ± 3	-- ³	5,5	< 5,0			3 ± 4

¹ Die Werte und die entsprechenden pharmakokinetischen Parameter sind einer der Arbeit von Langguth und Spahn-Langguth [1995] entnommen. Die entsprechenden Untersuchungen waren ebenfalls an mit Urethan narkotisierten Ratten durchgeführt worden.

² Versuchstier während der Untersuchung verstorben.

³ Liquor-Entnahme nicht gelungen.

Tab. 9.7.2.: TCP-Konzentrationen im Rattenblut und Ratten-CSF nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP bei den Ratten Nr. 1-3 bzw. 4 und 5 (n = 3-5; Fortsetzung).

Zeit [min]	Blut [ng/ml]						CSF [ng/ml]					
	1	2	3	4	5	MW ± SD	1	2	3	4	5	MW ± SD
i.n.-Applikation												
(-)-TCP												
2	101	64	175			113 ± 56	41,1	17,8	21,1			27 ± 13
10	114	99	84			99 ± 15	32,4	< 5,0	36,5			23 ± 20
20	31	47	43			40 ± 8	23,4	31,6	32,1			29 ± 5
70	14	44	43	31		33 ± 14	20,5	-- ¹	-- ¹	-- ¹		
130	8	9	22	14		13 ± 7	< 5,0	-- ¹	-- ¹	10,0		5 ± 7
195	16	3	12	13		11 ± 6	< 5,0	-- ¹	-- ¹	15,9		8 ± 11
(+)-TCP												
2	170	129	282			194 ± 79	30,1	19,1	13,8			21 ± 8
10	219	141	124			161 ± 51	26,6	15,1	19,7			21 ± 6
20	40	53	52			49 ± 7	11,3	26,8	21,3			20 ± 8
70	11	45	50	26		33 ± 18	7,8	-- ¹	-- ¹	-- ¹		
130	8	9	13	10		10 ± 2	< 5,0	-- ¹	-- ¹	< 5,0		< 3
195	10	3	3	8		6 ± 3	< 5,0	-- ¹	-- ¹	10,5		5 ± 7

Tab. 9.7.3.: TCP-Konzentrationen [ng/g] in verschiedenen Gehirnbereichen der Ratte nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP (n = 3-5).

Zeit [min]	i.p.-Applikation						i.n.-Applikation				
	1	2	3	4	5	MW ± SD	1	2	3	4	MW ± SD
Bulbus olfactorius											
(-)-TCP											
2	372	205	393			323 ± 103	460	376	859		565 ± 258
10	533	317	-- ²			425 ± 153	498	385	568		484 ± 92
20	597	316	329	221	210	335 ± 156	352	345	477		391 ± 74
70	200	114	183			166 ± 46	127	140	132	112	128 ± 12
130	81	70	59			70 ± 11	38	42	85	77	61 ± 24
195	23	54	42			48 ± 16	45	22	27	47	35 ± 13
(+)-TCP											
2	205	115	166			162 ± 45	217	195	563		325 ± 206
10	250	129	-- ²			190 ± 86	270	187	275		244 ± 49
Cerebellum											
(-)-TCP											
2	401	286	509			399 ± 112	478	401	640		506 ± 121
10	636	388	-- ²			512 ± 175	589	312	518		473 ± 144
20	595	283	356	283	317	367 ± 131	342	500	390		411 ± 81
70	270	130	225			208 ± 71	133	168	184	119	151 ± 30
130	82	77	84			81 ± 4	44	62	115	98	80 ± 33
195	39	49	49			46 ± 6	45	30	28	54	39 ± 12
(+)-TCP											
2	225	136	201			187 ± 46	227	174	417		273 ± 128
10	291	149	-- ²			220 ± 100	310	142	199		217 ± 85

¹ Liquor-Entnahme nicht gelungen.

² Versuchstier während der Untersuchung verstorben.

Tab. 9.7.3.: TCP-Konzentrationen [ng/g] in verschiedenen Gehirnbereichen der Ratte nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP (n = 3-5; Fortsetzung).

Zeit [min]	i.p.-Applikation						i.n.-Applikation				
	1	2	3	4	5	MW ± SD	1	2	3	4	MW ± SD
Cortex											
(-)-TCP											
2	506	369	557			477 ± 97	771	435	746		651 ± 187
10	1115	566	-- ¹			841 ± 388	525	567	563		552 ± 23
20	850	432	506	426	579	559 ± 175	504	692	534		577 ± 101
70	425	207	330			321 ± 109	186	247	304	209	237 ± 52
130	101	96	102			100 ± 3	77	85	142	140	111 ± 35
195	40	64	58			54 ± 12	74	50	126	83	83 ± 32
(+)-TCP											
2	270	178	211			220 ± 47	324	181	439		315 ± 129
10	491	230	-- ¹			361 ± 185	250	233	212		232 ± 19
Medulla oblongata											
(-)-TCP											
2	508	247	584			446 ± 177	517	367	741		542 ± 188
10	754	479	-- ¹			617 ± 194	575	457	685		572 ± 114
20	487	371	348	300	317		418	590	424		477 ± 98
70	285	157	231			365 ± 74	145	221	272	174	203 ± 56
130	81	84	68			224 ± 64	60	93	127	119	100 ± 30
195	52	75	51			78 ± 9	75	38	47	72	58 ± 18
(+)-TCP											
2	293	137	236			222 ± 79	256	173	481		303 ± 159
10	370	209	-- ¹			290 ± 114	309	206	263		259 ± 52
Mesencephalon											
(-)-TCP											
2	582	297	678			519 ± 198	683	388	756		609 ± 195
10	899	590	-- ¹			745 ± 218	659	476	646		594 ± 102
20	665	398	388	275	358	415 ± 143	415	680	470		522 ± 140
70	76	153	243			157 ± 84	143	214	36	107	125 ± 74
130	75	72	68			72 ± 4	55	67	126	106	89 ± 33
195	271	58	55			128 ± 124	60	31	30	64	46 ± 18
(+)-TCP											
2	329	160	261			250 ± 85	319	167	457		314 ± 145
10	431	255	-- ¹			343 ± 124	338	223	257		273 ± 59
Thalamus											
(-)-TCP											
2	433	275	432			380 ± 91	564	431	552		516 ± 74
10	681	420	-- ¹			551 ± 185	674	391	633		566 ± 153
20	639	421	421	322	457	452 ± 116	444	510	506		487 ± 37
70	359	170	321			283 ± 100	183	219	209	150	190 ± 31
130	91	96	96			94 ± 3	90	96	118	-- ²	101 ± 15
195	64	70	62			65 ± 4	45	30	53	89	54 ± 25
(+)-TCP											
2	230	138	160			176 ± 48	250	181	318		250 ± 69
10	288	168	-- ¹			228 ± 85	315	172	228		238 ± 72

¹ Versuchstier während der Untersuchung verstorben.² Detektorschaden.

Tab. 9.7.4.: Aus den mittleren Konzentrationen abgeschätzte pharmakokinetische Parameter in verschiedenen Gehirnbereichen, sowie Blut und CSF aus der Untersuchung zur Gewebeverteilung nach Applikation von Tranlycypromin (s. Tab. 9.7.2.-9.7.3.).¹

Organsegment (-)-TCP ²		i.p.-Applikation		i.n.-Applikation	
		Terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminations- geschwindigkeitskonstante [min ⁻¹]	Terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminations- geschwindigkeitskonstante [min ⁻¹]
Bulbus olfactorius		70	0,010	67	0,010
Cerebellum		58	0,012	64	0,011
Cortex		49	0,014	83	0,008
Medulla oblongata		56	0,012	69	0,010
Mesencephalon		94	0,007	86	0,008
Thalamus		59	0,012	69	0,010
Blut	(-)-TCP	76	0,009	80	0,009
	(+)-TCP	47	0,015	51	0,014
CSF	(-)-TCP	65	0,011	73	0,009
	(+)-TCP	79	0,009	-- ³	-- ³

9.7.3. Untersuchung der Gewebeverteilung nach Applikation von Tranlycypromin B: (-)-Tranlycypromin/(+)-Tranlycypromin-Quotienten

Tab. 9.7.5.: (-)/(+)-TCP-Verhältnisse im Blut und CSF in Abhängigkeit von der Zeit bei i.p.- und i.n.-Gabe (n = 3-5).

Zeit [min]	i.p.-Applikation						i.n.-Applikation				
	1	2	3	4	5	MW ± SD	1	2	3	4	MW ± SD
Blut											
2	0,58	0,47	0,56			0,54 ± 0,06	0,59	0,50	0,62		0,57 ± 0,06
10	0,65	0,77	-- ⁴			0,71 ± 0,08	0,52	0,70	0,68		0,63 ± 0,10
20	0,82	-- ³	0,71	0,57	0,67	0,69 ± 0,10	0,78	0,89	0,83		0,83 ± 0,06
70	0,85	0,87	0,68			0,80 ± 0,10	1,27	0,98	0,86	1,19	1,08 ± 0,19
130	0,85	1,11	1,18			1,05 ± 0,17	1,00	1,00	1,83	1,40	1,31 ± 0,04
195	3,50	1,33	0,89			1,91 ± 1,40	1,60	1,00	4,00	1,63	2,05 ± 1,33
CSF											
2	<0,01	0,56	1,41			0,99 ± 0,60	1,37	0,93	1,53		1,28 ± 0,31
10	-- ³	-- ³	-- ³				1,21	<0,01	1,85		1,53 ± 0,45
20	-- ³	-- ³	-- ³	-- ³	-- ³		2,07	1,18	1,51		1,59 ± 0,45
70	--	1,58	2,54			2,06 ± 0,68	2,63	-- ³	-- ³	-- ³	
130	0,94	-- ³	1,70			1,32 ± 0,54	<0,01	-- ³	-- ³	<0,01	
195	-- ³	1,16	1,59			1,38 ± 0,30	<0,01	-- ³	-- ³	1,51	

¹ Errechnet aus den Mittelwerten der letzten drei Datenpunkte.

² Im Falle von (+)-TCP stand aufgrund der z.T. aufgetretenen Instabilität dieses Enantiomers im Hirngewebe keine ausreichende Anzahl von Datenpunkten zur Berechnung zur Verfügung.

³ Aufgrund der vorliegenden Datenlage war eine Berechnung nicht möglich.

⁴ Aufgrund fehlender Konzentrationswerte (s. Tab. 9.7.2. bzw. 9.7.3.) konnten keine abgeleiteten Größen berechnet werden.

Tab. 9.7.6.: (-)/(+)-TCP-Verhältnisse in verschiedenen anatomischen Untereinheiten des Ratten-ZNS (n = 3) in Abhängigkeit der Zeit und Applikationsart.

Zeit [min]	i.p.-Applikation				i.n.-Applikation			
	1	2	3	MW ± SD	1	2	3	MW ± SD
Bulbus olfactorius								
2	1,81	1,78	2,36	1,98 ± 0,33	2,12	1,93	1,53	1,86 ± 0,30
10	2,13	2,45	-- ¹	2,29 ± 0,23	1,84	2,06	2,07	1,99 ± 0,13
Cerebellum								
2	1,78	2,10	2,53	2,14 ± 0,38	2,11	2,30	1,53	1,98 ± 0,40
10	2,19	2,60	-- ¹	2,40 ± 0,29	1,90	2,20	2,60	2,23 ± 0,35
Cortex								
2	1,87	2,07	2,64	2,19 ± 0,40	2,38	2,40	1,70	2,16 ± 0,40
10	2,27	2,46	-- ¹	2,37 ± 0,13	2,10	2,43	2,66	2,40 ± 0,28
Medulla oblongata								
2	1,73	1,80	2,47	2,00 ± 0,41	2,02	2,12	1,54	1,89 ± 0,31
10	2,04	2,29	-- ¹	2,17 ± 0,18	1,86	2,22	2,60	2,23 ± 0,37
Mesencephalon								
2	1,76	1,86	2,60	2,07 ± 0,45	2,14	2,32	1,65	2,04 ± 0,35
10	2,09	2,31	-- ¹	2,20 ± 0,16	1,94	2,13	2,51	2,19 ± 0,29
Thalamus								
2	1,88	1,99	2,70	2,19 ± 0,45	2,26	2,16	1,99	2,14 ± 0,14
10	2,36	2,50	-- ¹	2,43 ± 0,10	2,14	2,27	2,20	2,20 ± 0,07

9.7.4. Untersuchung der Gewebeverteilung nach Applikation von Tranlycypromin C: Gewebe/Blut-Quotienten nach Applikation von Tranlycypromin

Tab. 9.7.7.: CSF/Blut-Quotienten nach Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP auf verschiedenen Applikationswegen (n = 3-5).

Zeit [min]	i.p.-Applikation						i.n.-Applikation				
	1	2	3	4	5	MW ± SD	1	2	3	4	MW ± SD
(-)-TCP											
2	-- ¹	0,08	0,05			0,07 ± 0,02	0,41	0,28	0,12		0,27 ± 0,14
10	-- ¹	-- ¹	-- ¹				0,28	-- ¹	0,44		0,36 ± 0,11
20	-- ¹	-- ¹	-- ¹	-- ¹	-- ¹		0,75	0,68	0,74		0,72 ± 0,04
70	-- ¹	0,38	0,56			0,47 ± 0,13	1,45	-- ¹	-- ¹	-- ¹	
130	0,66	-- ¹	0,45			0,56 ± 0,15	0,58	-- ¹	-- ¹	0,72	0,65 ± 0,10
195	-- ¹	0,40	0,53			0,47 ± 0,09	<0,01	-- ¹	-- ¹	1,19	
(+)-TCP											
2	-- ¹	0,07	0,02			0,05 ± 0,04	0,18	0,15	0,05		0,13 ± 0,07
10	-- ¹	-- ¹	-- ¹				0,12	0,11	0,16		0,13 ± 0,03
20	-- ¹	-- ¹	-- ¹	-- ¹	-- ¹		0,28	0,51	0,41		0,40 ± 0,12
70	--	0,21	0,15			0,18 ± 0,04	0,71	-- ¹	-- ¹	-- ¹	
130	0,63	-- ¹	0,31			0,47 ± 0,23	0,24	-- ¹	-- ¹	0,09	0,17 ± 0,11
195	-- ¹	0,45	0,30			0,38 ± 0,11	<0,01	-- ¹	-- ¹	1,35	

¹ Aufgrund fehlender Konzentrationswerte (s. Tab. 9.7.2. bzw. 9.7.3.) konnten keine abgeleiteten Größen berechnet werden.

Tab. 9.7.8.: Gewebe/Blut-Quotienten nach Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP auf verschiedenen Applikationswegen (n = 3-5).

Zeit [min]	i.p.-Applikation						i.n.-Applikation				
	1	2	3	4	5	MW ± SD	1	2	3	4	MW ± SD
Bulbus olfactorius											
(-)-TCP											
2	3,4	3,7	2,0			3,0 ± 0,9	4,6	5,8	4,9		5,1 ± 0,7
10	3,9	3,1	-- ¹			3,5 ± 0,6	4,4	3,9	6,8		5,0 ± 1,6
20	6,1	-- ¹	5,8	4,7	3,5	5,0 ± 1,2	11,3	7,4	11,0		9,9 ± 2,2
70	3,1	2,4	5,4			3,6 ± 1,6	9,0	3,2	3,0	3,6	4,7 ± 2,9
130	7,2	6,8	4,7			6,2 ± 1,3	5,0	4,7	3,8	5,5	4,8 ± 0,7
195	1,1	3,4	5,2			3,2 ± 2,1	2,8	7,3	2,3	3,5	2,9 ± 0,6
(+)-TCP											
2	1,1	1,0	0,5			0,9 ± 0,3	1,3	1,5	2,0		1,6 ± 0,5
10	1,2	1,0	-- ¹			1,1 ± 0,1	1,2	1,3	2,2		1,6 ± 0,4
Cerebellum											
(-)-TCP											
2	3,7	5,2	2,6			3,81 ± 1,3	4,8	6,2	3,7		4,9 ± 1,3
10	4,7	3,8	-- ¹			4,3 ± 0,6	5,2	3,2	6,2		4,9 ± 1,5
20	6,1	-- ¹	6,3	6,1	5,3	6,0 ± 0,4	11,0	10,7	9,0		10,2 ± 1,1
70	4,2	2,8	6,6			4,5 ± 1,9	9,4	3,8	4,2	3,8	5,3 ± 2,7
130	7,3	7,5	6,7			7,2 ± 0,4	5,8	7,0	5,1	7,1	6,3 ± 1,0
195	1,8	3,0	6,0			3,6 ± 2,2	2,8	10,0	2,4	4,0	4,8 ± 3,5
(+)-TCP											
2	1,2	1,2	0,6			1,0 ± 0,3	1,3	1,4	1,5		1,4 ± 0,1
10	1,4	1,1	-- ¹			1,3 ± 0,2	1,4	1,0	1,6		1,3 ± 0,3
Cortex											
(-)-TCP											
2	4,6	6,7	2,8			4,7 ± 2,0	7,7	6,8	4,3		6,3 ± 1,8
10	8,2	5,6	-- ¹			6,9 ± 1,9	4,6	5,7	6,7		5,7 ± 1,1
20	8,7	-- ¹	8,9	9,1	9,6	9,1 ± 0,4	16,2	14,8	12,4		14,5 ± 1,9
70	6,7	4,4	9,6			6,9 ± 2,6	13,2	5,6	7,0	6,7	8,1 ± 3,4
130	8,9	9,3	8,2			8,8 ± 0,6	10,1	9,6	6,3	10,1	9,0 ± 1,8
195	1,9	4,0	7,2			4,4 ± 2,7	4,5	16,7	10,8	6,2	9,6 ± 5,5
(+)-TCP											
2	1,4	1,5	0,6			1,2 ± 0,5	1,9	1,4	1,6		1,6 ± 0,3
10	2,4	1,7	-- ¹			2,0 ± 0,4	1,1	1,7	1,7		1,5 ± 0,3
Medulla oblongata											
(-)-TCP											
2	4,6	4,5	3,0			4,0 ± 0,9	5,1	5,7	4,2		5,0 ± 0,8
10	5,5	4,7	-- ¹			5,1 ± 0,6	5,0	4,6	8,2		6,0 ± 2,0
20	5,0	-- ¹	6,1	6,4	5,3	5,7 ± 0,7	13,4	12,7	9,8		12,0 ± 1,9
70	4,5	3,3	6,8			4,9 ± 1,8	10,3	5,0	6,3	5,6	6,8 ± 2,4
130	7,2	8,2	5,4			6,9 ± 1,4	7,9	10,4	5,7	8,6	8,2 ± 1,9
195	2,4	4,7	6,2			4,4 ± 1,9	4,6	12,7	4,0	5,4	6,7 ± 4,1
(+)-TCP											
2	1,5	1,2	0,7			1,1 ± 0,4	1,5	1,3	1,7		1,5 ± 0,2
10	1,8	1,6	-- ¹			1,7 ± 0,1	1,4	1,5	2,1		1,7 ± 0,4

¹ Aufgrund fehlender Konzentrationswerte (s. Tab. 9.7.2. bzw. 9.7.3.) konnten keine abgeleiteten Größen berechnet werden.

Tab. 9.7.8.: Gewebe/Blut-Quotienten nach Applikation von 0,5 mg/kg KG rac-TCP auf verschiedenen Applikationswegen (n = 3-5; Fortsetzung).

Zeit [min]	i.p.-Applikation						i.n.-Applikation				
	1	2	3	4	5	MW ± SD	1	2	3	4	MW ± SD
Mesencephalon											
(-)-TCP											
2	5,3	5,4	3,5			4,7 ± 1,1	6,8	6,0	4,3		5,7 ± 1,3
10	6,6	5,8	-- ¹			6,2 ± 0,6	5,8	4,8	7,7		6,1 ± 1,5
20	6,8	-- ¹	6,8	5,9	5,9	6,4 ± 0,5	13,3	14,6	9,4		12,4 ± 2,7
70	1,2	3,2	7,1			3,8 ± 3,0	10,1	4,8	0,8	3,4	4,8 ± 3,9
130	6,6	7,0	5,4			6,3 ± 0,8	7,2	7,5	5,6	7,6	7,0 ± 0,9
195	12,8	3,6	6,8			7,7 ± 4,5	3,7	10,3	2,6	4,8	5,4 ± 3,4
(+)-TCP											
2	1,7	1,4	0,8			1,3 ± 0,5	1,9	1,3	1,6		1,6 ± 0,3
10	2,1	1,9	-- ¹			2,0 ± 0,1	1,9	1,3	1,6		1,6 ± 0,3
Thalamus											
(-)-TCP											
2	3,9	5,0	2,2			3,7 ± 1,4	5,6	6,7	3,2		5,2 ± 1,8
10	5,0	3,1	-- ¹			4,1 ± 1,3	5,9	4,0	7,6		5,8 ± 1,8
20	6,5	-- ¹	7,4	6,9	7,6	7,1 ± 0,5	14,3	10,9	11,7		12,3 ± 1,8
70	5,6	4,0	9,4			6,3 ± 2,8	13,0	4,9	4,8	4,8	6,9 ± 4,1
130	8,1	9,3	7,7			8,4 ± 0,8	11,8	10,8	5,3	-- ¹	9,3 ± 3,5
195	3,0	4,3	7,7			5,0 ± 2,4	2,8	10,0	4,5	6,6	6,0 ± 3,1
(+)-TCP											
2	1,2	1,2	0,5			1,0 ± 0,4	1,5	1,4	1,1		1,3 ± 0,2
10	1,4	1,3	-- ¹			1,3 ± 0,1	1,4	1,2	1,8		1,5 ± 0,3

9.7.5. Tranilcypromin-Konzentrationen aus Permeationsuntersuchungen

Tab. 9.7.9.: TCP-Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] aus den Permeationsuntersuchungen an Caco-2-Monolayer (n = 3).

	Donorseite		Entnahmezeit auf der Akzeptorseite [min]					
	Initial	Final	20	40	60	80	100	120
(-)-TCP								
Zelle 1	18,70	13,55	0,68	1,13	1,70	2,08	2,40	2,55
Zelle 2	20,05	14,70	0,65	1,20	1,73	2,28	2,58	2,63
Zelle 3	15,43	13,18	0,83	1,40	1,93	2,30	2,70	2,90
MW ± SD	18,06 ± 2,38	13,81 ± 0,79	0,72 ± 0,10	1,24 ± 0,14	1,79 ± 0,13	2,22 ± 0,12	2,56 ± 0,15	2,69 ± 0,18
(+)-TCP								
Zelle 1	18,90	13,70	0,70	1,15	1,75	2,13	2,45	2,60
Zelle 2	20,15	14,73	0,65	1,25	1,75	2,38	2,63	2,70
Zelle 3	15,53	13,30	0,85	1,45	1,95	2,33	2,73	2,93
MW ± SD	18,19 ± 2,39	13,91 ± 0,74	0,73 ± 0,10	1,28 ± 0,15	1,82 ± 0,12	2,28 ± 0,13	2,60 ± 0,14	2,74 ± 0,17

¹ Aufgrund fehlender Konzentrationswerte (s. Tab. 9.7.2. bzw. 9.7.3.) konnten keine abgeleiteten Größen berechnet werden.

Tab. 9.7.10.: Aus Tab. 9.7.9.A berechnete effektive Permeabilitäten, $P_{\text{eff}} [\times 10^{-5} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}]$.¹

	(-)-TCP	(+)-TCP
Zelle 1	11,7	11,8
Zelle 2	11,6	11,8
Zelle 3	15,9	15,9
MW \pm SD	13,1 \pm 2,5	13,2 \pm 2,4

9.8. Einzelwerte aus den kinetischen Studien zum Baclofen

9.8.1. Individuelle Baclofen-Blutkonzentrations-Zeit-Verläufe

Tab. 9.8.1.: Individuelle Baclofen-Blutkonzentrations-Zeit-Verläufe [ng/ml] nach i.v.-Applikation von 1,0 mg/kg KG rac-BAC bei der Ratte (n = 3).

Zeit [min]	rac-Bac-Konzentration im Blut; Einzelwerte [ng/ml]			rac-Bac-Konzentration im Blut; Mittelwert \pm SD [ng/ml]
	Ratte-A	Ratte-B	Ratte-C	
3	1548	1406	1855	1603 \pm 229
10	964	927	1167	1019 \pm 129
25	637	677	645	653 \pm 21
40	486	500	318	435 \pm 101
60	316	308	304	309 \pm 6
90	292	231	245	256 \pm 32
120	233	184	188	202 \pm 27
150	205	144	157	169 \pm 32
205	171	152	-- ²	162 \pm 13

Tab. 9.8.2.: Berechnete pharmakokinetische Parameter zur i.v.-Applikation von 1,0 mg/kg rac-Baclofen (n = 3).³

Parameter	A	B	C	MW \pm SD
Tiergewicht [g]	308	313	356	326 \pm 26
C_{max} [ng/ml]	1690	1440	1925	1685 \pm 243
k [min^{-1}]	0,00461	0,00481	0,00657	5,33 $\times 10^{-3} \pm 1,09 \times 10^{-3}$
$t_{1/2}$ [min]	150	144	106	133 \pm 24
AUC [$\mu\text{g} \times \text{min} \times \text{ml}^{-1}$]	111,7	102,7	85,3	99,80 \pm 13,46
AUMC [$\mu\text{g} \times \text{min}^2 \times \text{ml}^{-1}$]	20300	17700	10200	16067 \pm 5240
MRT [min]	182	172	120	158 \pm 33
CL [$\text{ml} \times \text{min}^{-1}$]	9,0	9,7	11,7	10,13 \pm 1,42
V_i [$\text{l} \times \text{kg} \text{KG}^{-1}$]	0,59	0,69	0,52	0,60 \pm 0,09
V_{ss} [l]	1,6	1,7	1,4	1,57 \pm 0,15

¹ Nach Artursson et al. [1996].² Versuchstier während der Untersuchung verstorben.³ Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Computersoftware TOPFIT (Version 2.0) [Heinzel et al., 1994] und einem Personal Computer.

9.8.2. Untersuchung der Gewebeverteilung nach Applikation von Baclofen - Konzentrationen in Blut, CSF und Hirngewebe

Tab. 9.8.3.: Baclofenkonzentrationen [ng/ml] in verschiedenen Matrices der Ratte nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 1,0 mg/kg KG rac-Baclofen. Daten der Ratten 1-3 bzw. 4 des entsprechenden Zeitpunktes (Mittelwerte \pm Standardabweichung).

Entnahmezeit [min]	Blut [ng/ml]					Liquor [ng/ml]					Hirngewebe [ng/g]				
	1	2	3	4	MW \pm SD	1	2	3	4	MW \pm SD	1	2	3	4	MW \pm SD
i.p.-Applikation															
5	195	235	1262		564 \pm 605	< 3	< 3	< 3		< 3	< 15	65	57		41 \pm 35
20	1127	1196	1431		1251 \pm 159	3,3	50,5	-- ¹		27,5 \pm 33,8	66	57	87		70 \pm 15
70	673	660	533		622 \pm 77	8,7	-- ¹	12,8		10,8 \pm 2,9	58	44	< 15		34 \pm 30
i.n.-Applikation															
5	106	117	77		100 \pm 21	< 3	< 3	< 3		< 3	74	< 15	< 15		25 \pm 43
20	431	705	489		542 \pm 144	< 3	17,4	65,2		27,5 \pm 33,8	87	175	90		117 \pm 50
70	393	332	281	627	408 \pm 153	23,9	-- ¹	74,7	-- ¹	49,3 \pm 35,9	75	< 15	52	59	37 \pm 32

Tab. 9.8.4.: Aus den mittleren Konzentrationen abgeschätzte pharmakokinetische Parameter für rac-Baclofen in den untersuchten Matrices.²

Matrix	i.p.-Applikation		i.n.-Applikation	
	Terminale Halbwertszeit [min]	Terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min ⁻¹]	Terminale Halbwertszeit [min]	Terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min ⁻¹]
Blut	50	0,014	120	0,001
CSF	37	0,019	-- ³	-- ³
Gesamthirn	48	0,014	30	0,023

¹ Liquor-Entnahme nicht gelungen.

² Abgeschätzt aus den Mittelwerten der letzten beiden Datenpunkte.

³ Über den Versuchszeitraum der letzten beiden Datenpunkte stieg die mittlere Konzentration an. Eine Abschätzung der Halbwertszeit bzw. der terminalen Eliminationsgeschwindigkeitskonstante war deshalb nicht möglich.

9.8.3. Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten nach Baclofen-Applikation

Tab. 9.8.4.: Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten nach i.p.- bzw. i.n.-Applikation von 1,0 mg/kg KG Baclofen (n = 3-4).

Zeit [min]	Hirngewebe/Blut					CSF/Blut				
	1	2	3	4	MW ± SD	1	2	3	4	MW ± SD
i.p.-Applikation										
5	< 0,01	0,28	0,05		0,11 ± 0,15	< 0,01	< 0,01	< 0,01		
20	0,06	0,05	0,06		0,06 ± 0,01	< 0,01	0,04	-- ¹		
70	0,09	0,07	< 0,01		0,05 ± 0,05	0,01	-- ¹	0,02		0,02 ± 0,01
i.n.-Applikation										
5	0,70	< 0,01	< 0,01		0,23 ± 0,40	< 0,01	< 0,01	< 0,01		
20	0,20	0,25	0,18		0,21 ± 0,04	< 0,01	0,02	0,13		0,05 ± 0,07
70	0,19	< 0,01	0,19	0,09	0,12 ± 0,09	0,06	-- ¹	0,27	-- ¹	0,17 ± 0,15

9.8.4. Baclofen-Konzentrationen aus den Everted-sac-Untersuchungen

Tab. 9.8.5.: Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen zum Baclofen am Everted-sac-Modell bei initial gleichen Konzentrationen auf beiden Darmseiten [Gleichgewichtsbedingungen, n(Jejunum) = 8, n(Ileum) = 4].

	Segment	Konzentration [ng×ml ⁻¹]	
		mucosal	serosal
Jejunum			
Ratte 1	1	2725	2745
	2	2675	2640
	3	2530	2435
	4	2895	2495
Ratte 2	1	2880	2515
	2	3375	2515
	3	2825	2550
	4	3095	2640
	MW ± SD	2875 ± 265	2565 ± 100
Ileum			
	Segment	mucosal	serosal
Ratte 1	1	3110	2035
	2	2965	2735
Ratte 2	1	2870	2710
	2	3030	2400
	MW ± SD	2995 ± 100	2470 ± 330

¹ Aufgrund fehlender Konzentrationswerte (s. Tab. 9.8.3.) konnten keine abgeleiteten Größen berechnet werden.

Tab. 9.8.6.A: Abhängigkeit der Konzentration [ng/ml] von der Inkubationszeit bei Everted-sac-Permeationsuntersuchungen [n(Jejunum) = 4, n(Ileum) = 2].

Darmabschnitt	Segment	Permeationszeit [min]			
		5	10	20	30
serosale Darmseite					
Jejunum	1	113	102	209	307
	2	72	142	196	303
	3	46	184	196	347
	4	65	111	255	fehlt
	MW ± SD	74 ± 28	135 ± 37	214 ± 28	319 ± 24
Ileum	1	150	121	277	383
	2	90	189	213	422
	MW ± SD	120 ± 42	155 ± 48	245 ± 45	403 ± 28
mucosale Darmseite					
Jejunum	1	2447	2740	2856	2880
	2	3085	3295	2581	2746
	3	2950	3380	2750	2959
	4	3188	2942	2801	3625
	MW ± SD	2918 ± 328	3089 ± 300	2747 ± 119	3053 ± 392
Ileum	1	3412	3334	2873	3007
	2	3202	2856	3079	3198
	MW ± SD	3307 ± 148	3095 ± 338	2976 ± 146	3103 ± 135

Tab. 9.8.6.B: Aus den Daten der Tabelle 9.8.6.A abgeschätzte Werte für Transportrate¹ und Absorptionsclearance [Mizuma et al., 1993].

	Transportrate [ng×min ⁻¹ ×cm ⁻¹]	Absorptionsclearance [μl×min ⁻¹ ×cm ⁻¹]
Jejunum	1,79	0,586
Ileum	1,52	0,490

9.8.5. Ergebnisse der In-vivo-Untersuchungen mit Baclofenestern

Tab. 9.8.7.: Konzentrationen des in vivo rückgespaltenen rac-Baclofen in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart (n = 3).

Baclofenester-Derivat	Tier	i.p.-Applikation			i.n.-Applikation		
		Zeit [min]					
		5	20	60	5	20	60
Methylester	1	45	80	60	< 30	71	54
	2	< 30	100	75	34	102	49
	3	70	88	93	52	63	76
	MW ± SD	38 ± 36	89 ± 10	76 ± 17	29 ± 26	79 ± 21	60 ± 14
Ethylester	1	126	124	166	33	60	91
	2	129	260	172	53	70	181
	3	132	365	225	33	79	143
	MW ± SD	129 ± 3	250 ± 70	188 ± 33	40 ± 12	70 ± 10	138 ± 45

¹ Absolute pro cm Darmpräparat transportierte Menge an Baclofen [ng].

Tab. 9.8.7.: Konzentrationen des in vivo rückgespaltenen rac-Baclofen in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart (n = 3, Fortsetzung).

Baclofenester-Derivat	Tier	i.p.-Applikation			i.n.-Applikation		
		Zeit [min]					
		5	20	60	5	20	60
1-Propylester	1	59	40	63	48	42	69
	2	< 30	69	87	31	43	51
	3	31	81	92	< 30	65	77
	MW ± SD	30 ± 30	63 ± 21	81 ± 16	26 ± 24	50 ± 13	66 ± 13
2-Propylester	1	72	33	40	< 30	44	68
	2	34	36	51	33	35	37
	3	30	45	58	< 30	43	32
	MW ± SD	45 ± 23	38 ± 6	60 ± 10	11 ± 19	41 ± 5	46 ± 20
n-Butylester	1	80	96	68	41	62	59
	2	50	92	114	< 30	79	85
	3	31	119	130	46	81	62
	MW ± SD	54 ± 25	102 ± 15	104 ± 32	29 ± 25	74 ± 10	69 ± 14

9.9. Einzelwerte aus den kinetischen Studien zum Indometacin

9.9.1. Konzentrationen in Blut, CSF und Hirngewebe

Tab. 9.9.1.: Indometacin-Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] im Blut und CSF nach i.p.-Applikation von 3,0 mg/kg KG rac-TCP (n = 3).

Zeit [min]	Blut [$\mu\text{g/ml}$]				CSF [$\mu\text{g/ml}$]			
	1	2	3	MW ± SD	1	2	3	MW ± SD
i.p.-Applikation								
2	11,2	12,5	3,4	9,9 ± 4,9	< 0,15	0,55	0,59	0,38 ± 0,33
10	18,6	5,8	12,9	12,4 ± 6,4	2,32	0,75	0,88	1,32 ± 0,87
20	14,4	7,5	3,8	8,6 ± 5,4	-- ¹	-- ¹	1,41	1,41
60	4,4	7,7	12,9	8,3 ± 4,3	0,71	0,64	0,80	0,72 ± 0,08
i.n.-Applikation								
2	8,2	10,7	12,6	10,5 ± 2,2	0,58	0,40	0,28	0,42 ± 0,15
10	10,9	23,6	15,5	16,7 ± 6,4	0,56	0,41	0,34	0,44 ± 0,11
20	10,3	8,1	12,9	10,4 ± 2,4	0,40	0,50	0,79	0,56 ± 0,20
60	8,4	8,5	-- ²	8,5 ± 0,1	0,57	0,37	-- ²	0,47 ± 0,14

¹ Chromatogramm nicht auswertbar.

² Versuchstier während der Untersuchung verstorben.

Tab. 9.9.2.: Indometacin-Konzentrationen [$\mu\text{g/g}$] in verschiedenen anatomischen Untereinheiten des Ratten-ZNS nach Gabe von 3,0 mg/kg KG Indometacin in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart bei den Ratten 1-3 des entsprechenden Zeitpunkts.¹

Zeit [min]	i.p.-Applikation				i.n.-Applikation			
	1	2	3	MW \pm SD	1	2	3	MW \pm SD
Cerebellum								
2	1,87	1,10	1,09	1,35 \pm 0,45	1,14	3,17	1,17	2,56 \pm 1,21
10	1,74	2,00	2,02	1,92 \pm 0,16	1,88	1,26	1,93	1,69 \pm 0,37
20	2,59	2,87	1,39	2,28 \pm 0,79	2,19	1,19	2,05	1,81 \pm 0,54
60	2,59	0,80	1,25	1,53 \pm 0,90	1,14	3,57	-- ²	2,36 \pm 1,72
Cortex								
2	0,68	0,71	0,66	0,68 \pm 0,03	2,98	2,17	0,88	2,01 \pm 1,06
10	1,07	1,39	1,31	1,26 \pm 0,17	1,88	2,27	1,74	1,96 \pm 0,27
20	2,38	1,32	1,24	1,65 \pm 0,64	1,96	1,46	4,64	2,64 \pm 1,71
60	1,50	0,49	0,88	0,96 \pm 0,51	1,22	1,85	-- ²	1,54 \pm 0,45
Medulla oblongata								
2	1,28	1,65	1,32	1,42 \pm 0,20	2,06	2,93	1,33	2,11 \pm 0,80
10	1,67	1,75	1,21	1,54 \pm 0,29	2,23	3,22	1,84	2,43 \pm 0,71
20	< 0,07	3,79	1,49	1,76 \pm 1,91	2,37	< 0,07	2,06	1,48 \pm 1,29
60	1,17	1,02	1,35	1,18 \pm 0,17	1,83	1,45	-- ²	1,64 \pm 0,27
Mesencephalon								
2	0,85	1,34	1,69	1,29 \pm 0,42	1,75	3,46	0,67	1,96 \pm 1,41
10	1,71	1,57	1,74	1,67 \pm 0,09	1,89	2,08	2,65	2,21 \pm 0,40
20	1,52	2,96	2,28	2,25 \pm 0,72	2,36	1,81	2,79	2,32 \pm 0,49
60	1,15	1,40	0,83	1,13 \pm 0,29	2,62	1,86	-- ²	2,24 \pm 0,54
Thalamus								
2	< 0,07	< 0,07	< 0,07	< 0,07	2,44	1,59	2,37	2,13 \pm 0,47
10	1,69	< 0,07	< 0,07	0,56 \pm 0,98	1,37	2,03	< 0,07	1,13 \pm 1,04
20	< 0,07	< 0,07	< 0,07	< 0,07	1,46	1,31	1,55	1,44 \pm 0,12
60	1,23	< 0,07	1,30	0,84 \pm 0,73	1,52	1,20	-- ²	1,36 \pm 0,23

Tab. 9.9.3.: Aus den mittleren Konzentrationen (Tab. 9.9.1.-9.9.2.) abgeschätzte pharmakokinetische Parameter für Indometacin in verschiedenen Gehirnarealen aus der Untersuchung zur Gewebeverteilung.³

Organsegment	i.p.-Applikation		i.n.-Applikation	
	Terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min^{-1}]	Terminale Halbwertszeit [min]	terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante [min^{-1}]
Blut	780	0,001	137	0,005
CSF	41	0,017	158	0,004
Cerebellum	70	0,010	-- ⁴	-- ⁴
Cortex	51	0,014	51	0,014
Medulla oblongata	70	0,010	-- ⁴	-- ⁴
Mesencephalon	40	0,017	790	0,001
Thalamus	-- ⁴	-- ⁴	485	0,001

¹ Die Konzentrationsangaben beziehen sich immer auf den freien Wirkstoff (Base), bezogen auf die Gewichtseinheit an Gewebe, nicht Gewebehomogenat.

² Versuchstier während der Untersuchung verstorben.

³ Abgeschätzt aus den Mittelwerten der letzten beiden Datenpunkten.

⁴ Über den betrachteten Versuchszeitraum stieg die Konzentration an. Eine Abschätzung der terminalen Halbwertszeit bzw. terminalen Eliminationsgeschwindigkeitskonstante war deshalb nicht möglich

9.9.2. Hirngewebe/Blut- bzw. CSF/Blut-Quotienten nach Indometacin-Applikation

Tab. 9.9.3.: CSF/Blut- bzw. Hirngewebe/Blut-Quotienten nach Gabe von 3,0 mg/kg KG Indometacin in Abhängigkeit von Zeit und Applikationsart bei den Ratten 1-3 des entsprechenden Zeitpunkts.

Zeit [min]	i.p.-Applikation				i.n.-Applikation			
	1	2	3	MW ± SD	1	2	3	MW ± SD
CSF/Blut-Quotienten								
2	< 0,02	0,04	0,17	0,07 ± 0,09	0,07	0,04	0,02	0,04 ± 0,03
10	0,12	0,13	0,07	0,11 ± 0,03	0,05	0,02	0,02	0,03 ± 0,02
20	-- ¹	-- ¹	0,37	0,37	0,04	0,06	0,06	0,05 ± 0,01
60	0,16	0,08	0,06	0,10 ± 0,05	0,07	0,04	-- ¹	0,06 ± 0,02
Cerebellum/Blut-Quotienten								
2	0,17	0,09	0,32	0,19 ± 0,12	0,41	0,30	0,09	0,27 ± 0,16
10	0,09	0,34	0,16	0,20 ± 0,13	0,17	0,05	0,12	0,11 ± 0,06
20	0,18	0,38	0,37	0,31 ± 0,11	0,22	0,15	0,167	0,18 ± 0,04
60	0,58	0,10	0,10	0,26 ± 0,28	0,14	0,42	-- ¹	0,28 ± 0,14
Cortex/Blut-Quotienten								
2	0,06	0,06	0,19	0,10 ± 0,08	0,36	0,20	0,06	0,21 ± 0,15
10	0,06	0,24	0,10	0,13 ± 0,09	0,17	0,10	0,11	0,13 ± 0,04
20	0,17	0,18	0,33	0,23 ± 0,09	0,19	0,18	0,36	0,24 ± 0,10
60	0,34	0,06	0,07	0,16 ± 0,16	0,15	0,34	-- ¹	0,25 ± 0,13
Medulla oblongata/Blut-Quotienten								
2	0,11	0,13	0,39	0,21 ± 0,16	0,25	0,27	0,11	0,21 ± 0,09
10	0,09	0,30	0,09	0,16 ± 0,21	0,20	0,14	0,21	0,15 ± 0,04
20	< 0,01	0,51	0,39	0,30 ± 0,27	0,23	< 0,01	0,16	0,13 ± 0,12
60	0,27	0,13	0,10	0,17 ± 0,09	0,22	0,17	-- ¹	0,20 ± 0,04
Mesencephalon/Blut-Quotienten								
2	0,08	0,11	0,50	0,23 ± 0,23	0,21	0,32	0,05	0,19 ± 0,14
10	0,09	0,27	0,13	0,16 ± 0,09	0,17	0,09	0,17	0,14 ± 0,05
20	0,11	0,39	0,60	0,37 ± 0,25	0,23	0,22	0,22	0,22 ± 0,01
60	0,26	0,28	0,06	0,20 ± 0,12	0,31	0,22	-- ¹	0,27 ± 0,06
Thalamus/Blut-Quotienten								
2	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,30	0,15	0,19	0,21 ± 0,08
10	0,09	< 0,01	< 0,01	0,03 ± 0,05	0,13	0,09	< 0,01	0,07 ± 0,07
20	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,14	0,16	0,12	0,14 ± 0,02
60	0,28	< 0,01	0,19	0,16 ± 0,14	0,18	0,14	-- ¹	0,16 ± 0,03

¹ Aufgrund fehlender Konzentrationswerte (s. Tab. 9.7.2. bzw. 9.7.3.) konnten keine abgeleiteten Größen berechnet werden.

CURRICULUM VITAE

BERND HERBER

01. Juni 1968 geboren in Flörsheim am Main als Sohn des Karl Herber (Betriebsfachwerker) und der Agnes Herber, geb. Schöppner (Hausfrau); drei Geschwister
- 9/1974 - 7/1978 Besuch der Grundschule Eddersheim
- 8/1978 - 7/1984 Besuch der Gesamtschule Hattersheim (Gymnasialzweig), Realschulabschluß
- 9/1984 - 6/1987 Ausbildung zum Chemielaboranten bei der Hoechst AG
- 8/1987 - 7/1988 Besuch der Fachoberschule der Paul-Ehrlich-Schule in Frankfurt-Höchst, Fachhochschulreife
- WS 1988/89 - SS 1989 Studium an der Fachhochschule Darmstadt im Studiengang Chemische Technologie, Erwerb des Grundstudien-Zertifikats mit der Fachgebundenen Hochschulreife für Chemie, Maschinenbau und Mineralogie
- WS 1989/90 - SS 1994 Studium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main im Studiengang Diplom-Chemie
11. April 1991 Diplom-Chemiker-Vorprüfung
01. Juli 1994 Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
- 10/1994 – 09/1997 Experimentelle Arbeit am Dissertationsprojekt „Verteilung von Pharmaka ins Gehirn – Korrelation mit der Lipophilie und Abhängigkeit vom Applikationsweg“ an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main (Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie) und der ETH Zürich (Departement Pharmazie) sowie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- SS 1995 – WS 2001/02 Studium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main im Studiengang Humanmedizin
31. März 1998 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
23. März 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Erstes Staatsexamen)
05. April 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Zweites Staatsexamen)
03. April 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Drittes Staatsexamen)
- 10/1999 – 07/2002 Arbeit an der Dissertation „Medizinische, kriminalistische und juristische Aspekte von begutachteten Kindesmißhandlungen“ am Zentrum der Rechtsmedizin Frankfurt (1994 – 1999)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertationsarbeit

Verteilung von Pharmaka ins Gehirn

- Korrelationen mit der Lipophilie und Abhängigkeit vom Applikationsweg -

am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main und an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. H. Spahn-Langguth selbständig bzw. im Rahmen der angegebenen Kooperationen durchgeführt und nur mit den in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel erarbeitet habe.

Weiterhin habe ich bisher an keiner in- oder ausländischen pharmazeutischen Fakultät bzw. im Fachbereich Pharmazie ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder diese Arbeit als Dissertationsschrift vorgelegt.

Halle/Saale, den 8. September 2002

Bernd Herber